ISSN 0073－8751

NUMBER 26

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

RESEARCH COMMUNICATIONS

2012

公益財団法人 発 酵 研 究 所

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 26



2012

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)

Published by

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

17–85, JUSO–HONMACHI 2–CHOME

YODOGAWA–KU, OSAKA 532–8686, JAPAN

公益財団法人発酵研究所

理事長	波多野和徳	
常務理事	中濱　一雄	
理　事	大嶋　泰治	木村　光
	武田　光子	冨田　房男
	中瀬　崇	古川　謙介
	別府　輝彦	本田　武司
監　事	岡田　将生	田浦　清
評議員	今田　哲	魚住　武司
	北本勝ひこ	下田　親
	竹内　昌男	谷　吉樹
	土屋　英子	松原　謙一
	吉田　敏臣	
顧　問	坂野　勲	

目　次

第６回助成研究報告会の開催 …… 1

■ 平成21年度研究助成

好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離源、分類群の多様性と系統分類学的研究……石川　森夫… 5

嫌気性グラム陰性桿菌の系統分類学的研究……坂本　光央… 23

陸上温泉に分布する光合成細菌の系統分類と種分化に関する研究……春田　伸… 39

希少海洋性アクチノバクテリアの系統保存……笠井　宏朗… 49

全世界産キツネタケ属（担子菌門・ハラタケ目・ヒドナンギウム科）の比較生物地理学的研究……保坂健太郎… 61

単細胞シャジクモ藻類ミカヅキモにおける生殖隔離、種分化機構の研究……関本　弘之… 71

アーバスキュラー菌根菌およびその菌に関連する微生物とパートナー植物を活用した土壌管理に関する研究……石井　孝昭… 87

新しいバイオマス利用法の開発に向けた放線菌群の共生的相互作用に関する研究……上田　賢志…101

マイコバクテリアの薬剤耐性におけるマイコケチドの役割……松永　勇…113

微生物間シグナル伝達機構を標的とした抗生物質に代わる新しい病原性抑制技術の開発……諸星　知広…127

■ 平成22年度大型研究助成

分断されたtRNAから解析するアーキアの系統分類と遺伝暗号の進化 ……金井　昭夫…137

担子菌類ハラタケ亜門の再分類に基づく真菌メタゲノム解析の基盤構築：Trichosporonales目を用いた菌類再分類モデルの開発 ……高島　昌子…149

放線菌ゲノムの再構成による新たな物質生産系の開発……池田　治生…159

難培養微生物種の全ゲノム配列取得による遺伝子資源化……本郷　裕一…175

■ 平成22年度一般研究助成

植物病原性菌類の新たな寄生性系統への進化メカニズムに関する研究……飯田祐一郎…187

実験室内進化させた耐熱大腸菌に対するゲノムワイド解析……應　蓓文…187

アメーバ動物類の系統分類　－粘菌類を中心として－……川上　新一…188

海洋性アナモックス細菌の系統分類とその集積培養系に共存する未培養古細菌の機能解析……金田一智規…189

古細菌から学ぶ酸素呼吸系獲得への機能進化の研究……鴻巣　麻子…190
菌類と植物の寄生関係における進化の特性……高松　進…190
アカントアメーバに共生する難培養性細菌が宿主細胞内で持続的に生存するために必須な分子基盤の解明……山口　博之…191
多様な時系列標本から分離されるヒト結核菌のゲノム情報抽出と分子進化学的検討……和田　崇之…192
植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼが大腸菌で可溶性に発現される変異機構の解明……浅野　泰久…193
新規な高速・高効率シキミ酸製造法の完成とタミフル増産への寄与……足立　収生…193
超好熱菌に存在する新規分子シャペロンの同定……金井　保…194
キノリン酸の利用ならびに合成に着目した出芽酵母の新規 NAD 合成経路……河井　重幸…195
極地由来好冷性微生物を宿主とした新しいタンパク質低温生産システムの開発……栗原　達夫…196
微生物変換による新規な不飽和脂肪族アルコールの製造法の開発……永尾　寿浩…196
放線菌の分泌シグナル非依存型タンパク質分泌機構の解明……畑中　唯史…197
キラル合成原料としての 4-ヒドロキシイソロイシン立体異性体個別生産へ向けた(2S,3R,4S)-HIL 変換酵素類の微生物スクリーニング……日比　慎…198
微生物とヨウ素の相互作用に関する総合的研究……天知　誠吾…198
酵母を利用した糖尿病の分子病態モデルの構築……井上　善晴…199
カイコ幼虫を用いた新規自然免疫活性化多糖生産菌の探索……浦井　誠…200
微生物に見出されたメナキノン新規生合成経路の全容解明と抗ピロリ菌薬開発への応用……大利　徹…201
植物病原菌の病原性発現に必要なオルガネラ機能の分子解析と創薬開発に向けての応用展開……高野　義孝…201
原油汚染環境の浄化に有効な嫌気的炭化水素分解遺伝子検出ツールの開発……福井　学…202
腸内共生細菌群の制御による疾患の改善・予防に関する研究……福田　真嗣…203
微生物代謝を活用した新環境地盤改良技術（バイオグラウト）の開発……安原　英明…204

第6回助成研究報告会の開催

平成24年6月7日千里ライフサイエンスセンター5階ホールにおいて第6回助成研究報告会を開催した．今回は平成21～23年度に助成を受けた10名の3年間にわたる研究成果，また平成22～23年度に助成を受けた4名の大型研究の2年間に得られた研究成果の口頭発表，ならびに平成22～23年度一般研究助成24名の研究のポスター展示による発表がおこなわれた．参加者は約170名であった．

開会に先立ち波多野理事長から次のような趣旨の挨拶があった．「多忙な中を大勢の方に参加いただき感謝いたします．第6回報告会をこのように盛大に開催できるのも皆様方の当財団の事業に対するご理解と支援の賜と嬉しく思っています．昨年は東日本大震災とそれに続く福島第一原子力発電所の爆発事故により生活環境は様々な汚染物質に毒されました．微生物はこれらの環境汚染を改善するのに少なからぬ力を発揮するのではないかと考えています．当財団は，この様に微生物の力を利用して健全で豊かな社会を作り出すための応用研究は勿論のこと，新たな微生物遺伝資源を見出し，その機能などを解明する基礎研究を行う人々を下支えする機関として活動していく所存であります．今回の報告会は平成21年度と平成22年度の研究助成が重なって，報告数が多くなり，発表時間が十分に取れず，そのため平成22年度の一般研究助成の発表はポスター展示でしかも懇親会の中で行わざるを得なくなりました．まことに申し訳ないがご理解をいただきたい．本報告会ならびに懇親会には様々な分野の研究者の参加をいただいており，相互に交流を一層深められ，皆様方の研究の進展の一助にしていただく良い機会と思っています．」

報告会では平成21年度の助成研究のうち6演題が中瀬崇 理化学研究所名誉研究員の座長の下に，次いで4演題が木村光 京都大学名誉教授の座長の下に発表された．引き続いて平成22年度大型研究助成の4題のうち2演題が西村和子 千葉大学名誉教授，また2演題が桑原正章 京都大学名誉教授の座長の下に報告された．各演者の報告内容は本助成研究報告集に収録されている．いずれの発表にも活発な質疑・応答がなされ，価値あるコメントが加えられた．今回の報告会は特にタイトなスケジュールで多くの質問を打ち切らざるをえず，大変申し訳なく思っています．平成22年度の一般研究助成の24題はポスターとして懇親会と同じ部屋で並行して展示発表された．ポスターの前で盛んに議論を交わす姿がみられ，まずまず目的を達したかと思われるが，次からはポスター展示のための独立した時間を設けねばならない．ポスター発表の研究成果についてはアブストラクトを本報告集に収載している．

懇親会には報告会への参加者のほとんどが出席した．中瀬崇先生の挨拶に続き，冨田房男 北海道大学名誉教授の発声によって乾杯が行われ，立食式のパーティーが始まった．分野の異なる研究者の間で和やかな会話が交わされるとともに，報告会で十分にできなかった討議などもなされて，交流の場として役立ったのではないかと，喜ばしく思っている．参加された皆様のご協力に心から感謝いたします．

第7回の研究助成報告会は来年平成25年6月7日(金)に同じ会場で開催する予定である．

以下に報告会と懇親会の模様の1部を写真で紹介します．

(文) 坂野　勲



開会挨拶
波多野和徳 理事長



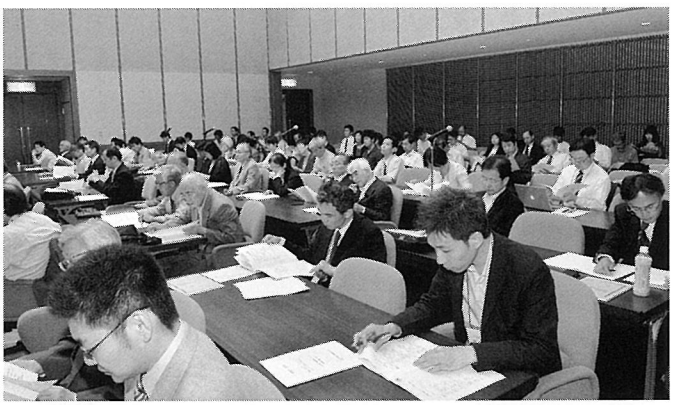
座長　中瀬　崇 理事



座長　木村　光 理事



座長　西村　和子 先生

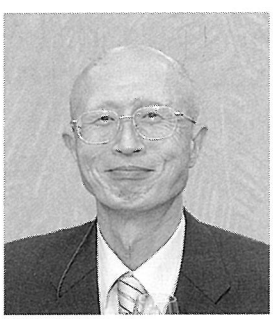




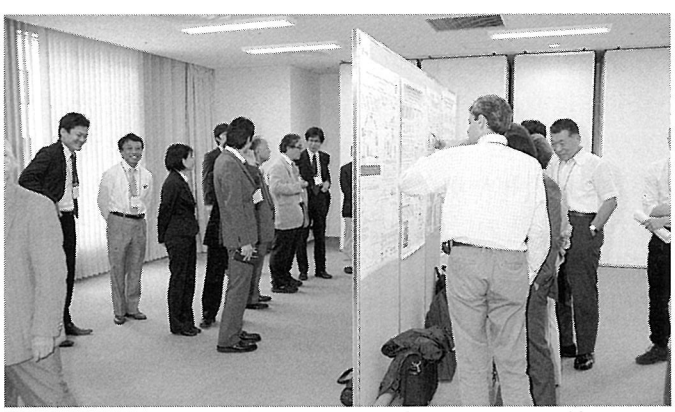
報　告　会



座長　桑原　正章 先生



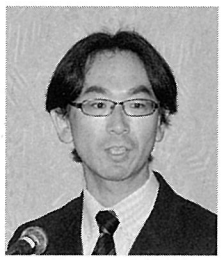
司会
中濱　一雄 常務理事

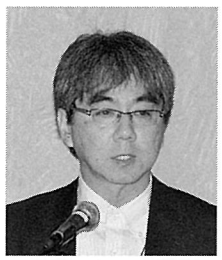


ポスター展示


石川　森夫 氏


坂本　光央 氏


春田　伸 氏


笠井　宏朗 氏


保坂健太郎 氏


関本　弘之 氏


石井　孝昭 氏


上田　賢志 氏


松永　勇 氏


諸星　知広 氏


金井　昭夫 氏


高島　昌子 氏


池田　治生 氏


本郷　裕一 氏


挨拶　中瀬　崇 理事


乾杯　冨田　房男 理事




懇　親　会

平成21年度研究助成の研究報告

助成期間：平成21年４月～平成24年３月

IFO Res.Commun. 26
5-21, 2012

好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離源，分類群の多様性と系統分類学的研究

石　川　森　夫

東京農業大学　応用生物科学部
〒156-8502　東京都世田谷区桜丘 1-1-1

Bio-diversity, phylogenetic and taxonomic studies on halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria

Morio Ishikawa

Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

Currently known niches for lactic acid bacteria (LAB) communities are human and animal intestines, dairy products and vegetal fermented foods. While, we previously conducted isolation of LAB from marine organisms and found two new genera of halophilic and alkaliphilic LAB (HALAB), *Marinilactibacillus* and *Halolactibacillus*. These organisms are slightly halophilic and alkaliphilic, preferentially growing under the physico-chemical conditions found in seawater [total salt concentration, 3.2-3.8% (w/v); pH, 8.2-8.3 (surface)]. For these marine-inhabiting organisms, we proposed the term 'marine LAB'. On the other hand, isolation and taxonomic studies of HALAB except from marine environment are few to date. On the supposition that the niches for LAB are more widespread than studied so far, we sought to confirm the presence of HALAB in cheeses and salted and fermented foods thus contribute to the understanding of bio-diversity of HALAB. We used 7% NaCl glucose-yeast extract-peptone-fish extract broth and agar media (pH 9.0 or 9.5) for pour-plating culture for various European cheeses and salted and fermented oysters. HALAB were present in 20 of the 28 samples at 10^{1}-10^{10} CFU/g. In several mold-ripened and bacterial - ripened soft cheeses, HALAB counts ranged from 10^{6}-10^{7} CFU/g. The 16S rRNA gene sequences of the isolates examined were identical or similar to that of *Marinilactibacillus psychrotolerans* or *Alkalibacterium kapii* and related species, all of which are HALAB. The isolates belonging to the genus *Alkalibacterium* constituted two new species on the basis of their taxonomic features. HALAB were present in various cheeses and salted and fermented seafood, and were highly predominant in some mould- and bacterial - ripened cheeses. We isolated and characterized LAB in cheeses using saline and alkaline media. This practice to revealed the broad presence of HALAB in various European cheeses and salted and fermented seafood and to provide a basis from which to view their possible roles in the ripening process of these fermented foods.

Key words: lactic acid bacteria, halophile, aklalophile, cheese, *Marinilactibacillus*

緒　言

乳酸菌は糖を発酵し，著量の乳酸を生成する細菌の総称であり，発酵乳，チーズ，ヨーグルトなどの発酵乳，味噌，醤油などの発酵調味料など，発酵食品の製造に不可欠である．また，人間および哺乳動物の腸管内においても健康の維持・促進の上で重要な役割を演じているため，乳酸菌がもつ食品製造，および健康的意義に強い関心が寄せられており，その有用性から多くの研究がなされている．上述の理由より，乳酸菌の分離，分類に関しても人間の生活に関わる環境を対象とした研究が主体となって展開してきた．一方，我々は乳酸菌の生息環境はこれまでの理解より幅広いものである，との想定の下，海洋生物試料より乳酸菌の分離を行い，新規乳酸菌，*Marinilactibacillus* 属，

E-mail: m1ishika@nodai.ac.jp
共同研究者：小泉幸道（東京農業大学応用生物科学部），貝沼（岡本）章子（東京農業大学応用生物科学部），児玉佳代（東京農業大学大学院農学研究科），松山未央子（東京農業大学大学院農学研究科）

Halolactibacillus 属，*Alkalibacterium* 属の5新種を提案し，これらについて「海洋乳酸菌」という呼称を提唱している（Ishikawa *et al.*, 2003, 2005, 2009, 2011）．これらの乳酸菌は好塩性，好アルカリ性で，乳酸発酵を行い酸生成する細菌であるにもかかわらず，初発pH 7以下での生育が非常に弱いことが特徴である．このような性状をもつ乳酸菌はこれまでに殆ど報告されていなかったが，現在までに海洋環境の他にアルカリ性の食用オリーブ洗浄水やインディゴ発酵液，アフリカのソーダ湖などの強アルカリ環境下に *Alkalibacterium* 属が存在していることが報告され，徐々に好塩性・好アルカリ性乳酸菌の生育環境の広がりが明らかにされてきている（Ntougias & Russell, 2001; Yumoto *et al.*, 2004, 2008; Nakajima *et al.*, 2005）．

現在，我々が乳酸菌として扱っている殆どの属を包含する *Lactobacillaceae* 科は33属で構成されている（De Vos *et al.*, 2009）．一般に，乳酸菌は食塩非含有，中性～微酸性域を好んで生育するとされており，実際，本科に包含される乳酸菌の属，種に関してもほとんどがこれに当てはまる．pHに対する挙動に関しては上述の通り好アルカリ性の性状をもつ乳酸菌種は殆どなく，*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* 各属の一部の種が耐アルカリ性をもつことが知られている．また，乳酸菌の食塩に対する挙動に関してはほとんどの属，種が食塩を含有しない環境を至適条件として生育し，醤油乳酸菌として知られる *Tetragenococcus* 属が好塩性乳酸菌として特徴的で，*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* 属の一部の種が耐塩性をもつことが知られている．このように，乳酸菌は巨大な分類群を構成するにも関わらず，好塩性・好アルカリ性の乳酸菌の分離報告例は限られている．これは，既知の乳酸菌種の多くが食塩非含有，中性～微酸性の条件で分離されていることが一つの理由と考えられる．一方，海洋環境より好塩性，好アルカリ性の生理学的特徴をもつ乳酸菌が分離されたのは海水（海水の塩類濃度，3.2－3.8%；pH 8.2－8.3）の影響を受けた分離源の特徴を考慮し，一般乳酸菌やグラム陰性の海洋細菌を排除し得る，食塩濃度7%，pH 9.5もしくは10という分離条件を設定したことが挙げられる．このことは，好塩性・好アルカリ性乳酸菌は一般的な乳酸菌とは異なる条件を用いることで分離されたことを示しており，一般的な乳酸菌が分離されてきた環境からも食塩含有，アルカリ性の分離条件を与えることにより，このような性状の乳酸菌が分離できる可能性を示していると考えられる．例えば，製造や熟成過程で乳酸菌が関与するチーズに着目すると，チーズの多くは塩分を含み，熟成後のpHはアンモニア生成菌や酵母による乳酸の資化などにより部分的に中性～弱アルカリ性になる．また，チーズの原産国や種類，製法は多岐にわたり，熟成チーズからは *Lactococcus* 属，*Streptococcus* 属，*Leuconostoc* 属，*Lactobacillus* 属などのスターター菌種に加え，*Pediococcus* 属や *Enterococcus* 属など乳酸菌種が分離され（Cogan *et al.*, 2002; Farkye *et al.*, 2002），多様な乳酸菌相を構成していることが知られているが，その種類や製法の多様さ故に，この他にも未知の乳酸菌種がチーズに存在している可能性が考えられる．以上のことを踏まえ，先に我々は海洋環境から分離された乳酸菌の分離条件や生育条件を踏まえ，食塩含有，アルカリ性の分離条件を用い，これまでチーズからの分離例がほとんどない好塩性・好アルカリ性乳酸菌の存在を明らかにしている（Ishikawa *et al.*, 2007）．そこで，本研究ではこれまでにチーズから分離された好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離株の生理学的性状についての検討，ならびに更なるチーズからの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離を行うことにより，熟成チーズの乳酸菌相の多様性およびその役割について考察を試みることとした．併せて，好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離源の多様性を解明するため，味噌や魚介類の塩蔵発酵食品や天日塩からも好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離を試みた．

実験方法

分離試料および分離方法　ヨーロッパ産チーズ計28点（白カビ熟成チーズ9点，青カビ熟成チーズ6点，ウォッシュチーズ6点，セミハードチーズ4点，フレッシュチーズ3点），国産生みそ9点，牡蠣の塩辛2点，海水天日塩38点を分離試料として用いた．分離試料の食塩濃度，pHについてはIshikawa *et al.* (2007) に従って測定した．各種チーズ，生みそ，牡蠣の塩辛の分離については試料をホモジナイズした後，pH 9.0またはpH 9.5の無機塩を含む希釈用培地（NaCl 70 g，K_2HPO_4 1 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 mg, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg，滅菌蒸留水1 l）で段階希釈した後，7% NaCl GYPF agar（pH 9.0またはpH 9.5）（Ishikawa *et al.*, 2005, 2007）を用い混釈培養を行った．培養は30℃，2－3日間，嫌気条件下（AneroPack-Keep, 三菱ガス化学）で行った．培養後，生菌数測定および菌株の純化を行い，16S rRNA遺伝子に基づく分子系統解析，各種分類学的性状の試験に供した．

また，白カビ熟成チーズ1点（sample number; Br3），ウォッシュチーズ2点（sample numbers; Ma1, La1）については，食塩濃度3条件（0%, 3.5%, 7.0%），pH 4条件（pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0）を組み合わせた12条

件の培地を用い分離を行い，生菌数測定ならびに分離株の16S rRNA遺伝子に基づく分子系統解析を行った．なお，分離培地は7% NaCl GYPF agarと食塩濃度，pH以外は同一組成のものを用いた．

海水天日塩からの分離については，試験管に無菌的に分注した食塩を含まない7% GYPF broth (pH 9.0) に天日塩を7% (W/V) となるよう混合し，30℃，2－3日間，嫌気条件下（AneroPack-Keep，三菱ガス化学）で集積培養を行った．培養液のpHが低下し，菌体の増殖が確認されたものについて，混釈培養による純粋分離を行った．なお，純粋分離には7% NaCl GYPF agar (pH 9.5) (Ishikawa *et al.*, 2005) を用いた．

16S rRNA遺伝子の解析　ChargeSwitch DNA Mini Bacteria Kit (Invitrogen) を用い，分離株のDNAを抽出，精製した．得られたDNA溶液を鋳型として細菌16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマーセット20F (5'-AGTTTGATCATGGCTCA-3') および1540R (5'-AAGGAGGTGATCCAACCGCA-3') を用い，約1500塩基の遺伝子断片を増幅した．PCR反応産物はDTCS Quick Start Master Mix（Beckman Coulter）を用い，サイクルシークエンス反応物を行った後，CEQ 8000 DNAシークエンサー（Beckman Coulter）を用い塩基配列の解析を行った．サイクルシークエンス反応にはプライマー20F，350F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAGT-3')，536R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3')，800F (5'-GTAGTCCACGCCGTAAACGA-3')，900R (5'-CGGCCGTACTCCCCAGGCGG-3')，1099F (GCAACGAGCGCAACCC-3')，1540Rを用いた．塩基配列については国際塩基配列データベース（DDBJ/EMBL/GenBank）による相同性検索を行い，分離株の簡易同定およびグルーピングを行った．系統解析については，マルチプルアライメントはClustal X (Thompson *et al.*, 1997) を用いて行い，系統樹はMEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) を用い，近隣結合法で系統樹を作製した．

分離株の食塩，pH，温度に対する挙動　分離乳酸菌の食塩，pH，温度に対する挙動を調べた．方法はIshikawa *et al.* (2003, 2005, 2009, 2011) に従い，各生育条件下における最大比増殖速度から生育至適域を決定し，生育限界は培養2週間後の生育度および酸生成能により評価した．培養培地は温度に対する挙動については2.5% NaCl GYPF brothで行い，食塩，pHに対する挙動については本培地の食塩濃度，pHを以下の条件に変更して実験に供した．生育条件については，食塩に対する挙動についてはNaCl 0，0.5，1.5，2.0，2.5，3.0，3.5，4.0，4.5，5.0，7.5，10.0，12.5，15.0，17.5，20.0%で行い，pHに対する挙動についてはpH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0で行い，温度に対する挙動については0，5，7，20，25，30，37，40，42.5，45℃で行った．

分離株の分類学的性状　16S rRNA遺伝子に基づく分子系統解析において，新規分類群を構成する可能性があった株について，形態学的性状，生理・生化学的性状（グラム染色，カタラーゼ反応，酸素に対する挙動，糖類発酵性，硝酸還元能，乳酸発酵能，酸素に対する挙動，ゼラチン液化性，ミルクカゼイン加水分解能，アルギニンからのアンモニア生成，V-Pテスト），化学分類学的性状（菌体脂肪酸組成，呼吸系キノン，細胞壁アミノ酸組成），DNA－DNA相同性を明らかにし，分離株の分類学上の位置付けを確定した．方法はIshikawa *et al.* (2003, 2005, 2009, 2011) に従って行った．

乳酸菌分離株のチーズ低温保存下での生育能　イタリア産ウォッシュタイプチーズより分離した*Marinilactibacillus* sp. B7-9-5株について，チーズ熟成条件下における生育能を評価するため，以下の検討を行った．加熱殺菌済みの国産カマンベールタイプチーズに滅菌生理食塩水に懸濁した供試菌株を噴霧し，5℃または10℃で保存した．経日的にチーズから直接平板分離を行い，生菌数を測定した．分離培地は7% NaCl GYPF agarを用いた．なお，対照として乳酸菌を添加しないチーズについても同様に直接平板分離，生菌数を測定した．

結　果

ヨーロッパ産各種チーズからの乳酸菌の分離　ヨーロッパ産各種チーズからの乳酸菌分離結果をTable 1に示した．なお，本助成研究において，既報（Ishikawa *et al.*, 2007）で報告した好塩性・好アルカリ性乳酸菌分離株の各種分類学的性状について検討を行ったため，その分離結果についても併せて記載した．食塩濃度7%，pH 9.0およびpH 9.5の条件での分離では供試した28点のうち20点のチーズで細菌の増殖を確認した．生菌数はチーズによって異なり，10^{1}－10^{10} CFU/gであった．中でも，一部の白カビ熟成チーズとウォッシュタイプのチーズからの生菌数は10^{8}－10^{10} CFU/gと非常に高い生菌数であった．本条件で得られた分離株は全てグラム陽性，カタラーゼ陰性の乳酸菌であった．また，供試したチーズの食塩濃度は0.6－3.5%，pHは4.9－7.6とチーズによって異なっており，弱酸性のチーズからも本分離条件で乳酸菌が分離された．食塩含有，アルカリ性の分離条件下で生育可能な乳酸菌は必ずしもアルカリ性のチーズ

からのみ分離されるとは限らず，これらはチーズの食塩濃度およびpH，また，原産国やチーズのカテゴリーに依らず広く存在していることが示唆された．

16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析　ヨーロッパ産各種チーズから得られた乳酸菌株を純化後，16S rRNA遺伝子に基づく分子系統解析を行い，分離株の簡易同定，ならびに分離株のグルーピングを試みた．分離株の16S rRNA遺伝子塩基配列をBLAST解析に供した結果をTable 2に，分離株の16S rRNA遺伝子のV1領域を含む，約500塩基の部分塩基配列に基づく分子進化系統樹をFig. 1に示した．食塩濃度7%，pH 9.0およびpH 9.5の条件での分離株は大部分がこれまでチーズからの分離例がほとんどない，好塩性，好アルカリ性乳酸菌，*Marinilactibacillus* 属，*Alkalibacterium* 属内で3つのクレード（Clade A, B, C）を構成した（Table 2, Fig. 1）．特に，Clade A内で*Marinilactibacillus psychrotolerans* と相同性が99－100%と非常に高い株は供試した28点のチーズのうち15点より分離され，その分離頻度は54%であった．また，*Alkalibacterium* 属内で構成した2つのクレード（Clade B, C）は*Alkalibacterium* 属の既知種から独立しており，新規分類群を構成する可能性が考えられたため，各種分類学的性状を明らかにし，分類学的位置を確定した（後述）．Clade Bは9株で構成され5種のチーズより分離され（分離頻度，18%）（Table 2, Fig. 1），Clade Cは1種のチーズより分離された1株で構成された．また，3点のチーズからはこれまでにチーズ熟成期に存在することが報告されている *Enterococcus faecalis* と相同値が高い（98－99%）株が分離された．これらが分離されたチーズのカテゴリーは白カビ熟成タイプとウォッシュタイプのチーズであり，Clade Aに属した株も同タイプのチーズより分離されたが，Clade A, Clade B，Clade Cに属した*Marinilactibacillus* 属，*Alkalibacterium* 属乳酸菌が分離されたチーズからは*Enterococcus* 属乳酸菌は分離されなかった．以上より，各種チーズから食塩濃度7%，pH 9.0およびpH 9.5の条件で分離される乳酸菌は*Marinilactibacillus*, *Alkalibacterium*, *Enterococcus* の各属内に位置し，特に*M. psychrotolerans* と系統的に近縁な株は原産国，製造法の異なるチーズに広く存在することが示唆された．

分離乳酸菌の食塩，pH，温度に対する挙動　分離乳酸菌について食塩，pH，温度に対する挙動を調べた（Table 3）．系統解析において*Marinilactibacillus* 属，*Alkalibacterium* 属内の3つのクレード（Clade A, B, C）に属した分離株は食塩濃度2－5%を生育至適域にもつ好塩性で，生育範囲は0－15%であった．生育至適pHは8－9で好アルカリ性であり，生育範囲はpH 7-10でpH 7以下での生育は非常に弱かった．また，分離株は中温性で生育至適域を30－37℃にもち，生育限界温度は42℃で，0℃においても良好な生育を観察し，耐冷性であった．分離株の食塩，pH，温度に対する挙動は好塩性，好アルカリ性であるこ

Table 1　Total cell counts, categories, NaCl concentrations, and pHs of cheese samples

Sample no.	Cheese sample (country)	Category	NaCl (%)	pH	Cell count (CFU/g) by using 7% NaCl GYPF agar: (pH 9.0)	(pH 9.5)
Br1	Brie (France)	Mold-ripened, soft	1.4	7.4		$>10^7$*
Br2	Brie (France)	Mold-ripened, soft	1.1	6.9		7.4×10^6*
Br3	Brie (France)	Mold-ripened, soft	1.3	6.3	1.9×10^6	
C1	Camembert (France)	Mold-ripened, soft	1.0	5.4		4.0×10^1*
C2	Camembert (France)	Mold-ripened, soft	1.7	7.3		
BB1	Blue–Brie (Germany)	Mold-ripened, soft	1.2	6.8		1.2×10^7*
SM1	Saint Marcellin (France)	Mold-ripened, soft	1.1	7.1	1.7×10^6	
G1	Gorgonzola (Italy)	Mold-ripened, soft	3.5	6.3		4.0×10^1*
G2	Gorgonzola picante (Italy)	Mold-ripened, soft	1.1	6.0	7.8×10^3	
G3	Gorgonzola dolce (Italy)	Mold-ripened, soft	0.9	7.0	3.6×10^3	
G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	Mold-ripened, soft	0.4	6.3	6.0×10^3	
Ta1	Taleggio (Italy)	Bacteria-ripened, soft	1.9	6.0	2.2×10^7	
Al1	Alpinus (Italy)	Bacteria-ripened, soft	1.8	7.1	4.0×10^{10}	
Ca1	Caciotta (Italy)	Bacteria-ripened, soft	1.6	6.4	7.4×10^9	
Ma1	Maroille (France)	Bacteria-ripened, soft	1.8	7.6	1.6×10^{10}	
La1	Langres (France)	Bacteria-ripened, soft	0.4	6.6	1.4×10^6	
Hs1	Hansi (France)	Bacteria-ripened, soft	0.8	6.6	5.4×10^8	
Ti1	Tilsiter (Switzerland)	Bacteria-ripened, semi-hard	1.2	6.3		2.0×10^1*
Ti2	Tilsiter (Switzerland)	Bacteria-ripened, semi-hard	0.6	7.3		5.0×10^4*
DC1	Denmark cream (Denmark)	Unripened	0.6	4.9		2.0×10^1*

HALAB were not isolated from 8 samples; mold-ripened Brue-Brie from Germany; bacteria-ripened Cheddar from England; mould-ripened Blue from Denmark; unripened Fromage frais from France; bacteria-ripened Marlbo from Denmark; mould-ripened Blue from Denmark; unripened Fromage frais from France; mold-ripened Brie from Switzerland.

* Data from Ishikawa *et al*. (2006).

Table 2 Identification of isolates from cheeses according to partial 16S rRNA gene sequence

Clade based on the phylogenetic analysis	Strain	Sample no.	Cheese sample (country)	Closest phylogenetic affiliation in the GenBank/EMBL/DDBJ dadabases (accession no.)	Similarity (%)
A	3BE-1*§	Br1	Brie (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	3BE-2	Br1	Brie (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	3BE-3	Br1	Brie (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	3BE-4	Br1	Brie (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	5AE-2*§	Br2	Brie (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	5AE-3	Br2	Brie (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.6
A	5AE-4	Br2	Brie (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	9AE-2*§	C1	Camembert (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	9AE-3	C1	Camembert (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	9AE-4	C1	Camembert (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	9BE-2*	C1	Camembert (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	9BE-3	C1	Camembert (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	9BE-4	C1	Camembert (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4AE-1	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4AE-2*§	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4AE-3	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1AD-3*§	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1AD-4	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1AE-1*	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1AE-2	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1AE-3	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1AE-4	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1BE-1*	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1BE-2	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1BE-3	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1BE-4	G1	Gorgonzola (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4-7-1	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4-7-2	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4-7-3	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4-7-10	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4-9-1*§	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	4-9-2	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.5
A	4-9-3*§	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7
A	4-9-9	G2	Gorgonzola picante (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	5-7-1	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.0
A	5-7-2*§	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.4
A	5-7-3	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	5-7-4	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	5-9-1	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	5-9-2	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	5-9-3*§	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	5-9-5	G3	Gorgonzola dolce (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-7-1*§	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-7-2§	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-7-8	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-7-10	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-9-1	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-9-2	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-9-3	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6-9-9	G4	Gorgonzola Mascarpone (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1-7-1	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	98.9
A	1-7-3	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7
A	1-7-5*§	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1-7-10	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1-9-1*§	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1-9-2	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1-9-3	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	1-9-4	Ta1	Taleggio (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	2-7-1	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	2-7-4	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	2-7-7	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.0
A	2-7-8*§	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7
A	2-9-1	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	2-9-2	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.3

Table 2 continued

Clade based on the phylogenetic analysis	Strain	Sample no.	Category of cheese sample	Closest phylogenetic affiliation in the GenBank/EMBL/DDBJ dadabases (accession no.)	Similarity (%)
A	2-9-3*§	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7
A	2-9-8	Al1	Alpinus (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	3-7-1	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	3-7-3	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.0
A	3-7-5	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.0
A	3-7-8	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	3-9-1*§	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	3-9-2	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	3-9-3	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	3-9-5§	Ca1	Caciotta (Italy)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-2*§	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-3*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-4*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-5*§	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-6*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-7*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-8*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-9*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-10*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-11	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	B7-9-12*	Ma1	Maroille (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	8-7-1	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	8-7-2*§	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	8-7-3*§	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	8-7-4	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	8-9-1	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	8-9-3	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7
A	8-9-5	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	8-9-10	Hs1	Hansi (France)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6BE-1*§	DC1	Denmark cream (Denmark)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6BE-2	DC1	Denmark cream (Denmark)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6BE-3	DC1	Denmark cream (Denmark)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	6BE-4	DC1	Denmark cream (Denmark)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.6
A	14BE-1*§	Ti1	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	14BE-2	Ti1	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	14BE-3	Ti1	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	14BE-4	Ti1	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	15AD-1*§	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	15AE-1*	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	15AE-2	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	15AE-3	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	15AE-4	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8
A	15BE-1*	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
A	15BE-2	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100
B	3AD-1*§	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	3AD-2	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	3AD-3	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	3AD-4	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	3AE-1*§	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	3AE-2	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	3AE-3	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	3AE-4	Br1	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	5AD-1*§	Br2	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	5AD-2	Br2	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	5AD-3	Br2	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	5AD-4	Br2	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	5AE-1*§	Br2	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	5BE-1*§	Br2	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	5BE-2	Br2	Brie (France)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	4AD-1*§	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	4AD-2	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	4AD-3	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	4AD-4	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	4BE-1*§	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0

Table 2 continued

Clade based on the phylogenetic analysis	Strain	Sample no.	Category of cheese sample	Closest phylogenetic affiliation in the GenBank/EMBL/DDBJ dadabases (accession no.)	Similarity (%)
B	4BE-2	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	4BE-3	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	4BE-4	BB1	Blue-Brie (Germany)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	1AD-1	G1	Gorgonzola (Italy)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	1AD-2*§	G1	Gorgonzola (Italy)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
B	15BE-3*§	Ti2	Tilster (Switzerland)	*Alkalibacterium kapii* T22-1-2^T (AB294171)	96.0
C	9BE-1*§	C1	Camembert (France)	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1^T (AB194167)	97.9
D	9C3*	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	9C4*	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	9C5	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	9C6	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	9C7	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	9C8	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.7
D	9C9	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	9C10	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.7
D	9C11	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.7
D	9C12	Br3	Brie (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.7
D	CN-6*	C2	Camembert (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	CN-11*	C2	Camembert (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	CN-12	C2	Camembert (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	CN-15	C2	Camembert (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	CN-16	C2	Camembert (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	CN-18	C2	Camembert (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	CN-19	C2	Camembert (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	SA-6*	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.5
D	SA-7*	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	SA-8	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	SA-15	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	SA-16	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	SA-17	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.8
D	SA-18	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6
D	SA-19	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.4
D	SA-20	SM1	Saint Marcellin (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	98.8
D	A7-9-2*	La1	Langres (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.7
D	A7-9-3*	La1	Langres (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.2
D	A7-9-11*	La1	Langres (France)	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99.6

*Selected representative strains for phenotypic and chemotaxonomic characterizations.

§Selected representative strains for deposit to the culture collections.

とに加え，pH 7 以下での生育能の低下や耐冷性である点など，既知の *Marinilactibacillus* 属，*Alkalibacterium* 属の性状と類似していた．また，*Enterococcus* 属内のクレード（Clade D）に属した分離株は食塩濃度 0－1% を生育至適域にもち，10% まで生育する耐塩性であった．生育至適 pH は 7－7.5 であり，生育範囲は 5.5－9.0 で耐アルカリ性の性状を示した．本クレードに属した分離株の最近縁種である *E. faecalis* の生育限界食塩濃度は 7% で，分離株はより高い耐塩性を示した．また，*E. faecalis* の生育限界 pH は 9.5 であり，これについては類似した性状を示した．

***Alkalibacterium* 属分離株の新種提案**　チーズからの乳酸菌分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析において *Alkalibacterium* 属内に位置した 2 つのクレード（Clade A, B）（Table 1, Fig. 1）を構成する分離株について，その分離上の位置付けを確定するため，各種分類学的性状の検討を行った．これらの株の 16S rRNA 遺伝子，約1400塩基の配列に基づく分子進化系統樹を Fig. 2 に示した．両クレードの *Alkalibacterium* 属内の系統的位置は 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列に基づいた系統関係と同一で，Clade B はタイ国の小エビミンチの塩辛ペースト，魚の干物より分離された *Alkalibacterium kapii* の近傍に位置し，Clade C は海洋環境より分離された *Alkalibacterium putridalgicola* と *Alkalibacterium subtropicum* の近傍に位置した．Clade B を構成する 9 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は同一で，最近縁種である *A. kapii* との相同値は 97.4% であった．また，1 株で構成される Clade B の 9BE-1 株と最も近縁な *A. putridalgicola* との相同値は 99.1%，*A. subtropicum* との相同値は 99.0% であった．DNA－DNA 相同性試験の結果，Clade B を構成する 9 株間の相同値

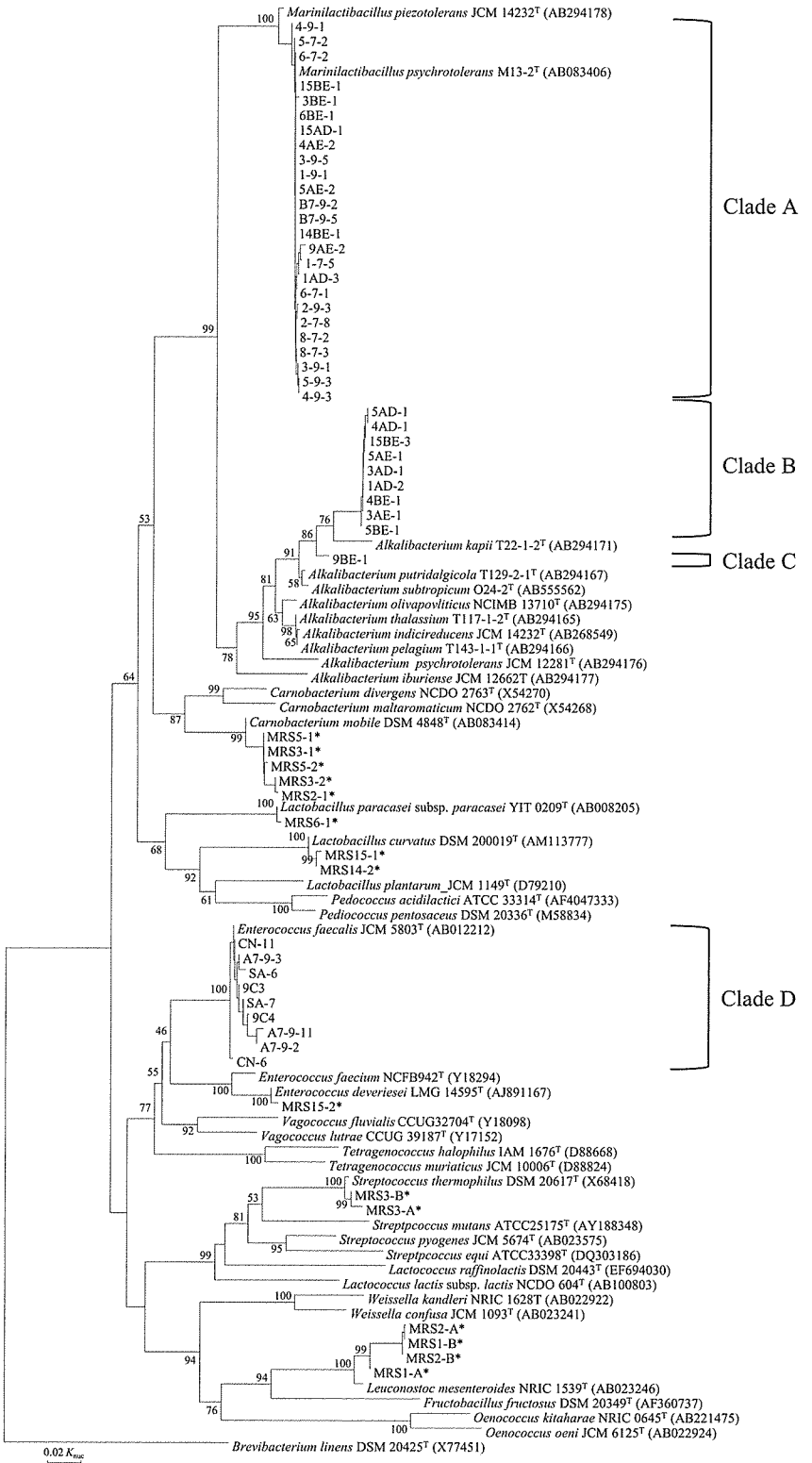


Fig. 1 Phylogenetic relationships between the isolates and other related bacteria, according to 16S rRNA gene sequences. The tree, constructed using the neibour-joining method, is based on comparison of approximately 500 nucleotides from the 5' end of the 16S rRNA gene. Bootstrap values, expressed as percentage of 100 replications, are given at branching points; only values above 50% are shown.
* Isolated from European cheeses by using Lactobacilli MRS agar (Ishikawa *et al.*, 2007).

は75－100%で同一種を構成した．また，Clade Bの3AD-1株と*Alkalibacterium*属の既知種との間の相同値は21%以下であり，本クレードに属する分離株は*Alkalibacterium*属の新種を構成することが示唆された．また，Clade Cの9BE-1株と*Alkalibacterium*属の既知種との間の相同値は49%以下で*Alkalibactgetrium*属の新種を構成することが示唆された．これらの分離株については生理・生化学的性状，化学分類学的性状の差異に基づき*Alkalibacterium*属の2新種として提案予定である．新規分類群を構成した菌株の記載を以下に示す．

Clade B（3AD-1T, 1AD-2, 3AE-2, 4AD-1, 4BE-1, 5AD-1, 5AE-1, 5BE-1, 15BE-3株）の記載　細胞はグラム陽性の桿菌で胞子形成せず，運動性なし．NaCl 2.5% GYPF ager (pH 9.0) の内部で淡黄色のレンズ状コロニーを，表面に淡黄色の丸型コロニーを形成する．カタラーゼ，オキシダーゼ反応陰性で微好気条件下における生育が良好である．硝酸還元能，ゼラチン液化性なし．ミルクカゼイン分解能をもち，L-アルギニンからアンモニアを弱く生成する．グルコースからガス生成はなく，発酵生産物は乳酸でギ酸，酢酸，エタノールを副成する．好気条件下ではグルコースより酢酸を生成する．糖類発酵性は，全株がD-リボース，D-グルコース，D-フルクトース，D-ガラクトース，D-マンノース，D-セロビオース，D-マルトース，D-スクロース，グリセロール，D-サリシンを発酵し，D-アラビノース，D-キシロース，D-ラムノース，メリビオース，D-メレジトース，D-ラフィノース，D-マンニトール，D-ダルシトール，アドニトール，イノシトール，メチル-α-D-グルコシド，イヌリンを発酵しない．菌株によってL-アラビノース，D-ラクトース，D-トレハロース，D-ソルビトール，グルコン酸ナトリウム，可溶性デンプンを発酵する．呼吸系キノンをもたない．細胞壁ペプチドグリカン組成はタイプA4β，Orn-D-Asp型，主要菌体脂肪酸はC14:0, C16:0, C16:1ω9c, C18:1ω9cである．DNAのG+C含量は36.8－37.6%である．フランス産ブリー熟成チーズより分離した3AD-1T株（=DSM 25751T =JCM 18271T =NRIC 0870T）を基準株として*Alkalibacterrium gilvum*と命名し新種提案を行った（Ishikawa *et al.*, 2012）．

Table 3　NaCl, pH, temperature for cell growth of the isolates

Clade based on the phylogenetic analysis	Strain	NaCl (%)*		pH*		Tenperature (C)*	
		Range	Optimum	Range	Optimum	Range	Optimum
A	*Marinilactibacillus* spp. (22 strains)	0 to 15-17.5	2.0-5.0	7.0 to 9.0-10.0	8.0-9.0	0-40	30-37
B	*Alkalibacterium* spp. (9 strains)	0-1 to 15-17.5	2.0-5.0	7.0-7.5 to 9.5-10.0	8.5-9.5	0-37	20-30
C	*Alkalibacterium* sp. (1 strains)	0-17.5	4.5	7.0-9.5	9.0-9.5	0-37	30-37
D	*Enterococcus* spp. (9 strains)	0-1.0	0-10	7.0-7.5	5.5-9.0	37	5-45
	Marinilactibacillus psychrotolerans [a]	0 to 17-20.5	2-3.75	6.0-10.0	8.5-9.0	-1.8 to 40-45	37-40
	Marinilactibacillus piezotolerans [b]	0-12.0	1.0-2.0	5.5-10.0	7.0-8.0	4-50	37-40
	Alklaibacterium kapii [c]	0 to 19-21	1.5-2.5	6.5-10.0	8.5-9.0	5-10 to 40-42.5	25-37
	Alkalibacterium putridalgicola [c]	0 to 18-20	2-4	6.0-6.5 to 10	8.0-9.0	-1.8 to 40-45	37-40
	Alkalibacterium thalassium [c]	0-11	1-2.5	7.0-11.0	9.0	10-42.5	37
	Alkalibacterium pelagium [c]	0-17	0.5-1.5	7.0-11.0	9.0-9.5	10-47.5	37
	Alkalibacterium subtropicum [d]	0-17	1.0 to 2.0-3.0	7.5-8.0 to 9.5	8.0-8.5	15-40	20-30
	Alkalibacterium olivapovliticus [e]	0-15	3-5	8.5-10.8	9.0-10.2	4 to 35-37	27-32
	Alkalibacterium psychrotolerans [f]	0-17	2-12	9.0-12.0	9.5-10.5	5-45	34
	Alkalibacterium iburiense [g]	0 to 14-16	3-13	9.0-12.0	9.5-10.5	5-45	30-37
	Alkalibacterium indicireducens [h]	0 to 14-15	1-11	9.0-12.3	9.5-11.5	15-40/18-37	20-30

* Data from: a, Ishikawa *et al*. (2003); b, Toffin *et al*. (2005); c, Ishikawa *et al*. (2009); d, Ishikawa *et al*. (2011); e, Ntougias & Russell (2001); f, Yumoto *et al*. (2004); g, Nakajima *et al*. (2005); h, Yumoto *et al*. (2008).

Clade C（9BE-1 株）の記載　細胞はグラム陽性の桿菌で胞子形成せず，運動性なし．NaCl 2.5% GYPF ager (pH 9.0) の内部で淡黄色のレンズ状コロニーを，表面に淡黄色の丸型コロニーを形成する．カタラーゼ，オキシダーゼ反応陰性で微好気条件下における生育が良好である．硝酸還元能，ゼラチン液化性なし．ミルクカゼイン分解能をもち，L-アルギニンからアンモニアを弱く生成する．グルコースからガス生成はなく，発酵生産物は乳酸でギ酸，酢酸，エタノールを副成する．好気条件下ではグルコースより酢酸を生成する．糖類発酵性は，D-リボース，D-キシロース，D-グルコース，D-フルクトース，D-ガラクトース，D-マンノース，D-セロビオース，D-ラクトース，D-マルトース，D-スクロース，D-トレハロース，D-サリシンを発酵し，L-アラビノース，D-アラビノース，D-ラムノース，メリビオース，D-メレジトース，D-ラフィノース，D-マンニトール，D-ソルビトール，D-ダルシトール，アドニトール，グリセロール，イノシトール，メチル-α-D-グルコシド，グルコン酸ナトリウム，イヌリンを発酵しない．呼吸系キノンをもたない．細胞壁ペプチドグリカン組成はタイプ A4β，Orn-D-Asp 型，主要菌体脂肪酸は C14:0, C16:0, C16:1ω9c, C18:1ω9c である．DNA の G+C 含量は 42.4% である．フランス産カマンベールチーズより分離した 9BE-1 株（=NRIC 0873^T）を基準株として *Alkalibacterium molliscaseum* と命名し新種を提案する予定である．

食塩，pH を組み合わせた条件での乳酸菌の分離および乳酸菌相の解析　食塩含有，アルカリ性の分離条件を用いることでチーズから *Marinilactibacillus* 属や *Alkalibacterium* 属などのチーズ製造におけるスターター菌種とは異なる好塩性・好アルカリ性乳酸菌が分離されたため，3 点のチーズについて食塩濃度（NaCl 0, 3.5, 7%），pH（pH 6, 7, 8, 9）を組み合わせた計12条件の分離培地を用い，乳酸菌の分離を行い，さらに詳細な乳酸菌相の解析を試みた．供試試料としてはウォッシュタイプのチーズ 2 点（フランス産マロワル，フランス産ラングル），白カビ熟成チーズ 1 点より行った．各チーズからの分離結果（生菌数，分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性検索結果）を Table 4，Fig. 3 に示した．ウォッシュタイプチーズのマロワルからの分離では，食

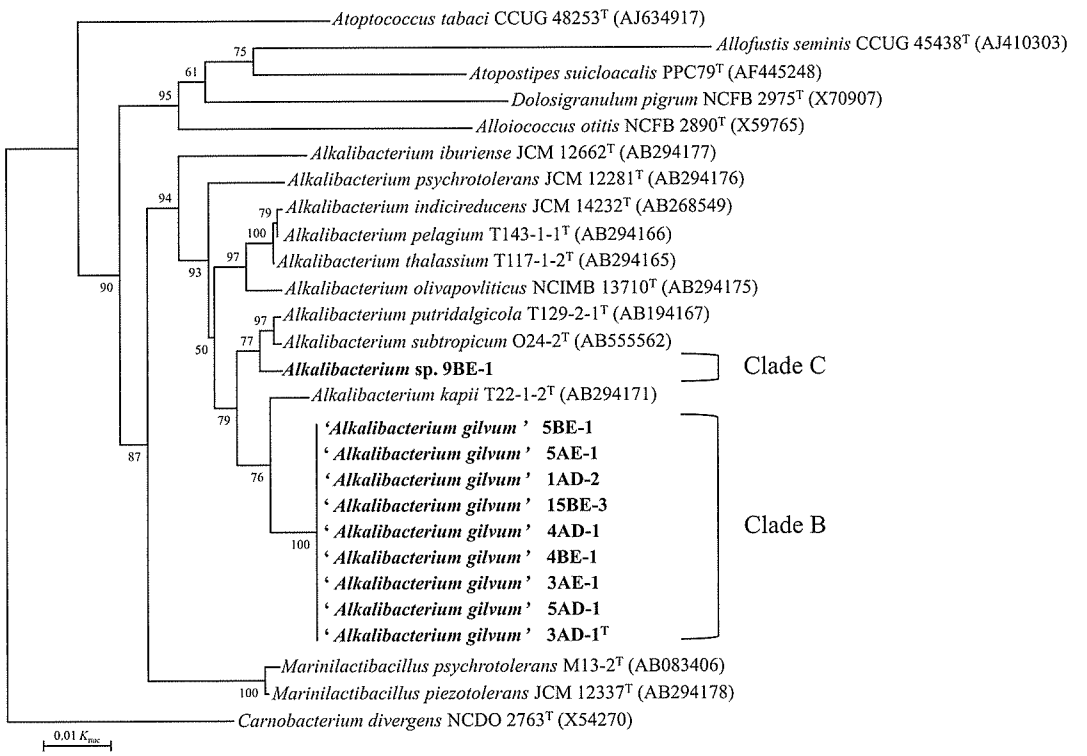


Fig. 2　Phylogenetic relationships among the isolates belonging to the genus *Alkalibacterium* and related bacteria. The tree, constructed by the neibour-joininf method, is based on the comparison of approximately 1400 nucleotides. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are given at branching points; only values above 50% are shown.

塩濃度0%，pH 8およびpH 9，食塩濃度3.5%，pH 7，8，9，食塩濃度7%，pH 7，8，9の条件で*M. psychrotolerans*と16S rRNA遺伝子の塩基配列の相同値が97－100%の株が10^9－10^{10} CFU/gの生菌数で分離された．一方，食塩濃度0%，pH 6およびpH 7，食塩濃度3.5%，pH 6の条件ではチーズスターター菌種である*Lactococcus lactis*と相同値が非常に高い株（相同値，97－100%）が10^7－10^{10} CFU/gの生菌数で分離された．また，各条件で上記の乳酸菌種と異なる分類群の乳酸菌は分離されず，*M. psychrotolerans*と*L. lactis*と近縁な株が優占種として分離された．ウォッシュタイプのラングルからの分離では，すべての分離条件で*E. faecalis*と相同値が非常に高い株（相同値，97－100%）のみが10^6－10^{10} CFU/gの生菌数で分離され，*L. lactis*などのスターター菌種や*Marinilactibacillus*属や*Alkalibacterium*属などの好塩性・好アルカリ性乳酸菌は分離されなかった．一方，フランス産白カビ熟成チーズからの分離では16S rRNA遺伝子の塩基配列の相同性検索結果，各条件から分離された乳酸菌の菌相は大きく異なっていた（Fig. 3）．一般に熟成期のチーズ中に存在することが知られている*Pediococcus acidilactici*と系統的に近縁な株（相同値，99－100%）が酸性条件と中性条件の一部（食塩濃度0%，pH 6, 7；食塩濃度0%, 3.5%, 7%, pH 6）で分離された．また，*E. faecalis*と系統的に近縁な株（相同値，99－100%）は全てのpHの条件（食塩濃度0%，pH 7，8，9；食塩濃度3.5%，pH 6，7，8，9；食塩濃度7%，pH 9）で分離された．また，一般乳酸菌の分離条件と異なる分離条件の一部でこれまでチーズからの分離報告例の殆どない乳酸菌と系統的に近縁な株が分離された．食塩濃度7%, pH 6, 7, 8の分離条件からは好塩性乳酸菌，*Tetragenococcus halophilus*，*Tetragenococcus korrensis*と系統的に近縁な株（相同値，99－100%）が分離され，特に食塩濃度7%，pH 7およびpH 8の分離条件ではこれらの株のみが生菌数10^7－10^8 CFU/gで分離され，主要な乳酸菌相を構成した．加えて，アルカリ性の分離条件（食塩濃度0%，pH 8, 9；食塩濃度3.5%, pH 8, 9；食塩濃度7%, pH 9）では*Vagococcus lutrae*と系統的に近縁な乳酸菌株が分離された．*Tetragenococcus*および*Vagococcus*に属した分離株の食塩，pH，温度に対する挙動をTable 5に示した．

乳酸菌分離株のチーズ低温保存下での生育能　好塩性・好アルカリ性乳酸菌分離株のチーズ熟成中における生存能を評価するため，加熱殺菌済み白カビ熟成チーズ中での低温保存下での生存性を評価した（Table 6）．

Table 4 Isolation from bacteria-ripened cheeses under the conditions of various NaCl concentration and pH value

Sample	Isolation condition			Identification of isolates according to partial 16S rRNA gene sequence	
	NaCl (%)	pH	CFU/g	Closest phylogenetic affiliation in the GenBank/EMBL/DDBJ dadabases	Similarity (%), (total number of tested strain)
Maroille (France)	0	6	4.5×10^7	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T (AB100803)	99-100 (9 strains)
		7	1.1×10^{10}	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T (AB100803)	97-100 (10 strains)
		8	1.4×10^{10}	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99-100 (10 strains)
		9	6.5×10^9	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	98-100 (10 strains)
	3.5	6	4.9×10^8	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 604^T (AB100803)	97-100 (9 strains)
		7	1.1×10^{10}	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99-100 (9 strains)
		8	3.4×10^{10}	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100 (9 strains)
		9	3.5×10^{10}	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99-100 (9 strains)
	7.0	6	ND		
		7	5.3×10^9	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100 (10 strains)
		8	3.9×10^9	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99-100 (10 strains)
		9	1.6×10^{10}	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99-100 (10 strains)
Langres (France)	0	6	1.3×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	100 (8 strains)
		7	1.2×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	100 (8 strains)
		8	3.2×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	98-100 (9 strains)
		9	3.3×10^8	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99-100 (9 strains)
	3.5	6	5.7×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	100 (8 strains)
		7	2.5×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	97-100 (9 strains)
		8	1.4×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99-100 (10 strains)
		9	2.0×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99-100 (9 strains)
	7.0	6	1.6×10^{10}	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99-100 (8 strains)
		7	4.4×10^9	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	97-100 (9 strains)
		8	5.4×10^8	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	97-100 (9 strains)
		9	1.4×10^6	*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T (AB012212)	99-100 (8 strains)

ND: not detected.

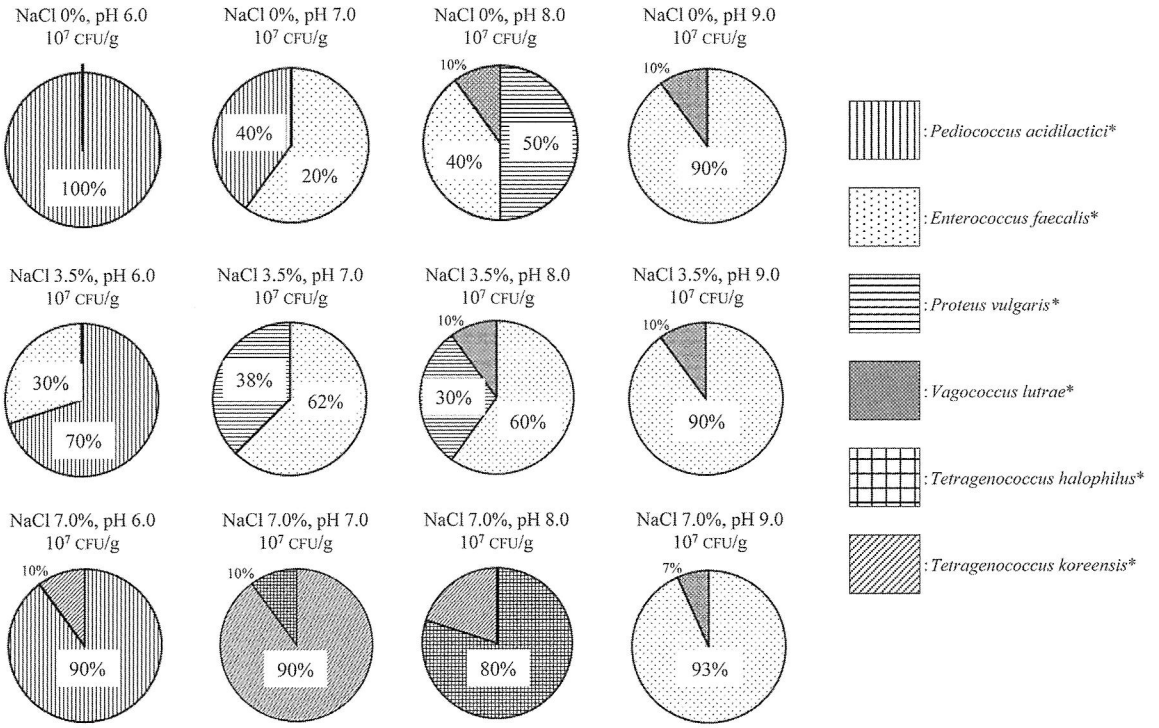


Fig. 3 Isolation from mould-ripened cheese under the conditions of various NaCl concentration and pH value.
*Identified by partial 16S rRNA 8gene sequences.

供試菌株にはイタリア産ウォッシュタイプチーズより分離した *Marinilactibacillus* sp. B7-9-5 株を用いた．保存は5℃および10℃で行い，1週間毎に生菌数を測定した結果，両保存条件ともに21日後の生菌数は 10^7-10^8 CFU/g で，本菌は低温保存下のチーズ中で十分に生育可能であることが示唆された．

各種塩蔵発酵食品，海水天日塩からの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離　好塩性・好アルカリ性乳酸菌が塩蔵発酵食品中に広く存在するのかどうか検討するため，味噌や魚介類の塩蔵発酵食品，更に海水天日塩より分離を試みた（Table 7）．国産の生みそ9点より NaCl 7% GYPF agar (pH 9.0) を用い分離を行った結果，*Marinilactibacillus* 属，*Alklaibacterium* 属などの好塩性・好アルカリ性乳酸菌は分離されなかった．一方，牡蠣の塩辛2点から同様に分離を行った結果，広島県産牡蠣の塩辛では 7.9×10^7 CFU/g，宮城県産牡蠣の塩辛では生菌数 7.9×10^4 CFU/g が得られ，分離株の 16S rRNA 遺伝子に基づく分離系統解析の結果，すべての分離株は *M. psychrotolerans* と 99.5－100% の相同値であった．また，国産および外国産の海水天日塩38点より，好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離を集積培養にて試みたところ，フランス産海水天日塩2点より好塩性・好アルカリ性乳酸菌を分離した．分離株の生理・生化学的性状，16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析，DNA－DNA 相同性を調べた結果，海水天日塩からの分離株は海洋環境より分離された *A. putridalgicola* と同一種を構成した．

考　察

好塩性・好アルカリ性の性状をもつ乳酸菌は主に海洋環境より分離されてきているが，近年では海洋環境と異なる環境にも存在することが明らかになってきている．海洋環境より分離された好塩性．好アルカリ性乳酸菌群は魚の塩漬け（干物を含む），タイ国のエビの塩蔵発酵調味料，カピ（ka-pi），などの食品からも分離されている（Ishikawa *et al.*, 2009）．しかし，食品からの乳酸菌の分離において，食塩含有，アルカリ性側の条件での分離はこれまでほとんど行われていない．このため，我々は乳酸菌が製造過程で関与するチーズに焦点を当て，好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離を試みている．チーズの多くは塩分を含み，熟成後の pH は熟成中に増殖する細菌によるアンモニアの生成や酵母による乳酸の資化などによって，中性～アルカリ性になる（Cogan &

Table 5 NaCl, pH, temperature for cell growth of the halophilic and halotolerant isolates

Strain (Closest phylogenetic relative)	NaCl (%)*		pH*		Tenperature (°C)*	
	Range	Optimum	Range	Optimum	Range	Optimum
Tetragenococcus spp. (*Tetragenococcus halophilus*)	0 to 22.5-25.0	7.5-10.0	6.0 to 8.5-9.0	7.0-7.5	10 to 40-45	37
Tetragenococcus spp. (*Tetragenococcus koreensis*)	0 to 15.30-17.5	2.5-5.0	6.0-9.0	7.0-8.0	5 to 40-45	37
Vagococcus spp. (*Vagococcus lutrae*)	0 to 15.0-17.5	2.5-5.0	6.0-9.5	7.5-8.0	5-45	25 or 37
Tetragenococcus halophilus[a]	5.0-25.0	5.0-10.0	6.0-8.5	7.0-8.0	ND	30
Tetragenococcus koreensis[b]	0-7.5	2.5-5.0	7.0-9.0	9	15-37	30

* Data from: a, Schleifer (1986); b, Lee *et al*. (2005)

ND: no data

Table 6 Cell viability of HALAB isolate in cheese under low-temperature strage (CFU/g)

Strain	Straged temperature (°C)	Days			
		0	7	14	21
Marinilactibacillus sp. B-7-9-5	5	2.6×10^6	2.9×10^7	4.0×10^7	2.6×10^7
	10	1.7×10^6	8.9×10^8	5.1×10^8	3.3×10^8
Non-supplemented	5	ND	ND	ND	ND
	10	ND	ND	ND	ND

ND: not detected.

Table 7 Identification of isolates from salted and femented oyster and solar dried sea salt according to 16S rRNA gene sequence

Strain	Sample (area and country)	Closest phylogenetic affiliation in the GenBank/EMBL/DDBJ dadabases (accession no.)	Similarity (%)
9-7-1[§]	Salted and fermented oyster (Hiroshima Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100*
9-7-2	Salted and fermented oyster (Hiroshima Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.5*
9-7-3	Salted and fermented oyster (Hiroshima Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8*
9-7-4	Salted and fermented oyster (Hiroshima Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7*
9-7-5[§]	Salted and fermented oyster (Hiroshima Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7*
9-7-9	Salted and fermented oyster (Hiroshima Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100*
10-9-2	Salted and fermented oyster (Miyagi Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100*
10-9-5	Salted and fermented oyster (Miyagi Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.7*
10-9-6	Salted and fermented oyster (Miyagi Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.6*
10-9-7[§]	Salted and fermented oyster (Miyagi Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100*
10-9-9	Salted and fermented oyster (Miyagi Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	100*
10-9-10[§]	Salted and fermented oyster (Miyagi Pref., Japan)	*Marinilactibacillus psychrotolerans* M13-2^T (AB083406)	99.8*
A5-6-4[§]	Solar dried sea salt (Guerande, France)	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1^T (AB194167)	99.5
A5-6-5[§]	Solar dried sea salt (Guerande, France)	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1^T (AB194167)	100
A6-5-2[§]	Solar dried sea salt (Guerande, France)	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1^T (AB194167)	99.8
A6-6-1[§]	Solar dried sea salt (Guerande, France)	*Alkalibacterium putridalgicola* T129-2-1^T (AB194167)	99.9

[§]Selected representative strains for deposit to the culture collections.

*Identified by partial 16S rRNA gene sequences.

Beresford, 2002; Farkye & Vedamuthu, 2002). しかし，これまでのチーズからの乳酸菌の分離は食塩を含む条件で行われることが少なく，またpHに関しては中性～微酸性の条件で行われることが一般的である．そこで，本研究では海洋環境からの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離条件を考慮し，NaCl 7%，pH 9.0またはpH 9.5の条件を用いて生産国・製造方法の異なる熟成チーズについて乳酸菌の分離を試みた．これまでの我々の分離結果（Ishikawa *et al.*, 2007）と併せると，好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離頻度は*Marinilactibacillus*属が54%，*Alkalibacterium*属が21%であり，これらの乳酸菌群はチーズのカテゴリー，製造法に依らず広くチーズ中に存在しているものと考えられる．また，チーズ中でのこれらの乳酸菌群の生菌数はサンプルとしたチーズによって異なり，$10^{1}-10^{10}$ CFU/gと様々であったが，白カビ熟成およびウォッシュタイプの一部のチーズでは$10^{9}-10^{10}$ CFU/gと非常に高い生菌数でこれらのチーズの主要な乳酸菌相を構成しているものと考えられた．また，チーズからの乳酸菌分離に関する他グループによる検討により，フランス産およびドイツ産の細菌熟成チーズ（red-semar cheese）において，*M. psychrotolerans*が細菌相の1－15%を示すことが報告されていること（Maoz *et al.*, 2003; Feurer *et al.*, 2004）などから，これら好塩性・好アルカリ性乳酸菌は熟成チーズに広く存在しているものと考えられる．

好塩性・好アルカリ性乳酸菌が分離されたチーズからはチーズスターター菌種として添加される乳酸菌種である*Streptococcus thermophilus*，*Leuconostoc mesenteroides*やチーズ熟成期に増殖することが知られている乳酸菌である*Lactobacillus curvatus*，*Lactobacillus paracasei*，*Enterococcus deveriesei*などが一般的な乳酸菌分離培地であるLactobacilli MRS agar（食塩濃度0%，pH 6.8）を用いたときに分離されることを報告しており（Ishikawa *et al.*, 2007），分離試料中の乳酸菌相は好塩性・好アルカリ性乳酸菌のみで構成されているわけではない．また，本研究で行った食塩濃度，pHを組み合わせた条件での分離においても，食塩を含まず，中性～微酸性の条件ではスターター乳酸菌種である*Lactococcus lactis*と近縁な株のみが分離され，好塩性・好アルカリ性乳酸菌は同一のチーズ中に10^{10} CFU/g存在するにも関わらず，一般的な乳酸菌の分離条件では全く分離されなかった（Table 4）．さらに，白カビ熟成チーズに対し同様の検討を行った結果，好塩性乳酸菌の*Teragenococcus*属が主要な乳酸菌相として，食塩含有，中性～アルカリ性の条件でのみ分離され，さらにこれまでチーズからの分離例が殆どない耐塩性の乳酸菌の*Vagococcus*属がアルカリ性の条件で分離されてきている．これは，チーズ中の乳酸菌相を培養法で解析する場合，食塩非含有かつ中性～微酸性の条件を与えた一般的な乳酸菌の分離のみでは実際の乳酸菌相を明らかに出来ないことを示す結果と考えられる．特に好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離には食塩含有，アルカリ性の分離条件を与えることの必要性を示す結果であり，このことが，これまでのチーズからの乳酸菌分離において*Marinilactibacillus*属や*Alkalibacterium*属などの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の存在が見落とされてきた理由の一つと考えられる．加えて，食塩，pHを組み合わせた分離は好塩性・好アルカリ性乳酸菌に限らず，チーズの乳酸菌相の解明に有効な手法の一つと考えられる．

本研究によって好塩性・好アルカリ性乳酸菌が幅広いカテゴリーのチーズに存在することが明らかになったが，これらがチーズの品質に及ぼす影響については明らかになっておらず，今後検討すべき大きな課題である．*Marinilactibacillus*属および*Alkalibacterium*属の分離株は耐酸性が低いため，チーズ製造過程において原料乳のpHが一般にpH 4近くまで低下する凝乳，成形過程では増殖，生育は不可能と考えられる．しかし，多くの熟成チーズは熟成後にはpHが中性—弱アルカリ性となることや，分離株が耐冷性であり，一般的なチーズの熟成温度である7－15℃といった低温環境下で生育可能であることから，分離された好塩性・好アルカリ性乳酸菌群はチーズの熟成過程で増殖したものと推察される．さらに，殺菌済み市販白カビ熟成チーズに*Marinilactibacillus*属分離株を添加し，低温条件で保存したときの生菌数は保存後21日後で$10^{7}-10^{8}$ CFU/gと比較的高い生菌数を維持し，チーズ中のジアセチル含量の増加が確認された（詳細は割愛）．また，分離株はアンモニア生成能やミルクカゼイン分解能を有することなどから，好塩性・好アルカリ性乳酸菌はチーズの熟成に関与している可能性が考えられる．しかし，その関与を明確にするには今後，チーズ製造過程における好塩性・好アルカリ性乳酸菌の消長やチーズ熟成時の成分変化を詳細に検討する必要があるものと考えられる．

これまで主に海洋環境より分離されてきた好塩性・好アルカリ性乳酸菌と同一種，あるいは類縁の乳酸菌がチーズから分離されてきた理由については生物の進化や伝播を考える上で非常に興味深い点である．熟成チーズの細菌相について，Bockelmann *et al.*（2005），およびMounier *et al.*（2005）は細菌熟成チーズの表層に*Halomonas*属などの海洋細菌が存在していることを明らかにしており，これらは成形したチーズを浸漬する冷食塩水を生息場所とし，使用された食塩に由来する可能性を論じている．このことと，本研究において海水天日塩から海洋環境より分離された*A. putridalgicola*と同

一種や牡蠣の塩辛などの魚介類の塩蔵発酵食品から *Marinilactibacillus* 属　好塩性・好アルカリ性乳酸菌が分離されたことを考慮すると，チーズから分離された好塩性・好アルカリ性乳酸菌は海洋環境から塩に付着した後，有機栄養分，食塩濃度，熟成期の pH といった点でチーズを生育に適した環境として増殖した可能性も考えられる．一方，好塩性・好アルカリ性乳酸菌はアルカリ性の食用オリーブ洗浄水や発酵したインディゴ，さらにアフリカ大陸内陸部のソーダ湖などからも分離報告があり（Mwirichia *et al.*, 2010），好塩性・好アルカリ性乳酸菌がどのように様々な環境に伝播したのかについては，今後，更なる検討が必要と考えられる．

好塩性・好アルカリ性乳酸菌の存在は先に述べたように海洋環境に分離源を求めたことから，その存在や分類学的性状が明らかになってきた．また，海洋以外の環境では強アルカリ環境などから分離される．そのため，我々はこれらの乳酸菌を海洋環境や極限環境に存在する非典型的な乳酸菌と捉えることが妥当と考えてきた．しかし，本研究により好塩性・好アルカリ性乳酸菌はチーズをはじめとする発酵食品から分離され，我々の身近な環境に広く存在していることが明らかになってきた．これまで，食品中から好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離の報告が殆どなかった理由については，我々研究者が典型的な乳酸菌の生育条件を考慮した分離に注力してきたため，このような性状をもつ乳酸菌の存在を見逃してきたことが一つの理由と考えられる．本研究で分離試料としたチーズの食塩濃度，pH は必ずしも好塩性・好アルカリ乳酸菌の生育至適域とは合致していない．このことは好塩性・好アルカリ性乳酸菌が生育し得る微環境がチーズの中に存在することを意味し，その分離には典型的な乳酸菌とは異なる分離条件を与える必要があるものと考えられる．さらに好塩性・好アルカリ性乳酸菌はチーズをの熟成など，食品製造で何らかの役割を果たしている可能性も考えられるため，今後，これらの乳酸菌が食品製造上で果たす役割や食品に及ぼす影響を明らかにしていくことは，食品製造における微生物管理の観点からも重要なテーマになっていくものと考えられる．

要　約

現在報告されている乳酸菌の殆どは食塩非含有，中性～微酸性条件を至適域として生育し，好塩性，好アルカリ性の乳酸菌の分離報告例は僅かである．これらは主に海洋環境から分離されており，我々は *Marinilactibacillus* 属，*Halolactibacillus* 属，*Alkalibacterium* 属の新種を報告している．これらの乳酸菌は海水の影響を受けた分離源の pH，塩濃度を考慮して設定した NaCl 7%，pH 9.5～10 という通常，乳酸菌分離には用いられない条件で分離されている．また，この条件で熟成チーズから乳酸菌の分離を行い，上述の海洋環境からの乳酸菌と同一種，或いは系統的に近縁な株が一部のチーズの主要な乳酸菌相を構成し，好塩性，好アルカリ性乳酸菌がチーズの熟成に関与している可能性を明らにしている．このように，好塩性，好アルカリ性の乳酸菌は海洋環境など一部の環境のみならず我々の身近な環境にも存在することが明らかとなってきており，これらは未知の菌種も含め，多様な分類群を構成し，種々の環境に存在している可能性が考えられる．そこで本研究では，好塩性・好アルカリ性の乳酸菌の分離を行い，その分離源および分類群の多様性，系統分類学的性質を明らかにすることを目的とした．

ヨーロッパ原産の各種チーズ，海水天日塩，各種塩蔵発酵食品を分離試料とし，食塩含有，アルカリ性の分離条件で直接平板培養および集積培養により好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離を試みた，直接平板分離を行った試料については生菌数の測定を行い，分離株については純化後，16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析によるグルーピングに基づき選定した乳酸菌供試菌株について，生理・生化学的諸性質，化学分類学的性質の検討を行った．

食塩濃度7%，pH 9 の条件で分離を行った結果，原産国，製法の異なる各種チーズ，海水天日塩，牡蠣の塩辛より好塩性・好アルカリ性乳酸菌が分離された．チーズおよび牡蠣の塩辛中の生菌数は $10^{1}-10^{10}$ CFU/g であり，一部の食品では主要な乳酸菌相を構成していた．16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析の結果，殆どの分離株が海洋環境から分離された *Marinilactibacillus psychrotolerans* と同一または *Alkalibacterium* 属内で独立したクラスターを形成した．系統的に *Marinilactibacillus* 属に位置した供試株は *Marinilactibacillus psychrotolerans* と系統的に同一で，至適食塩農度2.5～5%，至適 pH 8-9 の好塩性・好アルカリ性乳酸菌であり，生理・生化学的性状は既知分離株と類似していた．また，*Alkalibacterium* 属内で独立したクラスターを形成した分離株は各種分類学的性質に基づき 2 新種を構成することを確認した．数点のチーズについて食塩濃度と pH を相互に網羅的に組みあわせた条件で分離を行ったところ，分離条件によって菌種の構成は異なっていた．食塩非含有，酸性条件下ではスターターの乳酸菌種が分離され，他の条件では *Marinilactibcillus* 属，*Enterococcus* 属，*Tetragenococcus* 属などが 10^{6}～10^{10} CFU/g で分離された．海水天日塩から分離された 4 株は DNA 相同性により，海藻より分離された好塩性・好アルカリ性乳酸菌 *Alkalibacterium*

putridalgicola と同一種と同定した．熟成チーズからもこれと近縁な株が分離されており，このような性質を有する乳酸菌は海洋環境にとどまらず，我々の身近な環境にも存在し，チーズをはじめとする発酵食品の熟成など，人間の生活に関わっている可能性が示唆され，その分離には食塩含有，アルカリ性の条件を与えることが必要と考えられた．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 石川森夫，岡本（貝沼）章子，二井大作，山里一英，小泉幸道（2009）．海水天日塩から分離した好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分類学的性状．第61回日本生物工学会大会，名古屋大学東山キャンパス（名古屋），2009年9月25日．
2) 松山未央子，石川森夫，岡本（貝沼）章子，小泉幸道（2012）．チーズからの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離と系統分類学的研究．第64回日本生物工学会大会，神戸国際会議場（神戸）2012年10月24日．

原著論文

1) Ishikawa, M., Yamasato, K., Kodama, K., Yasuda, H., Matsuyama, M., Okamoto-Kainuma, A. & Koizumi, Y. (2012). *Alkalibacterium gilvum* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterium isolated from soft- and semi-hard cheeses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press)

保存機関に寄託した菌株

本研究を通じて分離した菌株は以下の保存機関に寄託した．

（保存機関名）

独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター（JCM）

東京農業大学菌株保存室（NRIC）

Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)

（菌株名・番号）

Marinilactibacillus psychrotolerans 1AD-3 (=NRIC 0841)
Marinilactibacillus psychrotolerans 3BE-1 (=NRIC 0842)
Marinilactibacillus psychrotolerans 4AE-2 (=NRIC 0843)
Marinilactibacillus psychrotolerans 5AE-2 (=NRIC 0844)
Marinilactibacillus psychrotolerans 6BE-1 (=NRIC 0845)
Marinilactibacillus psychrotolerans 9AE-2 (=NRIC 0846)
Marinilactibacillus sp. 14BE-1 (=NRIC 0847)
Marinilactibacillus sp. 15AD-1 (=NRIC 0848)
Marinilactibacillus sp. B7-9-2 (=NRIC 0849)
Marinilactibacillus sp. B7-9-5 (=NRIC 0850)
Marinilactibacillus sp. 1-7-5 (=NRIC 0851)
Marinilactibacillus sp. 1-9-1 (=NRIC 0852)
Marinilactibacillus sp. 2-7-8 (=NRIC 0853)
Marinilactibacillus sp. 2-9-3 (=NRIC 0854)
Marinilactibacillus sp. 3-9-1 (=NRIC 0855)
Marinilactibacillus sp. 3-9-5 (=NRIC 0856)
Marinilactibacillus sp. 4-9-1 (=NRIC 0857)
Marinilactibacillus sp. 4-9-3 (=NRIC 0858)
Marinilactibacillus sp. 5-7-2 (=NRIC 0859)
Marinilactibacillus sp. 5-9-3 (=NRIC 0860)
Marinilactibacillus sp. 6-7-1 (=NRIC 0861)
Marinilactibacillus sp. 6-7-2 (=NRIC 0862)
Marinilactibacillus sp. 8-7-2 (=NRIC 0863)
Marinilactibacillus sp. 8-7-3 (=NRIC 0864)
Marinilactibacillus sp. 9-7-1 (=NRIC 0865)
Marinilactibacillus sp. 9-7-5 (=NRIC 0866)
Marinilactibacillus sp. 10-9-7 (=NRIC 0867)
Marinilactibacillus sp. 10-9-10 (=NRIC 0868)
'*Alkalibacterium gilvum*' 3AD-1^T (=DSM 25751^T =JCM 18271^T=NRIC 0870T)
'*Alkalibacterium gilvum*' 4BE-1 (=DSM 25752)
'*Alkalibacterium gilvum*' 1AD-2 (=DSM 25753=NRIC 0869)
'*Alkalibacterium gilvum*' 5AE-1 (=DSM 25754)
'*Alkalibacterium gilvum*' 15BE-3 (=DSM 25755)
'*Alkalibacterium gilvum*' 3AE-1 (=DSM 25757)
'*Alkalibacterium gilvum*' 4AD-1 (=DSM 25758)
'*Alkalibacterium gilvum*' 5AD-1 (=DSM 25759)
'*Alkalibacterium gilvum*' 5BE-1 (=DSM 25760)
Alkalibacterium sp. 9BE-1^T (=NRIC 0873^T)
Alkalibacterium putridalgicola A5-6-4 (=NRIC 0876)
Alkalibacterium putridalgicola A5-6-5 (=NRIC 0877)
Alkalibacterium putridalgicola A6-5-2 (=NRIC 0878)
Alkalibacterium putridalgicola A6-6-1 (=NRIC 0879)

謝　辞

本研究に対し，3年間にわたる助成を頂きました公益財団法人発酵研究所に深く感謝いたします．また，本研究に対して，ご指導，ご助言を賜りました東京大学，東京農業大学前教授，山里一英先生に深く感謝申し上げます．本研究の一部は東京農業大学大学院農学研究科の学生，児玉佳代（博士前期課程修了），松山未央子（博士前期課程）の両氏によりなされたものであります．また，分離株の保存機関への寄託に際し，ご対応いただきました独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター

(JCM)，東京農業大学菌株保存室（NRIC)，Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures（DSMZ）の皆様に感謝申し上げます．

文　献

Bockelmann, W., Willems, K.P., Neve, H. & Heller, K.H. (2005). Cultures for ripening of smear cheeses. Int. Dairy J. **15**: 719-732.

Cogan, T.M. & Beresford, T.P. (2002). Microbiology of hard cheeses. *In* Robinson, R.K. (ed.) Dairy Microbiology Handbook, 3rd edn.: 515-560. John Wiley and Sons, New York.

De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W.L., Reiney, F.A., Schleifer, K,-H. & Whitman, W.B. (eds.) (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edn.Vol. 3, The Firmicutes: Springer, New York.

Farkye, N.Y. & Vedamuthu, E.R. (2002). Microbiology of soft cheeses. *In* Robinson, R.K. (ed.) Dairy Microbiology Handbook, 3rd edn.: 515-560. John Wiley and Sons, New York.

Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H.E., Glaser, P. & Vallaeys, T. (2004). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. J. Appl. Microbiol. **97**: 546-556.

Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y. & Yamasato, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**: 711-720.

Ishikawa, M., Nakajima, K., Itamiya,Y., Furukawa, S., Yamamoto, Y. & Yamasato, K. (2005). *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1. Int. J Syst. Evol. Microbiol. **55**: 2427-2439.

Ishikawa, M., Kodama, K., Yasuda, H., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, Y. & Yamasato, K. (2007). Presense of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. Lett. Appl. Microbiol. **44**: 308-313.

Ishikawa, M., Tanasupawat, S., Nakajima, K., Kanamori, H., Ishizaki, S., Kodama, K., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, Y., Yamamoto, Y. & Yamasato, K. (2009). *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium putridalgicola* sp nov. and *Alkalibacterium kapii* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolates from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 1215-1226.

Ishikawa, M., Nakajima, K., Ishizaki, S., Kodama, K., Okamoto-Kainuma, K., Koizumi, Y., Yamamoto, Y. & Yamasato, K. (2011). *Alkalibacterium subtropicum* sp. nov., a slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from decaying marine algae collected at a subtropical area of Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 2996-3002.

Ishikawa, M., Yamasato, K., Kodama, K., Yasuda, H., Matsuyama, M., Okamoto-Kainuma, A. & Koizumi, Y. (2012). *Alkalibacterium gilvum* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterium isolated from soft- and semi-hard cheeses. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press)

Lee, M., Kim, M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, S.-H., Kang, M.S. & Lee, S.-Y (2005). *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. Int. J. Syst. Evol. Mocrobiol. **55**: 1409-1413.

Maoz, A., Mayr, R. & Scherer, S. (2003). Temporal stability of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 4012-4018.

Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Sherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F. & Cogan, T.M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 6489-6500.

Mwirichia, R., Muigai, A.W., Tindall, B., Boga, H.I. & Stackebrandt, E. (2010). Isolation and characterization of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenia. Extremophiles **14**: 339-348.

Nakajima, K., Hirota, K., Nodasaka, Y. & Yumoto, I. (2005). *Alkalibacterium iburiense* sp. nov., an obligate alkaliphile that reduces an indigo dye. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 1525-1530.

Ntougias, S. & Russell, N. (2001). *Alkalibacterium olivoapoviliticus* gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash-waters. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 1161-1170.

Schleifer, K.H. (1986). Gram-positive cocci. *In* Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.**2**: 999-1103. Williams and Wilkins, Baltimore.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumer, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. **28**: 2731-2739.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic. Acids Res. **24**: 4876-4882.

Toffin, L., Zink, K., Kato, C., Pignet, P., Bidault, A., Bienvenu, N., Birrien, J.-L. & Prieur, D. (2005). *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 345-351.

Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., Yokota, Y., Hoshino, T. & Nakajima, K. (2004). *Alkalibacterium psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant obligate alkaliphile that reduces indigo dye. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 2379-2383.

Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., Tokiwa, Y. & Nakajima, K. (2008). *Alkalibacterium indicireducens* sp. nov., an obligate alkaliphile that reduces indigo dye. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 901-905.

IFO Res.Commun. 26
23-37, 2012

嫌気性グラム陰性桿菌の系統分類学的研究

坂 本 光 央

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（JCM）
〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1

Phylogenetic studies of Gram-negative anaerobic rods

Mitsuo Sakamoto

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center
3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan

Multilocus sequence analysis (MLSA) was performed on species of the genus *Bacteroides*, which is one of the representative of Gram-negative anaerobic rods, to understand the relationships among the strains of similar species. Internal fragments of the genes selected, *dnaJ, gyrB, hsp60, recA, rpoB* and 16S rRNA, were amplified by direct PCR and then sequenced from 38 *Bacteroides* strains representing 35 species. Neighbor-joining (NJ), maximum-likelihood (ML), and maximum-parsimony (MP) phylogenies of the individual genes were compared. The data confirm that the potential for discrimination of *Bacteroides* species is greater using MLSA of housekeeping genes than 16S rRNA genes. Among the housekeeping genes analysed, *gyrB* gene was the most informative, followed by *dnaJ*. Analyses of concatenated sequences (4816 bp) of all six genes revealed robust phylogenetic relationships among different *Bacteroides* species when compared with the single-gene trees. NJ, ML and MP trees were very similar, and almost fully resolved relationships of *Bacteroides* species were obtained, to our knowledge for the first time. Ten distinct clades were recognized using the SplitsTree4 program. For the genus *Bacteroides*, we can define species as a group of strains that share at least 97.5% gene sequence similarity based on the fragments of five protein-coding housekeeping genes and 16S rRNA gene. This study demonstrates that MLSA of housekeeping genes is a valuable alternative technique for the identification and classification of species of the genus *Bacteroides*.

Key words: MLSA, *Bacteroides, dnaJ, gyrB, hsp60*

緒　言

嫌気性グラム陰性桿菌，特に *Bacteroides* 属は，ヒトおよび動物の腸管内の常在菌として多数棲息しており，また時としてヒトおよび動物に様々な疾患を起こさせる菌種を含み臨床細菌学上重要な細菌群である．従来，形態学的特徴や生理・生化学的性質に基づいてその分類が行われ，また1980年代初めまでは本属の定義が曖昧であったため，*Fusobacterium* 属あるいは *Leptotrichia* 属に分類できない偏性嫌気性，無芽胞性のグラム陰性桿菌のほとんどが *Bacteroides* 属に分類されていた（Holdeman *et al.*, 1984; Moore *et al.*, 1985）．その後，Shah & Collins（1989）によって *Bacteroides* 属の記載が修正され，*Bacteroides* 属は基準種 *B. fragilis* とその類縁種である *B. caccae, B. distasonis, B. eggerthii, B. merdae, B. ovatus, B. stercoris, B. thetaiotaomicron, B. uniformis* および *B. vulgatus* に限定された（狭義の *Bacteroides* 属）．また多くの菌種が本属から *Porphyromonas* 属（Shah & Collins, 1988）および *Prevotella* 属（Shah & Collins, 1990）へと移籍された（詳細は総説（坂本，2007）を参考にされたい）．細菌の分類に16S rRNA遺伝子配列の比較という手法が本格的に導入されていなかった当時，前述の新属は，主に終末代謝産物，DNAのG+C mol%，各種脱水素酵素（グルコース-6-リン酸脱水素酵素，6-ホスホグルコン酸脱水素酵素，リンゴ酸脱水素酵素およびグルタミン酸脱水素酵素）の有無，菌体脂肪酸組成およ

E-mail: sakamoto@jcm.riken.jp

びメナキノン組成などの違いに基づいて創設された.

近年になって漸く16S rRNA遺伝子配列に基づいて嫌気性グラム陰性桿菌の分類体系が見直されてきた.本研究では,16S rRNA遺伝子だけでなく,その他多くの遺伝子(ハウスキーピング遺伝子)を使用した多遺伝子座配列解析(Multilocus sequence analysis: MLSA)という手法を用いて,*Bacteroides*属およびその類縁細菌群の分類体系を再構築することを目的とした.

実験方法

供試菌株　*Bacteroides*属を中心に10属(*Bacteroides*属38種42株, *Barnesiella*属2種2株, *Butyricimonas*属2種2株, *Odoribacter*属2種2株, *Parabacteroides*属5種5株, *Paraprevotella*属2種2株, *Porphyromonas*属17種18株, *Prevotella*属38種48株, *Tannerella*属1種1株および*Xylanibacter*属1種2株)108種124株を供試した(Table 1).各菌株はJCMオンラインカタログに指定されている培地(主にEG寒天培地)および培養温度で培養した.

MLSAの対象遺伝子および遺伝子配列解析　*dnaJ*, *gyrB*, *hsp60*, *recA*および*rpoB*遺伝子の5つのハウスキーピング遺伝子とともに,16S rRNA遺伝子を加えて解析した.MLSAは,まず初めに*Bacteroides*属を対象とした.

細菌の染色体DNAはHigh Pure PCR Template Preparation Kit(Roche)を用いて抽出・精製し,この50 ngのDNAをPCR増幅の鋳型として供試した.各プライマーの塩基配列と会合温度はTable 2に示した.PCR増幅産物は1.5%アガロースゲル電気泳動に供試し,単一バンドであることを確認した後,UltraClean PCR Clean-up DNA Purification Kit(MO BIO)を用いて精製した.シークエンス反応はBig Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequence Kit(Applied Biosystems)を用いて行ない,ABI 3130xl(Applied Biosystems)により塩基配列を決定した.

分子系統解析　得られた塩基配列はClustal X version 2.0(Larkin *et al.*, 2007)を用いてアライメントした後,必要に応じて手動による修正を行った.得られたデータセットを基に,近隣結合法(Neighbor-joining method: NJ法)(Saitou & Nei, 1987)により系統樹を作成した.枝の信頼性を検定するため,ブートストラップ検定(Felsenstein, 1985)を行い,ランダムサンプリングは1,000回反復した.また,MEGA version 4.0(Tamura *et al.*, 2007)を用いて最大節約法(Maximum-parsimony method: MP法)およびPhyML version 3.0(Guindon & Gascuel, 2003)を用いて最尤法(Maximum-likelihood method: ML法)による系統樹も作成した.ML解析を行う際には,jModelTest 0.1.1(Posada, 2008)により,モデルテストを行い.赤池情報基準(Akaike information criterion: AIC)を使用して最適なモデルを選択した.

遺伝子間の整合性は,CONSEL 0.1i(Shimodaira & Hasegawa, 2001)によりSHテスト(Shimodaira-Hasegawa Test, Shimodaira & Hasegawa, 1999)およびAUテスト(Approximately Unbiased Test, Shimodaira, 2002)を行い,検定した.

スプリット分解解析(Split decomposition analysis)はSplitsTree4プログラム(Huson & Bryant, 2006)により網状図の再構成を行った.アライメントした各遺伝子の塩基配列を結合してプログラムに入力し,Jukes-Cantor補正を行った後,網状図(neighbor net)として示した.

微生物株の表現形質　新規微生物株および既存菌株の生理・生化学試験はAPI 20A anaerobe test kitおよびRapid ID 32A anaerobe identification kit(bioMérieux)を用いて行った.また,代謝産物の測定はHoldeman *et al.*(1977)の方法に従って行った.

菌体脂肪酸組成およびメナキノン組成　菌体脂肪酸組成はSakamoto *et al.*(2002)に,また,メナキノン組成はKomagata & Suzuki(1987)の方法に従って行った.

G+C含量測定とDNA-DNA相同性試験　G+C含量の測定はTamaoka & Komagata(1984)の方法に従い,また,DNA-DNA相同性試験は,フォトビオチンを用いたマイクロプレート法(Ezaki *et al.*, 1989)によって行った.

結果と考察

嫌気性グラム陰性桿菌の分類における*hsp60*遺伝子の有用性　まず初めに,*Bacteroides*属の29種の基準株を対象として*hsp60*(558 bp)および16S rRNA遺伝子(約1500 bp)の塩基配列を決定した.その結果,各菌種間の塩基配列の類似度は16S rRNA遺伝子が83.5-100%(平均90.7%)であるのに対して,*hsp60*遺伝子は72.9-100%(平均84.5%)であり,16S rRNA遺伝子で近縁な種間を*hsp60*遺伝子を用いることによって,より明確に識別が可能であることが示された.例外として,*Bacteroides pyogenes* JCM 6294^T, *Bacteroides suis* JCM 6292^{T}および*Bacteroides tectus* JCM 10003^{T}の3株は種

Table 1 Bacterial strains used in this study and their accession numbers in the databases

Genus	Species	Strain	Accession number					
			dnaJ	*gyrB*	*hsp60*	*recA*	*rpoB*	16S rRNA
Bacteroides	*B. acidifaciens*	JCM 10556^T	AB619859	AB619897	AB510667	AB619935	AB619973	AB510696
	B. barnesiae	JCM 13652^T	AB619860	AB619898	AB510668	AB619936	AB619974	AB253726
	B. caccae	JCM 9498^T	AB619861	AB619899	AB510669	AB619937	AB619975	AB510697
	B. cellulosilyticus	JCM 15632^T	AB619862	AB619900	AB510670	AB619938	AB619976	AB510698
	B. chinchillae	JCM 16497^T	AB619863	AB619901	AB547549	AB619939	AB619977	AB547636
	B. chinchillae	JCM 16498	AB619864	AB619902	AB547550	AB619940	AB619978	AB547637
	B. clarus	JCM 16067^T	AB619865	AB619903	AB547551	AB619941	AB619979	AB547638
	B. coagulans	JCM 12528^T	ND	○	AB547552	ND	ND	AB547639
	B. coprocola	JCM 12979^T	AB619866	AB619904	AB510671	AB619942	AB619980	AB200224
	B. coprophilus	JCM 13818^T	AB619867	AB619905	AB510672	AB619943	AB619981	AB260026
	B. coprosuis	JCM 13475^T	AB619868	AB619906	AB510673	AB619944	AB619982	AB510699
	B. dorei	JCM 13471^T	AB619869	AB619907	AB510674	AB619945	AB619983	AB242142
	B. eggerthii	JCM 12986^T	AB619870	AB619908	AB510675	AB619946	AB619984	AB510700
	B. faecis	JCM 16478^T	AB619871	AB619909	AB547553	AB619947	AB619985	AB547640
	B. faecis	JCM 16477	AB619872	AB619910	AB547554	AB619948	AB619986	AB547641
	B. finegoldii	JCM 13345^T	AB619873	AB619911	AB510676	AB619949	AB619987	AB222699
	B. fluxus	JCM 16101^T	AB619874	AB619912	AB547555	AB619950	AB619988	AB547642
	B. fragilis	JCM 11019^T	AB619875	AB619913	AB510677	AB619951	AB619989	AB510701
	B. fragilis	JCM 11017	AB619876	AB619914	AB542762	AB619952	AB619990	AB542764
	B. gallinarum	JCM 13658^T	AB619877	AB619915	AB510678	AB619953	AB619991	AB253732
	B. graminisolvens	JCM 15093^T	AB619878	AB619916	AB547556	AB619954	AB619992	AB547643
	B. helcogenes	JCM 6297^T	AB619879	AB619917	AB510679	AB619955	AB619993	AB510702
	B. intestinalis	JCM 13265^T	AB619880	AB619918	AB510680	AB619956	AB619994	AB214328
	B. massiliensis	JCM 13223^T	AB619881	AB619919	AB510681	AB619957	AB619995	AB510703
	B. nordii	JCM 12987^T	AB619882	AB619920	AB510682	AB619958	AB619996	AB510704
	B. oleiciplenus	JCM 16102^T	AB619883	AB619921	AB547557	AB619959	AB619997	AB547644
	B. ovatus	JCM 5824^T	AB619884	AB619922	AB510683	AB619960	AB619998	AB510705
	B. paurosaccharolyticus	JCM 15092^T	○	○	AB547558	○	○	AB547645
	B. plebeius	JCM 12973^T	AB619885	AB619923	AB510684	AB619961	AB619999	AB200217
	B. propionicifaciens	JCM 14649^T	○	○	AB510685	○	○	AB510706

Table 1 continued

Genus	Species	Strain	Accession number					
			dnaJ	*gyrB*	*hsp60*	*recA*	*rpoB*	16S rRNA
	B. propionicifaciens	JCM 14650	○	○	AB542763	○	○	AB542765
	B. pyogenes	JCM 6294^T	AB619886	AB619924	AB510686	AB619962	AB620000	AB200229
	B. rodentium	JCM 16496^T	AB619887	AB619925	AB547559	AB619963	AB620001	AB547646
	B. salanitronis	JCM 13657^T	AB619888	AB619926	AB510687	AB619964	AB620002	AB253731
	B. salyersiae	JCM 12988^T	AB619889	AB619927	AB510688	AB619965	AB620003	AB510707
	B. stercoris	JCM 9496^T	AB619890	AB619928	AB510689	AB619966	AB620004	AB510708
	B. suis	JCM 6292^T	AB619891	AB619929	AB510690	AB619967	AB620005	AB510709
	B. tectus	JCM 10003^T	AB619892	AB619930	AB510691	AB619968	AB620006	AB200228
	B. thetaiotaomicron	JCM 5827^T	AB619893	AB619931	AB510692	AB619969	AB620007	AB510710
	B. uniformis	JCM 5828^T	AB619894	AB619932	AB510693	AB619970	AB620008	AB510711
	B. vulgatus	JCM 5826^T	AB619895	AB619933	AB510694	AB619971	AB620009	AB510712
	B. xylanisolvens	JCM 15633^T	AB619896	AB619934	AB510695	AB619972	AB620010	AB510713
Barnesiella	*B. intestinihominis*	JCM 15079^T	ND	○	AB547560	○	○	AB547647
	B. viscericola	JCM 13660^T	ND	○	AB547561	○	○	AB267809
Butyricimonas	*B. synergistica*	JCM 15148^T	○	○	AB547562	○	○	AB443948
	B. virosa	JCM 15149^T	○	○	AB547563	○	○	AB443949
Odoribacter	*O. laneus*	JCM 16069^T	○	○	AB547564	○	○	AB547648
	O. splanchnicus	JCM 15291^T	○	○	AB547565	○	○	AB547649
Parabacteroides	*P. distasonis*	JCM 5825^T	○	○	AB547566	○	○	AB238922
	P. goldsteinii	JCM 13446^T	○	○	AB547567	○	○	AB547650
	P. gordonii	JCM 15724^T	○	○	AB547568	○	○	AB470343
	P. johnsonii	JCM 13406^T	○	○	AB547569	○	○	AB261128
	P. merdae	JCM 9497^T	○	○	AB547570	○	○	AB238928
Paraprevotella	*P. clara*	JCM 14859^T	○	○	AB547571	○	○	AB547651
	P. xylaniphila	JCM 14860^T	ND	○	AB547572	ND	ND	AB547652
Porphyromonas	*P. asaccharolytica*	JCM 6326^T	○	○	AB547573	○	○	AB547653
	P. bennonis	JCM 16335^T	○	○	ND	○	○	AB588020
	P. cangingivalis	JCM 15983^T	○	○	AB547574	ND	○	AB547654
	P. canoris	JCM 16132^T	○	○	AB547575	ND	○	AB525416
	P. cansulci	JCM 13913^T	ND	○	AB547576	ND	○	AB547655

Table 1 continued

Genus	Species	Strain	Accession number					
			dnaJ	*gyrB*	*hsp60*	*recA*	*rpoB*	16S rRNA
	P. catoniae	JCM 13863^T	○	○	AB547577	○	○	AB547656
	P. circumdentaria	JCM 13864^T	ND	○	AB547578	ND	○	AB547657
	P. crevioricanis	JCM 15906^T	ND	○	AB547579	ND	○	AB547658
	P. endodontalis	JCM 8526^T	○	○	AB547580	○	○	AB547659
	P. gingivalis	JCM 12257^T	○	○	AB547581	○	○	AB547660
	P. gingivalis	JCM 8525	○	○	AB547582	○	○	AB547661
	P. gingivicanis	JCM 15907^T	○	○	AB547583	○	○	AB547662
	P. gulae	JCM 13865^T	○	○	AB547584	○	○	AB547663
	P. levii	JCM 13866^T	ND	○	AB547585	ND	○	AB547664
	P. macacae	JCM 13914^T	○	○	AB547586	○	○	AB547665
	P. salivosa	JCM 15984^T	ND	○	AB547587	○	○	AB547666
	P. somerae	JCM 13867^T	ND	○	AB547588	ND	○	AB547667
	P. uenonis	JCM 13868^T	○	○	AB547589	○	○	AB547668
Prevotella	*P. albensis*	JCM 12258^T	ND	○	AB547590	○	○	AB547669
	P. amnii	JCM 14753^T	○	○	AB547591	ND	○	AB547670
	P. aurantiaca	JCM 15754^T	○	○	AB480536	ND	○	AB480534
	P. baroniae	JCM 13447^T	ND	○	AB547592	○	○	AB547671
	P. bergensis	JCM 13869^T	○	○	AB547593	○	○	AB547672
	P. bivia	JCM 6331^T	○	○	AB547594	○	○	AB547673
	P. bivia	JCM 6332	○	○	AB547595	○	○	AB547674
	P. buccae	JCM 12245^T	ND	○	AB547596	○	○	AB547675
	P. buccalis	JCM 12246^T	ND	○	AB547597	○	○	AB547676
	P. copri	JCM 13464^T	ND	○	AB547598	○	○	AB064923
	P. corporis	JCM 8529^T	○	○	AB547599	ND	○	AB547677
	P. dentalis	JCM 13448^T	ND	○	AB547600	ND	○	AB547678
	P. dentasini	JCM 15908^T	ND	○	AB547603	ND	○	AB547681
	P. denticola	JCM 13449^T	ND	○	AB547601	ND	○	AB547679
	P. denticola	JCM 8528	ND	○	AB547602	○	○	AB547680
	P. disiens	JCM 6334^T	○	○	AB547604	ND	○	AB547682
	P. disiens	JCM 6333	○	○	AB547605	ND	○	AB547683

Table 1 continued

Genus	Species	Strain	Accession number					
			dnaJ	*gyrB*	*hsp60*	*recA*	*rpoB*	16S rRNA
	P. enoeca	JCM 12259^T	ND	○	AB547606	ND	○	AB547684
	P. falsenii	JCM 15124^T	ND	○	AB480537	ND	○	AB429504
	P. histicola	JCM 15637^T	ND	○	AB547607	ND	○	AB547685
	P. intermedia	JCM 12248^T	○	○	AB547608	○	○	AB547686
	P. intermedia	JCM 11150^T	○	○	AB547609	○	○	AB547687
	P. loescheii	JCM 12249^T	ND	○	AB547610	ND	○	AB547688
	P. loscheii	JCM 8530^T	ND	○	AB547611	ND	○	AB547689
	P. maculosa	JCM 15638^T	ND	○	AB547612	ND	○	AB547690
	P. marshii	JCM 13450^T	ND	○	AB547613	ND	○	AB547691
	P. melaninogenica	JCM 6325^T	○	○	AB547615	ND	○	AB547693
	P. melaninogenica	JCM 6321	○	○	AB547616	ND	○	AB547694
	P. micans	JCM 16134^T	○	○	AB547614	ND	○	AB547692
	P. multiformis	JCM 12541^T	ND	○	AB547617	○	○	AB182483
	P. multisaccharivorax	JCM 12954^T	○	○	AB547618	ND	○	AB200414
	P. nanceiensis	JCM 15639^T	ND	○	AB547619	ND	○	AB547695
	P. nigrescens	JCM 12250^T	ND	○	AB547620	ND	○	AB547696
	P. nigrescens	JCM 6322^T	ND	○	AB547621	ND	○	AB547697
	P. oralis	JCM 12251^T	○	○	AB547622	ND	○	AB547698
	P. oris	JCM 12252^T	ND	○	AB547624	○	○	AB547700
	P. oris	JCM 8540^T	ND	○	AB547625	ND	○	AB547701
	P. oulorum	JCM 14966^T	ND	○	AB547626	ND	○	AB547702
	P. pallens	JCM 11140^T	ND	○	AB480538	○	○	AB547703
	P. paludivivens	JCM 13650^T	ND	○	AB547627	○	○	AB547704
	P. paludivivens	JCM 13651	ND	○	AB547628	○	○	AB547705
	P. pleuritidis	JCM 14110^T	ND	○	AB547629	○	○	AB278593
	P. salivae	JCM 12084^T	○	○	AB547630	ND	○	AB108826
	P. shahii	JCM 12083^T	ND	○	AB547631	○	○	AB108825
	P. stercorea	JCM 13469^T	ND	○	AB547632	ND	○	AB244774
	P. timonensis	JCM 15640^T	○	○	AB547633	○	○	AB547706
	P. veroralis	JCM 6290^T	○	○	AB547634	○	○	AB547707

Table 1 continued

Genus	Species	Strain	Accession number					
			dnaJ	*gyrB*	*hsp60*	*recA*	*rpoB*	16S rRNA
	Prevotella sp.	JCM 6330	○	○	AB547623	○	○	AB547699
Tannerella	*T. forsythia*	JCM 10827^T	○	○	AB547635	○	○	AB547708
Xylanibacter	*X. oryzae*	JCM 13648^T	○	○	AB675483	○	○	AB588018
	X. oryzae	JCM 13649	○	○	AB675484	○	○	AB588019

ND: Not determined.

○: A sequence data will be submitted for publication in a scientific journal.

Table 2 Primer sequences for the MLSA of species of the genus *Bacteroides*

Target gene	Primer	Sequence	Amplicon (bp)	Annealing temp. (°C)
dnaJ	dnaJ3F	GHDAAAAGRGAYTAYTAYGAA	927	50
	dnaJ4R	RTCDATIGTBGGIAYYTCHAC		
gyrB	UP-1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA	1200	50
	UP-2r	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT		
hsp60	H729	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGAIIIIGCIGGIGAYGGIACIACIAC	600	50
	H730	AGCGGATAACAATTTCACACAGGAYKIYKITCICCRAAICCIGGIGCYTT		
recA	recAF	GAATCITCCGGTAARACIACI	669	50
	recAR	CCAIGAICCGCTYTTYTTGAT		
rpoB	BF	CACTTGAGCAAYCGTCGTRT	358	55
	BR	CCTTCAGGAGTYTCAATNGG		

Each sequencing primer was underlined.

間の塩基配列の類似度が，16S rRNA 遺伝子では 98.7-100%（平均 99.1%），*hsp60* 遺伝子では 99.6-100%（平均 99.7%）と非常に高かった．DNA-DNA 相同性試験の結果，*B. suis* および *B. tectus* は *B. pyogenes* の異タイプ異名（heterotypic synonym）であることが明らかになった（Sakamoto *et al.*, 2010b）．

続いて，*Bacteroides* 属以外の嫌気性グラム陰性桿菌の分類における *hsp60* 遺伝子の有用性について検討を行なった．*hsp60* 遺伝子配列の各種内の類似度は，*Porphyromonas gingivalis* の 98.9%（16S rRNA 遺伝子配列では 99.7%）から *Bacteroides* 種内や *Prevotella* 種内の 100%（100%）と非常に高い類似度を示した．16S rRNA 遺伝子配列の各種間の類似度は，*Bacteroides* 属が 83.5-100%（平均 91.2%），*Barnesiella* 属が 96.3%，*Butyricimonas* 属が 94.1%，*Odoribacter* 属が 90.0%，*Parabacteroides* 属が 92.1-97.9%（94.1%），*Paraprevotella* 属が 93.8%，*Porphyromonas* 属が 84.6-99.9%（88.3%）および *Prevotella* 属が 85.6-97.8%（89.6%）であるのに対して，*hsp60* 遺伝子では *Bacteroides* 属が 71.6-100%（84.3%），*Barnesiella* 属が 84.7%，*Butyricimonas* 属が 83.5%，*Odoribacter* 属が 78.0%，*Parabacteroides* 属が 83.3-97.1%（87.9%），*Paraprevotella* 属が 97.1%，*Porphyromonas* 属が 67.3-100%（73.8%）および *Prevotella* 属が 67.9-94.4%（77.5%）であった．以上の結果より，*Bacteroides* 属以外の嫌気性グラム陰性桿菌の分類においても *hsp60* 遺伝子の有用性が明らかになった（Sakamoto & Ohkuma, 2010）．

MLSA に基づく *Bacteroides* 属の分類　各遺伝子の

種間類似度を比較したところ，*gyrB* 遺伝子が64.4-100%（平均75.6%）と最も低い種間類似度を示し，*rpoB* 遺伝子が74.0-100%（平均85.4%）と最も高かった．*gyrB* 遺伝子に次いで，*dnaJ* 遺伝子（67.9-100%：平均77.7%），*recA* 遺伝子（72.1-100%：平均80.1%）そして *hsp60* 遺伝子（72.9-100%：平均85.0%）の順に類似度は低かった．以上の結果より，*Bacteroides* 属の分類において *hsp60* 遺伝子と同様にその他のハウスキーピング遺伝子も16S rRNA遺伝子（83.5-100%：平均90.7%）と比較して有用であることが示された．

また，6つの遺伝子（*dnaJ, gyrB, hsp60, recA, rpoB* および16S rRNA）を用い，スプリット分解解析法で *Bacteroides* 属の系統を再構成した結果，明確な網状根が観察された10のクレード（Clade）が見いだされた（Fig. 1）．すなわち，*Bacteroides* 属には Coprosuis クレード（*B. coprosuis* および *B. graminisolvens*），Fragilis クレード（*B. fragilis, B. nordii* および *B. salyersiae*），Intestinalis クレード（*B. intestinalis, B. cellulosilyticus* および *B. oleiciplenus*），Ovatus クレード（*B. ovatus, B. acidifaciens, B. caccae, B. finegoldii* および *B. xylanisolvens*），Plebeius クレード（*B. plebeius, B. barnesiae, B. coprocola, B. coprophilus* および *B. salanitronis*），Pyogenes クレード（*B. pyogenes, B. suis* および *B. tectus*），Stercoris クレード（*B. stercoris, B. clarus, B. eggerthii* および *B. gallinarum*），Thetaiotaomicron クレード（*B. thetaiotaomicron* および *B. faecis*），Uniformis クレード（*B. uniformis, B. fluxus, B. helcogenes* および *B. rodentium*）および Vulgatus クレード（*B. vulgatus, B. chinchillae, B. dorei* および *B. massiliensis*）が認められた（Sakamoto & Ohkuma, 2011）．各クレードに属する種は遺伝学的や生態学的な性質が類似していた（Table 3）．特に Pyogenes クレードに属する3種は，前述のとおり，同一種と考えられ，これらの結果を基に *Bacteroides* 属における「種」とは，6つの遺伝子の塩基配列を結合した MLSA による類似度が97.5%以上を示す集団として定義することができた．

現在，*Bacteroides* 属以外の分類群についても前述の各ハウスキーピング遺伝子の塩基配列の決定を行い（Table 1），MLSA の準備を進めている．しかし，一部の分類群の特定の遺伝子，特に *Porphyromonas* 属と *Prevotella* 属の *dnaJ* および *recA* 遺伝子の PCR 増幅，そ

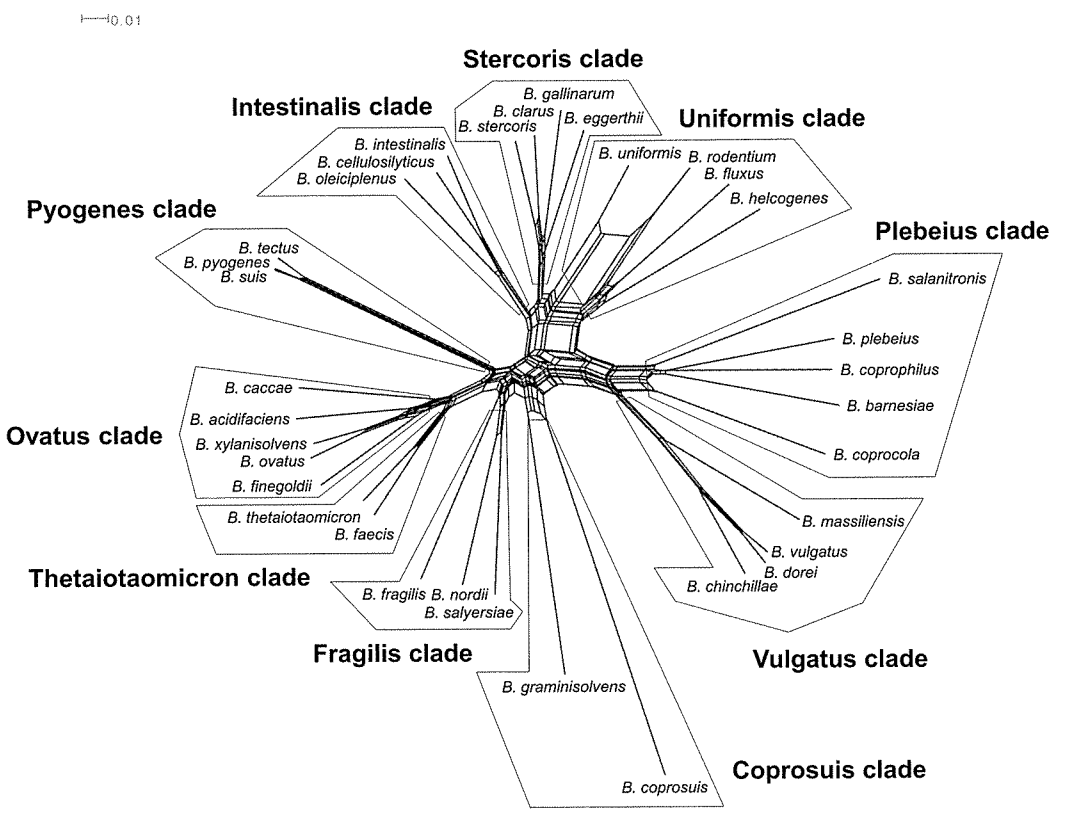


Fig. 1 Concatenated split network tree based on the six genes. The *dnaJ, gyrB, hsp60, recA, rpoB*, and 16S rRNA gene sequences (4816 bp) from 35 *Bacteroides* species were concatenated and reconstructed using the SplitsTree4 program. Sequence similarities were corrected using the Jukes-Cantor correction. Bar, 0.01 expected nucleotide substitutions per site.

Table 3 Clades proposed by means of MLSA for *Bacteroides*

Clade	Described species included	No. of species	DDH value (%)	G + C content[a] (%)	MLSA concatenated similarity (%)	Phi test[b] (*P* value)	Source
Coprosuis	*B. coprosuis* and *B. graminisolvens*	2	–	42–48	78.4	–	Rice-straw residue in a methanogenic reactor treating waste from cattle farms and swine-manure storage pit
Fragilis	*B. fragilis*, *B. nordii*, and *B. salyersiae*	3	–	47–48	85.8–88.4	–	Human clinical specimens
Intestinalis	*B. intestinalis*, *B. cellulosilyticus*, and *B. oleiciplenus*	3	<40[c]	48	89.9–93.5	–	Human feces
Ovatus	*B. ovatus*, *B. acidifaciens*, *B. caccae*, *B. finegoldii*, and *B. xylanisolvens*	5	<42[d]	48–49	89.0–95.2	3.9×10^{-5}	Human feces and mouse cecum
Plebeius	*B. plebeius*, *B. barnesiae*, *B. coprocola*, *B. coprophilus*, and *B. salanitronis*	5	–	46–53	83.7–87.8	2.7×10^{-2}	Human feces and chicken cecum
Pyogenes	*B. pyogenes*, *B. suis*, and *B. tectus*	3	>70[e]	51	97.5–100	–	Feline oral cavity and swine abscess and feces
Stercoris	*B. stercoris*, *B. clarus*, *B. eggerthii*, and *B. gallinarum*	4	–	51–53	90.1–93.5	6.5×10^{-2}	Human feces and chicken cecum
Thetaiotaomicron	*B. thetaiotaomicron* and *B. faecis*	2	<22[f]	48	93.9	–	Human feces
Uniformis	*B. uniformis*, *B. fluxus*, *B. helcogenes*, and *B. rodentium*	4	–	50–52	85.5–92.9	5.9×10^{-14}	Human feces, chinchilla feces, and swine abscess and feces
Vulgatus	*B. vulgatus*, *B. chinchillae*, *B. dorei*, and *B. massiliensis*	4	<53[g]	47–49	88.1–97.1	5.6×10^{-17}	Human feces and blood, and chinchilla feces

[a]Calculated based on the six genes.

[b]The Phi test was conducted for clades that included at least four species.

[c]Data from Robert *et al.* (2007). DNA-DNA hybridization (DDH) value between the pair *B. cellulosilyticus* and *B. intestinalis*.

[d]Data from Chassard *et al.* (2008). DDH value between the pair *B. ovatus* and *B. xylanisolvens*.

[e]Data from Sakamoto *et al.* (2010).

[f]Data from Kim *et al.* (2010).

[g]Data from Bakir *et al.* (2006). DDH value between the pair *B. dorei* and *B. vulgatus*.

して塩基配列の決定がうまくいっていない（Table 1）．このことは，言い換えれば *Bacteroides* 属と比較して，*Porphyromonas* 属と *Prevotella* 属においては *dnaJ* および *recA* 遺伝子の塩基配列が種間によって非常に多様（種間解像度が高い）であるといえる．

新種の提案　ヒトの口腔，げっ歯類（チンチラ）の糞便，シロアリの腸内から分離した嫌気性グラム陰性桿菌の同定の際に，従来の 16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析に加え，分類に有効な *hsp60* 遺伝子の塩基配列を決定し，分子系統解析を行った．その結果，明らかに既存種とは異なり，新規微生物であることが示唆されたため，常法に従い同定試験を行い，新種 *Prevotella aurantiaca*（Sakamoto *et al.*, 2010a），*Bacteroides chinchillae*（Kitahara *et al.*, 2011），*Bacteroides rodentium*（Kitahara *et al.*, 2011），*Bacteroides faecichinchillae*（Kitahara *et al.*, 2012），*Bacteroides stercorirosoris*（Kitahara *et al.*, 2012）および*Bacteroides reticulotermitis*（Sakamoto & Ohkuma, 2012d., *in press*）として提案した．

既存種の再分類　前述の *B. chinchillae* を新種として提案する過程で，Clavel *et al.*（2010）が新種 *Bacteroides sartorii* を Arch. Microbiol 誌2010年 6 月号に発表した（同年，Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 誌 7 月号の Validation List no. 134 に *B. sartorii* は掲載され，正式発表された）．一方で我々の提案した *B. chinchillae* の論文は，まず Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 誌の Papers in Press のリストに2010年 5 月21日付けで掲載され，翌年2011年の 4 月号に論文が掲載され，*B. chinchillae* は正式発表された．*B. sartorii* JCM 17136^T と *B. chinchillae* JCM 16497^T の 2 種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の類似度は 99.4% と非常に高く，同種であることが示唆された．*hsp60* 遺伝子の塩基配列を決定した結果，種間の類似度は 100% を示し（Fig. 2），DNA-DNA 相同性試験の結果，74% 以上の相同値を示した．以上の結果より，*B. chinchillae* は発表の優先権のある *B. sartorii* の異タイプ異名（heterotypic synonym）であることが明らかになった（Sakamoto & Ohkuma, 2012a）．

Porphyromonas crevioricanis（Hirasawa & Takada,

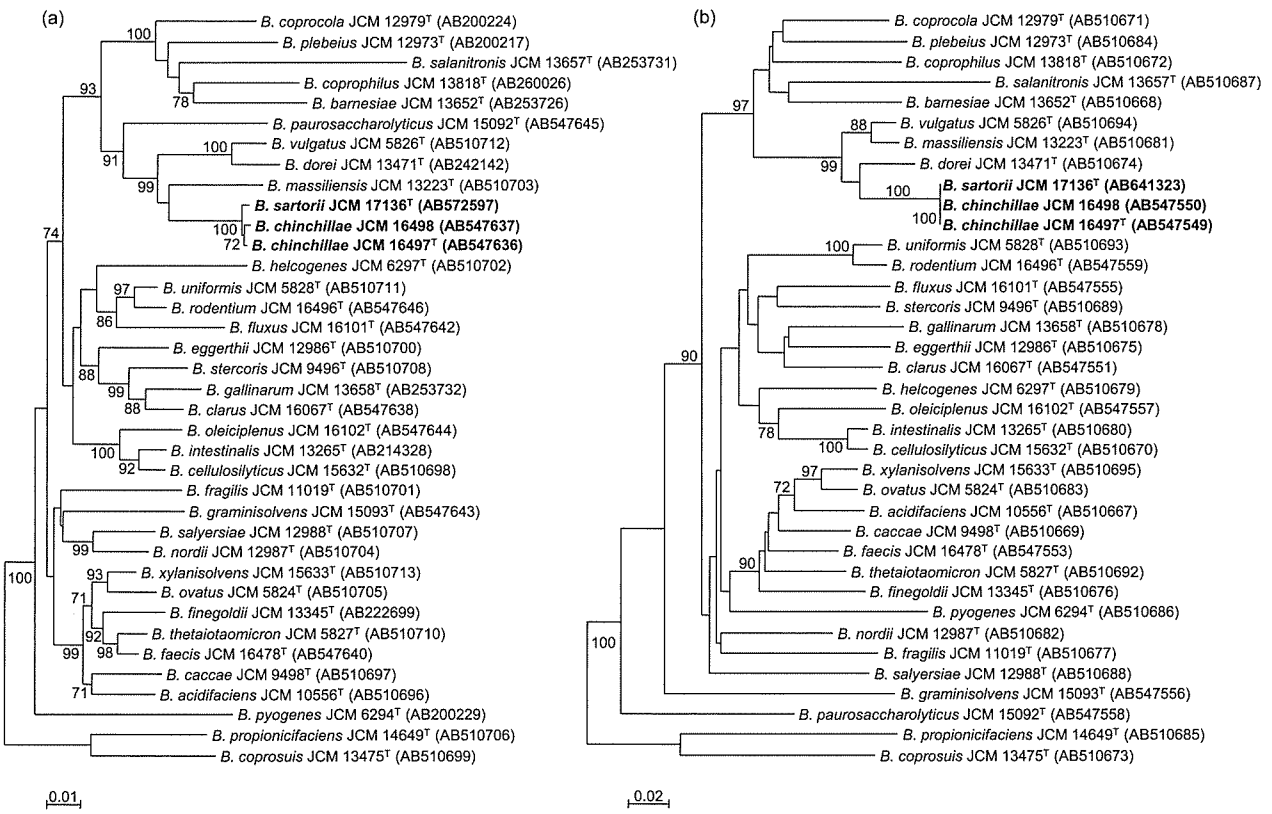


Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA (a) and *hsp60* (b) gene sequences showing the relationships between *Bacteroides sartorii* and *Bacteroides chinchillae*. The tree was constructed by the neighbor-joining method. Numbers at nodes indicate the percentage bootstrap values of 1000 replicates. Bars, 0.01 or 0.02 substitutions per nucleotide position. Accession numbers are given for each strain.

1994）と *Porphyromonas cansulci*（Collins *et al.*, 1994）の2種の16S rRNA遺伝子の塩基配列の類似度は99.9%と非常に高く，同種であることが示唆された（Sakamoto & Ohkuma, 2010）．*hsp60* 遺伝子の塩基配列を決定した結果，種間の類似度は100%を示し（Fig. 3），DNA-DNA相同性試験の結果，91%以上の相同値を示した．以上の結果より，*P. cansulci* は発表の優先権のある *P. crevioricanis* の異タイプ異名（heterotypic synonym）であることが明らかになった（Sakamoto & Ohkuma, 2012c. *in press*）．

湛水水田土壌中の植物残渣から分離された *Xylanibacter oryzae* は16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく系統解析により，*Prevotella* 属と近縁であることが報告されている（Ueki *et al.*, 2006）．我々は *X. oryzae* についてさらに詳細な系統分類学的検討を行った．*hsp60* 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果，*X. oryzae* JCM 13648^T および JCM 13649 は *Prevotella* 属に属し，*Prevotella* 属とは独立した新属新種ではないことが示唆された（Fig. 4）．系統樹推定に SH および AU テストを応用した結果，*X. oryzae* は *Prevotella* 属と単系統であり，*Prevotella* 属に属するという前述の仮説が支持された．また，*Prevotella* 属に対して報告されている16S rRNA遺伝子の塩基配列の Signature Sequence（Paster *et al.*, 1994）の全て（ポジション600:638の塩基対 U:G を除く）が *X. oryzae* の16S rRNA遺伝子の塩基配列中に認められた．以上の結果より，*Prevotella* 属の記載を修正し，*X. oryzae* を *Prevotella* 属に移して新組み合わせ *Prevotella oryzae* とすることを提案した（Sakamoto & Ohkuma, 2012b）．

以上述べたように，今後は，*Bacteroides* 属およびその類縁細菌群の分類において，ハウスキーピング遺伝子を用いた分子系統解析が益々盛んになると思われる．この件に関しては，2011年にロンドン（イギリス）で開催されたグラム陰性嫌気性桿菌国際命名小委員会の会議でも話題にあがった（Gharbia *et al.*, 2012）．また近年では，マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS）を用いた *Bacteroides* 属の分類・同定（Culebras *et al.*, 2012; Nagy *et al.*, 2009, 2011; Treviño *et al.*, 2012）も報告されており，今後，MLSAとの比較検討を行いたいと考えている．

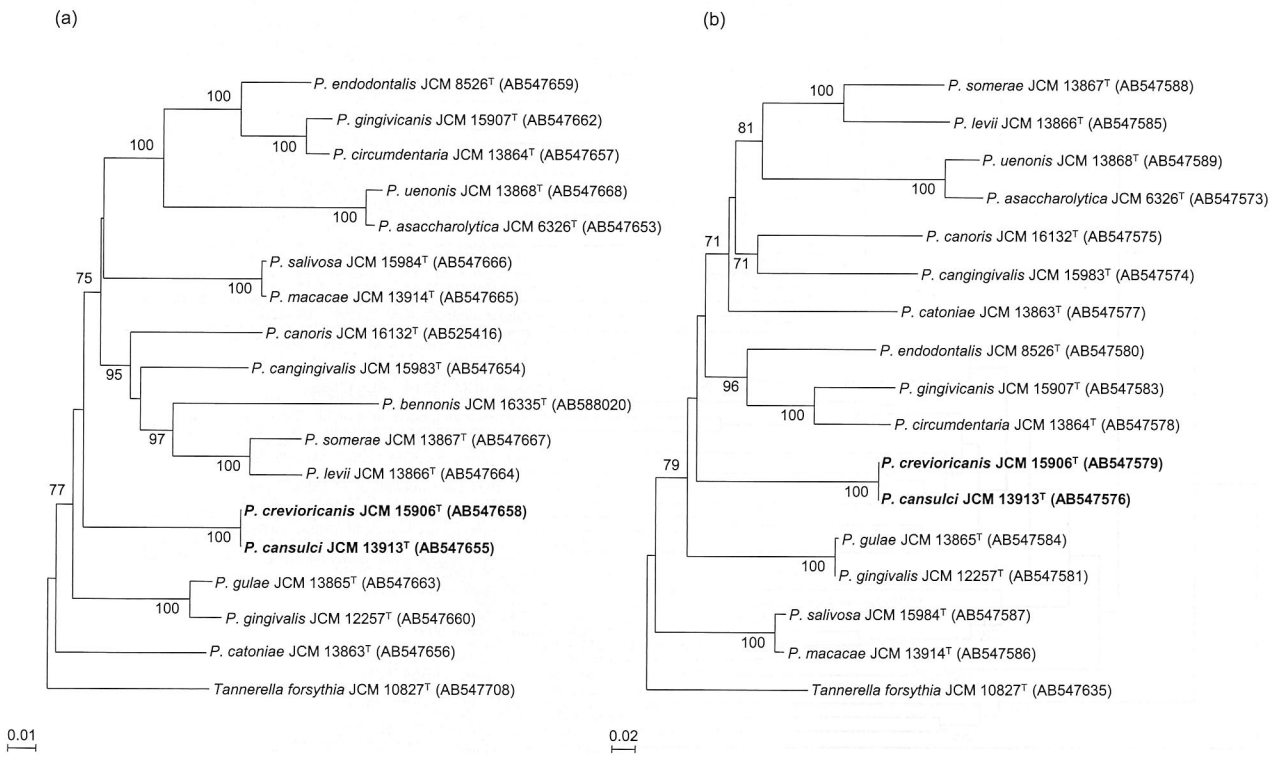


Fig. 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA (a) and *hsp60* (b) gene sequences showing the relationships between *Porphyromonas crevioricanis* and *Porphyromonas cansulci*. The tree was constructed by the neighbor-joining method. Numbers at nodes indicate the percentage bootstrap values of 1000 replicates. Bars, 0.01 or 0.02 substitutions per nucleotide position. Accession numbers are given for each strain.

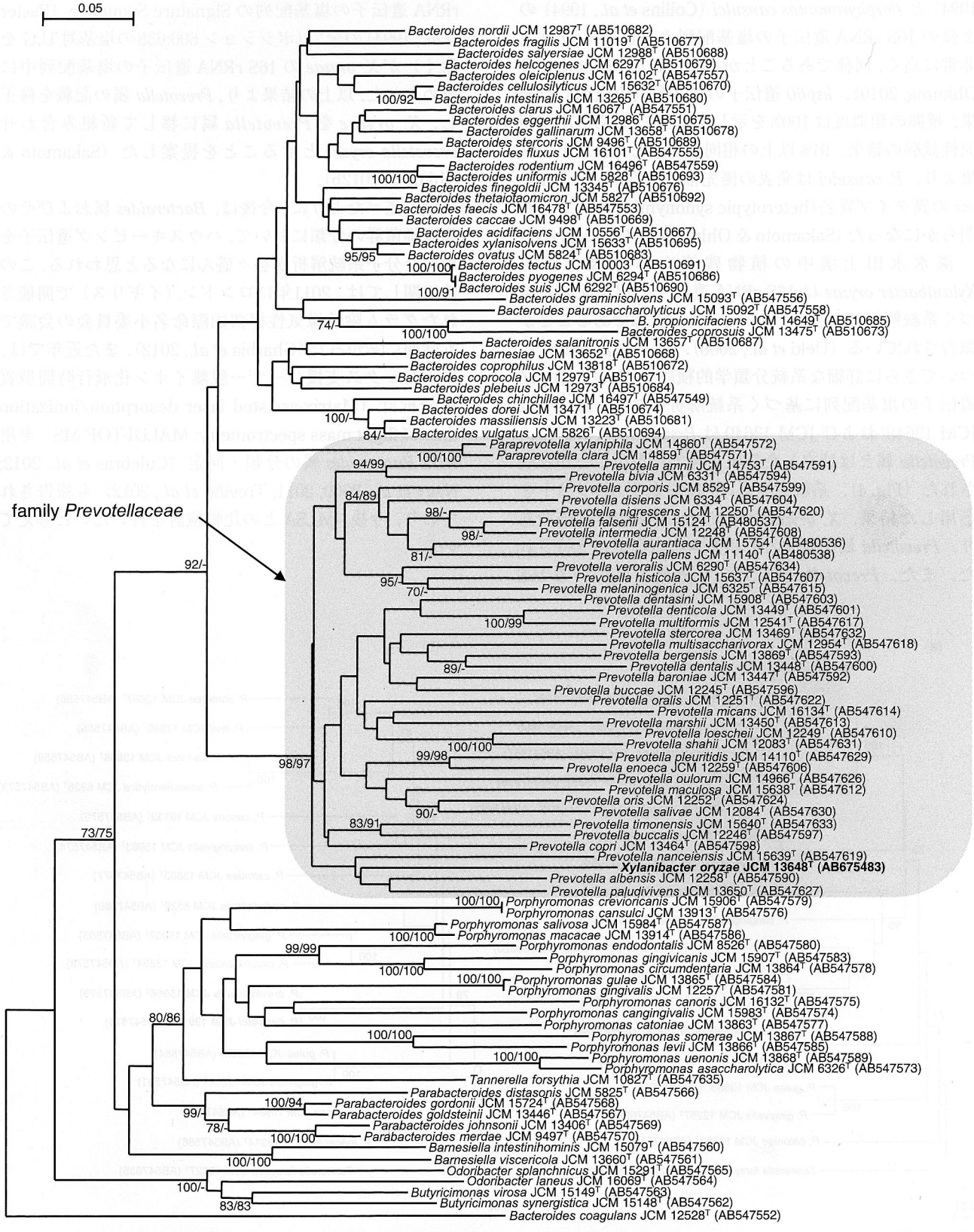


Fig. 4 Phylogenetic tree based on the *hsp60* gene sequences showing the relationships among the 107 type strains of Gram-negative anaerobic rods. The tree was constructed by the neighbor-joining method. Numbers at nodes indicate the percentage bootstrap values of 1000 replicates (>70%). Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. Accession numbers are given for each strain. Family *Prevotellaceae* is shaded. Bootstrap values from the ML analysis are shown in the right.

要　約

Bacteroides 属およびその類縁細菌群の分類体系を再構築することを目的とし，16S rRNA 遺伝子だけでなく，複数のハウスキーピング遺伝子（*dnaJ, gyrB, hsp60, recA* および *rpoB*）を用いて多遺伝子座配列解析（MLSA）を行った．6遺伝子の MLSA により，ほぼ完全な *Bacteroides* 属の種間の系統関係が初めて明らかになった．スプリット分解解析法で *Bacteroides* 属の系統を再構成した結果，10のクレードが見いだされた．各クレードに属する菌種は遺伝学的や生態学的に類似していた．*Bacteroides* 属における「種」とは，6つの遺伝子の塩基配列を結合した MLSA による類似度が97.5%以上を示す集団として定義することができた．本研究は，6遺伝子の MLSA が *Bacteroides* 属の分類のための有益な代替技術であることを示した．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 岡本正彰，坂本光央，前田伸子（2009）．口腔内から分離された *Prevotella intermedia* 様菌株について．第51回歯科基礎医学会学術大会（新潟）．
2) 坂本光央，鈴木奈津子（2009）．*Bacteroides* 属内における *hsp60* と 16S rRNA 遺伝子配列の関連について．第29回日本微生物系統分類研究会（かずさ）．
3) 坂本光央，大熊盛也（2010）．嫌気性グラム陰性桿菌の分類における *hsp60* 遺伝子の有用性．日本微生物資源学会第17回大会（岐阜）．
4) 北原真樹，土田さやか，川角浩，天尾弘実，坂本光央，辨野義己，大熊盛也（2010）．チンチラの糞便から分離された *Bacteroides* 属の新種提唱．日本微生物資源学会第17回大会（岐阜）．
5) Okamoto, M., Sakamoto, M., Suzuki, N. & Maeda, N. (2010). A new pigmented species to *Prevotella* isolated from periodontitis patient. IADR General Session, Barcelona, Spain.
6) 坂本光央（2010）．ヒト口腔細菌叢の分子生態．第52回歯科基礎医学会学術大会（東京）．
7) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2010). Usefulness of *hsp60* gene for identification and classification of Gram-negative anaerobic rods. 12th International Conference on Culture Collections, Florianópolis, Brazil.
8) Kitahara, M., Sakamoto, M., Tsuchida, S., Kawasumi, K., Amao, H., Benno, Y. & Ohkuma. M. (2010). *Bacteroides chinchillae* sp. nov. and *Bacteroides rodentium* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chincilla lanigera*) faeces. 12th International Conference on Culture Collections, Florianópolis, Brazil.
9) Sakamoto, M. (2011). The potential value of the *hsp60* gene for the identification and classification of Gram-negative anaerobic rods. Internal Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the Taxonomy of Gram-negative Anaerobic Rods, London, UK.
10) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2011). Multilocus sequence analysis (MLSA) of the genus *Bacteroides* by using the *dnaJ, gyrB, hsp60, recA, rpoB*, and 16S rRNA genes. 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, Japan.
11) Kitahara, M., Sakamoto, M., Benno, Y. & Ohkuma. M. (2011). *Bacteroides stercorirosoris* sp. nov. and *Bacteroides faecichinchillae* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, Japan.
12) Sakamoto, M. (2012). Identification and classification of the genus *Bacteroides* by multilocus sequence analysis. 第85回日本細菌学会総会（長崎）．
13) 坂本光央，大熊盛也（2012）．キシラン分解性細菌 *Xylanibacter oryzae* の再分類．日本微生物資源学会第19回大会（かずさ）．
14) 北原真樹，坂本光央，土田さやか，川角浩，天尾弘実，辨野義己，大熊盛也（2012）．チンチラの糞便から分離された *Parabacteroides* 属の新種提唱．日本微生物資源学会第19回大会（かずさ）．

原著論文

1) Sakamoto, M., Suzuki, N. & Okamoto, M. (2010). *Prevotella aurantiaca* sp. nov., isolated from the human cavity. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 500-503.
2) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2010). Usefulness of the *hsp60* gene for the identification and classification of Gram-negative anaerobic rods. J. Med. Microbiol. **59**: 1293-1302.
3) Sakamoto, M., Suzuki, N. & Benno, Y. (2010). *hsp60* and 16S rRNA gene sequence relationships among species of the genus *Bacteroides* with the finding that *Bacteroides suis* and *Bacteroides tectus* are heterotypic synonyms of *Bacteroides pyogenes*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 2984-2990.
4) Kitahara, M., Tsuchida, S., Kawasumi, K., Amao, H., Sakamoto, M., Benno, Y. & Ohkuma, M. (2011). *Bacteroides chinchillae* sp. nov. and *Bacteroides rodentium* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 877-881.
5) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2011). Identification and classification of the genus *Bacteroides* by multilocus sequence analysis. Microbiology **157**: 3388-3397.
6) Kitahara, M., Sakamoto, M., Tsuchida, S., Kawasumi, K., Amao, H., Benno, Y. & Ohkuma, M. (2012). *Bacteroides stercorirosoris* sp. nov. and *Bacteroides faecichinchillae* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 1146-1151.
7) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012). *Bacteroides sartorii* is an earlier heterotypic synonym of *Bacteroides chinchillae* and has priority. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 1241-1244.
8) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012). Reclassification of

Xylanibacter oryzae Ueki *et al.* 2006 as *Prevotella oryzae* comb. nov., with an emended description of the genus *Prevotella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 2637-2642.

9) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012). *Porphyromonas crevioricanis* is an earlier heterotypic synonym of *Porphyromonas cansulci* and has priority. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).

10) Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012). *Bacteroides reticulotermitis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite (*Reticulitermes speratus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).

保存機関に寄託した菌株

Prevotella aurantiaca OMA31^T (= JCM 15754^T = CCUG 57723^T)

Prevotella aurantiaca OMA130 (= JCM 15755)

Bacteroides chinchillae ST170^T (= JCM 16497^T = CCUG 59335^T)

Bacteroides chinchillae ST180 (= JCM 16498)

Bacteroides rodentium ST28^T (= JCM 16496^T = CCUG 59334^T)

Bacteroides faecichinchillae ST37^T (= JCM 17102^T = CCUG 60873^T)

Bacteroides stercorirosoris ST161^T (= JCM 17103^T = CCUG 60872^T)

Bacteroides stercorirosoris ST33 (= JCM 17101)

Bacteroides reticulotermitis Rs-03^T (JCM 10512^T = CCUG 62153^T)

Parabacteroides chinchillae ST166^T (JCM 17104^T = CCUG 62154^T)

謝　辞

本研究に対して3年間助成して頂いた公益財団法人発酵研究所の関係者各位に厚く御礼申し上げます. 本研究を遂行するにあたり, ご協力頂いた理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室　大熊盛也室長, 北原真樹博士, 松田美佐子さん, 鈴木奈津子さん, イノベーション推進センター辨野特別研究室　辨野義己博士に深謝いたします.

文　献

Bakir, M.A., Sakamoto, M., Kitahara, M., Matsumoto, M. & Benno, Y. (2006). *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 1639-1643.

Chassard, C., Delmas, E., Lawson, P.A. & Bernalier-Donadille, A. (2008). *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 1008-1013.

Clavel, T., Saalfrank, A., Charrier, C. & Haller, D. (2010). Isolation of bacteria from mouse caecal samples and description of *Bacteroides sartorii* sp. nov. Arch. Microbiol. **192**: 427-435.

Collins, M.D., Love, D.N., Karjalainen, J., Kanervo, A., Forsblom, B., Willems, A., Stubbs, S., Sarkiala, E., Bailey, G.D., Wigney, D.I. & Jousimies-Somer, H. (1994). Phylogenetic analysis of members of the genus *Porphyromonas* and description of *Porphyromonas cangingivalis* sp. nov. and *Porphyromonas cansulci* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 674-679.

Culebras, E., Rodríguez-Avial, I., Betriu, C., Gómez, M. & Picazo, J.J. (2012). Rapid identification of clinical isolates of *Bacteroides* species by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Anaerobe **18**: 163-165.

Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid − deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 224-229.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791.

Gharbia, S.E., Shah, H.N. & Bernard, K. (2012). International Committee on Systematics of Prokaryotes *Subcommittee on the taxonomy of Gram-negative anaerobic rods: Minutes of the open meeting, 1-2 February 2011, Health Protection Agency, London, UK. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 467-471.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. **52**: 696-704.

Hirasawa, M. & Takada, K. (1994). *Porphyromonas gingivicanis* sp. nov. and *Porphyromonas crevioricanis* sp. nov., isolated from beagles. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 637-640.

Holdeman, L.V., Cato, E.P. & Moore, W.E.C. (1977). Anaerobe Laboratory Manual, fourth edition. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia.

Holdeman, L.V., Kelley, R.W. & Moore, W.E.C. (1984). Genus I. *Bacteroides* Castellani and Chalmers 1919, 959^{AL}, *In* Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1, p. 604-631, Williams and Wilkins, Baltimore.

Huson, D.H. & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol. Biol. Evol. **23**: 254-267.

Kim, M.-S., Roh, S.W. & Bae, J.-W. (2010). *Bacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 2572-2576.

Kitahara, M., Tsuchida, S., Kawasumi, K., Amao, H., Sakamoto, M., Benno, Y. & Ohkuma, M. (2011). *Bacteroides chinchillae* sp. nov. and *Bacteroides rodentium* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. Int. J.

Syst. Evol. Microbiol. **61**: 877-881.

Kitahara, M., Sakamoto, M., Tsuchida, S., Kawasumi, K., Amao, H., Benno, Y. & Ohkuma, M. (2012). *Bacteroides stercorirosoris* sp. nov. and *Bacteroides faecichinchillae* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 1146-1151.

Komagata, K. & Suzuki, K. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. Methods Microbiol. **19**: 161-207.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics **23**: 2947-2948.

Moore, W.E.C., Cato, E.P. & Moore, L.V.H. (1985). Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the *International Journal of Systematic Bacteriology* since the 1980 Approved Lists of Bacterial Names (1 January 1980 to January 1985). Int. J. Syst. Bacteriol. **35**: 382-407.

Nagy, E., Maier, T., Urban, E., Terhes, G., Kostrzewa, M. & ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria (2009). Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Microbiol. Infect. **15**: 796-802.

Nagy, E., Becker, S., Sóki, J., Urbán, E. & Kostrzewa, M. (2011). Differentiation of division I (*cfiA*-negative) and division II (*cfiA*-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J. Med. Microbiol. **60**: 1584-1590.

Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Olsen, I. & Fraser, G.I. (1994). Phylogeny of *Bacteroides, Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. J. Bacteriol. **176**: 725-732.

Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol. Biol. Evol. **25**: 1253-1256.

Robert, C., Chassard, C., Lawson, P.A. & Bernalier-Donadille, A. (2007). *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 1516-1520.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406-425.

坂本光央 (2007). *Bacteroides* 属と類縁細菌群の分類の現状. Microbiol. Cult. Coll. **23**: 1-16.

Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2010). Usefulness of the *hsp60* gene for the identification and classification of Gram-negative anaerobic rods. J. Med. Microbiol. **59**: 1293-1302.

Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2011). Identification and classification of the genus *Bacteroides* by multilocus sequence analysis. Microbiology **157**: 3388-3397.

Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012a). *Bacteroides sartorii* is an earlier heterotypic synonym of *Bacteroides chinchillae* and has priority. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 1241-1244.

Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012b). Reclassification of *Xylanibacter oryzae* Ueki *et al.* 2006 as *Prevotella oryzae* comb. nov., with an emended description of the genus *Prevotella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **62**: 2637-2642.

Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012c). *Porphyromonas crevioricanis* is an earlier heterotypic synonym of *Porphyromonas cansulci* and has priority. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (*in press*).

Sakamoto, M. & Ohkuma, M. (2012d). *Bacteroides reticulotermitis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite (*Reticulitermes speratus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (*in press*).

Sakamoto, M., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2002). Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al.*, 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 841-849.

Sakamoto, M., Suzuki, N. & Okamoto, M. (2010a). *Prevotella aurantiaca* sp. nov., isolated from the human cavity. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 500-503.

Sakamoto, M., Suzuki, N. & Benno, Y. (2010b). *hsp60* and 16S rRNA gene sequence relationships among species of the genus *Bacteroides* with the finding that *Bacteroides suis* and *Bacteroides tectus* are heterotypic synonyms of *Bacteroides pyogenes*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 2984-2990.

Shah, H.N. & Collins, M.D. (1988). Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus, Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**: 128-131.

Shah, H.N. & Collins, M.D. (1989). Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 85-87.

Shah, H.N. & Collins, M.D. (1990). *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. Int. J. Syst. Bacteriol. **40**: 205-208.

Shimodaira, H. (2002). An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. Syst. Biol. **51**: 492-508.

Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (1999). Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. Mol. Biol. Evol. **16**: 1114-1116.

Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (2001). CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. Bioinformatics **17**: 1246-1247.

Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiol. Lett. **25**: 125-128.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. **24**: 1596-1599.

Treviño, M., Areses, P., Dolores Peñalver, M., Cortizo, S., Pardo, F., Luisa Pérez del Molino, M., García-Riestra, C., Hernández, M., Llovo, J. & Regueiro, B.J. (2012). Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group and characterization of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF. Anaerobe **18**: 37-43

Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D., Hattori, S. & Ueki, K. (2006). *Xylanibacter oryzae* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, xylanolytic bacterium isolated from rice-plant residue in flooded rice-field soil in Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 2215-2221.

IFO Res.Commun. 26
39-47, 2012

陸上温泉に分布する光合成細菌の系統分類と種分化に関する研究

春　田　　伸

首都大学東京大学院理工学研究科
〒192-0397　東京都八王子市南大沢 1-1

Phylogenetic analyses of thermophilic cyanobacteria distributed in terrestrial hot springs

Shin Haruta

Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University
1-1 Minami-Osawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

Cyanobacteria are oxygenic photosynthetic bacteria; however, some of them are designated on the basis of botanical code. It is hard to obtain the type strains of cyanobacterial species, especially thermophilic cyanobacteria, from public culture collections. In this study, I isolated thermophilic cyanobacteria from hot springs in Japan to clarify their phylogeny through molecular and physiological approaches and to determine speciation of cyanobacteria in each region.

I selected six hot springs, Onikoube (ON, Miyagi), Nakabusa (NK, Nagano), Tousenji (TS, Nara), Yunomine (YM, Wakayama), Kawayu (KW, Wakayama) and Maruo (MO, Kagoshima) in Japan. All the hot spring waters are slightly alkaline and the water temperatures were 45 to 69℃. Several strains of cyanobacteria which grew at 55℃ were isolated from each spring. Most of the isolates were unicellular and did not show nitrogen fixing ability. These Japanese isolates were related to *Synechococcus* sp. type C1 group including *Synechococcus lividus*. *Synechococcus* sp. type A/B' which predominates in North America was not observed. Phylogenetic analyses based on 16S-23S rRNA gene inter transcribed region and a photosynthesis gene (*psaA*) divided the isolates into three subtypes, 1) ON, 2) NK, TS, KW and YM, and 3) MO. This speciation seems to relate with the regional distance, although some isolates from YM and KW were clustered together with the isolates from NK. Growth properties of the isolates did not support that physicochemical parameters of the hot spring waters were the determinative factors for the speciation. The compositions of bacteria coexisting with the cyanobacterial isolates in microbial mats at each hot spring were determined by T-RFLP analysis using 16S rRNA gene fragments. Interestingly, genotypic difference among the cyanobacteria was well correlated with bacterial compositions in the mats. This possibly suggests that speciation of cyanobacteria was promoted by the coexisting heterotrophic bacteria.

In addition to the isolates described above, a multicellular type of nitrogen fixing cyanobacteria was detected from the hot springs tested in this study as a minor fraction. Molecular phylogenetic analyses indicated that these isolates belonged to the genus of *Chlorogloeopsis*, although the isolates in Japan differed from strains of *Chlorogloeopsis* sp. detected in North America and Europe in cell morphology. Regional speciation of this cyanobacterial type was negligible, *i.e.*, isolates from ON and NK hot springs were closely related each other. Nitrogen fixing ability and self-aggregation of cells may help these cyanobacteria to grow independently of other bacteria in microbial mats.

Key words: cyanobacteria, hot spring, thermophile, speciation, microbial mats

緒　言

酸素発生型の光合成細菌であるシアノバクテリアは形態による分類が先行し，生理や分子系統を反映せず包括的に命名されている例が多い．原核生物としての系統分類は発展途上にあり，分子系統解析が進んできたが，Bergey's Manual of Systematic Bacteriology においても，シアノバクテリアの分類・命名は未成熟と記述されており，属名や種形容語が厳密に定まっていないものが多数みられる（Castenholz, 2001）．近年では，培養を介さず環境 DNA を直接解析する分子生態学的解析によってシアノバクテリアの分布や多様性についても調べ

E-mail: sharuta@tmu.ac.jp

られるようになってきたが，遺伝子配列の情報だけではその生理的特性を知るに至らず，系統分類学的知見は蓄積されていない．また分離されているものでも，純粋性を強く要求しない藻類の保存機関に寄託されているものが多く，原核生物としての体系的な系統保存が進んでいない．保存されているものの多くは海洋や湖沼等から採取された中低温性菌である．好熱性種については公的な保存機関に寄託されているものはごくわずかであり，過去に寄託されていたものでも既に失われている菌株も散見される．本研究では陸上温泉から好熱性のシアノバクテリアを収集・保存し，日本列島におけるシアノバクテリアの系統や性質を明らかにするとともに，その形態，生理および各種分子マーカーを解析して系統分類を明確化することを目的とする．

さらに，生育する環境や微生物生態系に応じたシアノバクテリアの種分化を明らかにすることを第二の目的とする．環境に応じた微生物の遺伝型や性質の変化は，生態，環境，衛生，医療等，様々な研究分野で注目されている課題のひとつである（*e.g.*, Sher *et al.*, 2011; Mazard *et al.*, 2011）．陸上温泉には，シアノバクテリアを主たる一次生産者とする厚い膜状の微生物集塊（微生物マット）が発達している．湧き出た温泉水の温度は徐々に冷やされ，狭い範囲内に温度勾配に応じた微生物生態系が形成されている．一方，類似の環境でありながら，各地の温泉は地理的に隔離されている．海洋や湖のような水圏と異なり，陸上温泉の微生物マットは環境因子を比較的単純化でき，明確な地理的隔離があるため，微生物の種分化と環境要因との関係を理解するうえで，最適なモデル系である．

実験方法

温泉微生物マットの採取　2008年から2011年にかけて，次の温泉地から微生物マットを採取した．宮城県鬼首温泉（大崎市），長野県中房温泉（安曇野市），奈良県湯泉地温泉（十津川村），和歌山県湯の峰温泉（田辺市），和歌山県川湯温泉（田辺市），鹿児島県丸尾温泉（霧島市）．45℃から69℃の温泉水中に発達している緑色の微生物マットを滅菌したピンセットを用いて採取し，現地の温泉水とともに室温で実験室に持ち帰った．微生物マットを採取後，2日以内に微生物の培養を開始した．微生物マットの一部はDNAによる細菌叢解析に使用するまで，−20℃で凍結保存した．各温泉地の温泉水成分は，Papkeらの報告（Papke *et al.*, 2003）および公表されている最新の測定値を参照してTable 1にまとめた．

シアノバクテリアの培養・分離　シアノバクテリアの培養にはBG11培地を用いた．BG11培地の組成は以下の通りである．Na_2·EDTA, 1 mg/l; citric acid, 6 mg/l; $NaNO_3$, 1500 mg/l; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 40 mg/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 75 mg/l; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 36 mg/l; $Na_2CO_3 \cdot H_2O$, 20 mg/l; ferric ammonium citrate, 6 mg/l; SL-8 micronutrient solution（下記参照），1 ml; DN vitamin mix

Table 1　Physicochemical data for the hot springs sampled in Japan and Octopus Spring in USA

	Hot springs				
	OS	ON	NK	TS/YM/KW	MO
pH	8.2	8.5	8.5	7.2-8.6	8.5
Temp.	54-64°C	57-69°C	45-60°C	49-64°C	57-61°C
SH^-	<0.01 mM	<0.01 mM	0.08 mM	0.05-0.1 mM	0.06 mM
NO_3^-	6 μM	n.t.*	2 μM	1 μM	6 μM
NH_4^+	35 μM	6 μM	3 μM	20 μM	130 μM
Cl^-	8 mM	5 mM	5 mM	5 mM	35 mM
Na^+	13 mM	8 mM	3 mM	15 mM	33 mM
SiO_2	110 mg/l	150 mg/l	90 mg/l	110 mg/l	450 mg/l

OS, Octopus Spring in Yellow Stone National Park, USA; ON, Onikoube in Miyagi; NK, Nakabusa in Nagano; TS, Tousenji in Nara; YM, Yunomine in Wakayama; KW, Kawayu in Wakayama; MO, Maruo in Kagoshima.
*n.t.: not tested.

(下記参照); 1 ml. SL-8 micronutrient solution (per litter), Na_2·EDTA, 5.2 g; $FeCl_2$·$4H_2O$, 1.5 g; $ZnCl_2$, 0.07 g; $MnCl_2$·$4H_2O$, 0.1 g; H_3BO_3, 0.062 g; $CoCl_2$·$6H_2O$, 0.19 g; $CuCl_2$·$2H_2O$, 0.017 g; $NiCl_2$·$6H_2O$, 0.024 g; $NaMoO_4$·$2H_2O$, 0.036 g. DN vitamin mix (per litter), nicotinic acid, 0.1 g; *para*-aminobenzoic acid, 0.01 g; biotin, 0.001 g; thiamine, 0.200 g; cyanocobalamin, 0.001 g; folic acid, 0.001 g; *myo*-inositol, 0.001 g; calcium pantothenate, 0.1 g. pH は 8.2 に調整した.

採取した微生物マットの一部を BG11 液体培地 (綿栓をした 100-ml 容量の三角フラスコに 60 ml の培地) に接種し, 静置・光照射条件 (30-100 μmol photons m^{-2} s^{-1}; プラントルクス, 東芝), 55℃, 50℃ または 45℃ で継代培養を繰り返した. Bacto agar (Becton Dickinson) を終濃度 1% (w/v) になるよう添加した寒天平板培地を用いて同様に培養し, コロニーの純化を行った. 純化は, 顕微鏡観察および BG11 培地に有機栄養源を添加した BG11-PYG 培地 (BG11 培地に 0.5 g/l ペプトン, 0.25 g/l 酵母エキス, 0.1 g/l グルコースを含む) で他細菌が生育しないことで確認した.

分離したシアノバクテリア株は継代培養で維持するとともに, 培養液にジメチルスルホキシドを添加して −80℃ で保存した.

参照株として, "*Thermosynechococcus elongatus*" BP-1 および "*Thermosynechococcus vulcanus*" RKN を東京大学・池内昌彦博士から, *Synechococcus* sp. C1 および C9 をオレゴン大学・Castenholz 博士から提供いただき, 上記と同様に培養した.

遺伝子塩基配列解析　微生物マットおよび分離したシアノバクテリア株からの DNA 抽出には, Microbial DNA isolation kit (MO BIO laboratories) を使用した. 16S rRNA 遺伝子 (〜1,500 bp) の PCR 増幅には, 27F2, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Suzuki & Giovannoni, 1996) と 1492R2, 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane, 1991) を使用し, 16S-23S rRNA 遺伝子 ITS 領域 (〜500 bp) には, FGPS1490, 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT; FGPL132', CCGGGTTTCCCCATTCGG-3' (Laguerre *et al.*, 1996) を使用した. PCR の条件は既報に従った. またシアノバクテリアの光合成反応中心遺伝子 (*psaA*, 〜1,100 bp) の解析のため, 一部の *Prochlorococcus* 属を除く多くのシアノバクテリア由来の遺伝子を網羅するような PCR プライマーを設計した (psaA_147F, 5'-ACCACMACHTGGRTYTGG-3' と psa_1327R, 5'-RCANACCCAGTTBAGGTG-3'). 増幅した DNA 断片は精製後, BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) および Applied Biosystems 3130xl capillary sequencer を用いて解析した.

細菌のゲノムに見られる回文繰り返し配列間の長さで株ごとの違いを解析する Rep-PCR には, ERIC 1R, 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'; ERIC 2, 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' の組み合わせ, または BOX A1R, 5'-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3' を用いて PCR を行い, 生成する DNA 断片長をアガロースゲル電気泳動で解析した (Versalovic *et al.*, 1994).

微生物マットの細菌叢解析には, Terminal restriction fragment polymorphism (T-RFLP) 法を用いた. 16S rRNA 遺伝子をターゲットとする上述の 27F2 プライマーを蛍光 (FAM) 標識し, 907R2, 5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3' (Muyzer *et al.*, 1995) との組み合わせで, 微生物マットから直接抽出した DNA を鋳型として PCR を行った. 制限酵素 *Msp* I で消化した DNA 断片を Applied Biosystems 3130xl capillary sequencer で解析した.

分子系統解析　得られた遺伝子配列および GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) から入手した参照配列でデータセットを作成した. ソフトウェア MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) を用いて, アライメント (ClustalW), 系統樹を作成した (最尤法). ブートストラップ検定にはランダムサンプリングを 1,000 回反復し, ブートストラップ値を求めた.

結　果

分離株の生育特性と形態　鬼首温泉 (ON) から 9 株, 中房温泉 (NK) から 27 株, 湯泉地温泉 (TS) から 1 株, 湯の峰温泉 (YM) から 4 株, 川湯温泉 (KW) から 1 株, 丸尾温泉 (MO) から 4 株を得た. それぞれの分離株は, 採取した温泉地を表すアルファベット二文字と, 採取した場所の温度を示す数字との組み合わせで示す (例 NK55, 中房温泉の 55℃ の温泉水中に発達する微生物マット由来). 分離したシアノバクテリアはいずれも, 光独立栄養条件において, 50-55℃ で良好な生育を示した.

鬼首温泉からの 3 株 (ON57a, ON57b, ON57c) および中房温泉からの 3 株 (NK68a, NK62a, NK56a) は Fig. 1A に示すように連鎖状/糸状性の細胞形態を示したのに対し, その他はすべて単細胞性であった (Fig. 1B).

単細胞性株の系統と生理　分離した単細胞性のシアノバクテリアについて, 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定した. 株間の配列相同性は高く, 97から 100% の相同率であった. 最近縁種は過去に大分県別府温泉から分離されている "*Thermosynechococcus elongatus*" BP1 株であっ

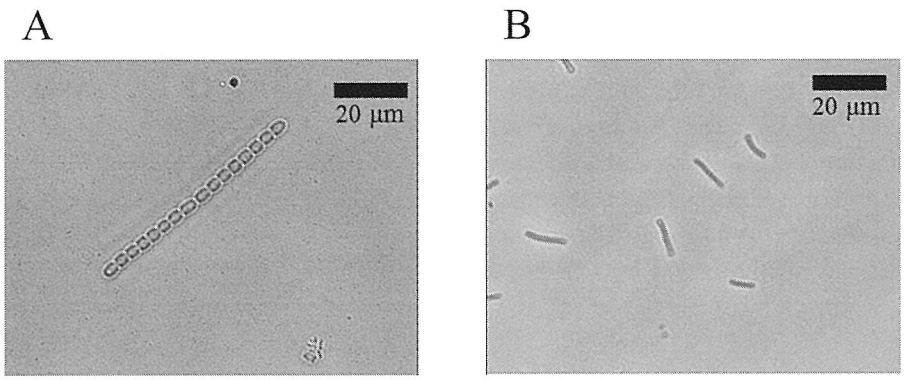


Fig. 1 Micrographs of two morphotypes of the isolates in this study. A, multicellular type (ON57a, *Chlorogloeosis* sp.); B, unicellular type (NK55a, *Synechococcus* sp.). Scale bar, 20 μm.

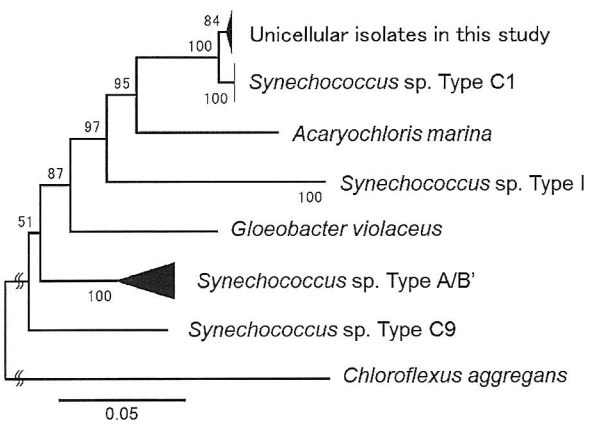


Fig. 2 Maximum likelihood phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequences of the unicellular isolates in this study and reference strains. Confidence values from 1,000 bootstrap replications that are higher given than 50% are given at branches. *Chloroflexus aggregans* was used as outgroup taxa. Bar indicates 0.05 *K*nuc in nucleotide sequences.

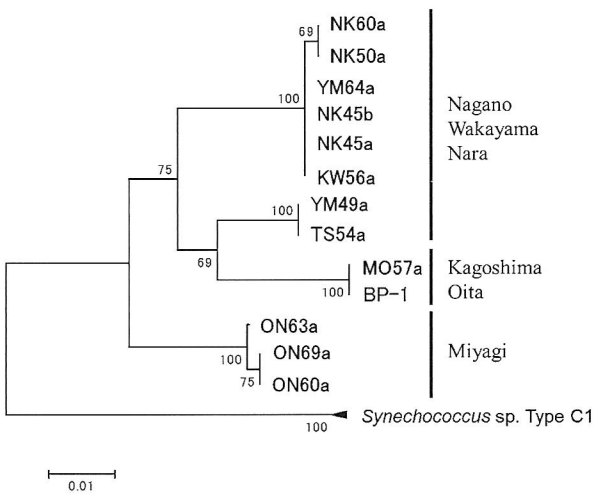


Fig. 3 Maximum likelihood phylogenetic tree derived from 16S-23S ITS region sequences of the unicellular isolates in this study and a reference strain. Confidence values from 1,000 bootstrap replications that are higher given than 50% are given at branches. Bar indicates 0.01 *K*nuc in nucleotide sequences.

た（Katoh *et al.*, 2001）．類縁菌株とともに，分子系統樹を作成した（Fig. 2）．好熱性の *Synechococcus* 属である *Synechococcus* sp. Type C1 グループと同系統と考えられた．

生育温度はどの分離株でも類似しており，また60℃を超える温度での生育は確認されていない．分離過程において細胞の運動性（走光性）が一部の株でみられたが，継代培養過程で失われた．また *Synechococcus* sp. Type C1 グループの他の株と同様に窒素固定活性は確認されなかった．

単細胞性株の地域分化　単細胞性の分離株について，16S-23S ITS 領域の塩基配列を比較したところ，16S rRNA 遺伝子と異なり，株間の違いがみられた．分子系統樹を作成すると（Fig. 3），宮城，長野/奈良/和歌山，鹿児島/大分と地域ごとに異なるクラスターを形成することが明らかとなった．特に宮城由来の株が他と大きく離れていることがわかる．またこの解析でも北米由来の株と日本の株が異なることが示された．

光合成反応中心をコードしている *psaA* 遺伝子でも解析したところ，Fig. 4 の分子系統樹が得られた．16S-23S ITS 領域の塩基配列の解析とほぼ同様に，宮城，奈

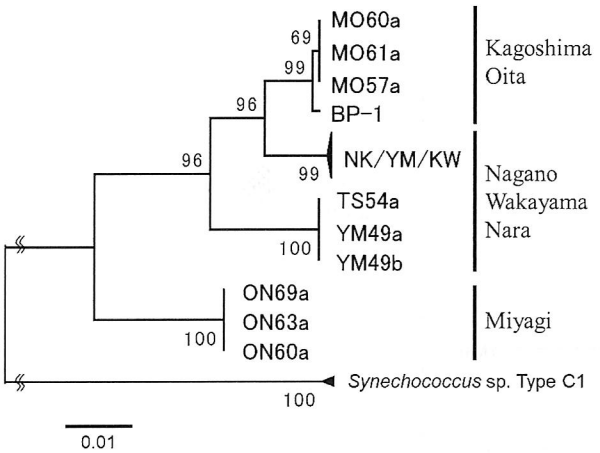


Fig. 4 Maximum likelihood phylogenetic tree derived from *psaA* gene sequences of the unicellular isolates in this study and a reference strain. Confidence values from 1,000 bootstrap replications that are higher given than 50% are given at branches. Bar indicates 0.01 *K*nuc in nucleotide sequences.

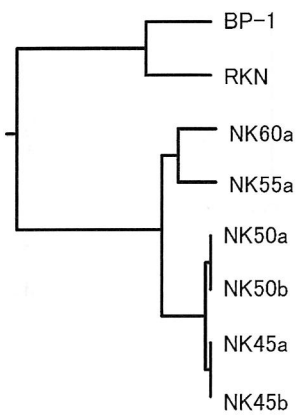


Fig. 5 UPGMA cluster analysis of Rep-PCR patterns for unicellular isolates from Nakabusa and strains (BP-1 and RKN) known as '*Thermosynechococcus*'.

良/和歌山，長野/和歌山，鹿児島/大分と地域ごとの分化を確認することができた．また結果は示さないが，チトロクロムをコードする遺伝子 *petB* でも類似の地域分化を確認している．

単細胞性株の局所的分化　長野県中房温泉由来の分離株について，Rep-PCR を行い，得られた DNA 断片パターンをクラスター解析した（Fig. 5）．45℃ 由来/50℃ 由来，55℃ 由来，60℃ 由来の分離株に分けられ，採取場所の温度に応じてゲノムタイプが異なることが示唆された．また 16S rRNA 遺伝子塩基配列は 99% の相同性を示した既報の株（BP-1 株，RKN 株）とも別グループを

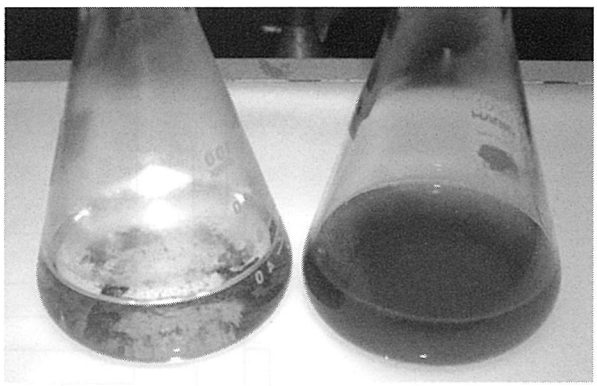


Fig. 6 Photo image of cultures of a multicellular isolate (left, ON57a, *Chlorogloeosis* sp.) and a unicellular isolate (right, NK55a, *Synechococcus* sp.).

形成していることがここでも確認された．

連鎖状株の系統と生理　連鎖状株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列について，BLAST（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/）を用いて GenBank データベースに対して相同性検索を行った．本研究で分離した株の配列は，グリーンランドの温泉に発達する微生物マットから見つかっていた配列と 99-100% 一致した．それらは *Chlorogloeopsis* 属のシアノバクテリアと考えられている（Roeselers *et al.*, 2007）．*Chlorogloeopsis* 属は *Fischerella* 属や *Mastigocladus* 属と同じくヘテロシストを形成するシアノバクテリアの系統に含まれ，ヘテロシストを形成し好気条件で窒素固定することが知られる（Castenholz, 2001）．本研究で分離した株にも窒素固定活性を確認することができた．窒素固定酵素をコードする遺伝子 *nifH* の塩基配列解析からも，この系統的位置が妥当であることを確認している（データ非掲載）．

鬼首温泉から分離した株についてゲノム解析を進めた結果，ヘテロシスト形成の誘導に必要な *hetR* 遺伝子の存在を確認している．しかし，顕微鏡観察では，明確なヘテロシスト様の細胞分化は見られず，既報の *Chlorogloeopsis* sp. と異なる点があると考えられる．

この連鎖状株は液体培養条件で細胞凝集性を示す（Fig. 6）．静置培養時だけでなく，振とう培養でも細胞凝集を形成し，その凝集体は激しい撹拌やホモジナイズでも分散せず，強固な細胞集塊と考えられる．また培養容器内壁への付着性もみられる．

連鎖状株の地域分化　宮城および長野から得られた株を比較すると，解析したどの遺伝子で比べても 98-100% の相同性を有しており，連鎖状株について遺伝型の明確な地域分化は確認されなかった．

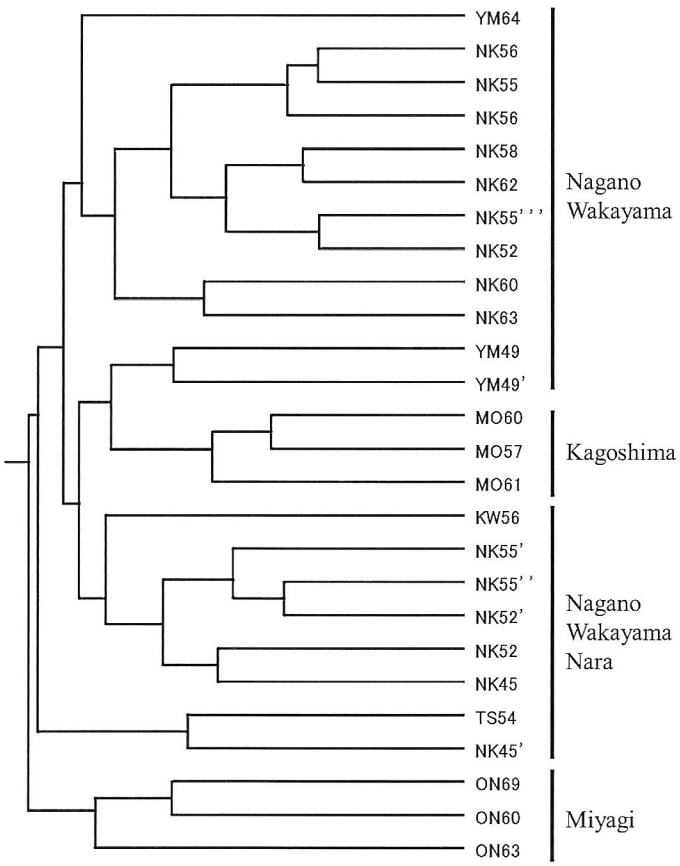


Fig. 7　UPGMA cluster analysis of T-RF patterns for microbial mats excluding T-RFs of cyanobacteria.

微生物マットの細菌叢解析　単細胞性のシアノバクテリアが検出された微生物マットから全DNAを抽出し，細菌の16S rRNA遺伝子の部分配列をPCR増幅してT-RFLP解析を行った．解析で検出されたDNA断片の種類をもとにUPGMAによるクラスター解析を行った（Fig. 7）．ただしここではシアノバクテリア由来のDNA断片は排除して解析している．宮城県鬼首温泉は他に比べ特有の細菌叢が形成されていると考えられた．また和歌山と奈良は類似するものの，長野，鹿児島と地域による違いがみられた．詳細に試料採取した長野についてみてみると，45-52℃，52-55℃，55-56℃，52-62℃，60-63℃にグループ分けされることから，採取した温度によって細菌叢が変化している傾向がみられる（Everroad *et al.*, 2012）．

考　察

これまでに別府温泉から分離されていた“*Thermosynechococcus elongatus*” BP-1株は，好熱性シアノバクテリアのモデル生物として，古くから生化学，生物物理学的な実験材料として利用されてきた．ただし，細菌分類学において本株の属名は未だ認定されておらず，保存株も微細藻類のひとつとして国立環境研究所の微生物系統保存施設に寄託されているのみである．北米等で見つかっている*Synechococcus* sp. Type C1と合わせた分類や命名の再整理が必要である．本研究で日本の複数の温泉から分離したシアノバクテリアのほとんどはBP-1株に近縁であり，このグループを特徴づけするには充分な数の培養株を得ることができた．代表株についてはNBRCに寄託しており，今後，解読したゲノム情報も併せて本系統群の分類・命名の見直しを図りたい

と考えている．

北米の温泉では窒素固定能を持つ *Synechococcus* sp. Type A/B' が微生物マットの主たる構成種として検出されるのに対し（Papke *et al.*, 2003），今回，解析した日本の温泉地では，北米での検出頻度が低い *Synechococcus* sp. Type C1 が優占化していた．Table 1 に示すように北米の温泉と比較して温泉水成分，特に窒素化合物の質や濃度に目立った違いは見られず，*Synechococcus* sp. Type A/B' が日本で見つからない環境要因は不明である．*Synechococcus* sp. Type A/B' はヘテロシストを形成できないため，光合成と窒素固定代謝を１日のなかで時間を分けて切り替えるといった代謝変化が大きい種である（Steunou *et al.*, 2006）．同じ微生物マットにいる共存細菌もこのような一次生産者の変化に適応してきた可能性も考えられる．

同じ Type C1 でも，アメリカ大陸と日本列島でみつかった株には遺伝型に違いがみられている．このことは日本列島に特有の遺伝型が分化していることを示しているが，この点についても温泉水成分や温度といった環境要因で説明するのは困難である．水素やメタン，鉄といった温泉水の微量な成分のほかに，日照，流れる温泉水の流速や微生物マットが発達している場所の水深といった酸化還元状態に影響を与える因子も検証していく必要があるだろう．一方，国内に限って遺伝型の違いをみると，宮城由来の株が他の地域由来の株と大きく異なっていた（Figs. 3, 4）．宮城では他の地域の温泉水として比較して，硫化水素濃度が低いことがその特徴として挙げられる．そこで，ON63a 株（宮城），NK55a 株（長野），YM49a 株（和歌山），MO57a 株（鹿児島）について，硫化水素存在下での生育を比較した．YM49a および MO57a が 3 mM SH^- を添加した培地でも生育するのに対し，ON63a および NK55a は 0.3 mM SH^- でもその生育は不安定になった（データ非掲載）．宮城由来の株が硫化水素耐性の低いことは理解できるが，他のシアノバクテリアが宮城に侵入できない要因は別にあるだろう．また，長野由来と和歌山由来の株の硫化水素に対する適応性の違いは，どちらの温泉も比較的高い濃度の硫化水素を含むことから，これらのシアノバクテリアの分化に温泉水中の硫化水素濃度が直接，影響したとは考えにくい．

シアノバクテリアは温泉水中に発達する微生物マットの中で多種類の細菌と共存している．そこでは物質/電子のやり取りや捕食・被食といった微生物同士の密な相互作用が観察される（Otaki *et al.*, 2012）．本研究でシアノバクテリアを採取した微生物マットについてその細菌叢を解析したところ，シアノバクテリアの遺伝型の分化と類似した地域性がみられた（Fig. 7）．この結果はシアノバクテリアが共存する従属栄養細菌と共分化していることを示唆しているのではないだろうか．実際にさまざまな組み合わせで共培養実験を試みると，長野県中房温泉から分離した従属栄養細菌は同じ温泉由来のシアノバクテリアとは共存できても，九州由来の株とは共存できない事例が観察された（未発表データ）．シアノバクテリアの光合成産物に対する利用性や従属栄養細菌による捕食から自身を守るシアノバクテリアの防衛機構といったことが，これら両者の関係性として推測される．

Fig. 5 でみたようにシアノバクテリアは同じ温泉地でも温度ごとに遺伝型が異なっていることが示唆された．ただし，採取した場所の温度と生育の温度特性に関連性は見られていない．温度低下により酸化還元電位が変化していることも予想されるが，温度に応じて共存する細菌叢も変化していることから，温度に対するシアノバクテリアの分布も上述のように共存者との相性を反映しているのかもしれない．

今回の解析では単細胞性で *Synechococcus* sp. Type C1 に属するシアノバクテリアのほかに，少数ではあるが，連鎖状の細胞形態をもつ *Chlorogloeopsis* sp. が検出された．これまで日本の温泉から *Chlorogloeopsis* sp. を検出した例はなく，初めての報告である．既報の株について遺伝子塩基配列の情報が限られているため，明確な解析はできていないが，細胞形態をみる限り，欧米で見つかっている株とは異なり，日本列島または本州に特有の種なのかもしれない．窒素飢餓に応答する *hetR* 遺伝子を持ちながら，明確なヘテロシスト様細胞に分化しない本研究の分離株は，窒素飢餓適応やヘテロシストの起源を研究していくうえで非常に興味深い生物になると考えている．この連鎖状シアノバクテリアの代表株についても，NBRC に寄託し，ゲノム解読も進んでいるため，ゲノム全体の遺伝子配列や遺伝子構造も踏まえることで，系統分類が充分とは言えない *Chlorogloeopsis* sp. およびその関連種について有用な知見を提供できると期待される．

この連鎖状株について，国内では硫化水素濃度に大きな違いがある宮城と長野でほぼ同じ遺伝型の株が得られている．好気条件でも窒素固定能を有し，栄養塩に関して独立性が高いこと，細胞集塊を形成し温泉流水中でも留まりやすいこと，などが環境に左右されずにニッチを拡大してきた要因ではないだろうか．ただし，可溶性窒素化合物が得られる環境では単細胞性の *Synechococcus* sp. 株の増殖が速いために，多くの温泉地では充分なニッチを獲得できなかったと予想される．

本研究で好熱性のシアノバクテリアの収集・保存が進んだが，系統分類を再整理するには近縁のシアノバクテリア株との生理やゲノムの比較を含め，まだ多くの情

報が必要である．系統分化の機構については，これまで環境因子を中心に議論されてきた「生態型」（エコタイプ）という考えを進め，他菌と協調しながら分化してきたと考える「群集型」（コミュニティータイプ）が存在することを提案した．群集レベルでの遺伝型を捉えながら，分離培養した個々の組み合わせ効果を解析することで，シアノバクテリアの種分化，進化や環境適応についてより深く理解できるようになるだろう．

要　約

酸素発生型の光合成細菌であるシアノバクテリアは植物としての分類が先行していたため，細菌の分類指標による系統解析が反映されずに分類・命名されている例が多い．特に好熱性種については体系的な系統保存も充分でない．本研究では陸上温泉からシアノバクテリアを収集・保存し，系統分類の明確化を目指すとともに，生態系に応じた遺伝型の分化（生態型）を明らかにすることを目的とした．

宮城県鬼首温泉，長野県中房温泉，奈良県湯泉地温泉，和歌山県湯の峰温泉，和歌山県川湯温泉，鹿児島県丸尾温泉から，温泉水中に発達する微生物集塊（微生物マット）を採取し50℃以上で生育するシアノバクテリアを分離した．どの地域からも“*Thermosynechococcus elongatus*” BP-1株（大分県別府温泉由来）に高い相同性を示す*Synechoccocus*属のシアノバクテリアが検出された．これらは国外の温泉からは見つかっていない系統群を形成し，日本の陸上温泉には日本に固有の系統が優占的に分布していると考えられた．これらの分離株はどれも単細胞性の桿菌で，細胞形態や生育特性の採取地による違いはみられていない．複数の遺伝子を用いた分子系統解析の結果，分離株は宮城，長野/奈良/和歌山，鹿児島由来の三つのグループに分けられた．この地域性には採取地の温泉水成分との明確な関連性は見出せない．地域によって微生物マットに共存する他の従属栄養細菌の構成も異なっていたため，温泉水成分や地理的な要因だけでなく，他種と協調しながら分化してきた可能性も考えられる．

鬼首温泉および中房温泉からは，連鎖状の細胞形態を示すシアノバクテリアも分離され，細胞凝集性を示す点，窒素固定能を有する点でも上述の系統群と明らかに異なっていた．遺伝子塩基配列も全く別の系統であることを示しており，これまで日本では見つかっていいなかった*Chlorogloeopsis*属であると考えられた．北米やヨーロッパの温泉にみられる既報株とは細胞形態に違いがみられ，この系統も日本で特有の分化をしてきた可能性が考えられる．ただし，国内における明確な地域性は見られなかった．これら*Chlorogloeopsis*属の分離株は，細胞の凝集性や付着性を有し，窒素固定能も持つことから，流水環境で他菌の影響を受けることなく独立して生育できるという特性が*Synechoccocus*属とは異なる様式でニッチが決定されてきたと考えられる．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) Everroad, C.R., Otaki, H., Matsuura, K. & Haruta, S. (2009). Diversification of bacterial species composition of microbial mats along a temperature gradient at a thermal spring. MSK's 50th Anniversary International Symposium on Microbiology 2009（Jeju-do, 韓国）.
2) Everroad, C.R., 大滝宏代，松浦克美，春田伸（2009）. Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. 第25回日本微生物生態学会（東広島）.
3) 春田伸，松浦克美（2011）. 陸上温泉に分布する好熱性シアノバクテリアの遺伝学的多様性. 日本農芸化学会2011年度大会（京都）.
4) Haruta, S., Otaki, H., Morohoshi, S. & Matsuura, K. (2011). Elaborate microbial ecosystems evolved in hot springs. 3rd Korea-Japan Symposium on Microbial Ecology.（Gwangju, 韓国）.
5) 春田伸，松浦克美（2011）. 陸上温泉に分布する好熱性シアノバクテリアの遺伝学的多様性と種分化. 第27回日本微生物生態学会（京都）.
6) 春田伸，大滝宏代，諸星聖，松浦克美（2012）. 微生物生態系の成立様式を電子の流れで理解する. 日本農芸化学会2012年度大会（京都）.

原著論文

1) Everroad, C.R., Otaki, H., Matsuura, K. & Haruta, S. (2012). Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. Microbes Environ. (in press).
2) Otaki, H. Everroad, C.R., Matsuura, K. & Haruta, S. (2012). Production and consumption of hydrogen in hot spring microbial mats dominated by a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium. Microbes Environ. **27**: 293-299.

保存機関に寄託した菌株

NBRC 108920 *Thermosynechococcus* sp. (class: *Cyanophyceae*)
NBRC 108921 *Chlorogloeopsis* sp. (class: *Cyanophyceae*)

謝　辞

本研究に際し，3年間の助成をいただいた公益財団法人発酵研究所に心より感謝申し上げます．また，本研究にご指導，ご助言を賜った松浦克美博士（首都大学東京），花田智博士（産業技術総合研究所，首都大学東京），池内昌彦博士（東京大学），宮下英明博士（京都大学），Richard W. Castenholz 博士 (University of Oregon)，David M. Ward 博士 (Montana State University)，Scott Miller 博士 (Montana State University)，Jim K. Fredrickson 博士 (Pacific Northwest National Laboratory)，Donald A. Bryant 博士 (The Pennsylvania State University) に厚くお礼申し上げます．最後に，試料採取に際してご協力いただいた温泉地の皆様に深く感謝いたします．

文　献

Castenholz, R.W. (2001). Phylum BX. Cyanobacteria. p. 473-599. *In* Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garity, G.M. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1. Springer, New York.

Everroad, C.R., Otaki, H., Matsuura, K. & Haruta, S. (2012). Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. Microbes Environ. in press.

Katoh, H., Itoh, S., She, J.-R. & Ikeuchi, M. (2001). Functional analysis of *psbV* and a novel c-type cytochrome gene *psbV2* of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1. Plant Cell Physiol. **42**: 599-607.

Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M.R., Charnay, M.P., Louvrier, P., Mazurier, S.I., Rigottier-Gois, L. & Amarger, N. (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 2029-2036.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-147. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acids techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.

Mazard, S., Ostrowski, M., Partensky, F. & Scanlan, D.J. (2011). Multi-locus sequence analysis, taxonomic resolution and biogeography of marine *Synechococcus*. Environ. Microbiol. **14**: 372-386.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C.O. & Jannasch, H.W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel-electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch. Microbiol. **164**: 165-172.

Otaki, H., Everroad, C.R., Matsuura, K. & Haruta, S. (2012). Production and consumption of hydrogen in hot spring microbial mats dominated by a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium. Microbes Environ. **27**: 293-299.

Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M. & Ward, D.M. (2003). Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. Environ. Microbiol. **5**: 650-659.

Roeselers, G., Norris, T.B., Castenholz, R.W., Rysgaard, S., Glud, R.N., Kuhl, M. & Muyzer, G. (2007). Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). Environ. Microbiol. **9**: 26-38.

Sher, D., Thompson, J.W., Kashtan, N., Croal, L. & Chisholm, S.W. (2011). Response of *Prochlorococcus* ecotypes to co-culture with diverse marine bacteria. ISME J. **5**: 1125-1132.

Steunou, A.-S., Bhaya, D., Bateson, M.M., Melendrez, M.C., Ward, D.M., Brecht, E., Peters, J.W., Kuhl, M. & Grossman, A.R. (2006). *In situ* analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **103**: 2398-2403.

Suzuki, M.T. & Giovannoni, S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 625-630.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. **28**: 2731-2739.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J. & Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction, Methods Mol. Cell. Biol. **5**: 25-40.

IFO Res.Commun. 26
49-60, 2012

希少海洋性アクチノバクテリアの系統保存

笠 井 宏 朗

北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所
〒022-0101 岩手県大船渡市三陸町越喜来字烏頭160-4

Genealogical preservation of rare actinobacteria isolated from marine environments

Hiroaki Kasai

Marine Biosciences Kamaishi Research Laboratory, Kitasato University
160-4 Utou, Okirai, Sanriku, Ofunato, Iwate 022-0101, Japan

The traditional impression that the diversity of actinobacteria in marine environments is poor has been completely dispelled by environmental 16S rRNA gene-based DNA studies and continuing cultivation efforts. More than half of the strains contained in the Kitasato Marine Microorganism Collection (KMMC) were derived from marine invertebrates, such as sponge, sea squirt, coral, etc., which led to the conclusions that actinobacteria are largely associated with marine sediments or exist as invertebrate symbionts, and that the planktonic lifestyle is rare. It is assumed that shallow marine sites can be dominated by strains originating from terrestrial runoff, and I found that nearly 100 of the strains in our collection (less than 10% of tested strains) are genuine marine actinobacteria requiring seawater for growth. Taxonomic analyses indicated that these strains are affiliated with new families or genera within the order *Acidimicrobidae*, and new species within the *Rhodococcus, Saccharopolyspora*, and other genera. This is the second report demonstrating the culturing of 10 of the marine *Acidimicrobidae* strains contained in our collection. All 10 of these strains grow very slowly. Strain YM16-304 requires more than one month for colony formation on agar medium. Whole genome sequencing of YM16-304 was undertaken to ascertain its physiological characteristics. The DAP (diaminopimelic acid) synthesis pathway of strain YM16-304 was the DAP aminotransferase pathway. Analyses of the enzymatic properties of the YM16-304 DAP aminotransferase pathway suggest that DAP synthesis may be insufficient to sustain rapid growth.
The KMMC was endangered by the tsunami of March 11, 2011. Several tens of thousands of strains were moved from Kamaishi to NITE (Tokyo) 2 weeks after the tsunami because they could not be preserved in a frozen state in the heavily damaged Kamaishi laboratory. A total of 13,000 representative KMMC strains were removed from the melting glycerol stocks and efforts were made to revive and preserve them. More than 70% of the rescued KMMC strains were successfully revived and preserved.

Key words: Marine actinobacteria, *Acidimicrobidae*, Genome analysis, DAP synthesis, Recovery from Tsunami damage

緒 言

海綿動物等の無脊椎動物は海水中の微生物をろ過摂食あるいは繊毛粘液摂食しており，体内に大量の微生物が存在しているという特徴を有している．我々は，海産無脊椎動物に由来する二次代謝産物の機能的多様性と体内に共存する海洋細菌の多様性（Salomon *et al.*, 2004; Fiedler *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2005）に興味を持ち，海綿動物等の無脊椎動物を分離源として，海洋微生物を分離，培養，同定，保存してきた．その結果，半数以上が海綿動物等の無脊椎動物に由来する数万株の海洋微生物から成るライブラリーを構築することができた（北里大学海洋微生物コレクション；以下，KMMC）．それらの約半数を，16S rRNA 遺伝子配列に基づいて同定したと

E-mail: hkasai@kitasato-u.ac.jp

ころ，16S rRNA遺伝子配列がデーターベースに登録されている既培養の菌株に対して，97%未満の相同性を示す新規株が約5,000株含まれていることが明らかとなった．今回，多様な二次代謝産物生産能に興味を持ち，特に*Actinobacteria*綱に分類される菌株に注目した．*Actinobacteria*綱は，*Acidimicrobidae*亜綱，*Coriobacteridae*亜綱，*Nitriliruptoridae*亜綱，*Rubrobacteridae*亜綱，*Actinobacteridae*亜綱の5つの亜綱に分類される．放線菌をはじめ数多くの分離株は*Actinobacteridae*亜綱に帰属される．土壌由来の菌株の研究が先行していたが，海洋環境からも分離例も増えてきている．しかし，*Salinispora*属のように生育に海水を要求する放線菌の系統群（Maldonado *et al.*, 2005）は必ずしも多くない．一方，他の4つの亜綱に分類される分離株は限られており，特に*Acidimicrobidae*亜綱については，嫌気性鉄酸化細菌である*Acidimicrobium ferroxidans*（Clark & Norris, 1996）が分離されていたが，それ以外の菌株についても数株が分離されていただけであった（Joseph *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2009; Kurahashi *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2009）．一方，培養を介さずに環境から調製したDNA混合液を鋳型として用いた16S rRNA遺伝子のクローン解析によって，本分類群に帰属される菌株が様々な環境に棲息していることが示唆され（Rheims *et al.*, 1996），特に，複数種の海綿動物内に，*Acidimicrobidae*に分類される細菌が優占的に存在していることが明らかとなっており，培養株の機能や性質には興味がもたれていた（Montalvo *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2008）．そこで，本事業においては，生育に海水を要求するアクチノバクテリアの中から*Acidimicrobidae*に分類される菌株に注目した．*Acidimicrobidae*に帰属する菌株は，KMMCの中に10株見いだされたが，いずれも寒天培地上あるいは液体培地中での成長が遅く，系統保存に必要な情報を入手するのが容易ではなかった．そこで，ゲノム情報から系統保存に有用な代謝系に関する情報の取得を試みた．

菌株の系統保存は，平常時はあまり重要視されない活動である．しかし，ひとたび，災害が発生し，菌株の維持が困難になると，その重要性が再認識される活動でもある．本助成期間中に，東日本大震災津波に被災し，旧株式会社海洋バイオテクノロジー研究所（以下，MBI）が，20年間にわたって国内の様々な海洋環境から収集し，2008年に北里大学に移管されたKMMCが全滅の危機に瀕した．系統保存を絶望視する声もある中，独立行政法人製品評価技術基盤機構等，国内外の様々な支援と粘り強い菌株救済活動により，約7割の菌株を再び安定的に保存することができた．

実験方法

培地及び培養方法　YM16-303株，YM16-304株の培養には，Marine broth 2216（Difco）および寒天培地を用いた．培養温度は28℃とした．海水要求性試験については，我々が保有している国内で採取し*Actinobacteria*に分類された2,904株について，Marine brtoth寒天培地に復元したのち，YEME（1% Yeast Ectract (Difco), 1% Malt extract (Difco), 3.4% sucrose)-70%人工海水寒天培地及びYEME淡水寒天培地を用いて，2週間後の生育の差異を観察した．微生物保存シート（アドバンテックに特注）を用いて保存していた菌株は，微生物保存シートの親水領域のグリッドに液体培養された菌体をスポット，3時間乾燥後，バリア性の高い袋内に脱酸素剤，乾燥材と共に密封し4℃で保存した．試験時には，角型シャーレを用いて作成した海水及び淡水培地上に，微生物保存シートを広げ，28℃での菌株の生育を2週間観察した．海水培地でのみ生育した株を海水要求株，海水淡水の両方で生育した株を海水耐性株とした．

分類学的解析　定法に則って実施した．

DNAの調製とゲノム解析　ゲノムDNAは，Genomic-tip 500/G（QIAGEN）を用いて調製した．調製したゲノムDNAは，Quant-iT DNA Assay kit（インビトロジェン）を用いて定量した．YM16-303株のドラフトゲノムシーケンスは次世代シーケンサーIllumina を用いて行い（タカラバイオ），YM16-304株の完全長ゲノムシーケンスは，Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzerを用いて（独）製品評価技術基盤機構で行った．

アノテーション　アノテーションは（独）製品評価技術基盤機構で行われた．ORFの予測には予測用プログラムGlimmerを用いた．ORFは，BLASTPの結果を参照して手動で行った．それぞれのORFはOCSSゲノムアノテーションシステムを用いて行った．相同性検索はUniprot，Interpro及びHAMAPデーターベースを用いて行い機能推定を行った．代謝経路の再構築についてはKEGGデーターベースを用いて行った．

被災菌株の復元　海洋細菌は1/5 Marine agar培地，放線菌はISP-2 / 50%人工海水培地，糸状菌はPDA / 50%人工海水培地，乳酸菌はDifco Lactobacilli MRS Broth寒天培地（Becton, Dickinson），酵母はYPD（1% Yeast extract (Difco), 2% Peptone (Difco), 2% glucose, 1.5% agar）培地，を用いて復元作業を行った．グリセロ

ールストックは既に完全に融解した状態でバイアルの底に菌体が沈殿した状態であったので，バイアルの底に沈殿した菌体をピペットマンで吸い取り，寒天培地上にスポットして培養した．培養は室温で行い，3日後，1週間後，1カ月後に生育が確認された株については，菌体をかき取って，あらかじめ500μlずつ分注した20%グリセロール溶液に懸濁して，−80℃で再凍結した．

結　果

海水要求性アクチノバクテリアの選抜

我々が保有していた国内産アクチノバクテリア2,904株について海水要求性を試験したところ，28℃で2週間の培養において，海水培地と淡水培地で顕著な生育の差が認められた株は，60株であった．微生物保存シートで保存していた株のうち，微生物保存シート5枚分に相当する480株は，5年前に作成した保存試料であったが，復元後，全てのアクチノバクテリア株の生育が確認された．このことは，微生物保存シートが，微生物ライブラリーの簡易保存法として十分に利用できることを示唆している．生育には大きな差はないが，基底菌糸の色や培地中に分泌される色素の違いなどから，海水培地と淡水培地で代謝産物が異なっていることが明らかな菌株も複数存在した．今後，これらの株については，機器分析によって，海水培地と淡水培地での代謝物のプロファイルを比較検討していく予定である．今回選抜された海水要求株を16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいて同定した．その結果をTable 1に示した．微生物保存シートを用いた試験では，*Salinispora* 属に分類される株が39株検出された（Fig. 1）．

Rhodococcus 属に帰属された海水要求性アクチノバクテリアの分類学的研究

海水要求性試験において，生育にとって海水を要求することが明らかになった株のうち，*Rhodococcus* 属に帰属された株が，13株見出された．それらを含む海洋由来 *Rhodococcus* 25株について16S rRNA遺伝子にもとづいた系統解析を行った．その結果，5つのグループに分類された．海水要求株については，DNA gyrase B（*gyrB*）遺伝子の塩基配列に基づく詳細な系統分類を行った．その結果，海水要求株とグループを形成したのは，海洋種である *Rhodococcus marinonascens*（Helmke & Weyland, 1984）であった（Fig. 2）．主要メナキノン種，細胞壁成分に基づく化学分類指標，ゲノムのG+C含量は，グループ1が，分子系統解析によって *Rhodococcus* 属に帰属されたことに矛盾しなかった．細胞形態は菌糸状で *R. marinonascens* に類似していた．0% NaCl濃度では生育

Table 1　List of marine actinobacteria requiring seawater for their growth

菌株ID	種名	相同性%	菌株ID	種名	相同性%
GX31	*Actinomadura hallensis*	99.5	LA28	*Rhodococcus wratislaviensis*	97.7
KO93	*Arthrobacter agilis*	99.6	IQ54	*Rhodococcus wratislaviensis*	97.7
IS91	*Brachybacterium squillarum*	99.3	KA17	*Rhodococcus wratislaviensis*	97.7
AB79	*Demequina salsinemoris*	98.8	LH47	*Rhodococcus wratislaviensis*	98
KS03	*Dietzia maris*	100	DU02	*Rhodococcus wratislaviensis*	98.4
ID17	*Jiangella muralis*	97.1	LA14	*Rhodococcus wratislaviensis*	98.6
U41	*Kineococcus marinus*	99.8	LA36	*Rhodococcus wratislaviensis*	98.6
KP39	*Kineococcus marinus*	100	GT61	*Rhodococcus wratislaviensis*	98.6
DU89	*Knoellia subterranea*	100	MN24	*Rhodococcus wratislaviensis*	98.6
AN52	*Knoellia subterranea*	100	ID21	*Rhodococcus wratislaviensis*	98.6
AH57	*Kocuria aegyptia*	99.6	IB72	*Rhodococcus wratislaviensis*	98.7
JD90	*Microbacterium aquimaris*	99.9	HZ62	*Saccharomonospora xinjiangensis*	98.7
HD60	*Microbacterium aquimaris*	100	HX50	*Saccharomonospora xinjiangensis*	98.7
KW46	*Micrococcus terreus*	99.8	HX82	*Saccharomonospora xinjiangensis*	98.7
LA63	*Micrococcus terreus*	99.8	T27	*Saccharomonospora xinjiangensis*	99.8
LB71	*Micromonospora carbonacea*	99.6	JS38	*Streptomyces albiaxialis*	98.7
HL61	*Micromonospora chalcea*	100	HX59	*Streptomyces angustmyceticus*	98.8
IX30	*Micromonospora marina*	100	HX51	*Streptomyces angustmyceticus*	98.9
KM95	*Mycobacterium poriferae*	98.6	IX54	*Streptomyces angustmyceticus*	98.9
KH92	*Nocardioides marinus*	98.8	IX41	*Streptomyces bambergiensis*	99.3
KT65	*Nocardioides mesophilus*	98.6	KZ68	*Streptomyces cacaoi*	99.1
MR88	*Nocardioides pyridinolyticus*	98.9	JM66	*Streptomyces coelescens*	99.7
KV40	*Nocardioides pyridinolyticus*	99.9	MN08	*Streptomyces flavovariabilis*	98.5
IN26	*Nocardiopsis lucentensis*	99.5	KQ92	*Streptomyces kurssanovii*	99.2
KO88	*Ornithinibacter aureus*	100	KA63	*Streptomyces marinus*	99.4
MW17	*Phycicoccus aerophilus*	98.4	JH17	*Streptomyces radiopugnans*	98.6
AC37	*Phycicoccus dokdonensis*	98.6	IR39	*Streptomyces sodiiphilus*	99.8
KH66	*Prauserella aidingensis*	100	KA85	*Streptomyces sulphureus*	99.8
HH10	*Rhodococcus equi*	100	KZ79	*Streptomyces xinghaiensis*	99.5
KK63	*Rhodococcus marinonascens*	97.8	HX95	*Streptomyces xinghaiensis*	99.6

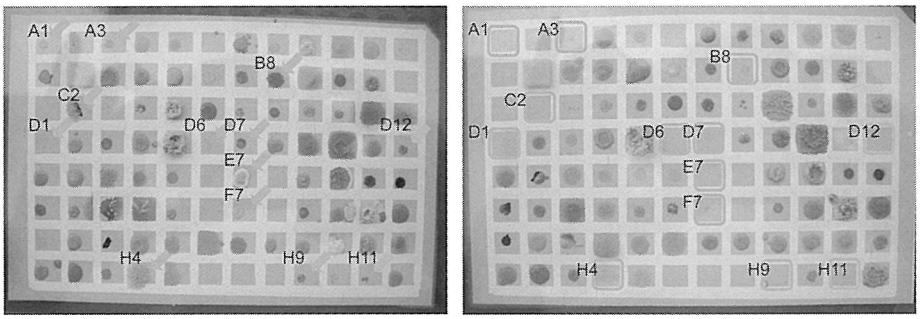


Fig. 1 Selection of seawater-requiring actinobacteria using a hydrophobic grid membrane.
Panels show bacterial strains incubated in medium containing seawater (left) or freshwater (right). Selected strains showed positive growth on seawater medium (arrows) and negative growth on freshwater medium (squares). Selected strains are: *Saccharopolyspora* sp. (A1), *Cellulomonas* sp. (D1), *Prauserella* sp. (C2), *Streptomyces* sp. (A3), *Microbacterium* sp. (D6), *Salinispora* sp. (D7), *Streptomyces* sp. (E7), *Nocardiopsis* sp. (F7), *Geodermatophilus* sp. (B8), *Salinispora* sp. (H9), *Micromonospora* sp. (H11), and *Salinispora* sp. (D12).

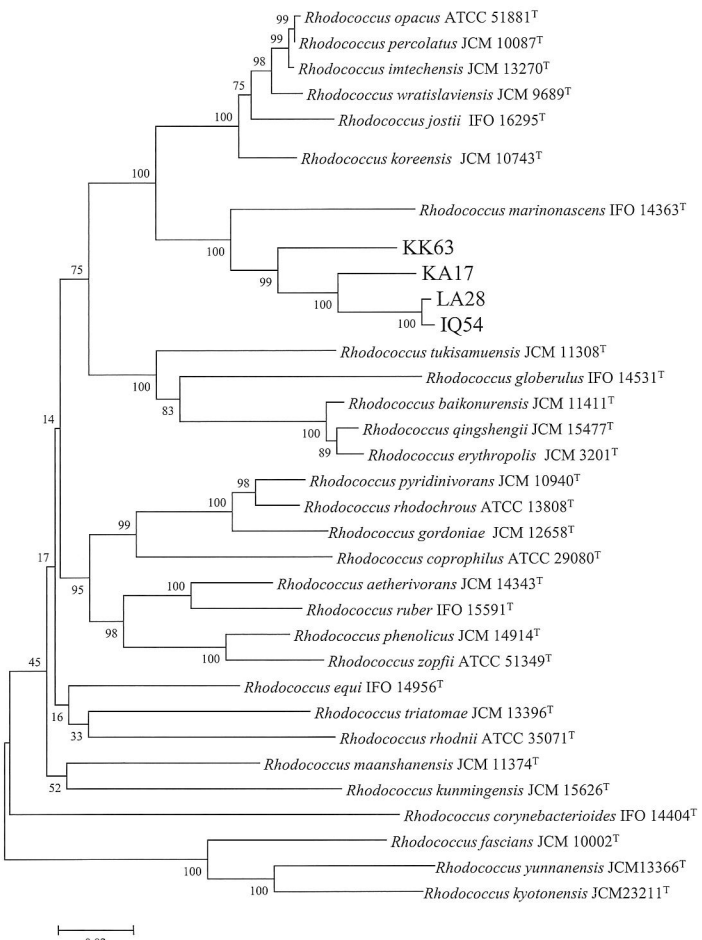


Fig. 2 Phylogenetic tree showing intra-generic relationship of strains belonging to the genus *Rhodococcus*, based on the *gyrB* gene.
Newly identified seawater-requiring rhodococci are indicated by larger font. Tree was reconstructed with the neighbor-joining method using MEGA5. Bootstrap values for 1000 replications are shown at the nodes. Scale bar: 0.02 nucleotide substitutions per site.

せず，海水程度のNaCl濃度（2－4%）が生育にとって至適NaCl濃度であった．しかし，海水要求株は，至適生育温度は25－37℃で，*R. marinonascens* と明らかに異なっていたこと，*gyrB* に基づく系統分類結果，DNA-DNAハイブリダイゼーション結果から，海水要求株が，*R. marinonascens* に続く海洋性 *Rhodococcus* として二番目に発見された種であることを示していた．海水要求株である4株はカイメンから分離された株であることから，*Rhodococcus spongiae* と命名した．

Acidimicrobidae 亜綱に分類される海水要求株のゲノム解析

KMMCにはYM16-304株をはじめ10株の *Acidimicrobidae* 亜綱に分類される細菌が含まれていた．それらの系統的類縁関係を示すため，16S rRNA遺伝子に基づく系統樹をFig. 3に示した．いずれも，生育が極めて遅く，海水要求性試験では，二カ月以上の培養によって，10株が海水要求を示すことが明らかとなった．そこで，10株の中から，島根県の海浜で採集した砂から分離されたYM16-303，YM16-304株に注目して，遅発育性と関連のあるゲノム情報を得ることを目的に，全ゲノムの塩基配列を決定した．YM16-304株は，fasmidクローンを使い完全長のゲノム塩基配列を得ることができた．4,830,181塩基対で，G+C含量が67.29%の一本の環状ゲノムを持っていた．ゲノム上には，4,292の蛋白質をコードしている遺伝子，2コピーのrRNA遺伝子と47のtRNA遺伝子が存在していた．既知の遺伝子との類似性が認められた各遺伝子について，最も類似性が高かった細菌種の系統群を調べたところ，*Actinobacteria*（55.8%），*Proteobacteria*（21.9%），*Firmicutes*（6.8%），その他の分類群（15.5%）となった．*Streptomyces* 属の株のゲノム情報で同様の解析を行うと，*Actinobacteria* 由来の遺伝子と最も高い類似性を示す遺伝子が，90%以上を占めるのに対して，YM16-304株の遺伝子は，*Actinobacteria* の遺伝子と最も高い類似性を示す遺伝子が55.8%と非常に低かったことからも，今回決定したゲノムの高い新規性を示していた．YM16-304株と同じ *Acidimicrobidae* 亜綱で唯一ゲノム解析がなされている *Acidimicrobium ferrooxidans* DSM 10331^{T}のゲノム塩基配列（Clum *et al.*, 2009）と，YM16-304株のゲノム塩基配列を，ドットプロット解析法を用いて比較した．その結果，両株のゲノム塩基配列の間に，明確な相同性を見出すことはできなかった．YM16-304株と16S rRNA遺伝子の相同性が97.7%を示したYM16-303株については，Illuminaシーケンサーを用いて，ドラフトゲノムシーケンスを行った．その結果，100塩基対以上のcontigは，399個となり，最長の

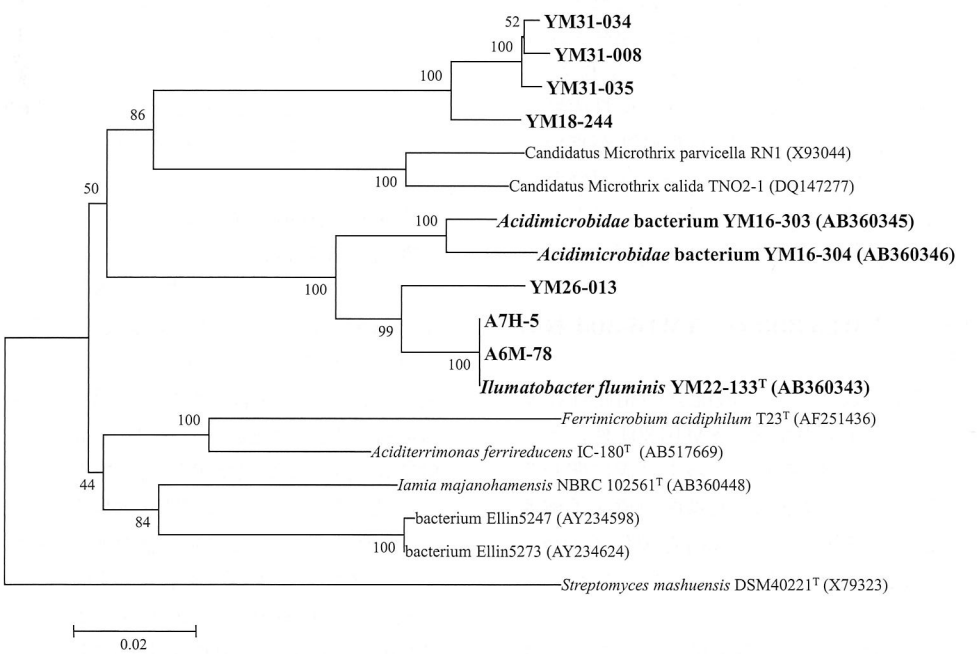


Fig. 3 Neighbor-joining tree showing the relationship between KMMC strains and other phylotypes, based on the 16S rRNA gene.
Names shown in bold indicate *Acidimicrobidae* strains contained in the KMMC. Phylogenetic analysis was performed using MEGA5. Bootstrap values for 1000 replications are shown at the nodes. Scale bar: 0.02 nucleotide substitutions per site.

contigは，94,156塩基対であった．100塩基対以上のcontigの塩基配列の総和は，4,331,932塩基対となり，YM16-304株のゲノムサイズに比較してほぼ完全長に近いと考えられるドラフトゲノムの情報が得られた．得られた塩基配列を，YM16-304株のゲノム塩基配列と比較し，相同な遺伝子の存在が確認された380個のcontigについて，YM16-304株の全ゲノム塩基配列と,ペアワイズアラインメント解析を用いて比較した．また，YM16-303とYM16-304のゲノム塩基配列の類似性を二つの手法で算出したところ，ANI（Average Nucleotide Identity）値が78.41，MUMi（Maximal Unique Matches index）値が0.910となった．これらの値は，DNA-DNA hybridizationとの相関について研究されており，DDHで種を区別する場合の目安である70%以下という値は，ANIではおおよそ95以下，MUMiではおおよそ0.33以上に対応するとされている（Konstantinidis & Tiedje, 2005; Goris *et al.*, 2007; Deloger *et al.*, 2009; Richter & Rosselló-Móra, 2009）．今回，YM16-303とYM16-304のゲノム塩基配列から算出された値は，いずれも閾値からは大きくはずれていることから，YM16-303とYM16-304は異種であるということを示唆していた．

蛋白質をコードしている1,824遺伝子については，機能推定が可能であった．その他に，520遺伝子については，何らかの蛋白質ファミリーに属していると考えられた．さらに，1,535遺伝子は，機能未知の蛋白質遺伝子に類似性が認められるhypothetical proteins，409遺伝子は，既存の遺伝子との類似性が認められないhypothetical proteinsに分類された．YM16-304株の特徴の一つである遅発育性という表現形と関連性が高いと考えられる一次代謝経路においては，一部，代謝経路の途中の酵素遺伝子が欠損している例を除いて，ほとんど全ての遺伝子をゲノム上に見出すことができた．

ゲノム構造からみた**YM16-303**株，**YM16-304**株のリジン生合成系

塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性に基づく遺伝子アノテーションの結果，YM16-304株のゲノムには，セリン，リジン，ヒスチジンの生合成に関わる酵素が一部欠損していた．以下に，大腸菌の遺伝子破壊実験から生育に必須な遺伝子である*dapE*遺伝子（Baba *et al.*, 2006）の欠損が見つかったリジン合成系について詳述する．

YM16-304株のゲノム上には，典型的なリジン生合成経路であるsuccinyl-,acetyl-DAP経路に関わる一連の酵素をコードする遺伝子（*dapA, dapB, dapC, dapD, dapF, LysA*）が存在することを見いだした．しかし経路は不完全で，succinyl-diaminopimelate desuccinylaseの遺伝子である*dapE*に相同な遺伝子を見出すことはできなかった．大腸菌などでは，*dapE*欠損した場合，リジンを添加した培地でも生育しないことから，LL-DAP, *m*-DAPといったペプチドグリカン層の構成アミノ酸を供給することができなくなり，その結果，ペプチドグリカンの構成が困難となり致死となると考えられる．興味深いことに，YM16-304のゲノム中には，DAP aminotransferase pathwayのLL-diaminopimelate aminotransferaseをコードしている*dapL*と類似している遺伝子(MA1_contigA_1114）が見いだされた．*dapL*は，植物，シアノバクテリア，*Chlamydia*で見いだされていた遺伝子（Hudson *et al.*, 2006; McCoy *et al.*, 2006）で，近年の微生物ゲノム解析の進展により，細菌類の中にも存在例が増えている（Hudson *et al.*, 2008）．MA1_contigA_1114にコードされているアミノ酸配列と近縁なアミノ酸配列をデーターベースから抽出し，系統解析を行った（Fig. 4）．系統解析の結果から，MA1_contigA_1114は，LL-diaminopimelate aminotransferaseをコードしていると考えられた．

一方，YM16-303株のゲノム情報から再構成されたリジン合成経路は，succinyl-,acetyl-DAP経路を構成する遺伝子群については，YM16-304株と同様に確認できたが，*dapE*遺伝子については，YM16-303株においても明確な相同性を示す遺伝子を見出すことはできなかった．一方，YM16-304株で見いだされた*dapL*遺伝子も，YM16-303では見出すことはできなかった．菌体成分の分析から，YM16-304株もYM16-303株も，LL-DAPを有することが明らかとなっているため，YM16-303株のゲノム未解読の領域に*dapE*か*dapL*もしくは既知の酵素遺伝子とは類似性の低い遺伝子が存在していると考えられる．

被災菌株の救済と系統保存

2011年3月11日（金）に発災した東日本大震災及びその後の大津波により，北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所は一階が壊滅する被害を受けた（Fig. 5）．一階部に保存されていた菌株はそのほとんどが津波で流失した．二階で保管されていた微生物菌株は，津波による直接の被害は免れたものの，停電により冷凍保存庫の機能が失われ，室温状態に戻ってしまった．そのため，早急に微生物の生存を確認し，再保存する対応が必要となった．独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）バイオテクノロジー本部（渋谷区西原）から支援の申し出をいただき，旧株式会社海洋バイオテクノロジー研究所（MBI）のOBから菌株を東京に移送するための救援トラック便の手配が可能であるというお知らせをいただいた．原山中央大学教授の主導で，この救援便に支援物資を積んで出発し，帰りの便で釜石研の菌株を東京に移送する方向で調整を開始した．3月25日（金）に当該微生

物をチャーター便で陸路NITEに移送し，同所の超低温庫（－80℃）を借用して仮保管することができた．3月28日(月)より7月29日(金)の四カ月に渡り，NITEの実験室を借用して，まず優先順位の高い微生物菌株約13,000株を選択し，それらの生存状態を確認と－80℃での再保存およびデータ整理を行った．一連の救済活動は，支援を申し出ていただいたNITE関係者，旧MBIメンバー3名と，北里大学関係者6名の計9名で実施した．

菌株の重要度を指標にして，13,000株を選抜して優先的に融解したグリセロールストックからの再培養，再保存作業を行った．その結果，海洋細菌が6,654株中4,315株（64.8%），放線菌が3,401株中2,756株（81.0%），糸状菌が1,307株中968株（74.1%），乳酸菌が281株中162株（57.7%），酵母が255株中249株（97.6%）の生残率であった．さらにその内訳について調査したところ，データーベースに登録されている既存の培養株との16S rRNA遺伝子の相同性が97%以上の株の生残率は78.6%であったのに対し，97%未満の株の生残率は41.1%と低かった．また，海洋細菌の分類群別にみたところ，*Actinobacteria* が 81.1%，*Firmicutes* が 89.7%，*Alphaproteobacteria* が63.6%，*Gammaproteobacteria* が59.7%と，6割以上の株が生残していたのに対して，*Bacteroidetes* は46.0%と低い生残率にとどまった．我々のライブラリーには，*Bacteroidetes* の新規株が多く含ま

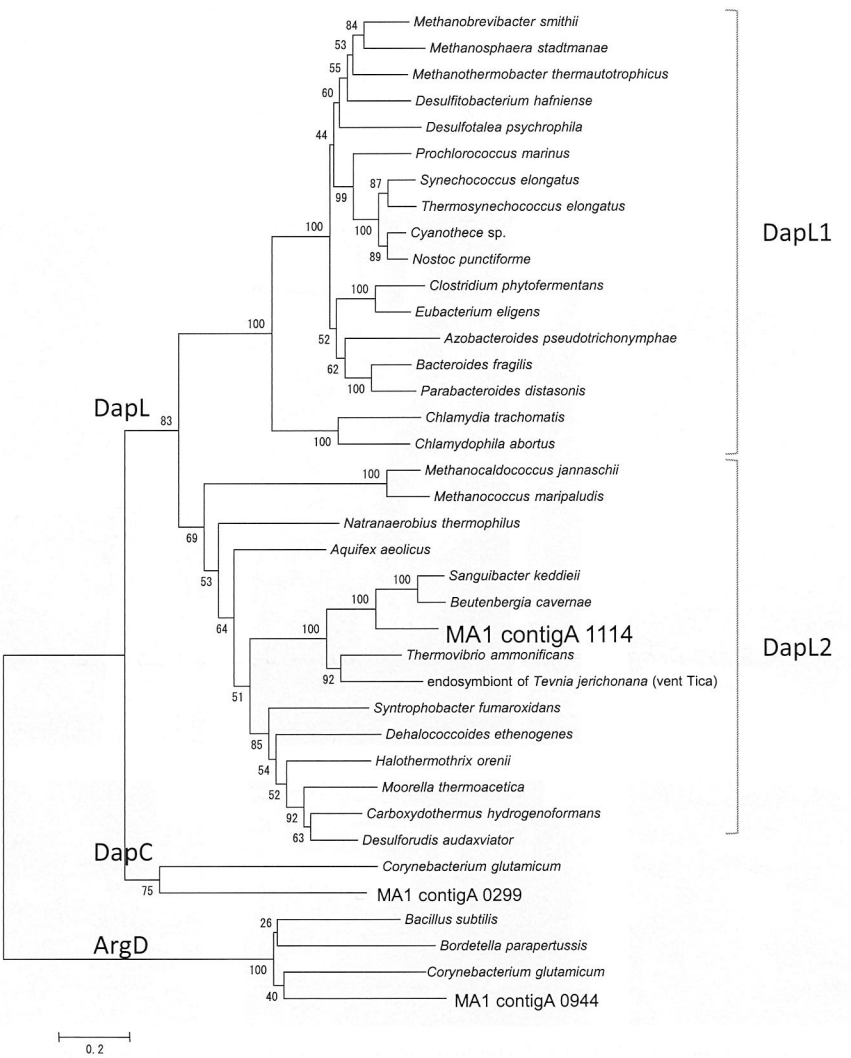


Fig. 4 Neighbor-joining tree showing the relationship between the amino acid sequences of DapL and related enzymes.
Labels beginning with "MA1" indicate enzymes of strain YM16-304 as deduced from the genome sequence. Phylogenetic analysis was performed using MEGA5. Bootstrap values for 1000 replications are shown at the nodes. Scale bar: 0.2 amino acid residue substitutions per site.

れていたが，津波被災によって半数以上の株を失ったことになる．菌種による差が顕著にみられた例としては，*Lactobacillus* spp.を示す．ライブラリーに含まれていた180株の*Lactobacillus* spp. について全体の生残率は，71.7%であった．しかし，*L. sakei* は57.4%で，他の菌種に比べて生残率が低かった．重要な菌株の3割は失われたが，もし菌株を移送し再培養，再保存を行わなければ，全ての菌株を失ったと考えると，71.0%の菌株を残すことができ，先人の努力によって収集された海洋微生物ライブラリーの系統保存に，大きな貢献をすることができた．

考　察

海水要求性アクチノバクテリアについて

海洋環境に由来する微生物は生育する上での塩の要求性から，海水要求性，海水耐性の二つに大別できる．特に，*Actinobacteria* 綱に分類される微生物は，海水耐性を示す株が多く，今回の我々が，海綿動物等の無脊椎動物の体内から分離したアクチノバクテリアにおいてもその傾向は同様であった．しかし，*Rhodococcus* 属に新たな海水要求性を示す系統を見出し，分類学的な位置づけができた．*Rhodococcus* 属は，1984年の *R. marinonascens* の記載以降，新たな海洋種の記載はなかったが，今回見出した *R. spongiae* が二例目となる．他にも，*Saccharomonospora* 属など，海水要求性を示す系統が見いだされており，今後，分類学的な解析を行っていく予定である．*Saccharomonospora* 属には，*S. halophila*（Al-Zarban *et al.*, 2002），*S. saliphila*（Syed *et al.*, 2008），*S. marina*（Liu *et al.*, 2010）等好塩製の生育をする種がすでに記載されているが，いずれも，10%程度の塩濃度でも生育する塩耐性を特徴としており，海水要求性の系統は初めて見いだされた（Fig. 6）．



Fig. 5 Photographs showing damage to the Kamaishi Institute resulting from the March 11, 2011 tsunami.
Tsunami damage to the first floor, as viewed from the outside (1). Deep freezers were washed away to the peripheral road (2). Deep freezer crashed through a ceiling (3). Deep freezers on the second floor that were saved from collapsing remained inoperable due to the power blackout that lasted until July 15 (4). All facilities on the first floor were completely destroyed, including shaking machines (5), clean bench (6), laboratories (7), and the NMR room (8). The heavy frame of an NMR machine was found on the roof terrace, although how it was transported there remains a mystery.

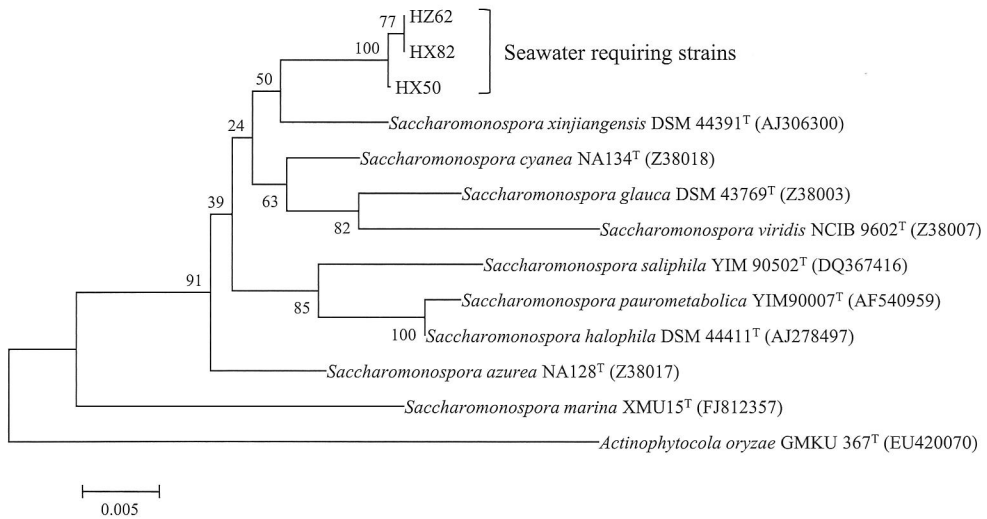


Fig. 6 Phylogenetic tree showing intra-generic relationship of strains belonging to the genus *Saccharomonospora*, based on the 16S rRNA gene.
Newly identified seawater-requiring strains of the genus *Saccharomonospora* are indicated by larger font. Tree was reconstructed with the neighbor-joining method using MEGA5. Bootstrap values for 1000 replications are shown at the nodes. Scale bar: 0.005 nucleotide substitutions per site.

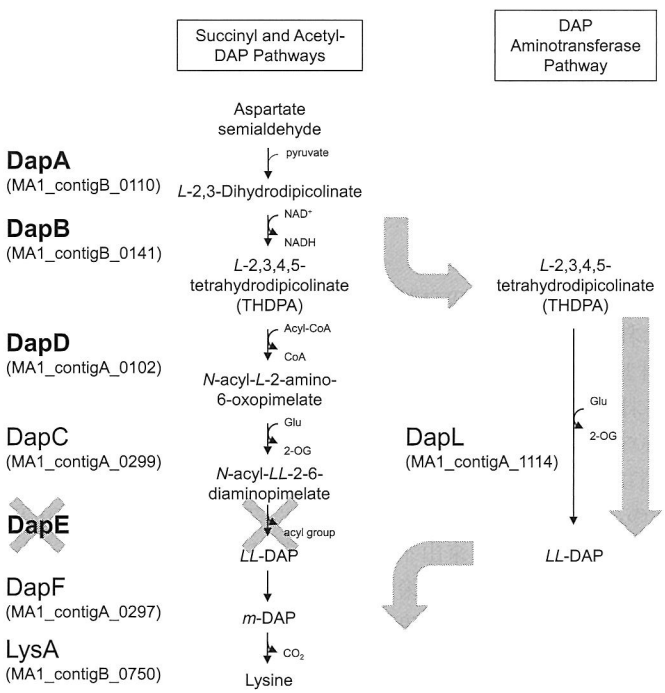


Fig. 7 Possible DAP-lysine pathway of strain YM16-304 reconstructed from the whole genome sequence.
The names of the pathways are indicated at the top of the diagram, and the individual steps, including enzyme symbols, are shown below. Genes identified within the genome of strain YM16-304 are designated in parentheses. The gene for DapE was not found in the YM16-304 genome. Essential enzymes for growth are indicated in bold. Only the step that differs from the succinyl and acetyl-DAP pathways is shown in the DAP aminotransferase pathway.

全く新たな系統群として見いだされた *Acidimicrobidae* 亜綱に属する10株についても，海水要求性を示すことが明らかとなった．*Acidimicrobidae* 亜綱は，分離株の数が少なく，系統群の特徴も未知の系統群である．ライブラリーの中から見いだされた10株がいずれも生育が遅く，従来の分類学的解析手法では，生理学的な特徴に関する情報を得るのが困難であったため，ゲノム情報を取得し，ゲノム情報に基づいて代謝経路を再構築することにより，生理学的な特徴を把握することを試みた．

YM16-304 株のリジン合成経路に関する考察

ほとんどの細菌においてリジン合成は，succinyl-, acetyl-DAP 経路で構成されている．新規系統群である YM16-304 においても，同経路に関与する酵素遺伝子のほとんどがゲノム上に見いだされた．しかし，YM16-304 株のゲノム塩基配列からは，succinyl-diaminopimelate desuccinylase の遺伝子である *dapE* 遺伝子が見いだされなかった．大腸菌を用いた遺伝子破壊実験によると，*dapE* 欠損は，リジン添加培地においても致死となる．その要因として，*dapE* 欠損によって，ほとんどの細菌のペプチドグリカンを構成成分である LL-DAP および *m*-DAP が生産されなくなるからと考えられる．それでは，なぜ *dapE* がゲノム上に見いだされない YM16-304 株は弱いながらも生育し，LL-DAP を合成できるのだろうか？興味深いことに，YM16-304 株のゲノム上に，LL-diaminopimelate aminotransferase をコードしていると考えられる MA1_contigA_1114 遺伝子を発見した．LL-diaminopimelate aminotransferase は，succinyl-,acetyl-DAP 経路とは異なるリジン生合成経路である DAP aminotransferase 経路に関与する酵素の遺伝子である．ゲノム情報から YM16-304 は，DAP aminotransferase 経路で LL-DAP を合成していることが強く示唆された．Hudson ら（2008）は，既知の DapL の酵素反応を試験管内で評価し，DapL が関与する DAP aminotransferase 経路が LL-DAP 合成にとって効率の良い経路ではないことを示し，生育速度に与える影響について議論している．また，大腸菌の *dapE* 変異株は培地に DAP を添加することにより生育が回復する．そこで，YM16-304 株の培地にも，DAP を添加して培養試験を行ったが，生育に大きな変化は見いだされなかった．この結果は，YM16-304 株の遅発育性が DAP の合成能だけでは説明できないことを示唆している．今後は，今回のゲノム解析で再構築された代謝経路に関する情報を参照しながら至適生育条件を明らかにしていく必要がある．

被災菌株の救済と系統保存

MBI の海洋微生物ライブラリーは，過去20年以上にわたって多大な予算をつぎ込んで構築された．系統的にも希少な菌株を含んでおり，これまでにも希少な海洋株の系統保存に貢献してきた．そうした系統保存上，最重要株については，公的な菌株保存機関に寄託すると同時に，研究所内においても，フリーザー内での凍結保存だけでなく，液体窒素タンクでの凍結保存や L-乾燥といった複数の長期保存法によって維持してきた．そのため，電源装置の津波に伴うフリーザーの停止にも揺らぐことはなかった．しかし，未整理の希少株が数多く残っており，それらの株はフリーザー内での凍結保存法という最も簡便な一つの方法のみに頼っていたため，全滅の危機に瀕することになった．そういった意味で，日ごろのリスク管理について十分に反省が必要である．そうした中で，数年前に開発した「微生物保存シート」を用いて数年間保存していた菌株が，電源喪失後，数ヶ月間にわたって，室温にさらされながらも，ほとんどすべての株が復元可能であったことは，自らが開発者でありながら驚くべきことであった．これらのことは，日頃からの地道な系統保存活動の重要さと共に，機能未知の微生物株を数多く含む規模の大きいライブラリーの保存技術の開発の重要さを改めて認識することになった．

今回の津波被害は，三陸地方の広範に及び，沿岸の水産加工業及び関連する産業に甚大なる被害を及ぼした．水産加工にとって醤油は必需品であるが，醸造業者も数多くが被災し，長年維持してきた醸造蔵を流失した．それと同時に，長年培ってきたモロミをも失い，存続の危機に瀕した伝統蔵が，偶然にも震災一ヵ月前にモロミを我々の研究所の二階で預かったことが幸いして，長年維持してきた醤油醸造用のモロミが復活し伝統を継続できたという事例を経験した．純粋培養された単独の菌株ではなく，モロミの様な複数の種類の微生物が混在する微生物相で機能している微生物資源については，その保存技術の開発は不十分であり，今後の開発課題であろう．

要　約

北里大学海洋微生物ライブラリーは，海綿動物等，海産の無脊椎動物から分離された微生物を数多く含んでいる．我々は，有用物質生産機能等が期待される *Actinobacteria* に注目し，3000株のアクチノバクテリアコレクションから約100株の海水要求性の特徴を示す菌株を選抜した．それらの中に，新たな海水要求性アクチノバクテリアの系統を見出し，それらが *Acidimicrobidae* 亜綱の新しい科あるいは属，*Saccharomonospora* 属，*Rhodococcus* 属の新しい種に帰属できることを明らかに

した．とくに，*Acidimicrobidae* 亜綱に帰属する10株については，分離株としての希少性が高かったが，いずれも寒天培地上での生育が極めて遅く，系統保存は必ずしも容易ではなかった．そこで，ゲノム情報を取得し代謝経路の再構築を試みることにより，生理学的な特徴を明らかにしようと試みた．その結果，YM16-304 株ではリジン合成経路として DAP aminotransferase 経路を持っていることを示唆するゲノム情報を得た．

研究の途中で，東日本大震災津波に被災し，海洋微生物ライブラリーのほとんどが全滅の危機に瀕した．数多くの支援と，迅速な救出及び，その後の地道な復元，再保存によって約７割の菌株を救済することができた．

本助成で得られた研究成果の報告

Ue, H., Matsuo, Y., Kasai, H. & Yokota, A. (2011). *Miniimonas arenae* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 123-127.

Ue, H., Matsuo, Y., Kasai, H. & Yokota, A. (2011). *Demequina globuliformis* sp. nov., *Demequina oxidasica* sp. nov. and *Demequina aurantiaca* sp. nov., actinobacteria isolated from marine environments, and proposal of *Demequinaceae* fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 1322-1329.

Yoon, J., Matsuda, S., Adachi, K., Kasai, H. & Yokota A. (2011). *Rubritalea halochordaticola* sp. nov., a carotenoid-producing verrucomicrobial species isolated from a marine chordate. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 1515-1520.

Yoon, J., Adachi, K., Park, S., Kasai, H. & Yokota, A. (2011). *Aureibacter tunicatorum* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from a coral reef sea squirt, and description of *Flammeovirgaceae* fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 2342-2347.

笠井宏朗 「釜石研海洋微生物バンク：救済と復興への活用」．三陸水産業の復興に向けた３大学連携推進シンポジウム（2011.10.30）（釜石）．

笠井宏朗，中島琢自，勝田麻津子，松本厚子，野中健一，相澤好治，紙野圭，関口弘志，藤田信之「津波で被災した海洋微生物コレクションの復旧と再構築」．日本農芸化学会2012大会　一般講演（2012.3.23）（京都）．

保存機関に寄託した菌株

Aureibacter tunicatorum A5Q-118^T (=KCTC 23232^T=NBRC 107587^T)

Demequina globuliformis YM24-125^T (=NBRC 106266^T=KCTC 19747^T)

Demequina oxidasica YM05-1041^T (=NBRC 106264^T=KCTC 19746^T)

Demequina aurantiaca YM12-102^T (=NBRC 106265^T=KCTC 19745^T)

Miniimonas arenae YM18-15^T (=NBRC 106267^T=KCTC 19750^T)

'Rhodococcus spongiae' YMYM27-097^T (=NCIMB 14619^T=NBRC 106598^T)

Rubritalea halochordaticola MN1-1006^T (=KCTC 23186^T=NBRC 107102^T)

謝　辞

本研究の遂行にあたり，多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に厚く御礼を申し上げます．特に，平成23年３月11日の東日本大震災に被災し研究が困難な状況に陥った際にも，海洋微生物ライブラリーの救済活動にご理解をいただき，助成を継続していただいたことに深く感謝いたします．本論文で紹介した研究成果は，独立行政法人製品評価技術基盤機構の藤田信之先生のゲノム解析グループ，及び，北里大学生命科学研究所の高橋洋子教授，松本厚子研究員のご協力によって得られたものです．さらに，津波被災菌株の救済活動にご参加ご協力をいただいた，独立行政法人製品評価技術基盤機構の菊池久理事をはじめとする皆様，北里大学生命科学研究所，北里大学感染制御機構の皆様，旧株式会社海洋バイオテクノロジー研究所の皆様に深く御礼申し上げます．

文　献

Al-Zarban, S. S., Al-Musallam, A. A., Abbas, I., Stackebrandt, E. & Kroppenstedt, R. M. (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 555-558.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knock-out mutants – the Keio collection. Mol. Systems Biol., doi:10.1038/msb4100050.

Clark, D. A. & Norris, P. R. (1996). *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. Microbiology **142**: 785-790.

Clum, A., Nolan, M., Lang, E., Glavina, Del Rio, T., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J. F., Lucas, S.,

Chen, F., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Mavrommatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Göker, M., Spring, S., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J , Jeffries, C. C., Chain, P., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P. & Lapidus, A. (2009). Complete genome sequence of *Acidimicrobium ferrooxidans* type strain (ICP). Stand. Genomic Sci. **1**: 38-45.

Deloger, M., El Karoui, M. & Petit, M. A. (2009). A genomic

distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. J. Bacteriol. **191**: 91-99.

Fiedler, H. P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. & Mihm, G. (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. Antonie Van Leeuwenhoek **87**: 37-42.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 81-91.

Helmke, E. & Weyland, H. (1984). *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 127-138.

Hudson, A. O., Singh, B. K., Leustek, T. & Gilvarg, C. (2006). An *LL*-diaminopimelate aminotransferase defines a novel variant of the lysine biosynthesis pathway in plants. Plant Physiol. **140**: 292-301.

Hudson, A. O., Gilvarg, C. & Leustek, T. (2008). Biochemical and phylogenetic characterization of a novel diaminopimelate biosynthesis pathway in prokaryotes identifies a diverged form of *LL*-diaminopimelate aminotransferase. J. Bacteriol. **190**: 3256-3263.

Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G. & Fenical, W. (2005). Marine actinomycete diversity and natural product discovery. Antonie Van Leeuwenhoek **87**: 43-48.

Johnson, D. B., Bacelar-Nicolau, P., Okibe, N., Thomas, A. & Hallberg, K. B. (2009). *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 1082-1089.

Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A. & Janssen, P. H. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 7210-7215.

Konstantinidis, K. T. & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **102**: 2567-2572.

Kurahashi, M., Fukunaga, Y., Sakiyama, Y., Harayama, S. & Yokota, A. (2009). *Iamia majanohamensis* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from sea cucumber *Holothuria edulis*, and proposal of *Iamiaceae* fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 869-873.

Liu, Z., Li, Y., Zheng, L. Q., Huang, Y. J. & Li, W. J. (2010). *Saccharomonospora marina* sp. nov., isolated from an ocean sediment of the East China Sea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**: 1854-1857.

Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T. & Goodfellow, M. (2005). *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 1759-1766.

Matsumoto, A., Kasai, H., Matsuo, Y., Omura, S., Shizuri, Y. & Takahashi, Y. (2009). *Ilumatobacter fluminis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. J. Gen. Appl. Microbiol. **55**: 201-205.

McCoy, A. J., Adams, N. E., Hudson, A. O., Gilvarg, C., Leustek, T. & Maurelli, A. T. (2006). *L,L*-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by *Chlamydia* and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **103**: 17909-17914.

Montalvo, N. F., Mohamed, N. M., Enticknap, J. J. & Hill, R. T. (2005). Novel actinobacteria from marine sponges. Antonie Van Leeuwenhoek **87**: 29-36.

Rheims, H., Spröer, C., Rainey, F. A. & Stackebrandt, E. (1996). Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. Microbiology **142**: 2863-2870.

Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **106**: 19126-19131.

Salomon, C. E., Magarvey, N. A. & Sherman, D. H. (2004). Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. Nat. Prod. Rep. **21**: 105-121.

Syed, D. G., Tang, S. K., Cai, M., Zhi, X. Y., Agasar, D., Lee, J. C., Kim, C. J., Jiang, C. L., Xu, L. H. & Li, W. J. (2008). *Saccharomonospora saliphila* sp. nov., a halophilic actinomycete from an Indian soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 570-573.

Xin, Y., Huang, J., Deng, M. & Zhang, W. (2008). Culture-independent nested PCR method reveals high diversity of actinobacteria associated with the marine sponges *Hymeniacidon perleve* and Sponge sp. Antonie Van Leeuwenhoek **94**: 533-542.

IFO Res.Commun. 26
61-70, 2012

全世界産キツネタケ属（担子菌門・ハラタケ目・ヒドナンギウム科）の比較生物地理学的研究

保　坂　健太郎

国立科学博物館植物研究部
〒305-0005　茨城県つくば市天久保4-1-1

Biogeography of globally distributed mushrooms, genus *Laccaria* and related taxa (Basidiomycota, Agaricales, Hydnangiaceae)

Kentaro Hosaka

Department of Botany, National Museum of Nature and Science
4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan

The genus *Laccaria* (Basidiomycota, Agaricomycetes, Agaricales, Hydnangiaceae) is distributed worldwide, including North and South Americas, Australasia, and Europe, but no species have been reported from Africa and tropical South America. They form ectomycorrhizae with various plant families, including Nothofagaceae and Myrtaceae from Southern Hemisphere, and Pinaceae and Fagaceae from Northern Hemisphere. The worldwide distribution of the genus can be explained by frequent, long distance dispersal across oceans, or ancient origin of the genus followed by vicariance. To clarify biogeographical patterns of *Laccaria*, I have conducted worldwide field survey of the genus and collected fresh fruit bodies as well as DNA and cultures. Based on multigene phylogenetic analyses of four nuclear markers (ITS, LSU, RPB2, and EF1α), a robust phylogeny of the genus became available. The results strongly indicated that the genus originated in Southern Hemisphere with only one successful dispersal and colonization to Northern Hemisphere. No dispersal back to Southern Hemisphere was detected. These patterns indicated that the presence of suitable ectomycorrhizal host plants was critical for a successful dispersal and colonization, and no frequent host shifts occurred during the history of the genus *Laccaria*.

Key words: ectomycorrhizae, host shift, long distance dispersal, molecular phylogeny, vicariance

緒　言

一般的に菌根菌はコロニーの成長が遅く培養が難しい．菌糸培養が全く成功していないグループも多く，生物の特性を研究するうえで大きなハードルとなっている．なかでも外生菌根性として知られる菌類は，目で見えるくらいの大型の子実体を形成する，いわゆる「きのこ」が多く，マツタケやポルチーニなどに代表されるように食用菌も多く存在することから，菌糸を培養することによるメリットは大きい．

全ての外生菌根性菌類が難培養性であるわけではない．中でも *Laccaria*（キツネタケ属）は比較的容易に培養株を得ることができることで知られており，各種の菌根合成実験などに広く利用されてきた．近年では *L. bicolor*（オオキツネタケ）が菌根性のきのことしては初めて，全ゲノムの解析に用いられた（Lammers *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2008）．現在のところ全ゲノムが解読されているのは，キツネタケ属ではただ1種である．ただし，ゲノム解析の技術が急速に進歩している今日，ゲノムレベルで種間の系統解析を行うことも，現実のものとなりつつある．そこで本研究では，近い将来のゲノム解析にそなえ，種レベルの系統関係を明らかにすることと，培養株を充実させることを目的とした．

キツネタケ属は Basidiomycota（担子菌門），Agaricomycetes（ハラタケ綱），Agaricales（ハラタケ目）

E-mail: khosaka@kahaku.go.jp
共同研究者：Gregory M. Mueller（Chicago Botanic Garden, USA），Tom W. May（Royal Botanic Gardens, Melbourne, Australia），Francis Martin（Tree-Microbes Interaction Joint Unit Forestry Center, INRA, France）

に属し，全世界から約75種が知られている（Kirk *et al.*, 2008）．ほぼ全世界から報告されているものの，アフリカおよび南米大陸の熱帯域からは未報告である．ただし，菌根宿主の移植にともない，北半球のユーカリ植林地や南半球のマツ植林地において，それぞれ移入されたと考えられるキツネタケ属も確認されている（Mueller, 1992）．本菌は属レベルの形態的特徴は明らかであり，他のきのこと見間違える可能性は少ない．ただし，属内分類は困難であり，全世界を対象にしたモノグラフは存在しない．現存する最も充実したモノグラフは，Mueller (1992) によるアメリカおよびカナダ産の種についてのものである．

キツネタケ属は分子系統解析についても十分に検討されておらず，複数種を含む分子系統解析は，Matheny *et al.* (2006)，Osmundson *et al.* (2005)，Slot *et al.* (2010) などがある程度である．同属は白色の胞子紋を持つことから，従来は他の明色胞子を持つグループと近縁であるとされてきたが，最近の研究によると，Psathyrellaceae（ナヨタケ科）や Cortinariaceae（フウセンタケ科）などの暗色系の胞子を持つグループと近縁であるとされる（Matheny *et al.*, 2006）．筆者らは，これまで世界各地に保管されていた乾燥標本を基に，キツネタケ属の分子系統解析を試みてきたが，より多くの遺伝子を解析するためには DNA の質が十分ではなく，また，多様な種をカバーするだけの培養株は全く保存されていないため，研究の大きな支障となってきた．

本研究では，全世界規模でキツネタケ属の野外調査を行い，新たな標本を得た．これらを基に，複数遺伝子による分子系統解析を行い，種間関係を明らかにすること，そして菌根宿主のシフトを含む生物地理パターンを明らかにすることを目的とした．さらに，遺伝子源として多様なキツネタケ属菌の分離培養株を得ることも目的とした．

実験方法

子実体の採集　キツネタケ属および関連属菌の採集は，日本および世界各地における現地調査で，GPS データおよび周辺の植生環境を記録したうえで行った．海外における主な採集地は，オーストラリア（タスマニアおよびビクトリア州），ニュージーランド，ニューカレドニア，台湾，中国（雲南省），タイ，スウェーデン，アルゼンチン（フエゴ島周辺）である．植生については，外生菌根性樹木が特定できる場合は種または属，科レベルの同定を行い，それが不可能な場合は広葉樹林か針葉樹林かの記録のみに留めた．子実体は採集後 6 時間以内に実験室にて処理を行った．

全子実体は新鮮な状態で写真撮影をし，色調・大きさ・形態を記録した．また，子実体の一部（子実層およびその周辺の新鮮な部位）を滅菌済みのカミソリを使い小片（約 5 mm²）に切り出し，DNA 保存用の緩衝液に保管した．緩衝液は Seutin ら (1991) による 20% DMSO バッファーを基本とし，さらに 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) と 0.1 M sodium sulfite (Na_2SO_3) を追加したものである (Hosaka & Castellano, 2008; Hosaka, 2009)．子実体の組織片を保管したバッファーは現地調査中は室温で，実験室に戻った後は 4℃ にて保存した．

標本の作成にはディハイドレーター（Snackmaster Express FD-60, Nesco/American Harvest, WI, USA）を使い，DNA の劣化を防ぐために，事前研究の結果 (Hosaka & Uno, 2011) に従い比較的低温（45-52℃）で送風しながら24時間から48時間かけて乾燥した．乾燥標本は採集情報をデータベース化した後，国立科学博物館植物研究部に保管した．また，海外からの一部の標本（オーストラリア，ニュージーランドおよび中国）については，現地の標本庫にも重複標本を保管した．

培地および培養方法　新鮮な子実体のヒダの一部または子実体内部の実質から，極細ピンセットを用いて小片を取り出し，菌株を分離・培養した．使用した培地の１リットルあたりの組成は以下の通りである：

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類（日本製薬株式会社）　１袋
グルコース　5 g
マルトース　5 g
クロラムフェニコール　50 mg
ベンレート水和剤（住友科学園芸）　10 mg
チアミン　0.1 mg
マルトエクストラクト　3 g
寒天　20 g

培地はオートクレーブ滅菌後，直径 90 mm のプラスチックシャーレに分注して用いた．分離後は室温で数日から数週間後に菌糸の成長を確認し，雑菌でないことを顕微鏡下でチェックした後に，斜面培地に移植した．斜面培地の組成は上記と同様であるが，クロラムフェニコールおよびベンレートを含まないものである．斜面培地に移植した分離株については，室温および 4℃ にて保管し，１年ごとに継代培養を行った．

DNA 実験　DNA 抽出は Hosaka & Castellano (2008) および Hosaka (2009) の方法に従った．緩衝液を用いて保存した組織片を，液体窒素で凍結し，滅菌済みの乳鉢ですり潰した後，CTAB バッファー（Doyle & Doyle,

1987）に移して一時保管した．CTABバッファーに0.1 M sodium sulfite (Na_2SO_3) を追加後，65℃で1時間インキュベートし，12000 rpmで5分間遠心した後，上清を新しいチューブに移して抽出に用いた．クロロフォルム：イソアミルアルコール（24:1）でタンパク質を除去した後，6 Mヨウ化ナトリウムバッファーとグラスミルク（Hosaka & Castellano, 2008; Hosaka, 2009）を用いてさらに精製し，各サンプルより約100 μlの抽出DNAを得た．なお，抽出に未使用だった組織片およびインキュベート後のCTABバッファーはそれぞれ国立科学博物館植物研究部に保管されており，今後の研究に用いることができる．

PCRは核6領域（ITS，LSU, RPB1, RPB2, EF1 α, Gapdh）およびミトコンドリア2領域（*atp6*, mtSSU）について行った．使用したプライマーはITSがITS5/ITS4（White *et al.*, 1990），LSUがLR0R/LR5（Vilgalys & Hester, 1990），RPB1がRPB1-Af/RPB1-Cr（Matheny *et al.*, 2002），RPB2がfRPB2-5F/bRPB2-7.1R（Liu, 1999; Matheny, 2005），EF1 αがEF1-983F/EF1-2218R（Rehner & Buckley, 2005），GapdhがGPD forward general/ GPD reverse general（den Bakker *et al.*, 2004），*atp6*がatp6-3/atp6-2（Kretzer & Bruns, 1999），mtSSUがMS1/MS2（White *et al.*, 1990）である．PCR反応にはTaKaRa Ex Taqポリメラーゼ（TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan）を用いた．PCR反応は基本的に，熱変性を95℃（3分）で1サイクル行った後，95℃（35秒），52℃（35秒），72℃（60秒）のサイクルを計35サイクル行い，最後に72℃を5分間行った．ただし，*atp6*についてはアニーリング温度を37℃から始める特殊な反応を行なった（Kretzer & Bruns, 1999）．

PCR産物は1.5%アガロースゲルでバンドの有無とサイズを確認後，ExoSap-IT（Millipore, Molsheim, France）を用いて精製し，Big Dye Terminator V. 3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA）を用いてシーケンス反応を行い，DNAシーケンサー（ABI 3100）により塩基配列を決定した．

系統解析　得られた塩基配列を基に，最節約法およびベイズ法による系統解析を行った．解析に先立ち，各領域のデータセットを作成し，Muscle v.3.6（Edgar, 2004a, b）を用いてアライメントを行った．アライメントの後，信頼のおけるアライメントが不可能な部位については解析から除外した．最節約法はPAUP*（Swofford, 2002），ベイズ法はMrBayes（Huelsenbeck & Ronquist, 2001）によった．各領域のデータセットを個別に解析し，得られた系統樹同士に相違が無いのを確認後，全領域を結合して系統解析を行った．

結果と考察

子実体の採集　海外の野外調査においては，ほぼ全ての国・地域においてキツネタケ属を採集することができた（Fig. 1）．このうち，ニューカレドニアおよび台湾の種については，これまで未報告の種である可能性が高く，現在新種記載の可能性も含め検討中である．また，採集した標本全点からDNAを抽出し，塩基配列も決定済みである．ただし，これまで関連菌の分布が確認されていないアフリカおよび南米北部の熱帯地域においては，キツネタケ属の発生を確認することはできなかった．共同研究者および現地の協力者などによる情報収集にもかかわらず，キツネタケ属の発生は全く確認されなかったことから，本菌はアフリカおよび南米熱帯地域には存在しないものと考えられる．ただし，これを実証するためには，今後土壌からのメタゲノム解析などの研究が必要になるであろう．

菌株の分離・培養　新鮮な子実体の大部分から分離を試みた結果，合計200株を得ることができた．このなかには成長速度が遅く，分離後数カ月たっても菌糸がミリ単位でしか伸びてこないものも多く存在した．菌根菌には継代培養中や凍結保存により死滅してしまうものも多く知られており，菌株の長期保存についてはさらなる検討が必要であろう．そのなかでも，最近開発された活性炭を利用する方法（Stielow *et al.*, 2012）は，菌根菌にも幅広く応用できる可能性が示唆されている．

分離・培養を試みた子実体（標本数）は500以上にも及んだ．このうち，明らかな雑菌（子嚢菌およびバクテリア）の増殖による分離の失敗以外に，菌糸の成長がまったく見られないサンプルが多く存在した．分離に成功した個体と見比べても，子実体の状態に明確な差は認められないことから，何らかの培養条件が適していなかったものと考えられる．今回の研究では，ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類と糖分を基本にした培地に，抗生物質としてクロラムフェニコール，子嚢菌の成長を抑えるためにベンレートを加えたものを用いた．その他の培地は，一部にポテト・デキストロース培地（PDA）を使用した他は，試していない．難培養性の種については，他の培地も検討する必要があるであろう．特にベンレートおよび抗生物質の濃度は，菌根菌の成長にも影響を与える可能性もあり，これらを欠く培地も各種検討する必要がある．

分離・培養に成功した株の多くが，紫色の色素を保持する種（*Laccaria amethystina, L. violaceoniger* および類

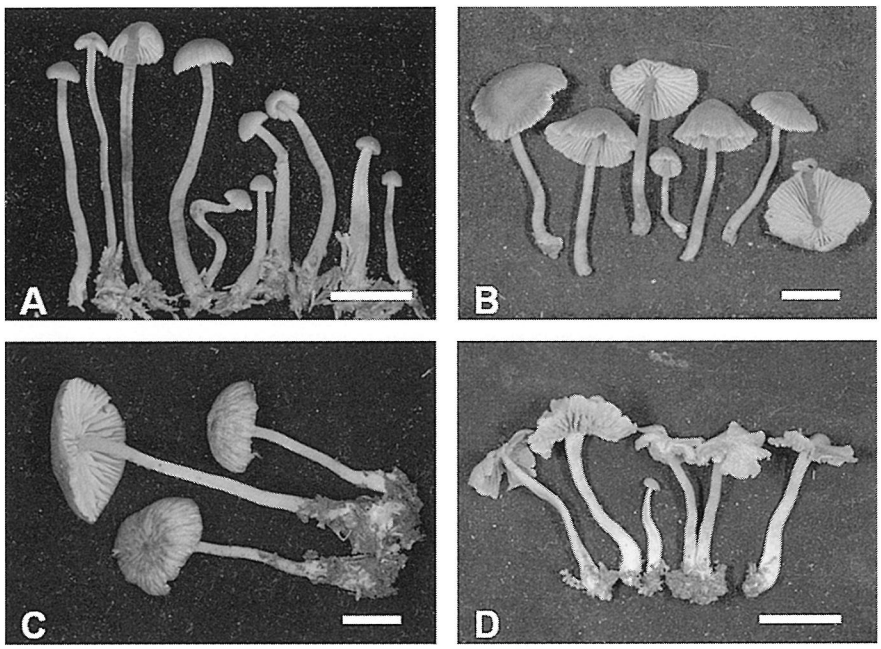


Fig. 1　Fruit bodies of *Laccaria* spp. from different continents. A. *L. galerinoides* from Tierra del Fuego, Argentina (specimen no.: KH-ARG10-108). B. *Laccaria* sp. from Tasmania, Australia (specimen no.: KH-AUS10-036). C. *Laccaria violaceoniger* from New Zealand (specimen no.: KH-NZ09-067). D. *Laccaria* sp. from New Caledonia (specimen no.: KH-NC11-094). Bars = 1 cm.

似種）であった．キツネタケ属の多くが同様の色素を持ち，異なる培地を用いることで初めて色素の存在が明らかになる場合も知られている（Mueller, 1992）ことから単純な比較はできないが，紫色の色素と菌株の性質に何らかの関連があるかもしれない．ただし，子実体に強い紫色を帯びる種は南北半球それぞれで知られており，それらは単系統群を形成しない．そのことから，培養株の性質が単純に系統群の特徴を反映するわけではなさそうである．

PCR とシーケンシング　本研究で利用したプライマーで，PCR 増幅の成功率が高かったのは，ITS，LSU，RPB2およびEF1α であった．ただし，RPB2 と EF1α については，古い乾燥標本からの増幅成功率は著しく低くなった．ミトコンドリア 2 領域（*atp6*, mtSSU）については増幅の成功率は高かったものの，特に mtSSU においては標本の年代に関わらず，全く増幅が見られないサンプルが存在した．担子菌類の mtSSU では，長大なイントロンがプライマー領域内外に存在することが知られており（Hibbett & Donoghue, 1995），キツネタケ属にも当てはまるものと思われる．*atp6* については，担子菌類の幅広い分類群で系統解析に使われており，特に高次分類群の解析に適した解像力があることが実証されている（Kretzer & Bruns, 1999; Hosaka *et al.*, 2006）．ただし，本研究では *atp6* を PCR 増幅したサンプルに限りがあり，ミトコンドリア遺伝子同士の比較ができなかったため，系統解析の結果には含めていない．残りの 2 領域（RPB1, Gapdh）は PCR の成功率が低く，また増幅産物からのシーケンスも成功しない場合が多かった．

本研究で検討した遺伝子領域は，どれも担子菌類の系統解析に利用された実績があり，塩基配列情報を蓄積することができれば，より信頼性の高い系統樹の構築に寄与することは間違いない．特に ITS 領域については近年の研究の結果，菌類の正式な DNA バーコード領域として提唱されており（Schoch *et al.*, 2012），今後もデータ量が飛躍的に増大していくことは間違いない．しかし，上記の通り増幅に困難が伴う場合も多く，より適したプライマーの設計を含めて検討していく必要があるであろう．特にキツネタケ属については *Laccaria bicolor* で全ゲノムが解読されており（Martin *et al.*, 2008），上記以外にも系統解析に適した領域を探ることが可能になってきている．今後はさらにゲノムレベルでの種間関係を解析することも可能になるであろう．

系統解析と生物地理　遺伝子領域ごとに得られた系統樹を比較した結果，明らかな相違は見られなかったことから，4 遺伝子（ITS，LSU，RPB2 および EF1α）のデータセットを結合したうえで系統解析を行った（Fig. 2）．

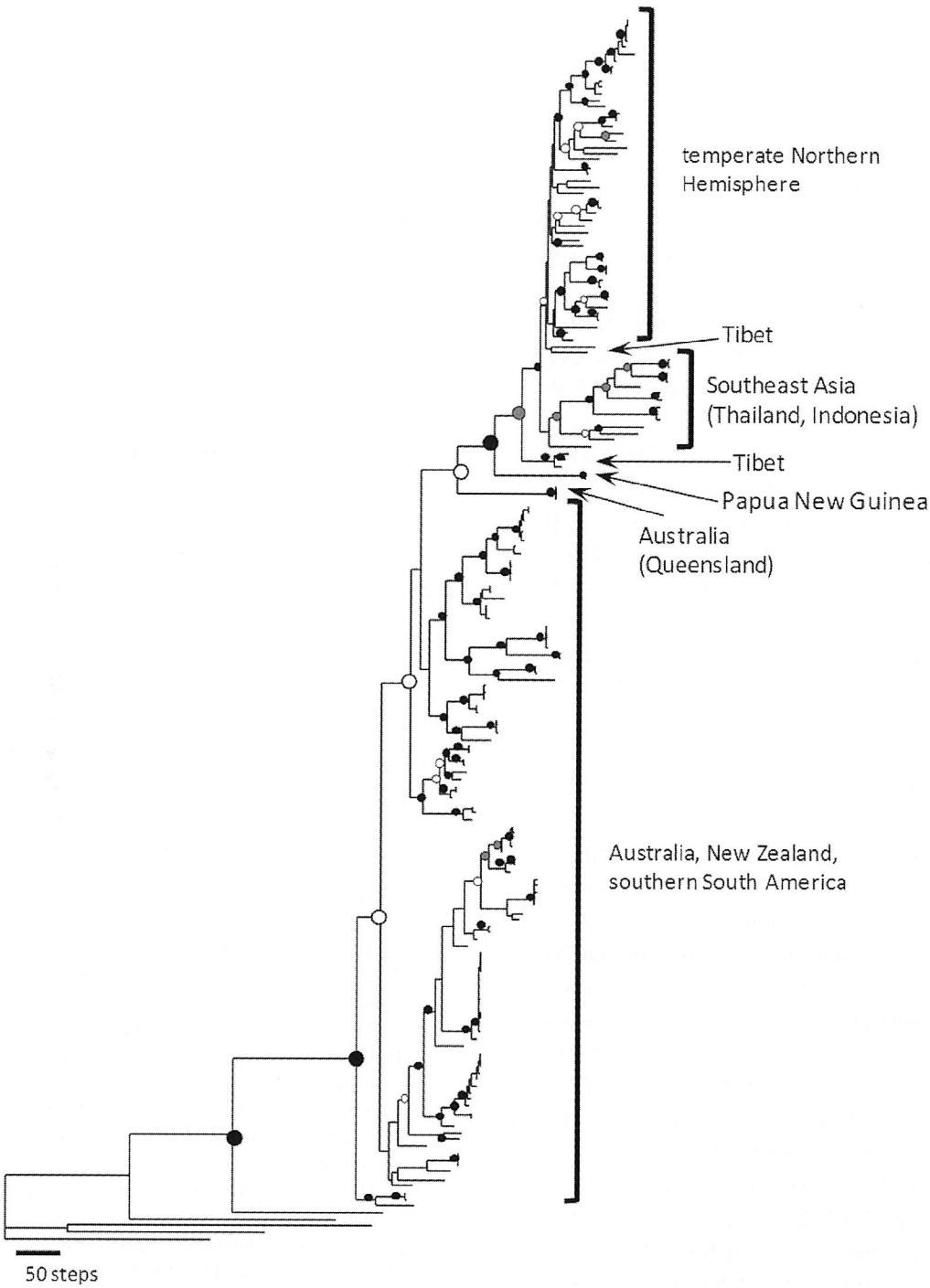


Fig. 2 One of the most parsimonious trees derived from parsimony analyses using PAUP* (Swofford, 2002). Nodal supports are shown with symbols (black circles = Bayesian posterior probability 95% or higher and parsimony bootstrap values 70% or higher; grey circles = posterior probability 95% or higher and bootstrap values between 50-69%, or posterior probability less than 95% and bootstrap values 70% or higher; white circles = posterior probability 95% or higher & bootstrap values less than 50%, or posterior probability less than 95% & bootstrap values between 50-69%)

その結果，系統樹のより基部には南半球産の種が側系統を形成した．一方，北半球産の種は系統樹の頂部に単系統群を形成した．このことより，キツネタケ属が南半球起源であり，北半球への分散および定着が一度のみ起こったことが強く示唆された．

生物地理パターンをさらに細かく見てみると，北半球クレードの基部には，東南アジア（タイ，インドネシア）およびチベット産の種が位置することが明らかであった．さらに南半球グレードの最も頂部には，オーストラリアのクイーンズランドおよびパプアニューギニア産の種が位置した．このことから，キツネタケ属の南北半球間の分散はランダムなものではなく，パプアニューギニア，東南アジアを経て，北半球温帯地域に広がったものと推測できる．つまり，遠距離分散であることに違いはないが，南太平洋から東南アジア地域の島々を飛び石状に分散して，分布を広げていったものと考えられる．

キツネタケ属が南半球から北半球へ移動するに伴い，菌根宿主をシフトしながら進化してきたはずである．現在の南半球では，Nothofagaceae（ナンキョクブナ科）およびMyrtaceae（フトモモ科）の一部，特に*Eucalyptus*（ユーカリ属）および*Leptospermum*（レプトスペルムム属）が主な宿主となっており，これらは北半球には分布しない．一方，北半球ではPinaceae（マツ科）とFagaceae（ブナ科）が主な宿主であり，これらは南半球には分布しない．北半球への分散と定着が起こったのが一回のみであり，なおかつ南半球へ戻っていった形跡が見られないのは，このような科レベルの宿主シフトが必要であったことも大きな原因であろうと思われる．

南半球と北半球のグループが分子系統で明瞭に分けられるパターンは，担子菌類では他にHysterangiales（ヒステランギウム目）（Hosaka *et al.*, 2008），*Pisolithus*（コツブタケ属）（Martin *et al.*, 2002; Hosaka, 2009）*Pleurotus*（ヒラタケ属）（Vilgalys & Sun, 1994; Zervakis *et al.*, 2004），Inocybaceae（アセタケ科）（Matheny *et al.*, 2009）などで広く知られている．この中でもヒステランギウム目は，キツネタケ属と同様に外生菌根菌であり，かつ南半球起源であることが実証されており（Hosaka *et al.*, 2008），菌根菌の生物地理を比較する上で興味深い対象である．ただし，同じ菌根菌であってもアセタケ科の場合は旧熱帯区起源であることが示唆されており（Matheny *et al.*, 2009），全ての菌根菌が同様の生物地理パターンを示すわけではないことは明らかである．今後は比較対象となる分類群を菌根性，腐生性を問わず増やしていく必要があり，そのための全世界的な調査は継続していかなくてはならない．

要　約

外生菌根菌の代表として，全ゲノムも解読されている*Laccaria*（キツネタケ属）を対象として，全世界的規模で野外調査を行い，複数遺伝子による分子系統解析を行った．本研究期間中に得ることのできた標本数は500を超え，うち200標本からは分離培養株を得ることができた．このうち，台湾およびニューカレドニアから採集した標本については，未記録である可能性が高く，新種の可能性も含めて検討中である．全標本からDNAを抽出して核ITS領域の塩基配列を決定した他，核LSU，RPB2, EF1αの計4領域の塩基配列を基に最節約法およびベイズ法による分子系統解析を行った．その結果，系統樹の基部は南半球産の種がクレードを形成し，北半球の種は系統樹の頂部に単系統群を形成した．そのことから，キツネタケ属が南半球起源であり，北半球への分散と定着が一回のみ起こったことが示唆された．さらには，北半球への移動が，パプアニューギニア，東南アジアを経て可能であったことが示唆された．北半球への移動が一回のみであったこと，さらには南半球への逆戻りを確認することはできなかったことなどから，キツネタケ属にとって菌根宿主のシフトが分散・定着において大きな障壁となっていることが推測された．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) Hosaka, K. (2009). Comparative biogeography of closely related, ectomycorrhizal and saprotrophic basidiomycetes. International Conference on Fungal Evolution and Charles Darwin: from morphology to molecules, Thailand Science Park, Thailand.
2) Hosaka, K. (2009). Do ectomycorrhizal and saprotrophic fungi show different biogeographical patterns? Asian Mycological Congress, Taichung, Taiwan.
3) Hosaka, K. (2010). Do ectomycorrhizal and saprotrophic fungi show different biogeographical patterns? VI Southern Connection Congress, Gondwana reunited: a southern perspective for a changing world, Bariloche, Argentina.
4) Hosaka, K. (2011). Do ectomycorrhizal and saprotrophic mushrooms show different biogeographic patterns? XVIII International Botanical Congress (Melbourne, Australia).
5) Hosaka, K. (2011). Systematics of an enigmatic basidiomycete, *Broomeia*: its phylogenetic and biogeographic implications. Asian Mycological Congress 2011 (Incheon, Korea).
6) Hosaka, K. (2011). Fungal DNA barcoding and related projects at the National Museum of Nature and Science, Japan. Annual Meeting of Japan Society for Culture

Collections (JSCC) (Sapporo, Japan).

7) Hosaka, K. (2011). Comparative biogeography of ecologically distinct, but closely related fungi: a case study from Phallomycetidae. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (XIII International Congress of Mycology) (Sapporo, Japan).

ポスター発表

1) Wilson, A.W., Hosaka, K. & Mueller, G.M. (2011). *Laccaria* from the eastern Himalayas. Mycological Soceity of America (Fairbanks, Alaska, USA).

原著論文

1) Hosaka, K. & Uno, K. (2011). Assessment of the DNA quality in mushroom specimens: effect of drying temperature. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. B **37**: 101-111.
2) Shoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Couse, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.D., Bai, F.Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L, Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B.J., Crespo, A., Cubas, P., Cumings, C., Damm, U., de Beer, Z.W., de Hoog, G.S., Del-Prado, R., Dentinger, B., Diéguez-Uribeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Dueñas, M., Duong, T.A., Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliegerova, K., Furtado, M., García, M.A., Ge, Z.W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, C., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Högnabba, F., Hollingsworth, P.M., Hong, S.B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K.D., James, T., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Kelly, L.J., Kirk, P.M., Knapp, D.G., Kõljalg, U., Kovács, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D., Liggenstoffer, A.S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maganti, H., Maharachchikumbura, S.S.N., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S., Meyer, W., Moncalvo, J.M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T.L., Ruibal, C., Sarmiento-Ramírez, J.M., Schmitt, I., Schüßler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O.P., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.H., Sung, G.H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vágvölgyi, C., Vialle, A., Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiß, M., White, M.M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.C., Zhang, N., Zhuang, W.Y. & Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**: 6241-6246.

保存機関に寄託した菌株

本研究によって得られた分離培養株200株は国立科学博物館植物研究部菌株保存室にて保存している．これらのうち47株についてはICMP Culture Collection (Auckland, New Zealand) に寄託済みである．また，分類学上重要な分離培養株については順次NBRCに寄託予定である．以下は，全て国立科学博物館植物研究部の菌株保存室に保管されている分離培養株のリストである：

Hydnangium sp. (KHC-00106), *Hydnangium* sp. (KHC-00107), *Laccaria amethystina* (KHC-00152)
Laccaria amethystina (KHC-00153), *Laccaria amethystina* (KHC-00154), *Laccaria amethystina* (KHC-00155)
Laccaria amethystina (KHC-00156), *Laccaria amethystina* (KHC-00157), *Laccaria amethystina* (KHC-00200)
Laccaria amethystina (KHC-00203), *Laccaria amethystina* (KHC-00204)
Laccaria amethystina (KHC-00205), *Laccaria amethystina* (KHC-00206)
Laccaria amethystina (KHC-00223), *Laccaria amethystina* (KHC-00353)
Laccaria bicolor (KHC-00027), *Laccaria bicolor* (KHC-00028)
Laccaria bicolor (KHC-00134), *Laccaria bicolor* (KHC-00135), *Laccaria bicolor* (KHC-00151)
Laccaria bicolor (KHC-00158), *Laccaria bicolor* (KHC-00159), *Laccaria bicolor* (KHC-00289)
Laccaria bicolor (KHC-00290), *Laccaria bicolor* (KHC-00291), *Laccaria bicolor* (KHC-00297)
Laccaria canaliculata (KHC-00385), *Laccaria galerinoides* (KHC-00332), *Laccaria galerinoides* (KHC-00338)
Laccaria galerinoides (KHC-00362), *Laccaria laccata* (KHC-00001), *Laccaria laccata* (KHC-00031)
Laccaria laccata (KHC-00032), *Laccaria laccata* (KHC-00298), *Laccaria laccata* (KHC-00355)
Laccaria masonii (KHC-00066), *Laccaria masonii* (KHC-00067), *Laccaria masonii* (KHC-00361)
Laccaria murina (KHC-00033), *Laccaria murina* (KHC-00034), *Laccaria murina* (KHC-00182)
Laccaria murina (KHC-00183), *Laccaria murina* (KHC-00230), *Laccaria murina* (KHC-00231)
Laccaria ohiensis (KHC-00017), *Laccaria ohiensis* (KHC-00018), *Laccaria ohiensis* (KHC-00139)

Laccaria ohiensis (KHC-00140), *Laccaria ohiensis* (KHC-00141), *Laccaria violaceoniger* (KHC-00124)
Laccaria violaceoniger (KHC-00125), *Laccaria* sp. (KHC-00011), *Laccaria* sp. (KHC-00012)
Laccaria sp. (KHC-00014), *Laccaria* sp. (KHC-00015), *Laccaria* sp. (KHC-00019)
Laccaria sp. (KHC-00021), *Laccaria* sp. (KHC-00022), *Laccaria* sp. (KHC-00023)
Laccaria sp. (KHC-00025), *Laccaria* sp. (KHC-00026), *Laccaria* sp. (KHC-00029)
Laccaria sp. (KHC-00030), *Laccaria* sp. (KHC-00035), *Laccaria* sp. (KHC-00036)
Laccaria sp. (KHC-00038), *Laccaria* sp. (KHC-00042), *Laccaria* sp. (KHC-00044)
Laccaria sp. (KHC-00045), *Laccaria* sp. (KHC-00055), *Laccaria* sp. (KHC-00056)
Laccaria sp. (KHC-00057), *Laccaria* sp. (KHC-00058), *Laccaria* sp. (KHC-00059)
Laccaria sp. (KHC-00062), *Laccaria* sp. (KHC-00071), *Laccaria* sp. (KHC-00072)
Laccaria sp. (KHC-00075), *Laccaria* sp. (KHC-00076), *Laccaria* sp. (KHC-00079)
Laccaria sp. (KHC-00080), *Laccaria* sp. (KHC-00081), *Laccaria* sp. (KHC-00082)
Laccaria sp. (KHC-00085), *Laccaria* sp. (KHC-00086), *Laccaria* sp. (KHC-00087)
Laccaria sp. (KHC-00088), *Laccaria* sp. (KHC-00090), *Laccaria* sp. (KHC-00091)
Laccaria sp. (KHC-00092), *Laccaria* sp. (KHC-00118), *Laccaria* sp. (KHC-00120)
Laccaria sp. (KHC-00122), *Laccaria* sp. (KHC-00126), *Laccaria* sp. (KHC-00128)
Laccaria sp. (KHC-00130), *Laccaria* sp. (KHC-00131), *Laccaria* sp. (KHC-00132)
Laccaria sp. (KHC-00133), *Laccaria* sp. (KHC-00142), *Laccaria* sp. (KHC-00143)
Laccaria sp. (KHC-00144), *Laccaria* sp. (KHC-00145), *Laccaria* sp. (KHC-00146)
Laccaria sp. (KHC-00147), *Laccaria* sp. (KHC-00148), *Laccaria* sp. (KHC-00149)
Laccaria sp. (KHC-00162), *Laccaria* sp. (KHC-00164), *Laccaria* sp. (KHC-00165)
Laccaria sp. (KHC-00166), *Laccaria* sp. (KHC-00167), *Laccaria* sp. (KHC-00168)
Laccaria sp. (KHC-00169), *Laccaria* sp. (KHC-00171), *Laccaria* sp. (KHC-00173)
Laccaria sp. (KHC-00174), *Laccaria* sp. (KHC-00175), *Laccaria* sp. (KHC-00176)
Laccaria sp. (KHC-00184), *Laccaria* sp. (KHC-00185), *Laccaria* sp. (KHC-00186)
Laccaria sp. (KHC-00190), *Laccaria* sp. (KHC-00191), *Laccaria* sp. (KHC-00192)
Laccaria sp. (KHC-00198), *Laccaria* sp. (KHC-00199), Laccaria sp. (KHC-00201)
Laccaria sp. (KHC-00202), *Laccaria* sp. (KHC-00207), *Laccaria* sp. (KHC-00208)
Laccaria sp. (KHC-00209), *Laccaria* sp. (KHC-00211), *Laccaria* sp. (KHC-00212)
Laccaria sp. (KHC-00213), *Laccaria* sp. (KHC-00214), *Laccaria* sp. (KHC-00215)
Laccaria sp. (KHC-00216), *Laccaria* sp. (KHC-00217), *Laccaria* sp. (KHC-00218)
Laccaria sp. (KHC-00219), *Laccaria* sp. (KHC-00221), *Laccaria* sp. (KHC-00222)
Laccaria sp. (KHC-00224), *Laccaria* sp. (KHC-00225), *Laccaria* sp. (KHC-00226)
Laccaria sp. (KHC-00227), *Laccaria* sp. (KHC-00242), *Laccaria* sp. (KHC-00243)
Laccaria sp. (KHC-00244), *Laccaria* sp. (KHC-00260), *Laccaria* sp. (KHC-00261)
Laccaria sp. (KHC-00272), *Laccaria* sp. (KHC-00292), *Laccaria* sp. (KHC-00293)
Laccaria sp. (KHC-00294), *Laccaria* sp. (KHC-00299), *Laccaria* sp. (KHC-00300)
Laccaria sp. (KHC-00301), *Laccaria* sp. (KHC-00311), *Laccaria* sp. (KHC-00312)
Laccaria sp. (KHC-00313), *Laccaria* sp. (KHC-00314), *Laccaria* sp. (KHC-00315)
Laccaria sp. (KHC-00324), *Laccaria* sp. (KHC-00326), *Laccaria* sp. (KHC-00327)
Laccaria sp. (KHC-00328), *Laccaria* sp. (KHC-00329), *Laccaria* sp. (KHC-00333)
Laccaria sp. (KHC-00334), *Laccaria* sp. (KHC-00335), *Laccaria* sp. (KHC-00336)
Laccaria sp. (KHC-00337), *Laccaria* sp. (KHC-00339), *Laccaria* sp. (KHC-00340)
Laccaria sp. (KHC-00341), *Laccaria* sp. (KHC-00342), *Laccaria* sp. (KHC-00343)
Laccaria sp. (KHC-00344), *Laccaria* sp. (KHC-00345), *Laccaria* sp. (KHC-00346)
Laccaria sp. (KHC-00347), *Laccaria* sp. (KHC-00352), *Laccaria* sp. (KHC-00354)
Laccaria sp. (KHC-00358), *Laccaria* sp. (KHC-00360), *Laccaria* sp. (KHC-00363)

Laccaria sp. (KHC-00364), *Laccaria* sp. (KHC-00365), *Laccaria* sp. (KHC-00366)
Laccaria sp. (KHC-00367), *Laccaria* sp. (KHC-00368), *Laccaria* sp. (KHC-00369)
Laccaria sp. (KHC-00370), *Laccaria* sp. (KHC-00372), *Laccaria* sp. (KHC-00374)
Laccaria sp. (KHC-00375), *Laccaria* sp. (KHC-00378), *Laccaria* sp. (KHC-00379)

謝　辞

本研究に対し，3年間の助成をいただいた公益財団法人発酵研究所に心より感謝申し上げます．国立科学博物館に保管されているキツネタケ関連属菌の標本管理については，大塚恵氏，坂本晴雄氏，塚越一也氏，西堀和男氏，野村彩氏，前島つかさ氏，村松義昭氏にご協力いただきました．分子実験は宇野邦彦氏，南京沃氏，平山裕美子氏にご協力いただきました．日本および世界各地の協力者を通じてサンプル提供をしていただきました．海外での野外調査については，以下の方々にご尽力いただきました．厚く御礼申し上げます：Mario Rajchenberg 博士（アルゼンチン），Wichien Yongmanitchai 博士，Anong Chandrasrikul 博士，Poonpilai Suwanarit 博士，Savitree Limtong 博士，Jes Kettratad 博士（タイ），Fuqiang Yu 博士，Zai-wei Ge 博士，Pei-gui Liu 博士，Zhuliang Yang 博士（中国），Pi-Han Wang 博士，Sheng-Hua Wu 博士（台湾），Fabian Carriconde 博士（ニューカレドニア），Ross Beever 博士（ニュージーランド），Tom May 博士，Teresa Lebel 博士（オーストラリア），Stellan Sunhede 博士（スウェーデン）．

文　献

den Bakker, H.C., Zuccarello, G.C., Kuyper, T.H.W. & Noordeloos, M.E. (2004). Evolution and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Leccinum*. New Phytol. **163**: 201-215.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11-15.

Edgar, R.C. (2004a). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research **32**: 1792-1797.

Edgar, R.C. (2004b). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics **5**: 113.

Hibbett, D.S. & Donoghue, M.J. (1995). Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. Can. J. Bot. **73** (Suppl. 1): S853-S861.

Hosaka, K. (2009). Phylogeography of the genus *Pisolithus* revisited with some additional taxa from New Caledonia and Japan. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. B **35**: 151-167.

Hosaka, K. & Castellano, M.A. (2008). Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. B **34**: 161-173.

Hosaka, K., Bates, S.T., Beever, R.E., Castellano, M.A., Colgan, W., Domínguez, L.S., Nouhra, E.R., Geml, J., Giachini, A.J., Kenney, S.R., Simpson, N.B., Spatafora, J.W. & Trappe, J.M. (2006). Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. Mycologia **98**: 949-959.

Hosaka, K., Castellano, M.A. & Spatafora, J.W. (2008). Biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). Mycol. Res. **112**: 448-462.

Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics **17**: 754-755.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A. (2008). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10th edition. CAB International, Wallingford.

Kretzer, A.M. & Bruns, T.D. (1999). Use of *atp6* in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. Mol. Phylogenet. Evol. **13**: 483-492.

Lammers, P., Tuskan, G.A., DiFazio, S.P., Podila, G.K. & Martin, F. (2004). Mycorrhizal symbionts of *Populus* to be sequenced by the United States Department of Energy's Joint Genome Institute. Mycorrhiza **16**: 63-64.

Liu, Y.J., Whelen, S. & Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. Mol. Biol. Evol. **16**: 1799-1808.

Martin, F., Díez, J., Dell, B. & Delaruelle, C. (2002). Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. New Phytol. **153**: 345-357.

Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E.G.J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H.J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P.E., Coutinho, P.M., Delaruelle, C., Detter, J.C., Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P.J., Jain, P., Kilaru, S., Labbé, J., Lin, Y.C., Legué, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Oudot-Le Secq, M.P., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kües, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G.K., Polle, A., Pukkila, P.J., Richardson, P.M., Rouzé, P., Sanders, I.R., Stajich, J.E., Tunlid, A., Tuskan, G. & Grigoriev, I.V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. Nature **452**: 88-93.

Matheny, P.B. (2005). Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (*Inocybe*; Agaricales). Mol. Phylogenet. Evol. **35**: 1-20.

Matheny, P.B., Liu, Y.J., Ammirati, J.F. & Hall, B.D. (2002).

Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). Am. J. Bot. **89**: 688-698.

Matheny, P.B., Curtis, J.M., Hofstetter, V., Aime, M.C., Moncalvo, J.M., Ge, Z.W., Yang, Z.L., Slot, J.C., Ammirati, J.F., Baroni, T.J., Bougher, N.L., Hughes, K.W., Lodge, D.J., Aanen, D.K., DeNitis, M., Daniele, G.M., Desjardin, D.E., Kropp, B.R., Norvell, L.L., Parker, A., Vellinga, E.C., Vilgalys, R. & Hibbett, D.S. (2006). Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. Mycologia **98**: 982-995.

Matheny, P.B., Aime, M.C., Bougher, N.L., Buyck, B., Desjardin, D.E., Horak, E., Kropp, B.R., Lodge, D.J., Soytong, K., Trappe, J.M. & Hibbett, D.S. (2009). Out of the Palaeotropics? Historical biogeography and diversification of the cosmopolitan ectomycorrhizal mushroom family Inocybaceae. J. Biogeogr. **36**: 577-592.

Mueller, G.M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. Fieldiana (Botany) **30**: 1-158.

Osmundson, T.W., Cripps, C.L. & Mueller, G.M. (2005). Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. Mycologia **97**: 949-972.

Rehner, S.A. & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia **97**: 84-98.

Seutin, G., White, B.N. & Boag, P.T. (1991). Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. Can. J. Zool. **69**: 82-90.

Slot, J.C., Hallstrom, K.N., Matheny, P.B., Hosaka, K., Mueller, G., Robertson, D.L. & Hibbett, D.S. (2010). Phylogenetic, structural and functional diversification of nitrate transporters in three ecologically diverse clades of mushroom-forming fungi. Fungal Ecology **3**: 160-177.

Stielow, J.B., Vaas, L.A.I., Göker, M., Hoffmann, P. & Klenk, H.P. (2012). Charcoal filter paper improves the viability of cryopreserved filamentous ectomycorrhizal and saprotrophic Basidiomycota and Ascomycota. Mycologia **104**: 324-330.

Swofford, D.L. (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several *Cryptococcus* species. J. Bacteriol. **172**: 4238-4246.

Vilgalys, R. & Sun, B.L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 4599-4603.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), PCR protocols, p. 315-322, Academic Press, New York.

Zervakis, G.I., Moncalvo, J.M. & Vilgalys, R. (2004). Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. Microbiol. **150**: 715-726.

IFO Res.Commun. 26
71-85, 2012

単細胞シャジクモ藻類ミカヅキモにおける生殖隔離，種分化機構の研究

関　本　弘　之

日本女子大学理学部物質生物科学科
〒112-8681　東京都文京区目白台2-8-1

Speciation and reproductive isolation in unicellular charophycean alga, *Closterium peraceroum-strigosum-littorale* complex

Hiroyuki Sekimoto

Department of Biological and Chemical Sciences, Faculty of Science, Japan Women's University
2-8-1 Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, Japan.

The *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex is a unicellular alga, and is known to be composed of several reproductively isolated mating groups of heterothallic strains. Group I-E is completely isolated from mating groups II-A and II-B, groups II-A and II-B are partially isolated from each other, and only mating-type plus (mt^+) cells of group II-A and mating-type minus (mt^-) cells of group II-B form zygotes. Sexual cell division in both mating-type cells of group II-A was stimulated in conditioned media in which cells of group II-B had been cultured. When mt^- cells of group II-B were stimulated in conditioned medium derived from group II-A, mt^+ cells of group II-B did not respond to the conditioned medium. Conditioned media derived from group I-E did not exhibit SCD-inducing activity against any strain except those within its own group. From the alignment of deduced amino acid sequences from orthologous PR-IP Inducer genes, we detected a significant similarity among groups II-A and II-B, and mating group I-E had low similarity to other mating groups. The existing degree of reproductive isolation can be partially explained by differences in molecular structures and physiological activities of sex pheromones of these heterothallic mating groups. In the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex, there are two modes of zygospore formation, heterothallic and homothallic. A homothallic strain of *Closterium* (Designation, kodama20) was isolated from a Japanese rice paddy field. Based on alignment of the 1506 group-I introns, which interrupt nuclear small-subunit rDNAs, homothallic kodama20 is most closely related to the heterothallic mating group II-B, which is partially sexually isolated from group II-A. Time-lapse photography of the conjugation process in kodama20 revealed that most of the observed zygospores originated from one vegetative cell. The sexual conjugation process consisted of five stages: 1) cell division resulting in the formation of two sister gametangial cells from one vegetative cell, 2) formation of a sexual pair between the two sister gametangial cells (or between gametangial cells of another adjoined individual), 3) formation of conjugation papillae, 4) release of gametic protoplasts from both members of a pair, and 5) formation of the zygospore by protoplast fusion. We analyzed conjugation of homothallic cells in the presence of phylogenetically closely related heterothallic cells. Homothallic cells could be distinguished from heterothallic cells using calcofluor white vital staining, and hybrid zygospores between the homothallic cells and heterothallic mt^+ cells were confirmed. The results show that at least some of the homothallic gametangial cells possess heterothallic mt^--like characters.

Key words: *Closterium*, heterothallism, homothallism, reproductive isolation, sex pheromone

緒　　言

ミカヅキモを含むシャジクモ藻類は，陸上植物とともにストレプト植物門を構成し，藻類の中でも最も陸上植物に近縁な一群である（Graham *et al.*, 2009; Karol *et al.*, 2001）．シャジクモ藻類には５つの系統群（クロロキブス目，クレブソルミディウム目，ホシミドロ目，コレオケ

E-mail: sekimoto@fc.jwu.ac.jp
共同研究者：土金勇樹（日本女子大学理学部）

ーテ目，シャジクモ目）が含まれるが，クロロキブス目，クレブソルミディウム目では有性生殖が観察されていない．ホシミドロ目，コレオケーテ目，シャジクモ目では有性生殖過程の存在が明らかにされており，特にシャジクモ目が最も陸上植物に近縁であると考えられていたが（Karol *et al.*, 2001），現時点では論争があり結論は得られていない（Timme *et al.*, 2012; Turmel *et al.*, 2006; Wodniok *et al.*, 2011）．ミカヅキモは，ホシミドロ目に属す単細胞藻類である．ミカヅキモの無性増殖期の栄養細胞は単相であり二分裂により増殖しているが，窒素源欠乏などの環境条件変化に反応し有性生殖へ移行し，最終的に二細胞が接合して複相の接合子を形成する．成熟した接合子は，環境条件などの回復に伴い減数分裂を行い，再び単相の栄養細胞として増殖を繰り返すようになる．ミカヅキモ属は，100種類を越える形態学的種から構成され，さらにある種の形態学的種については，雌雄にあたる2つの性を持つヘテロタリックな接合様式（ヘテロタリズム）を示すもの，同一クローン内で接合子を生じるホモタリックな接合様式（ホモタリズム）を示すもの，接合はせずに単為胞子を形成するものなどを含む場合もある．さらにヘテロタリックなものは，交配群を超えた接合反応が全く起こらない完全に生殖隔離した集団や，低い頻度で接合子を形成できる不完全な生殖隔離交配群などを含んでおり，非常に分化が進んだ集団である．ヘテロタリックな接合を行う二種の細胞に光学顕微鏡レベルでの形態的差異は認められず，いわゆる同型配偶子接合を行うが，この際，接合する細胞の一方を＋型細胞，＋型細胞と有性生殖を起こす相手の細胞を－型細胞と呼んでいる．これまでに，市村，笠井，渡邉らの一連の研究で，オオミカヅキモ（*Closterium ehrenbergii*）およびヒメミカヅキモ（*C. peracerosum-strigosum-littorale* complex）の交配に基づく生殖隔離状況と生物学的種の存在について，いくつかの事実が得られている（Ichimura, 1981, 1983; Ichimura & Kasai, 1982, 1984, 1987; Kasai & Ichimura, 1984, 1986; Watanabe & Ichimura, 1978a, b, 1982）．

一方，我々はヒメミカヅキモの有性生殖に関わる分子機構を解析してきた（Sekimoto 2000, 2005; Sekimoto *et al.*, 2012）．これまでに，接合成立に不可欠な二種の性フェロモン（PR-IP, PR-IP Inducer）が単離され（Nojiri *et al.*, 1995; Sekimoto *et al.*, 1990），それらをコードする遺伝子の配列が明らかになり（Sekimoto *et al.*, 1998; Sekimoto *et al.*, 1994a, b, c），多様な生理活性が示されている（Akatsuka *et al.*, 2006; Tsuchikane *et al.*, 2005）．また，cDNAマイクロアレイ解析により，有性生殖過程で機能する88種の遺伝子群の単離・解析なども進んでいる（Sekimoto *et al.*, 2003; Sekimoto *et al.*, 2006）．さらに，最近，遺伝子導入系が確立され，原因遺伝子の影響を直接モニター出来るようになった（Abe *et al.*, 2008; Abe *et al.*, 2011）．加えて，オオミカヅキモからも有性分裂を誘導する性フェロモンが精製され（Fukumoto *et al.*, 2002），最終的にPR-IP Inducerと相同性を有する遺伝子がクローニングされており（Fukumoto *et al.*, 2003），交配の成否に直接影響をもたらすような遺伝子について，様々な系統株から単離・解析できるようになった．

このような先行研究を通して，ヒメミカヅキモは，分子レベルで配偶子間の相互情報交換を解析し，種分化機構を検討できる，唯一の単細胞生物と位置づけられるようになった．本研究では，生殖隔離度と性フェロモンの活性，遺伝子変異度の相関に注目し，性フェロモン遺伝子の変異が交配能力の第一義的な決め手であることを示唆した．さらにヘテロタリック株の交配群II-Bと非常に近縁な系統関係を示したホモタリック株について，接合過程の詳細を明らかにし（Tsuchikane *et al.*, 2010a; Tsuchikane *et al.*, 2010b），ホモタリック株にヘテロタリック株の接合型に相当する性が存在する可能性についても検証した（Tsuchikane *et al.*, 2012）．

実験方法

野外フィールドからのサンプル採集　国内（島根県，北海道，三重県，山口県，茨城県，岡山県，宮崎県，静岡県，埼玉県），海外（台湾，インドネシア，スロバキア，ニュージーランド，アメリカ，スイス，オーストラリア）にてフィールドを調査し，液体サンプルと土壌サンプルを採集した．サンプルの偏りを減らすために，1つの拠点内の複数箇所からサンプルを採集することとし，サンプルの温度上昇を防ぐため，発泡スチロールの容器と保冷剤を使用した．また，採集場所の緯度と経度，さらに水のpHと水温も測定した．

新規系統保存株の確立　採集したサンプルについて，目的とするヒメミカヅキモと思われる細胞の存在を顕微鏡下で調べた．細胞が見つかった場合，毛細管現象によるパスツールピペット単離法（Pringsheim, 1946）を用い，単離を試みた．液体サンプルは，採集してからできるだけ短時間に，サンプルを直接シャーレに移して行い，土壌サンプルの場合は，研究室内でサンプルをシャーレに移し，一度風乾させた後，シャーレから0.5g移しとり，水を加えて3-4日間静置培養にて，発芽を誘起した後，単離を行った．

滅菌した時計皿を複数用意し，CA培地（Kasai *et al.*, 2004）を満たした後，パスツールピペット単離法を用い

て一個体を時計皿に順に移動させ，ヒメミカヅキモについた土壌，バクテリアなどを落とすための洗浄を行った．これを10回程度くりかえし，無菌化し，最終的にCA培地の入ったねじ口試験管の中に洗浄後の1個体を入れ，静置培養を行った．2-3週間後，試験管内で増殖したヒメミカヅキモを150 mlのCA培地の入った300 ml三角フラスコに植え替えし，系統保存株を確立した(Table 1)．培養は，23℃のインキュベーター内で，16時間明期，8時間暗期の連続周期下で行い，光源とした蛍光灯（FL40SSD; Toshiba, Tokyo, Japan）の光量は培養培地表面において94 μmol·m^{-2}·s^{-1}になるように調節した．

既存系統保存株の培養　本研究では，国立環境研究所より分譲されたNIES-67, 68（交配群I-E），NIES-53, 54, 56, 57, 58, 59, 62, 63（交配群II-A），NIES-60, 61, 64, 65, 69, 70（交配群II-B），NIES-261（交配群II-C）のヒメミカヅキモ既存系統保存株も用いた．これらの細胞についても，150 mlのCA培地が入った300 ml三角フラスコにて，前述の条件下で静置培養した．

ゲノムDNAの単離とPCRによる18S rDNA 1506 group 1 intron領域，ITS2領域の増幅，配列決定　300 ml三角フラスコで2週間培養したヒメミカヅキモ培養株を遠心し（3000 rpm, 5 min ; KUROTA/RS-240 ローター），上清を捨て，新たなC培地を加えた．これを3回繰り返し，多糖類を洗い落とした．回収した細胞から，CTAB法（Murray & Thompson, 1980）またはDNeasy Plant Kits（QIAGEN）を用いてゲノムDNAを抽出した．18S rDNAの1506 group 1 Intron領域は，プライマーとしてCl-GliおよびCL-SR14（Denboh *et al.*, 2003）を用い，96℃で1分間加熱後，95℃で30秒，58℃で30秒，72℃で3分のサイクルを35回繰り返す条件でPCRによる増幅を行った．5.8Sおよび28S rDNAを分断するITS2領域は，Primerセットとして Cl-ITS3 (5'-TCCTGGCTCGATGAAGAACG-3', Denboh *et al.*, 2003), LR1 (5'- GGTTGGTTTCTTTTCCT -3', Vilgalys & Hester, 1990) を用い，同様のPCR条件により増幅を行った．増幅されたPCR産物を精製し，CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Quick Start Kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて反応させた後，キャピラリーシークエンサー（CEQ 2000 XL, Beckman）により，DNA配列を決定した．

ヒメミカヅキモ種内での分子系統解析　1506 group 1 intron領域の配列後部にITS2配列を加えMAFFT ver. 6（Katoh & Toh, 2008）を用いてアラインメントを行ない，ギャップ部分を手動で削除した．ベイズ推定にあたり，MrModeltest 2.1（Nylander, 2004）を利用した階層的尤度比検定でGTR + Gモデルを分子進化のモデルとして利用した．ベイズ推定はMrBayeses 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) により行った．系統樹の構築にはマルコフ連鎖モンテカルロ法（MCMC法）を使用した．計算の反復は10^6世代繰り返し，100世代につき1つのサンプリングを行って，合計10^4本の系統樹を得た．この際，MCMCが定常状態に達したことの指標として，複数のMCMC反復を同時に行い，それぞれで得られた系統樹の分割頻度分布の標準偏差の平均が0.01以下であることを確認した．得られた系統樹のうち，最初の25%をburn-inとして除去し，残った系統樹から50% majority-rule consensus系統樹を作製し，樹形とそれぞれの枝の事後確率を推定した．1506 group 1 intron領域については，PAUP 4.0b10 (Swofford) を用いて，重み付けをしない最大節約法（MP）による解析（1000回計算）によりブートストラップ値を算出した（Felsenstein, 1985）．また，近隣結合法（NJ, Saitou & Nei, 1987）では，Jukes-Cantor model（Jukes & Cantor, 1969）を用い，PAUP 4.0b10による1000回計算によりブートストラップ値を算出した．また，ルートとして，交配群II-Cの1506 group 1 intron領域の配列（Tsuchikane *et al.*, 2008）を用いた．

接合様式解析と交配群推定　CA培地に植え継ぎ後2週間培養した細胞群を，50 mlチューブに移し，遠心（3000 rpm, 5 min; KUBOTA/RS-240 ローター）により培地を取り除き，窒素源を含まない培地（MI培地：(Ichimura, 1971)）中に再懸濁した．この操作を3回繰り返して細胞を洗浄し，血球計算板を用いて顕微鏡下で細胞数を計測した．24穴プレート内の各ウェルあるいは試験管（直径17 mm，長さ130 mm）に，掛け合わせる2種の細胞を各10000細胞ずつ加え，液量を最終的に2 mlになるようにMI培地で調整した．掛け合わせには，交配群，接合型が明らかになっている既存の交配群の系統保存株も用いた．また，ホモタリック株であるかを確認するために，1つのクローン株のみを20000細胞（最終液量は2 ml）入れるウェルも用意した．その後，プレートごと23℃のインキュベーター内にセットし，連続光で72時間培養した後，接合子形成の有無を確認した．本研究で単離したkodama20株（NIES-2666, 国立環境研究所）については，接合誘導開始時の細胞密度を変えて，最終的な接合子形成に対する影響も検討した．

有性分裂誘導活性の検出　MI培地中に懸濁した交配群II-A（NIES-53, -54），II-B（NIES-64, -65），およびI-E（NIES-67, -68）の各細胞を，交配群毎に2 mlのMI培地中に10000細胞ずつ含むよう混合し，試験管内で連続光

Table 1 List of *Closterium* strains used in this study

Strain designation	Locality	Mating type	Mating group	DDBJ accession number 1506 group I intron	DDBJ accession number ITS2
[a]NIES- 58	Mito, Ibaraki, Japan	–	II-A	AB363684	AB625552
[a]NIES- 59	Mito, Ibaraki, Japan	+	II-A	AB363685	AB625553
[a]NIES- 62	Katsuta, Ibaraki, Japan	+	II-A	AB625558	AB625550
[a]NIES- 63	Katsuta, Ibaraki, Japan	–	II-A	AB625559	AB625551
[a]NIES- 60	Mito, Ibaraki, Japan	+	II-B	AB625557	AB625549
[a]NIES- 61	Mito, Ibaraki, Japan	–	II-B	AB625556	AB625548
[a]NIES- 64	Japan	–	II-B	AB363686	AB625544
[a]NIES- 65	Japan	+	II-B	AB363687	AB625545
[a]NIES- 69	Abiko, Chiba, Japan	+	II-B	AB363688	AB625546
[a]NIES- 70	Abiko, Chiba, Japan	–	II-B	AB363689	AB625547
Slo26-1	Devín, Bratislava, Slovakia	+	II-B	AB625539	AB625541
Slo26-4	Devín, Bratislava, Slovakia	–	II-B	AB625540	AB625542
[a]NIES- 261	Katsuta, Ibaraki, Japan	+	II-C	AB363690	AB625543
[a]NIES- 67	Damchan, Nepal	+	I-E	AB363691	AB625554
[a]NIES- 68	Damchan, Nepal	–	I-E	AB363692	AB625555
kodama20 (NIES-	Kodama, Saitama, Japan	hom	hom	AB477426	AB625611
shima6–1	Matsue, Shimane, Japan	x	unknown	n.a.	n.a.
shima10–5	Matsue, Shimane, Japan	hom	hom	n.a.	n.a.
shima10–2	Matsue, Shimane, Japan	x	unknown	n.a.	n.a.
shima19-10	Izumo, Shimane, Japan	x	unknown	n.a.	n.a.
shima19-9	Izumo, Shimane, Japan	x	unknown	n.a.	n.a.
HO36-3	Naie-tyo, Hokkaido, Japan	x	unknown	n.a.	n.a.
HO36-6	Naie-tyo, Hokkaido, Japan	x	unknown	n.a.	n.a.
Mie54–1	Matsuzaka, Mie, Japan	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mie54–2	Matsuzaka, Mie, Japan	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mie54–7	Matsuzaka, Mie, Japan	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Zu81-12	Kerns, Switzerland	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Zu81-13	Kerns, Switzerland	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
mel88–1	Warmambool, Australia	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
mel88–2	Warmambool, Australia	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
mel88–4	Warmambool, Australia	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
mel88–5	Warmambool, Australia	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
mel88–7	Warmambool, Australia	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
oki23-4	Japan	-	II-B	n.r.	n.a.
oki23-2	Japan	+	II-B	n.r.	n.a.
oki21-8	Japan	hom	hom	n.r.	n.r.
twl15-4	Taoyuan, Taiwan.	-	II-B	n.r.	n.r.
twl15-7	Taoyuan, Taiwan.	+	II-B	n.r.	n.r.
twl15-3	Taoyuan, Taiwan.	hom	hom	n.r.	n.a.
twl15-8	Taoyuan, Taiwan.	hom	hom	n.r.	n.a.
twl15-10	Taoyuan, Taiwan.	x	unknown	n.r.	n.a.
ba18_18	Pacung, Bali, Indonesia	hom	hom	n.r.	n.r.
BS3-2	Tikusei, Ibaraki, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
YS6	Tikusei, Ibaraki, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
GS6	Tikusei, Ibaraki, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
oka3	Seto, Okayama, Japan	hom	hom	n.r.	n.r.
oka4	Seto, Okayama, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.

Table 1 continued

Strain designation	Locality	Mating type	Mating group	DDBJ accession number 1506 group I intron	ITS2
saku1	Sakuragawa, Ibaraki, Japan	n.a.	n.a.	n.r.	n.a.
Miya184-1	Ebino, Miyazaki, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
Miya184-12	Ebino, Miyazaki, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
yama51	Nagato, Yamaguchi, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
yama58	Bofu, Yamaguchi, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
shi11	Tamo, Shizuoka, Japan	hom	hom	n.r.	n.a.
shi17	Ito, Shizuoka, Japan	hom	hom	n.r.	n.r.
Tw231-2	Nanto, Taiwan.	hom	hom	n.r.	n.a.
Tw231-4	Nanto, Taiwan.	hom	hom	n.r.	n.a.
Tw231-5	Nanto, Taiwan.	hom	hom	n.r.	n.a.

[a]Strains obtained from the National Institute for Environmental Studies (Ibaraki, Japan).
x, no sexual reaction was observed,
n.a.; not analyzed, n.d.; not determined, n.r.; analyzed but not registered yet in the public database.

の下48時間培養した．その後，細胞をメンブレンフィルター（Durapore, GVWP; Millipore, Bedford, MA, USA）で濾過し，調製培地を得た．さらに，調製培地中に，MI培地中で1日前培養した各細胞を10000細胞となるように加え，有性分裂により半細胞が伸長せず短いままとなっている細胞の割合を，24時間後に計測した（Tsuchikane *et al.*, 2003）．コントロールとして，調製培地の代わりにMI培地を用いたものを用いて各細胞を培養し，栄養分裂後の一過的に見られる短い細胞の割合を計測した．

PR-IP Inducer オルソログをコードする **cDNA** のクローニングとシークエンス　MI培地に置換，洗浄した交配群 II-A（NIES-53, -54）または交配群 II-B（NIES-64, -65）の細胞を，75 ml の MI 培地の入った 300 ml 三角フラスコに36万細胞ずつ含むように混合し，連続光下で2日間培養した．細胞を回収し，全 RNA を既報の通りに単離した（Tsuchikane *et al.*, 2008）．TAKARA RNA LA PCR Kit (AMV) ver. 1.1（Takara Bio, Ohtsu, Shiga, Japan）を用いて，cDNA を合成し，オオミカヅキモ（NIES-229 株，DDBJ accession number AB066448）と交配群 I-E（NIES-68 株）の PR-IP Inducer のアミノ酸およびヌクレオチド配列（DDBJ accession number BAA88710）を参考にした縮重プライマー（DP-1: 5'-T(A/T)CAAC(A/C) T(C/G) AC(C/G)TTCTACAA-3', Tsuchikane *et al.*, 2008）を設計し，cDNA adapter-specific primer（5'-GTTTTCCCAGTCA CGAC-3'）とともに用いて，3'-RACE を行った．PCR 条件は，95℃ で1分の後，95℃ で1分，58℃ で0.5分，72℃ で3分の反応を35回繰り返し，最後に72℃ で3分反応させるものとした．ダイレクト PCR により増幅産物の塩基配列を決定した後，GeneRacer Kit（Invitrogen）を用いて cDNA を再度合成し，遺伝子特異的プライマー（5'-CAGGGCCGGAAGTCCCACAAGTA-3'）およびアダプタープライマー（5'-CGACTGGAGCACGAGGACA CTGA-3'）を用いて，遺伝子の5'上流側領域を増幅した．増幅産物を pGEM T-easy vector（Promega）に挿入した後，宿主大腸菌として DH5α を用いてクローニングし，塩基配列を決定した．

タイムラプスビデオ解析　MI培地に懸濁した kodama20 株を始めとするホモタリック株について，MI培地を加えたガラスベースディッシュ（GLASS BASE DISH, IWAKI）内に10000-30000細胞となるように添加し，計3 ml の MI 培地による細胞懸濁液を調製した．その後，倒立顕微鏡（IX-71: Olympus, Tokyo, Japan）下でタイムラプス撮影を行った．培地表面において108μ mol (photons) m^{-2} s^{-1}になるように光量を調節した顕微鏡下で，1 well につき3視野に対する15分間隔の連続撮影（多点タイムラプスビデオ撮影）を室温（約23℃），連続光下で行った．撮影と解析には Lumina Vision Ver. 2.5（MITANI, Tokyo, Japan）を使用した．72 h 後の最後の画面上にある接合子に番号をつけ，その接合子1つ1つを72 h から時間を遡りながら細胞がどの時間にどのような振る舞いをしていたのか調べた．このとき最初から最後まで追跡出来ないものは数に加えないこととした．

FB28 による生体染色法を用いた接合実験　交配群 II-B のヘテロタリック株（slo26-1; het+, slo26-4; het−）を接合実験用に調製し，細胞懸濁液 5 ml に対して最終濃度が0.01%になるように FB28（Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich Japan CO. LTD., Tokyo, Japan）を添加

して，時折懸濁しながら30分間室温で静置した．その後ふたたびMI培地で洗浄を3回繰り返し，血球計算盤を用いて顕微鏡下で細胞数を計測した．その後，染色していないホモタリック株と，染色した一方のヘテロタリック株を，全体が1×10^4細胞になるように1：1で試験管に加え，最終液量が2mlになるようにMI培地で調整した．また，ホモタリック株の代わりに，染色していない相補的なヘテロタリック株をコントロールとして用いる処理区も調製した．これらの細胞を，培養温度23℃，連続光下で72時間培養し，接合を誘起した．誘起後，12.5%グルタルアルデヒド溶液を，サンプル2mlに対して100μl注入し，細胞を固定した．蛍光染色された細胞は，倒立顕微鏡を用い，紫外線による励起とフィルター（U-MWU2, Olympus）を組み合わせて可視化した．

結果と考察

新規ヒメミカヅキモ系統株の確立と種内系統解析　国内外の水田や湖沼などの止水淡水域から，液体サンプル・土壌サンプルを採取し，微小形態を指標にヒメミカヅキモの単離を試み，最終的に国内から26株，海外から18株のヒメミカヅキモと思われる系統株を得た（Table 1）．得られた系統株のうち，33株について交配様式を調べたところ，20株がクローン株内で接合子を形成したことから，自家接合型の接合様式（ホモタリズム）であることが明らかになった．また，さらにその多くは水田から単離された株であることが確認された．クローン株内で接合子を形成しないものについては，他家接合型の接合様式（ヘテロタリズム）を示すヘテロタリック株であると推定されたが，既存の系統株との掛け合わせでも接合子を形成しないものも含まれており，新規の交配群である可能性も示唆された．

ヘテロタリック株の交配関係　交配群の中からII-A, II-B, II-C, I-Eを選び，それらを構成する系統株を掛け合わせ，接合子形成を調べた（Table 2）．接合子形成は，同一交配群内では安定して観察され，交配群II-Aの＋型細胞と交配群II-Bの－型細胞の間でも観察されたが，反対の組み合わせでは観察されず，非対称な生殖隔離が生じていることが判明した．また，交配群I-Eはどの交配群とも接合子を形成せず，完全に生殖隔離していた．なお，この実験では，交配群II-CのNIES-261株（＋型細胞）も用いたが，どの交配群とも接合子を形成せず，完全に生殖隔離していることが判明したものの，NIES-261株と相補的な接合型を示す系統株が系統保存施設において失われており，今回の調査でも見つけることが出来なかったため，II-A, II-B, I-Eに絞って，以後の解析を進めることとした．

有性分裂誘導活性の検出と交配群を超えた交叉活性　各交配群の異性細胞を混合培養した後，培地を回収し，調製培地とした．その中で各交配群の細胞を単独で培養し，有性分裂により配偶子嚢細胞形成が誘起されるかを観察した．その結果，各交配群の調製培地には自身の有性分裂を誘起する能力が含まれていることが確認された（Fig. 1）．また，交配群II-Bの調製培地には，交配群II-Aのいずれの接合型細胞（NIES-53, 54）に対しても有性分裂を誘起する活性が含まれていた．交配群II-Aの調製培地には，交配群II-Bの－型細胞（NIES-64）の有性分裂を誘起する活性は含まれていたものの，＋型細胞（NIES-65）の有性分裂を誘起する活性は見られなかった．交配群I-Eに対しては，交配群II-A, II-Bのいずれの細胞由来の調製培地も，有性分裂を誘起する活性を示さず（データ非掲載），交配群I-Eの調製培地も，交配群II-A, II-Bのいずれの細胞にも有性分裂を誘起する活性を示さなかった．

交配群II-AおよびII-Bについて，接合型と性フェロモン放出の関係を調べたところ，交配群I-Eとは異なり，＋型細胞がPR-IP Inducerを放出し，－型細胞がPR-IPを放出することが判明した（Tsuchikane *et al.*, unpublished）．これらの結果より，交配群II-AとII-Bのそれぞれの＋型細胞から放出されるPR-IP Inducerは，互いの－型細胞には作用しうることが示唆された．さら

Table 2　Intercrosses among heterothallic strains of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex

		group II-A		group II-B		group I-E	
		mt+	mt-	mt+	mt-	mt+	mt-
group II-A	mt+	-	Z	-	Z	-	-
	mt-	Z	-	Z	-	-	-
group II-B	mt+	-	-	-	Z	-	-
	mt-	-	-	Z	-	-	-
group II-C	mt+	-	-	-	-	-	-
group I-E	mt+	-	-	-	-	-	Z
	mt-	-	-	-	-	Z	-

Z; Zygospores were formed, -; No sexual reaction was observed

に，交配群 II-A および II-B の間で見られた非対称な生殖隔離の原因は，交配群 II-A の－型細胞から放出される PR-IP が交配群 II-B の＋型細胞に対して，有性分裂誘導を始めとした生理活性を発揮できなくなったためであることも示唆された．

性フェロモンオルソログをコードする cDNA の単離とアミノ酸配列比較　オオミカヅキモ（*Closterium ehrenbergii*）の有性分裂誘導フェロモン（AB066448）とヒメミカヅキモの交配群 I-E の PR-IP Inducer（AB 012698; *CpPI-E*）について，アミノ酸配列，ヌクレオチド配列を比較し，交配群 II-A および II-B から PR-IP Inducer のオルソログ分子をコードする cDNA を単離した（AB363680; *CpPI-A* and AB363681; *CpPI-B*）．PR-IP Inducer に関して推定されるアミノ酸配列を比較したところ，CpPI-A と CpPI-B の間で 95.1% のアミノ酸配列が一致していたが，交配群 I-E の PR-IP Inducer（CpPI-E）に対しては，CpPI-A および CpPI-B は，それぞれ 70.4% および 68.3% の同一性に留まっていた（Fig. 2）．これらの結果は，交配群 II-A および II-B の PR-IP Inducer が，交配群を超えて互いに作用しうるが，交配群 I-E には作用し得ないことと一致していた．

PR-IP を構成する 19-kDa サブユニットについても，交配群 I-E の配列を利用して数カ所のプライマーをデザインし，コードする cDNA（*Cp19ksu*）を交配群 II-A および II-B から単離した．その結果，Cp19ksu-A と Cp19ksu-B の間で 82.9% まで同一性が低下しており，交配群 I-E の 19-kDa サブユニット（Cp19ksu-E）に対しても，Cp19ksu-A および Cp19ksu-B は，それぞれ 73.4% および 74.2% の同一性に留まっていることが判明した（Tsuchikane *et al.*, unpublished）．この結果も，交配群 II-A および II-B の間で見られた非対称な生殖隔離の原因が，PR-IP にあるとする考察と一致しており，性フェロモンに変化が生じることにより，生殖隔離が引き起こされ，生物学的な種へと分化することが強く示唆された．また，交配群 II-A の＋型細胞は，交配群 II-B の PR-IP に反応しうるが，交配群 II-B の＋型細胞は交配群 II-A の PR-IP に反応できないことから，両者の PR-IP の受容体のどのような特性の違いが認識能力に影響を与えているのかを，今後，解析する必要性が示唆された．また，性フェロモンの一次構造上の違いは，生殖隔離の原因ではなく，別の理由で生殖隔離した後，遺伝子配列に変異が

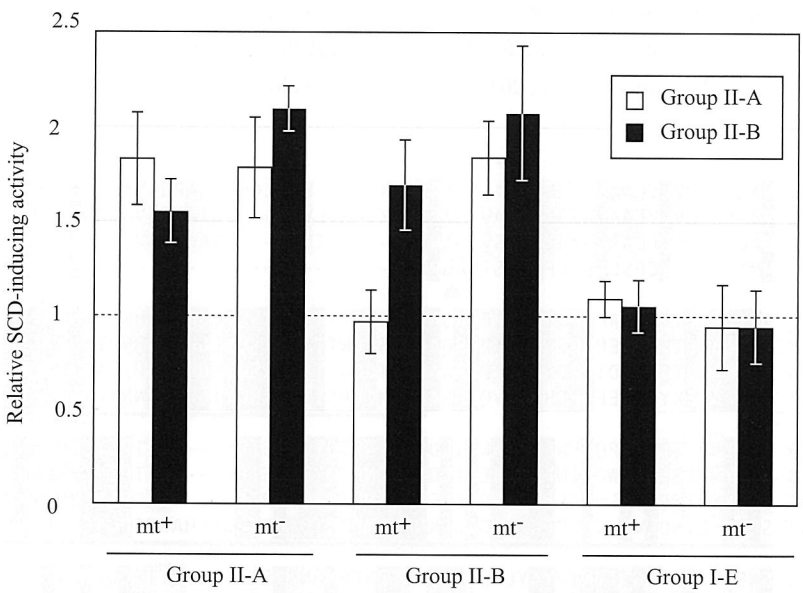


Fig. 1　Effects of conditioned media of group II-A and II-B on the SCD-induction of groups II-A, II-B, and I-E. The mt^+ and mt^- cells from each mating group were incubated separately in conditioned media in which mt^+ and mt^- cells of mating groups II-A or II-B had been cocultured. After 24 h, the numbers of short and normal cells were counted. Control experiments were performed using cells incubated in MI medium for 24 h. The combination of strains prepared for the conditioned media are as follows: NIES-53 (mt^+) and -54 (mt^-) (group II-A) and NIES-64 (mt^-) and -65(mt^+) (group II-B). The vertical bars indicate the SD (n = 3). The activity of each conditioned medium against respective cells is indicated as the relative value; the ratios of short cells in control experiments are assigned the value of 1.0 (dotted line) (partially reproduced from Tsuchikane *et al.*, 2008).

蓄積した結果であることも想定しうる．今後，性フェロモン以外の遺伝子についても，交配群間の比較を進め，進化速度の違いについて検証する必要性が提起された．

ホモタリック株の接合過程のタイムラプス観察による解析　埼玉県児玉郡の水田から単離されたkodama20株は，クローン内で接合子を形成したことから，ホモタリック株であることが確認された．この株のタイムラプス撮影を行い，接合過程を観察したところ，接合子の多くが，分裂により生じた姉妹配偶子嚢細胞同士のペア形成を経て，互いに接合突起を出し，その場所からプロトプラスト放出を行うことにより形成されることが確認された（Fig. 3）（Tsuchikane *et al.*, 2010b）．このような姉妹配偶子嚢細胞間での接合を姉妹接合として，それ以外の非姉妹配偶子嚢細胞間での接合（非姉妹接合）と分けて解析したところ，約90%の接合が姉妹接合によるものであることが明らかになった（Fig. 4）．また，kodama20以外のヒメミカヅキモ，あるいはヒメミカヅキモと近縁なミカヅキモ（*Closterium* sp.）においても，ホモタリック株における接合過程は，姉妹接合による場合が多いことも判明した（Tsuchikane *et al.*, unpublished）．さらにはミカヅキモ属と近縁な接合藻であるタテブエ（*Penium margaritaceum*）のホモタリック株においても，姉妹接合するものが同様に非常に多く見られることも明らかになった（Tsuchikane *et al.*, 2011）．これまでの調査で水田から単離された株の多くは，ホモタリック株である．ホモタリズムでは，ヘテロタリズムに比べると遺伝的多様性が低下すると考えられるが，一年を通した生育条件変化が激しい水田などの環境では，接合相手の存在を必要とするヘテロタリック株よりも，姉妹配偶子嚢細胞間で容易に接合子を形成しうるホモタリック株の方が適応しやすいことが示唆された．

ホモタリック株とヘテロタリック株の接合実験　ホモタリック株において，有意に姉妹接合が起こりやすいことから，ホモタリック株において有性分裂による配偶子嚢細胞が形成される際，ヘテロタリック株における性的二型が生じる可能性が示唆された．ベイズ系統樹により，kodama20株とヘテロタリック株である交配群II-Bは，交配群II-Bと非対称な生殖隔離にある交配群II-Aの株以上に極めて近縁な系統関係にあることが示唆された（Fig. 5）．前述のように，交配群II-AとII-Bは性フェロモンPR-IPの認識低下を原因とする非対称な生殖隔離をしており，種分化の途中段階にあると考えられるが，II-Aが分岐したのち，交配群II-Bとホモタリックな系統に分岐したことが示唆された．また，より近縁なkodama20と交配群II-Bの株を混合した場合，両者はなんらかの接合反応を示すことが期待された．また，交配群II-Bのなかから，近年採集され生殖能力が減退していないslo26-1株（het＋株）およびslo26-4株（het－株）

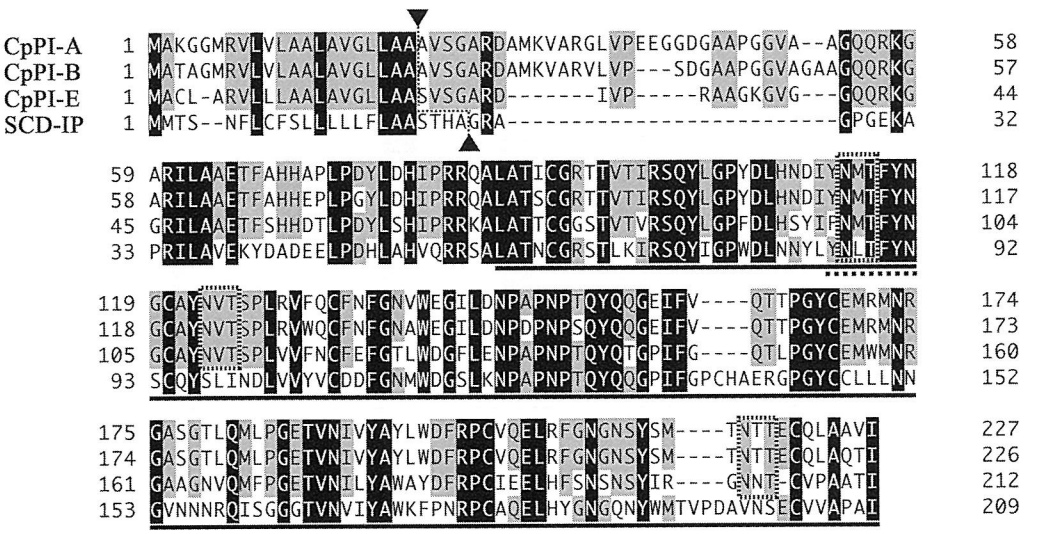


Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of the PR-IP Inducers from the respective mating groups and those of SCD-IP from *C. ehrenbergii*. CpPI-A, CpPI-B, and CpPI-E: PR-IP Inducer from groups II-A, II-B, and I-E, respectively. Underline: putative extracellular secreted portions (mature peptide portion of the sex pheromones); dotted line: amino acid residues used to design the degenerate DNA primer; frame with broken line: consensus sequences for the asparagine-linked glycosylation site; arrowheads and broken lines: putative cleavage sites for the respective signal peptides (partially reproduced from Tsuchikane *et al.*, 2008).

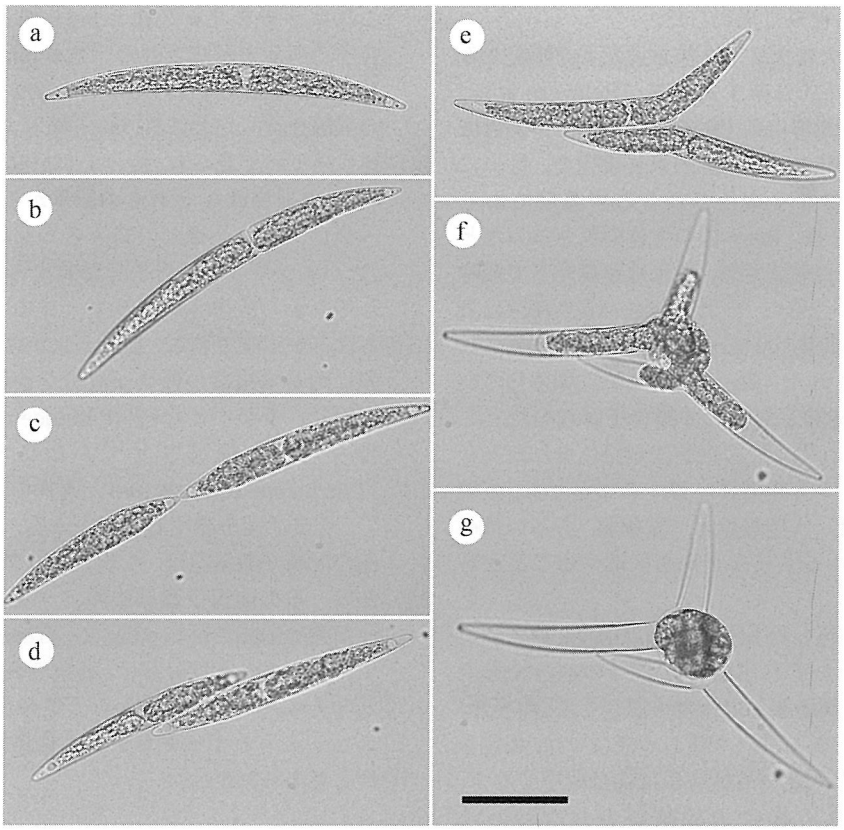


Fig. 3 Zygospore formation in kodama20. Cells of kodama20 were cultured in MI medium. (a) Vegetative cell, (b) formation of septum, (c) cell division resulting in the formation of two sister gametangial cells from one vegetative cell, (d) formation of a sexual pair, (e) formation of conjugation papillae, (f) release of gametic protoplasts from each member of a pair, (g) formation of zygospore by protoplast fusion. Scale bar = 50 μm (reproduced from Tsuchikane *et al.* 2010b).

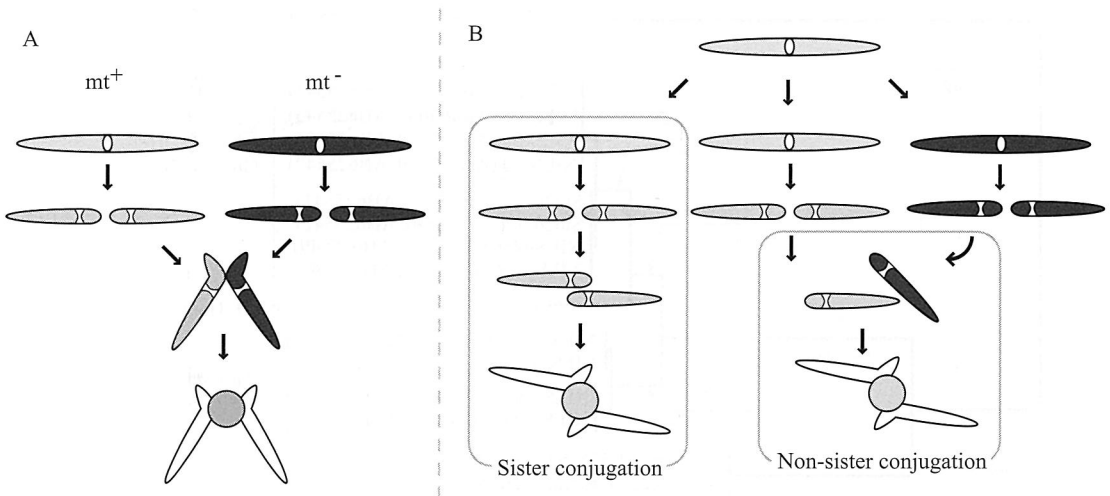


Fig. 4 Schematic illustrations of the processes involved in zygospore formation in the *C. psl.* complex. (A) Zygospore formation of heterothallic strain. (B) Sister and non-sister conjugation of homothallic strain. Sister conjugation proceeds between two sister gametangial cells derived from one vegetative cell. Non-sister conjugation was observed between gametangial cells of separately adjoined individuals (reproduced from Sekimoto *et al.*, 2012).

を以後の接合実験の材料に選択した．

実験に先立ち，ヘテロタリック株を蛍光下で特定するため，紅藻の生長様式に関する報告（Belliveau *et al.*, 1990）を参考に，蛍光増白剤 FB28 を用いた生体染色法の確立を試みた．染色時の FB28 の最終濃度を，接合に影響を与えず，ムラなく染色される最終濃度である0.01％として，het＋株，het－株の生体染色を試みたところ，細胞壁の染色が確認され，染色は連続光下で72時間培養した後も維持された．分裂後細胞の成長部位は染まらないので，72時間後は中心から片側だけが染色された栄養細胞が観察された（Fig. 6）．さらに，染色していない逆の接合型の細胞と混合して接合を誘起したところ，接合阻害は見られず１片の細胞壁が染色された接合子が観察された（データ非掲載）．以上のことから，生殖能力を維持したまま，＋型細胞と－型細胞，あるいはヘテロタリック株とホモタリック株を区別することが可能となった．

kodama20 株と染色した het＋株，kodama20 株と染色した het－株を，それぞれ試験管に１：１の割合で混合し，連続光下で72時間培養して接合を誘起した．明視野，蛍光下で観察したところ，het－株との混合では，染色された細胞に特徴的な変化や有性生殖反応は確認できず，細胞壁が染色された接合子も確認されなかった（Tsuchikane *et al.*, 2012）．一方 het＋株との混合では，染色された細胞に有性生殖反応が起こっており，さらに細胞壁が染色された接合子が観察された（Fig. 6）．ヘテロタリック株単独では，接合子は形成されないことから，これはホモタリック株と het＋株とのハイブリッド接合子であると示唆された（Tsuchikane *et al.*, 2012）．なお，kodama20 株以外のホモタリック株を用いて，同様の実験を行ったところ，het＋株および het－株ともに有性生殖反応が見られ，接合子が形成されることもあった（データ非掲載）．これらの結果から，ホモタリック株とヘテロタリック株との組み合わせにも左右されるものの，ハイブリッド接合子を形成するにあたり，両者は，それぞれから放出される性フェロモンを互いに識別できることが示唆される．kodama20 株では，接合過程の調整に関わる複数の性フェロモンが活性として検出されており，少なくとも PR-IP Inducer のオルソログ分子が接合過程を促進させていることが判明しており（Tsuchikane *et al.*, 2010a），両株の性フェロモンについて，交叉活性を調べる必要がある．さらにホモタリック株の配偶子嚢細胞は，ヘテロタリズムにおける＋型，または－型の配偶子嚢細胞のような性を持っている可能性が強く示唆された（Fig. 7）（Tsuchikane *et al.*, 2012）．ミカヅキモの有性分裂は，減数分裂ではなく体細胞分裂と考えられていることから，性分化が生じるとすれば，エピジェネティックなゲノム修飾が起こっている可能性も考えられた．

結論と課題　ヒメミカヅキモの生殖隔離の１つの機構として，性フェロモンの変異による pre-zygotic な隔離が関わっていることが強く示唆された．今後，各交配群から単離された性フェロモン遺伝子を他の交配群に

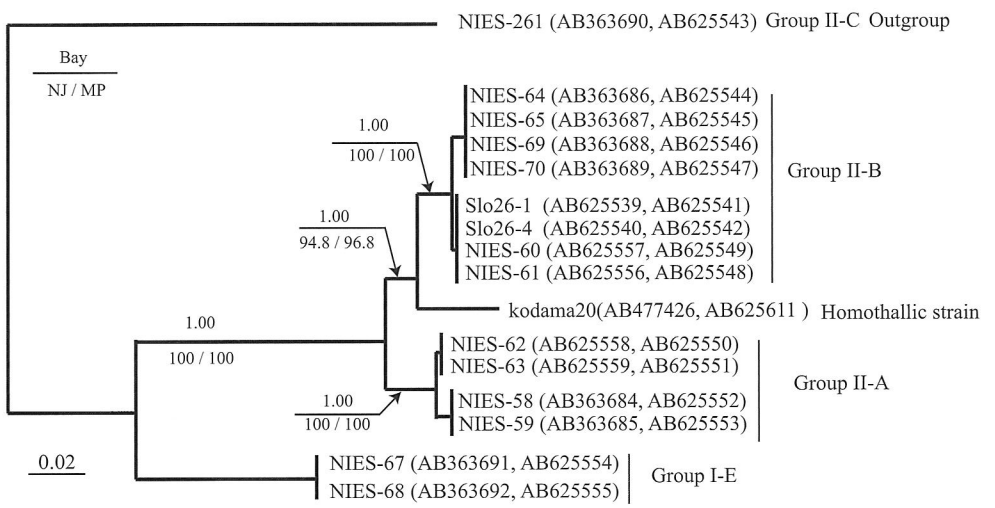


Fig. 5 Bayesian tree based on 1011 bp of the combined aligned 1506 group I intron and ITS2. *Closterium* strains with identical sequences were treated as a single operational taxonomic unit. Numbers indicate posterior probabilities from the Bayesian analysis (top) and bootstrap values from neighbor-joining (NJ) (bottom left) and maximum parsimony (MP) (bottom right) analyses. Branch lengths represent nucleotide substitutions per site (reproduced from Tsuchikane *et al.*, 2012).

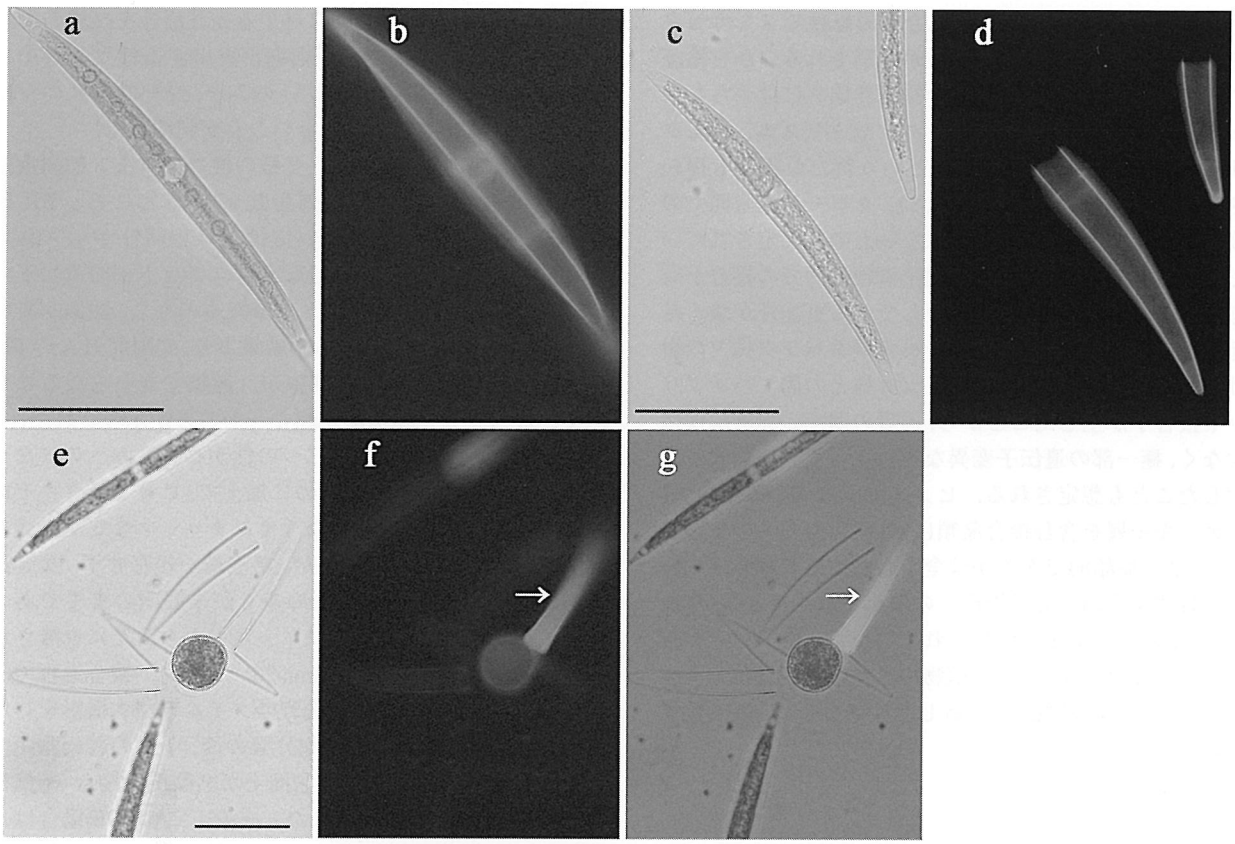


Fig. 6 Photographs of vitally stained *Closterium* cells. a, b; stained mating-type plus (mt^-) cell (slo26-4). c, d; mt^+ cells (slo26-1) cultured for 72 h after staining. e, f, g; hybrid zygospore observed in mixed culture of stained mt^+ and non-stained homothallic cells at 72 h. Scale bar = 50μm. a, c, e; light-microscopic image. b, d, f; Fluorescent Brightener 28 fluorescence image. g; merged fluorescence/light-microscopic images. Arrow points to the stained semi-cell wall (partially reproduced from Tsuchikane *et al.*, 2012).

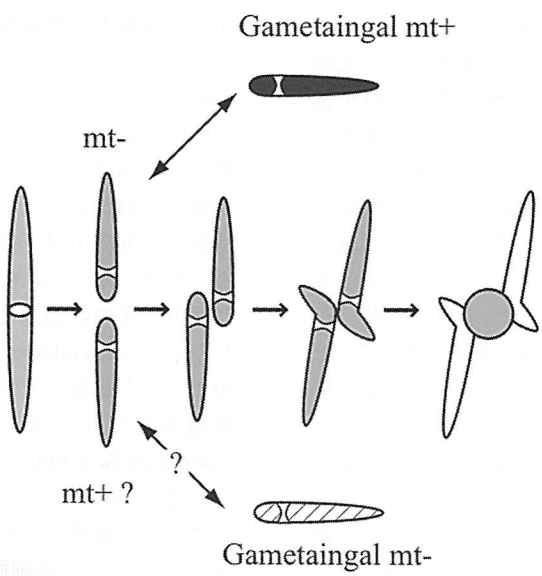


Fig. 7 Possible conjugation process modes in homothallic (gray), heterothallic mating-type plus (mt^+) (black), and mating-type minus (mt^-) cells (slash) (reproduced from Tsuchikane *et al.*, 2012).

対して遺伝子導入し，作製された形質転換ヒメミカヅキモにおいて，どの程度まで隔離が解消されるのかを検証する必要がある．また，新規の交配群確立には至らなかったが，調査，採集の過程で，ヘテロタリズム，ホモタリズムという生殖様式の進化という新たな課題も提起された．ホモタリズムにおいては，クローン細胞間での接合であることから，性分化はないものと推定されていたが，本研究により，姉妹配偶子嚢細胞間での接合が有意に起こることから，性が出現している可能性が強く提起されることとなった．近縁なヘテロタリック株との掛け合わせではあるが，ホモタリック株との間でハイブリッド接合子が生じたことから，両者の間での隔離障壁は少なく，極一部の遺伝子変異などによって生殖様式が変化したことも想定される．ヒメミカヅキモのみならず，ミカヅキモ属を含む接合藻類において，どちらの生殖様式が，より原始的であるかは全くわかっておらず，今後，生殖様式を決める分子機構への取組が求められる．本研究は，これまであまり注目されてこなかったシャジクモ藻類ヒメミカヅキモから，植物の生殖機構の進化を考える上で，重要な問題点を提起したものとして，高く位置づけられた．

要　約

生物学的種概念に基づく種とは，生殖的に他の集団から隔離されている集団のことである．そして，生殖隔離の機構を解析することが，種分化機構の解明につながるものと考えた．単細胞接合藻ヒメミカヅキモ *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex は，＋型，－型と呼ばれる接合型（性）を持ち，生殖的に隔離された交配群の存在が報告されている．また，二種の糖タンパク質性の性フェロモン（＋型細胞から放出され，－型細胞のプロトプラスト放出や有性分裂を誘導する PR-IP と，－型細胞から放出され，＋型細胞の PR-IP 産生や有性分裂を誘導する PR-IP Inducer）により有性生殖過程が厳密に制御されていることが明らかになっている．ヒメミカヅキモにおける交配群間の生殖隔離は，有性生殖時の相互認識が失われることが原因の一つであると推定し，その原因因子として性フェロモンに注目し，生殖隔離の解析を行った．

交配群 I-E は，他の交配群（II-A, II-B）と完全に生殖隔離されており，その性フェロモンも交叉活性を示さない．一方，交配群 II-A の＋型細胞と交配群 II-B の－型細胞の掛合わせでは接合が見られるものの，逆の掛合わせでは接合が見られない．このように非対称な生殖隔離関係にある交配群から有性分裂誘導活性を示す培地を調製し，もう一方の交配群に対する交叉活性を試験したところ，交配群 II-A の－型細胞が放出する性フェロモン（交配群 I-E の PR-IP に相当）のみが，交配群 II-B の＋型細胞にほとんど作用出来ないことが判明した．

交配群 II-A，II-B より，2 種の性フェロモン相同遺伝子を単離し，両者の配列を比較したところ，PR-IP Inducer 相同遺伝子については高い相同性が示された（95.1%）が，PR-IP の 19 kDa サブユニット相同遺伝子ではコードする 129 個のアミノ酸残基のうち，22個が異なっていた（82.9%）．これらの結果より，交配群 II-A の PR-IP を交配群 II-B の＋型細胞が，認識できなくなることで，非対称な生殖隔離が起こったことが示唆された．

＋型，－型と呼ばれる二つの性が存在するヘテロタリックな交配様式を示すものに加えて，ヒメミカヅキモには，同一株内で接合を行なうホモタリックな交配様式を持つものが知られていたが，培養株が現存せず，接合過程や交配様式の進化を含め多くが未解明のままであった．本研究では，国内のフィールドから新たに単離されたホモタリック株（kodama-20）を用い，接合過程の解析を行った．まず，接合過程のタイムラプス撮影を行なったところ，同調的な細胞分裂の後，1 つの親細胞由来の 2 つの姉妹配偶子嚢細胞同士が高頻度に接合（姉妹接合）することが確認された．また，この姉妹接合は，kodama20 株以外のホモタリック株，ミカヅキモ属と近縁な接合藻であるタテブエでも観察された．

1506 group 1 intron 領域および ITS2 領域を用いて，系統解析を行ったところ，kodama20 株は，ヘテロタリックな交配群 II-B と近縁であり，姉妹群を形成した．交配群 II-A と II-B は性フェロモン PR-IP の認識低下を原因とする非対称な生殖隔離をしており，種分化の途中段階にあると考えられるが，II-A が分岐したのち，交配群 II-B とホモタリックな系統に分岐したことが示唆された．

kodama20 株で見られる姉妹接合には，相補的な接合型を示すヘテロタリック株（het）株のような何らかの生理変化を前提にしていることを想定し，kodama20 株と近縁な交配群 II-B の細胞（slo26-1, 26-4）とを掛け合わせた．また，これらは形態的に識別できないため，あらかじめ het 株の細胞壁をカルコフロールホワイトで染色したところ，kodama20 株と het（＋）細胞との混合で，染色された細胞壁を持つ接合子が観察された．het（＋）細胞単独では，接合反応は起こらないため，これは kodama20 株と het（＋）細胞のハイブリッド接合子であると考えられた．このことから，①両者は，それぞれから放出される性フェロモンを互いに識別できること，②hom 株の配偶子嚢細胞は，ヘテロタリズムにおける＋型，または－型の配偶子嚢細胞のような性を持っている可能性，が強く示唆された．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) Tsuchikane, Y., Kokubun, Y. & Sekimoto, H. (2009). Sexual processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). The 9th international phycological congress (Tokyo, Japan), p133.
2) 土金勇樹，国分夢，関本弘之（2009）．ホモタリックな接合藻ヒメミカヅキモにおける接合調整分子の解析．日本植物学会第73回大会（山形），p108.
3) Tsuchikane, Y. & Sekimoto, H. (2010). Asymmetric reproductive isolation by sex pheromones in a unicellular charophycean alga, *Closterium*. International symposium of cell-cell communication in plant reproduction - from pollination to fertilization - (Nara, Japan), p88.
4) 土金勇樹，土屋美紀，日向淑恵，関本弘之（2010）．接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株における「性」の発見．日本藻類学会第34回大会（つくば），p39.
5) 土屋美紀，土金勇樹，関本弘之（2010）．接合藻ヒメミカヅキモにおけるホモタリック株の解析：ヘテロタリック株との接合実験から明らかになった「性」の存在．日本植物分類学会第9回大会（愛知），p57.
6) 土金勇樹，加納亜子，関本弘之（2010）．単細胞接合藻におけるホモタリズムの分子系統．日本植物分類学会第9回大会（愛知），p38.
7) 土金勇樹，関本弘之（2010）．接合藻ヒメミカヅキモにおけるホモタリック株の接合は性フェロモン（PR-IP Inducer）により促進される．日本植物学会第74回大会（愛知），p171.
8) 土屋美紀，土金勇樹，関本弘之（2010）．単細胞接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株は，「性分化」する．日本植物学会第74回大会（愛知），p171.
9) 土金勇樹，馬場未悠，日向淑恵，関本弘之（2011）．接合藻ヒメミカヅキモのホモタリック株における接合機構の解析．日本藻類学会第35回大会（富山），p56.
10) 土金勇樹，関本弘之（2011）．接合藻タテブエ（*Penium margaritaceum*）のホモタリック株における接合過程の解析．日本植物学会第75回大会（東京），p121.
11) Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Baba, M., Nozaki, H. & Sekimoto, H. (2011). Hybrid zygospore formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). The 6th Asian Pacific Phycological Forum (Yeosu, Korea), p151.

原著論文

1) Tsuchikane, Y., Sato, M., Ootaki, T., Kokubun, Y., Nozaki, H., Ito, M. & Sekimoto, H. (2010). Sexual processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). J. Phycol. **46**: 278-284.
2) Tsuchikane, Y., Kokubun, Y. & Sekimoto, H. (2010). Characterization and molecular cloning of conjugation-regulating sex pheromones in homothallic *Closterium*. Plant Cell Physiol. **51**: 1515-1523.
3) Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Kokubun, Y., Abe, J. & Sekimoto, H. (2011). Conjugation processes of *Penium margaritaceum* (Zygnematophyceae, Zygnematophyta). Phycol. Res. **59**: 74-82.
4) Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M. & Sekimoto, H. (2011) Stable nuclear transformation of *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Cell Physiol. **52**: 1676-1685.
5) Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Hindák, F., Nozaki, H. & Sekimoto, H. (2012). Zygospore formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*. Sex Plant Reprod. **25**: 1-9. DOI: 10.1007/s00497-011-0174-z.
6) Sekimoto, H., Abe, J. & Tsuchikane, Y. (2012). New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*. Int. Rev. Cell Mol. Biol. **297**: 309-338.

保存機関に寄託した細胞株

本研究で単離した系統保存株は，以下の学名で国立環境研究所微生物系統保存施設に寄託済みである．
Closterium peracerosum-strigosum-littorale complex (kodama20; NIES-2666).

謝　辞

本研究を進めるにあたり，3年間にわたって研究助成を頂きました公益財団法人発酵研究所ならびに関係者各位に深く感謝致します．

本研究を進めるにあたり，佐藤真知子さん，大滝知子さん，中原千春さん，日向淑恵さん，山崎華奈子さん，国分夢さん，加納亜子さん，中井彩香さん，馬場未悠さん，土屋美紀さんを始めとした本研究室に所属した多くの学生の皆さんが，協力してくださいました．さらに，日本女子大学理学部学術研究員の阿部淳博士，大槻涼博士には，本研究遂行にあたって様々な助言，サポートを頂きました．研究室関係各位に対し深く感謝申し上げます．

文　献

Abe, J., Hiwatashi, Y., Ito, M., Hasebe, M. & Sekimoto, H. (2008). Expression of exogenous genes under the control of endogenous *HSP70* and *CAB* promoters in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Cell Physiol. **49**: 625-632.

Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y., Kitao, N., Kato, M. & Sekimoto, H. (2011). Stable nuclear transformation of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Cell Physiol. **52**: 1676-1685.

Akatsuka, S., Tsuchikane, Y., Fukumoto, R., Fujii, T. &

Sekimoto, H. (2006). Physiological characterization of the sex pheromone protoplast-release-inducing protein from the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Charophyta). Phycol. Res. **54**: 116-121.

Belliveau, D.J., Garbary, D.J. & McLachlan, J.L. (1990). Effects of fluorescent brighteners on growth and morphology of the red alga *Antithamnion kylinii*. Stain Technol. **65**: 303-311.

Denboh, T., Ichimura, T., Hendrayanti, D. & Coleman, A.W. (2003). *Closterium moniliferum-ehrenbergii* (Charophyceae, Chlorophyta) species complex viewed from the 1506 group I intron and ITS2 of nuclear rDNA. J. Phycol. **39**: 960-977.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791.

Fukumoto, R., Dohmae, N., Takio, K., Satoh, S., Fujii, T. & Sekimoto, H. (2002). Purification and characterization of a pheromone that induces sexual cell division in the unicellular green alga *Closterium ehrenbergii*. Plant Physiol. Biochem. **40**: 183-188.

Fukumoto, R., Fujii, T. & Sekimoto, H. (2003). Cloning and characterization of a cDNA encoding a sexual cell division-inducing pheromone from a unicellular green alga *Closterium ehrenbergii* (Chlorophyta). J. Phycol. **39**: 931-936.

Graham, L.E., Graham, J.E. & Wilcox, L.W. (2009). Algae 2nd ed. Peason Education, San Francisco, CA.

Ichimura, T. (1971). Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. In *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*. Edited by Nishizawa, K. pp. 208-214. University of Tokyo Press, Tokyo.

Ichimura, T. (1981). Mating types and reproductive isolation in *Closterium ehrenbergii* Meneghini. Bot. Mag. Tokyo **94**: 325-334.

Ichimura, T. (1983). Hybrid inviability and predominant survival of mating type minus progeny in laboratory crosses between two closely related mating groups of *Closterium ehrenbergii*. Evolution **37**: 252-260.

Ichimura, T. & Kasai, F. (1982). New mating groups, group H and group I, of *Closterium ehrenbergii* Meneghini from Kathmandu Valley and Terai Plains of Nepal. In *Reports on the Cryptogamic Study in Nepal*, March 1982. Edited by Otani, Y. pp. 61-73. National Science Musium, Tokyo.

Ichimura, T. & Kasai, F. (1984). Post-zygotic isolation between allopatric mating groups of *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae). Phycologia **23**: 77-85.

Ichimura, T. & Kasai, F. (1987). Time-lapse analyses of sexual isolation between two closely related mating groups of the *Closterium ehrenbergii* species complex (Chlorophyta). J. Phycol. **23**: 523-534.

Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. *In Mammalian protein metabolism*. Edited by Munro, H.N. Academic Press, New York.

Karol, K.G., McCourt, R.M., Cimino, M.T. & Delwiche, C.F. (2001). The closest living relatives of land plants. Science **294**: 2351-2353.

Kasai, F. & Ichimura, T. (1984). Meiotic anomalies in intergroup crosses between closely related mating groups of *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae). Phycologia **23**: 508-510.

Kasai, F. & Ichimura, T. (1986). Morphological variabilities of three closely related mating groups of *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Chlorophyta). J. Phycol. **22**: 158-168.

Kasai, F., Kawachi, M., Erata, M. & Watanabe, M.M., eds. (2004). NIES-Collection. List of Strains. Microalgae and Protozoa, 7th ed. National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan.

Katoh, K. & Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Brief. Bioinform. **9**: 286-298.

Murray, M.G. & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. **8**: 4321-4325.

Nojiri, T., Fujii, T. & Sekimoto, H. (1995). Purification and characterization of a novel sex pheromone that induces the release of another sex pheromone during sexual reproduction of the heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Cell Physiol. **36**: 79-84.

Nylander, J.A.A., ed. (2004). MrModeltest 2.1. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.

Pringsheim, E.G., ed. (1946). Pure Cultures of Algae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics **19**: 1572-1574.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406-425.

Sekimoto, H. (2000). Intercellular communication during sexual reproduction of *Closterium* (Conjugatophyceae). J. Plant Res. **113**: 343-352.

Sekimoto, H. (2005). Plant sex pheromones. Vitam. Horm. **72**: 457-478.

Sekimoto, H., Abe, J. & Tsuchikane, Y. (2012). New insights into the regulation of sexual reproduction in *Closterium*. Int. Rev. Cell Mol. Biol. **297**: 309-338.

Sekimoto, H., Fukumoto, R., Dohmae, N., Takio, K., Fujii, T. & Kamiya, Y. (1998). Molecular cloning of a novel sex pheromone responsible for the release of a different sex pheromone in *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Cell Physiol. **39**: 1169-1175.

Sekimoto, H., Satoh, S. & Fujii, T. (1990). Biochemical and physiological properties of a protein inducing protoplast release during conjugation in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Planta **182**: 348-354.

Sekimoto, H., Sone, Y. & Fujii, T. (1994a). cDNA cloning of a 42-kilodalton subunit of protoplast-release-inducing protein from *Closterium*. Plant Physiol. **104**: 1095-1096.

Sekimoto, H., Sone, Y. & Fujii, T. (1994b). A cDNA encoding a 19-kilodalton subunit of protoplast-release-inducing protein from *Closterium*. Plant Physiol. **105**: 447.

Sekimoto, H., Sone, Y. & Fujii, T. (1994c). Regulation of expression of the genes for a sex pheromone by an inducer of the sex pheromone in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Planta **193**: 137-144.

Sekimoto, H., Tanabe, Y., Takizawa, M., Ito, N., Fukumoto, R. & Ito, M. (2003). Expressed sequence tags from the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex, a unicellular charophycean alga, in the sexual reproduction process. DNA Res. **10**: 147-153.

Sekimoto, H., Tanabe, Y., Tsuchikane, Y., Shirosaki, H., Fukuda, H., Demura, T. & Ito, M. (2006). Gene expression profiling using cDNA microarray analysis of the sexual reproduction stage of the unicellular charophycean alga *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. Plant Physiol. **141**: 271-279.

Swofford, D.L., ed. (2002). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Timme, R.E., Bachvaroff, T.R. & Delwiche, C.F. (2012). Broad phylogenomic sampling and the sister lineage of land plants. PloS one **7**: e29696.

Tsuchikane, Y., Fukumoto, R., Akatsuka, S., Fujii, T. & Sekimoto, H. (2003). Sex pheromones that induce sexual cell division in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Charophyta). J. Phycol. **39**: 303-309.

Tsuchikane, Y., Ito, M., Fujii, T. & Sekimoto, H. (2005). A sex pheromone, protoplast-release-inducing protein (PR-IP) inducer, induces sexual cell division and production of PR-IP in *Closterium*. Plant Cell Physiol. **46**: 1472-1476.

Tsuchikane, Y., Ito, M. & Sekimoto, H. (2008). Reproductive isolation by sex pheromones in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zynematales, Charophyceae). J. Phycol. **44**: 1197-1203.

Tsuchikane, Y., Kokubun, Y. & Sekimoto, H. (2010a). Characterization and molecular cloning of conjugation-regulating sex pheromones in homothallic *Closterium*. Plant Cell Physiol. **51**: 1515-1523.

Tsuchikane, Y., Sato, M., Ootaki, T., Kokubun, Y., Nozaki, H., Ito, M. & Sekimoto, H. (2010b). Sexual processes and phylogenetic relationships of a homothallic strain in the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex (Zygnematales, Charophyceae). J. Phycol. **46**: 278-284.

Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Hindak, F., Nozaki, H. & Sekimoto, H. (2012). Zygospore formation between homothallic and heterothallic strains of *Closterium*. Sex Plant Reprod **25**: 1-9.

Tsuchikane, Y., Tsuchiya, M., Kokubun, Y., Abe, J. & Sekimoto, H. (2011). Conjugation processes of *Penium margaritaceum* (Zygnemophyceae, Charophyta). Phycol. Res. **59**: 74-82.

Turmel, M., Otis, C. & Lemieux, C. (2006). The chloroplast genome sequence of *Chara vulgaris* sheds new light into the closest green algal relatives of land plants. Mol. Biol. Evol. **23**: 1324-1338.

Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J. Bacteriol. **172**: 4238-4246.

Watanabe, M.M. & Ichimura, T. (1978a). Biosystematic studies of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. II. Reproductive isolation and morphological variation among several populations from the Northern Kanto area in Japan. Bot. Mag. Tokyo **91**: 1-10.

Watanabe, M.M. & Ichimura, T. (1978b). Biosystematic studies of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. III. Degree of sexual isolation amang the three population groups from the Northern Kanto area. Bot. Mag. Tokyo **91**: 11-24.

Watanabe, M.M. & Ichimura, T. (1982). Biosystematic studies of the *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex. IV. Hybrid breakdown between two closely related groups, Group II-A and Group II-B. Bot. Mag. Tokyo **95**: 241-247.

Wodniok, S., Brinkmann, H., Glockner, G., Heidel, A.J., Philippe, H., Melkonian, M. & Becker, B. (2011). Origin of land plants: do conjugating green algae hold the key? BMC evolutionary biology **11**: 104.

IFO Res.Commun. 26
87-100, 2012

アーバスキュラー菌根菌およびその菌に関連する微生物とパートナー植物を活用した土壌管理に関する研究

石　井　孝　昭

京都府立大学大学院生命環境科学研究科
〒606-8522　京都市左京区下鴨半木町 1-5

Soil management with partner plants which propagate arbuscular mycorrhizal fungi and their endobacteria

Takaaki Ishii

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University
1-5 Shimogamohangi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8522, Japan

The aim of this research is as follows: 1) To improve our axenic cultural methods of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) by developing new AMF growth stimulants for spore formation, 2) To isolate and characterize bacteria from spores of AMF, *Gigaspora margarita* Becker & Hall and *Glomus clarum* Nicol. & Smith. These bacteria to be able to inhabit in AMF spores are designated as AMF endobacteria. 3) To propose the introduction of intercropping using sods such as bahiagrass and *Vulpia myuros* for profitable use of AMF and their endobacteria. From these research, we have found amines such as ethylenediamine (EDA) and 1,2-propanediamine (PDA) which remarkably stimulate AMF spore formation. These amines were detected in mycorrhizal bahiagrass roots, but not in non-mycorrhizal ones. EDA and PDA released from roots, which are known as chelate compounds, will contribute to absorption of mycorrhizal plants as well as spore formation of AMF. Three bacterial strains were detected in only three spores from approximately 500 spores of *Gi. margarita*, and one bacterial strain was detected in six spores from approximately 500 spores of *G. clarum*. These bacteria were classified by morphological methods and on the basis of ribosomal RNA gene sequences as *Bacillus* sp. (KTCIGM01), *Bacillus thuringiensis* (KTCIGM02), and *Paenibacillus rhizospherae* (KTCIGM03) from *Gi. margarita*, and as *Pseudomonas* sp. (KCIGC01) from *G. clarum*. These four endobacteria were not only antagonistic microorganisms to the soil-borne plant pathogens (SBPPs) such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* MAFF 744088, *Rosellinia necatrix*, *Rhizoctonia solani* MAFF 237426, and *Pythium ultimum* NBRC 100123, but also beneficial microorganisms on stimulation of phosphorus solubilization, ethylene production, nitrogen fixation by nitrogenase activity, and AMF hyphal growth. As AMF and their endobacteria were well-propagated in/on partner plants, the utilization of the partner plants with these beneficial microorganisms will be useful to the construction of safe and secure crop production. In addition, from observation of spores and hyphae of AMF by using an in situ scanning electron microscope (Quanta 250FEG; FEI Co., Japan), bacterial aggregates and structures similar to biofilms were detected on the surface of hyphae and spores. We also obtained AMF spores without their endobacteria by using our axenic cultural methods. Therefore, we are investigating whether AMF in themselves have antagonistic effects on SBPPs, and the stimulation of phosphorus solubilization, ethylene production, nitrogenase activity and AMF hyphal growth.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi, axenic culture, amines, AMF endobacteria, intercropping

緒　　言

第 2 次世界大戦後の化学合成農薬や化学肥料の使用は，大戦後の衛生面や食料不足の改善に大いに貢献した反面，広範囲に渡り大量に使用されたため，使用20数年後から環境破壊，食料汚染，病害虫の農薬抵抗性獲得などの様々な問題が表面化してきている．その改善策の非常に有望な方法としては，植物が本来持っている能力を十分に発揮させるための「土づくり」と「パートナーを活かす」技術であると考えられる．この栽培技術の開発は環境にやさしく，消費者への安心・安全な農産物の提供に大いに貢献すると思われる．また近い将来の天然資

E-mail: tishii@kpu.ac.jp

源の枯渇という問題に対する有効な解決策の一つにもなると考えられる.「パートナーを活かす」技術は,「土づくり」と密接なつながりを持ち,特に果樹と相性の良いパートナーであるナギナタガヤのような植物は,アーバスキュラー菌根菌(AMF)を共生させ,その増殖を助けるとともに,土壌病原菌に対する拮抗作用および難溶性リンを溶解させる能力を有している微生物もAMFの胞子内あるいは周辺に生息することから,ナギナタガヤのようなパートナー植物を用いた草生栽培は好適な土壌環境を作る上で有効であることを筆者らは明らかにしている(石井, 2007; 石井・Cruz, 2010).このようなパートナー植物とそれに生息する微生物の利用は化学合成肥料や農薬の削減に有効であり,環境にやさしく,安心・安全な食料生産に貢献することが期待される.

草生栽培は,果樹園の土壌管理法の一つとして古くから先人によって検討されてきた技術である.しかし,この技術の短所として,1) 樹と草との養水分の競合が起こる,2) 病害虫の潜伏場所を与えて防除が困難となる,3) 凍害を受けやすい地帯では草生によって被害がやや大きくなる傾向がある,などがあげられる.そのため,除草剤による清耕法が土壌侵食や土壌の悪化を助長し,また安全性に欠け,危険な技術であるという大きな問題を投げられているにもかかわらず,この清耕法が樹園地の主要な土壌管理法になっている.

その反面,長所としては,1) 雨滴の衝撃を軽減して,土壌侵食を防止し,養分の溶脱を防ぐ,2) 腐植源としての有機物が補給できる,3) 草の根による土壌の物理性の改善が期待できる,4) 地温の激変を防止する,5) センチュウなどの害を軽減する,6) マメ科植物を利用すれば根粒細菌の働きで空気中の窒素を固定できるので,窒素肥料の削減あるいは低減が図れる,7) AMFとその菌に関連する有用微生物が増殖するので,化学肥料の削減が図れる,8) ナギナタガヤ草生では除草剤の削減が図れる,などがあげられる(Ishii *et al.* 1996a; 2000a; 石井, 2007).

AMFは,宿主植物の養水分の吸収促進,病害抵抗性やストレス耐性の付与,果実品質の向上などに貢献する見返りとして宿主の根に菌糸を侵入させて植物から光合成産物を得ている.そのため,AMFは自らの増殖のための炭素源を宿主のみからしか得られない絶対共生菌であると考えられており,本菌の純粋培養は不可能であると言われてきた.そのため,AMF接種源は一般に宿主植物を利用して作製されており,ポットなどで宿主植物を栽培することで接種源を大量に生産することができる(堀井ら, 2007).しかしながら,その保存性は悪く,保存期間が長くなると胞子の休眠,発芽率低下といった問題が生じる.また,ポットでの接種源作製は一般的に無菌条件でないため,他の生物や環境の影響を受ける.同じ場所で複数の接種源を作製する場合では,目的のAMF以外の混入も起こり,胞子を採取する際に除去作業が非常に煩雑になる.しかし,筆者らはAMFの生長に関与する物質の単離・同定によって,宿主の根や根抽出物を全く用いない人工の培養基内でも,AMF母胞子から新胞子を生産でき,数世代も継代培養できる純粋培養技術を確立した(石井・堀井, 2007a; 2007b; 堀井・石井, 2007).この純粋培養用培地には,AMF菌糸を誘引する作用やAMFの生長を促進する作用を持ち,胞子形成をも促進させるトリプトファンダイマー(Trp-Trp),ロイシルプロリン(Leu-Pro)などのペプチドが含まれている(石井・堀井, 2007b; Horii *et al.*, 2009).しかし,AMFの純粋培養技術の実用化を図るためにはAMFの生長に関与する物質のさらなる探索が必要である.

一方,土壌中の微生物,特に細菌相はAMFの存在によって変化しやすく(Marschner *et al.*, 2001),AMFは根圏の微生物相を拡げる役目を果たしていると考えられている(Boddey *et al.*, 1991).AMFに関連する微生物は,胞子や菌糸周辺に生息するだけでなく,AMF胞子内にも存在すること(Bonfante *et al.*, 1994; Xavier & Germida, 2003; クルスら, 2008; 竹森ら, 2009; Naumann *et al.*, 2010)や,これらの微生物から生産される極微量のエチレンなどがAMFの菌糸生長を促進すること(Horii & Ishii, 2006)が明らかになっている.また,Horii *el al.* (2008)はこれらの細菌とAMFとの併用接種がカラタチの菌根形成および樹体生長を促進することを報告している.

そこで本研究では,AMFの純粋培養技術の実用化研究中にその菌の胞子形成を著しく促進する物質,アミンを発見したので,この新規物質がAMF胞子形成に及ぼす効果や,菌根植物における本物質の有無を調査するとともに,この新規物質が植物の養分吸収にも密接に関与していると考えられる知見を述べる.また,AMFおよびその菌に関連する有用微生物の働きを詳細に調査するとともに,これらの菌の併用処理によるカラタチの生育に及ぼす影響についても調査した.これらの成果をもとに,AMFおよびその菌に関連する有用微生物を効果的に活用できるパートナー植物の利用法について考察した.

実験方法

アミンが**AMF**の胞子形成に及ぼす影響

石井・堀井(2007a)が開発した基本培養液(IH培養液)を含むゲルライト(1.5%)培地をオートクレーブした後,

孔径0.2μmの滅菌フィルターでろ過したFig. 2に示すアミン類を10，30および100μMの濃度になるように加え，直径5cmのシャーレに入れた．その後，この培地に表面殺菌を施した*Glomus clarum* IK97胞子を置床し，26℃で赤色発光ダイオードによる光照射下（10μmol/m²·sec）で培養した．なお，殺菌方法は胞子を消毒剤（chloramine T：7000 ppm，streptomycin：56 ppm，chloramphenicol：21 ppmおよびTween 80：数滴）に投入し，超音波洗浄機で数秒間処理した後，12分間静置して殺菌した．培養2か月後，新しく形成された胞子数を調査した．

これ以外に，胞子形成促進効果が大であるアミンと，これまでに発見したペプチド（Trp-TrpおよびLeu-Pro，各10 ppm）との併用処理が菌糸生長および胞子形成に及ぼす影響についても検討を行った．菌糸長は，スタイラスペン付のタブレット（WACOM Tablet UD－0608II）と自作のプログラムソフトウェア（石井，1993）を用いて計測した．

なお，上述のゲルライト培地での研究成果を基に，最適な濃度下での液体培養の調査も行った．殺菌方法および培養方法は前述と同様に行った．

AMF感染および非感染のバヒアグラス根内のアミン

無加温のガラスハウス内で育成させたAMF感染および非感染のバヒアグラス根内からアミン類をFig. 1に示す方法で抽出し分析した．すなわち，根内のアミン類を4 mMメタンスルホン酸で抽出し，ろ過した後，Shodex IC-YS-50カラムを装備した電気伝導度検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC）で分析した．HPLCの分析条件は，以下に示すとおりである．

カラム：Shodex IC-YS-50，4.6 mmID x 125 mm
溶離液：4 mMメタンスルホン酸
流速：10 ml/min

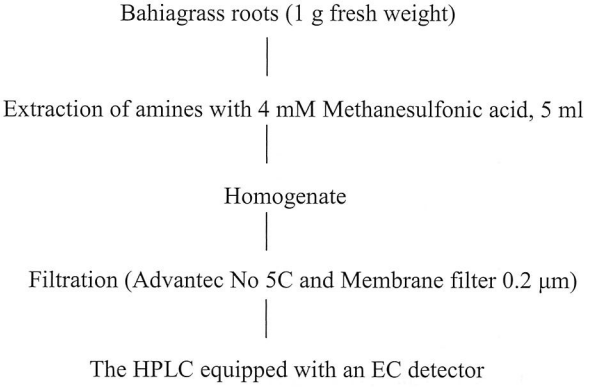


Fig. 1 Extraction of amines from bahiagrass roots.

カラム温度：40℃
検出器：Hitachi L3720 Electric Conductivity Detector
ポンプ：Hitachi Pump L-2130

AMF胞子内に生存する細菌（胞子内在細菌）の分離

a) *Gigaspora margarita*の場合

菌根菌資材（セントラル硝子（株））から採集した*Gi. margarita*胞子を50%エタノールに30秒間浸し，滅菌蒸留水で5回洗浄した後，消毒剤（chloramine T：7000 ppm, streptomycin：56 ppm，chloramphenicol：21 ppmおよびTween 80：数滴）に3日間浸した．胞子表面が完全に殺菌されたことを確かめるため，ニッスイ標準寒天培地（日水製薬（株））上で48時間，27℃で培養し，菌が増殖しないことを確認した．クリーンベンチ内で胞子を一つずつスライドガラスに置き，瞬間接着剤（東亞合成（株）「アロンアルファ」）で固定した．顕微鏡下で滅菌した極細の針（テルモ（株），「ナノパス33」，φ200μm）を用いて胞子内容物を抽出し，ニッスイ標準寒天培地上に広げ，27℃の暗黒所で培養した．なお，供試した胞子は約500個を用いた．

b) *Glomus clarum*の場合

前述の方法で，*G. clarum* IK97胞子を消毒した後，その胞子をニッスイ標準寒天培地上に置床し，48時間，27℃で培養して菌が増殖しないことを確認した．内在菌が存在する胞子はUV下で蛍光を示すことを予備実験で確認しているので，無菌下で蛍光を有す胞子を選び出し，それぞれを別々に0.2 mlの滅菌蒸留水を加えてすりつぶした．その液をニッスイ標準寒天培地上に広げ，27℃の暗黒所で培養した．なお，供試した胞子は約500個を用いた．

細菌の同定

前述の培養によって得られた胞子内在細菌株を同定するため，16SrDNA配列解析，グラム染色試験，並びに形態観察を行った．

1）16SrDNA配列解析

胞子内在細菌株をペプトン酵母液体培地（ポリペプトン：5 g，酵母エキス：1 g，蒸留水：1000 ml）に接種し，27℃の暗所下にて24時間振とう培養を行った．培養後，ニッポンジーン（株）のDNA抽出キット（ISOPLANT）を用いてDNAを抽出した．抽出したDNAを鋳型として，細菌の16S rDNA領域を標的としたプライマーセット 27f：5'-agagtttgatcctggctcag-3' と 1492r：5'-ggctaccttgttacgactt-3' を用いてPCRを行った．反応液組成並びに反応条件を以下に示す．

鋳型DNA　1 μl

プライマー 27f	2.5 μl
プライマー 1492f	2.5 μl
KOD Dash（TOYOBO（株））	1 μl
dNTPs（KOD Dash に付属）	5 μl
10×buffer（KOD Dash に付属）	5 μl
滅菌蒸留水	33 μl

94℃：3 min, 30 cycle（94℃：30 sec 54℃：2 sec 74℃：45 sec）20 ℃：5 min

得られた PCR 産物は GENECREAN Kit（Q-BIOgene（株））を用いて精製し，BigDye Terminator v 3.0 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems（株））並びに プライマー 27f を用いて Genetic Analyzer 310（Applied Biosystems（株））にて配列決定を行った．得られたシークエンスデータを Blast 検索（http://www.ebi.ac.uk/

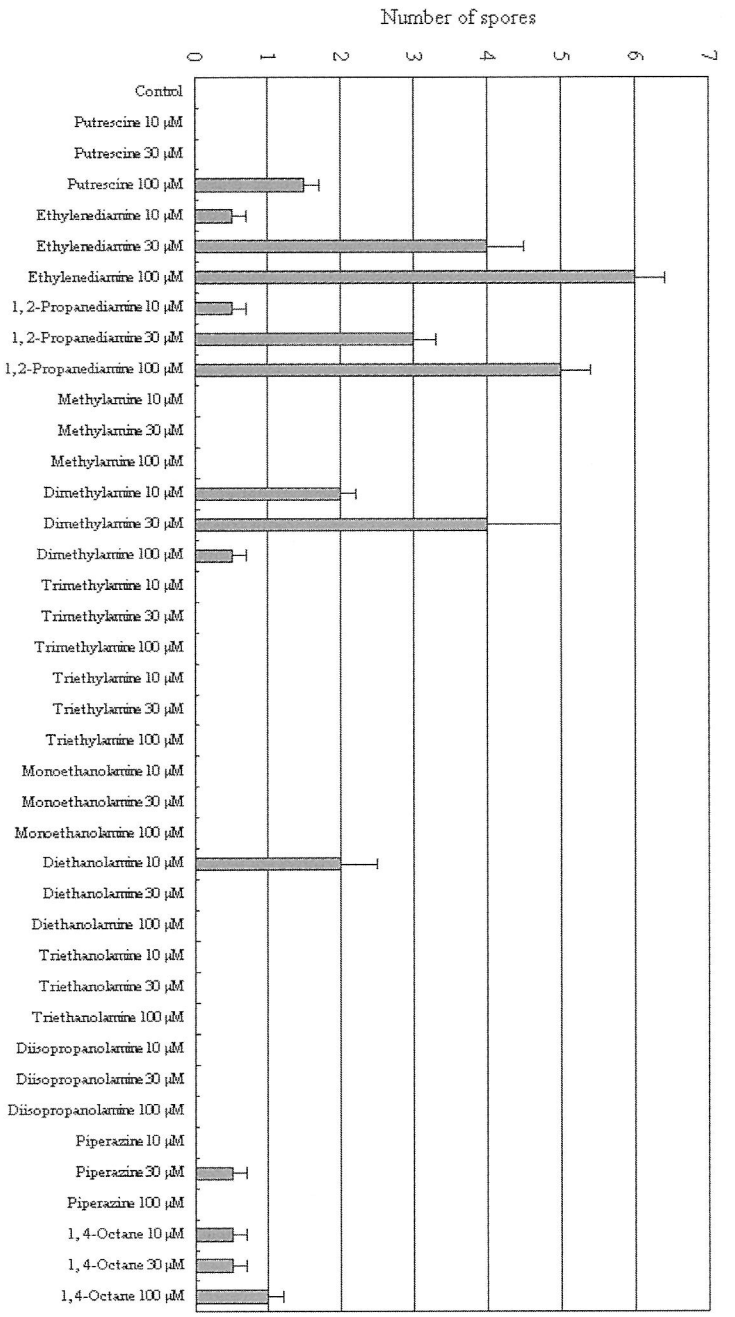


Fig. 2 Effects of amines on new spore formation of *G. clarum* under axenic cultural conditions.
After 2 month-incubation under red LED radiation at 26℃. Vertical bars indicate standard error (SE) (n=8).

blastall//）にかけ，既知の細菌の塩基配列との相同性を調べた．

2）グラム染色試験並びに形態観察

グラム染色は和光純薬工業（株）のグラム染色キット（グラム染色B＆Mワコー）を用いて行った．染色後，光学顕微鏡を用いて，染色の有無および形態観察を行った．

胞子内在細菌の働き

Gi. margarita および *G. clarum* 胞子から分離した胞子内在細菌株がどのような機能および活性を有しているのかを明らかにするため，1) 難溶性リン溶解作用，2) AMF菌糸生長促進効果，3) エチレン生成作用，4) アセチレン還元（窒素固定）作用，並びに5) 主要土壌病原菌の生長に対する抑制効果の検定を行った．

1）リン溶解作用

ニッスイ標準寒天培地で増殖させた胞子内在細菌の菌そうを直径9mmのコルクボーラーでくり抜いた後，その菌そうを100mlのPikovskaya液体培地（Pikovskaya, 1948）に接種し，27℃の暗所下にて振とう培養した．培養1週間後に上清1mlを採取し，アスコルビン酸法（Watanabe & Olsen, 1965）によるリン酸イオン濃度の検定に供した．測定には島津製作所（株）の分光光度計（UV-120-02）を用いた．

2）菌糸生長促進効果

前述と同様な方法で得た菌そうを石井・堀井（2007a）によって開発されたIH寒天培地の中心に置いた．その四方に表面殺菌した *Gi. margarita* あるいは *G. clarum* 胞子を置き，暗所で培養を行った．培養2週間後の菌糸の長さを，CCDカメラを装備した実体顕微鏡およびパーソナルコンピューターによる画像処理法（石井, 1993）にて測定した．なお，*Gi. margarita* 胞子の表面殺菌は胞子を消毒剤（chloramine T：7000ppm, streptomycin：56ppm, chloramphenicol：21ppmおよびTween 80：数滴）に浸し，15秒間超音波処理した後，15分間静置して消毒した．*G. clarum* 胞子の場合，12分間の静置消毒の他は前述と同様に殺菌処理した．

3）エチレン生成作用

ペプトン酵母液体培地（ポリペプトン：5g，酵母エキス：1g，蒸留水：1000ml）を30mlバイアルビンに4mlずつ分注し，それに同培地で増殖させた胞子内在細菌株を一定の濃度（108CFU/ml）で1ml接種し，振とう培養を行った．27℃の暗条件にて1週間振とう培養を行った後，シリンジでビン内の気相を1ml採集し，水素炎イオン検出器（FID）を搭載した日立製作所（株）のガスクロマトグラフ（163型）を用いてエチレン濃度を測定した．分析条件はIshii *et al.*（1996b）の方法に従った．

4）窒素固定作用

ペプトン酵母液体培地で増殖させた胞子内在細菌株を一定の濃度（2.5×109 CFU/ml）になるよう30mlバイアルビンに5ml接種し，気相に100μlのアセチレン標準ガス（0.0951%）を注入した後，27℃の暗所下にて振とう培養を行った．3日後，シリンジでビン内の気相を1ml採集し，前述の方法によるFIDガスクロマトグラフを用いてエチレン濃度を測定した．アセチレン還元活性の値は対照（アセチレン無添加）区との差から算出した．

5）土壌病原菌抑制効果

バレイショ・デキストロース寒天（PDA）培地の中心にコルクボーラーで切り抜いた土壌生息植物病原糸状菌（*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* MAFF 744088, *Rhizoctonia solani* MAFF 237426, *Rosellinia necatrix*（小林紀彦博士より恵与される）および *Pythium ultimum* NBRC 100123,）を植菌し，その左右に胞子内在細菌株を同様に植菌し，27℃の暗所下にて対峙培養を行った．培養開始から *Fu. oxysporum* は7日後，*Rh. solani* および *Ro. necatrix* は5日後，*Py. ultimum* は3日後に病原菌の生長に対する抑制効果を5段階（0～4）で評価した．評価基準は以下に示すとおりである．

『0』：対象病原菌の菌糸が，胞子内在細菌株の生長範囲に到達してそれを覆っている．

『1』：対象病原菌の菌糸が胞子内在細菌株の生長範囲と接触しているが，そこで菌糸が薄くなっている．または，接触していない部分がある．

『2』：対象病原菌の菌糸が胞子内在細菌株の生長範囲と接触している部分が少なく，また菌糸のない範囲が生長範囲の周辺に帯状となっている．

『3』：対象病原菌の菌糸が胞子内在細菌株の生長範囲とごく一部接触しているが，その周囲には菌糸が存在しない．

『4』：対象病原菌の菌糸が胞子内在細菌株の生長範囲のどの部分にも接触していない．

新型走査型電子顕微鏡による胞子内在細菌と *Gi. margarita* との共存培養下での観察

前述の消毒剤で胞子表面を殺菌した *Gi. margarita* 胞子をIH寒天培地（石井・堀井, 2007a）上に置床し，26℃の赤色LED照明（10μmol/m^2·sec）で培養した．培養1週間後，ペプトン酵母液体培地において27℃の暗所下で一晩増殖させた胞子内在細菌株の培養液を遠心分離（5000rpm, 5min., 室温）にかけ，上清液を滅菌蒸留水と置換した接種細菌懸濁液50μlを分注し，前述のIH寒天培地上において培養中の *Gi. margarita* に接種し，26℃で赤色LED照明（10μmol/m^2·sec）下で培養した．培養1週間後，FEI（株）の新型走査型電子顕微鏡（in situ SEM）（Quanta 250FEG）を用いて，IH寒天培地上の *Gi.*

margarita 胞子および発芽菌糸，並びに分離内在菌の生長状況を観察した．

UV 下における *G. clarum* 胞子とその胞子内在細菌の観察

数百個の *G. clarum* 胞子を入れたプラスティックシャーレを UV 検出装置（254 nm）上に置き，実体顕微鏡を用いて蛍光を示す胞子内在細菌の有無を観察した．

***Gi. margarita* とその胞子内在細菌の併用接種がカラタチ実生苗の生長に及ぼす影響**

無加温のガラスハウスで育成した 1 年生のカラタチ実生苗をバーミキュライト：ゼオライト（2:1, v/v）の培土を用いて 1000 ml の鉢に移植した後，*Gi. margarita* 胞子約20個を接種した．その接種10日後，*Gi. margarita* 胞子から分離した胞子内在細菌，KTCIGME01, KTCIGME02 および KTCIGME03 をそれぞれ 1 鉢当たり 4.2×10^8 CFU をカラタチ根圏に処理した．施肥は，移植時に 1 鉢当たり苦土石灰 5 g，移植 1 週間後に 1 鉢当たり窒素 140 ppm，リン 10 ppm およびカリ 140 ppm を与えた．潅水は毎日行った．移植 110 日目に解体調査を行い，乾物重を測定した．

結　果

アミンの効果

供試したアミン類の中で，第一アミンおよび第二アミンに含まれるアミン類は胞子形成を誘発させる作用を有していた．特に，エチレンジアミン（EDA），1, 2-プロパンジアミン（PDA）およびジメチルアミンは著しい効果を示した（Fig. 2）．

この結果を基に，アミン，特に EDA とペプチドとの併用処理を調査した．Table 1 に示すとおり，IH 培地のみの区では菌糸生長は旺盛であったが，胞子形成は全く認められなかった．しかし，ペプチド（Trp-Trp, 10 ppm + Lue-Pro, 10 ppm）添加区では，既報（石井・堀井，2007a）と同様に，菌糸生長が良好で，胞子形成も観察された．一方，EDA 添加区では 100 および 250 μM のいずれにおいても菌糸生長は阻害され，特に 250 μM 区では顕著であった．しかし，いずれの EDA 添加区でも母胞子 1 個から新しい胞子が数個形成された．EDA とペプチドとの併用添加区では，EDA による菌糸生長阻害効果が軽減され，胞子形成が促進される傾向が認められた．特に，EDA 250 μM + ペプチド添加区では菌糸生長，胞子形成ともに良好であった（Fig. 3-Left）．さらに，EDA とペプチド併用処理における胞子形成促進効果を液体培養下でも検討したところ，培養 3 か月後の解体時には 1 個の母胞子から多数の新胞子が形成されていた（Fig. 3-Right）．

根内のアミン

菌根および非菌根（No AMF）のバヒアグラスにおける根内のアミンを分析したところ，非菌根のバヒアグラス根ではアミン類は検出されなかった．しかし，*Gi. margarita, G. fasciculatum* および *G. clarum* の AMF が感染した根ではジエタノールアミン，ジメチルアミン，トリエチルアミン，PDA, EDA などのアミン類が検出された（Fig. 4）．特に，EDA はいずれの AMF 感染根でも検出されたが，PDA は *G. clarum* 感染根でのみ分析された（Fig. 4）．また，それらの含量は胞子形成促進に効果のある濃度で検出された（Table 2）．

AMF 胞子内在細菌の出現頻度，菌種および役割

AMF 胞子から分離された細菌（胞子内在細菌）の出現頻度は，*Gi. margarita* の場合，約 500 個の胞子のうちわずか 3 個の胞子からしか分離されなかった（出現頻度：約 0.8%）．

Gi. margarita の内在細菌を遺伝子分析，グラム染色および形態観察で調査したところ，これらの内在細菌は，Table 3 に示すように，KTCIGME01 は *Bacillus* sp. (FJ528077), KTCIGME02 は *Bacillus thuringiensis* (Z84587) および KTCIGME03 は *Paenibacillus rhizosphaerae* (EU857426) とそれぞれ相同性が99, 100, 99% であり，グラム染色は陽性であった．またいずれも桿菌であり，そのサイズはそれぞれ 1-5, 1-5, 1-3 μm であった（Fig. 5）．

これらの内在細菌は，Table 3 に示すように，リン溶解

Table 1 Effects of ethylenediamine (EDA) and peptides on hyphal growth and new spore formation of *G. clarum* under axenic cultural conditions[X].

Treatment	Hyphal length (mm)	No. of spores
EDA 100 μM	10.4±2.3 [Z] [n.s.†]	6±1
EDA 250 μM	10.1±1.6 *	5±1
EDA 100 μM + Peptides [Y]	18.7±2.2 [n.s.]	8±1
EDA 250 μM + Peptides	20.5±1.6 [n.s.]	12±2
Peptides	23.9±1.4 *	7±1
Control (IH base media)	16.7±1.6	0

[Z] Mean ± SE, n=8.

[†] Significantly different at 95% (*) as compared with the control, using t-test. [n.s.] Non-significantly as compared with the control.

[Y] Peptides: Trp-Trp (10 ppm) + Lue-Pro (10 ppm),

[X] After 2 month-incubation under red LED radiation at 26 °C.

能，窒素固定能（ニトロゲナーゼ活性）を有していた．特に，KTCIGME02 は窒素固定能が，KTCIGME03 はリン溶解能が著しく高かった．また，これらの細菌は *Gi. margarita* の菌糸生長を促進する作用を有しており，KTCIGME01 および KTCIGME02 はエチレン生成菌でもあった．

土壌病原菌に対する生長阻害効果を調査したところ，Table 4 に示すように，いずれの内在細菌も抗菌作用を有していた．特に，KTCIGME01 は *Ro. necatrix* および *Py. ultimum* に，KTCIGME02 は *Fu. oxysporum, Rh. solani*

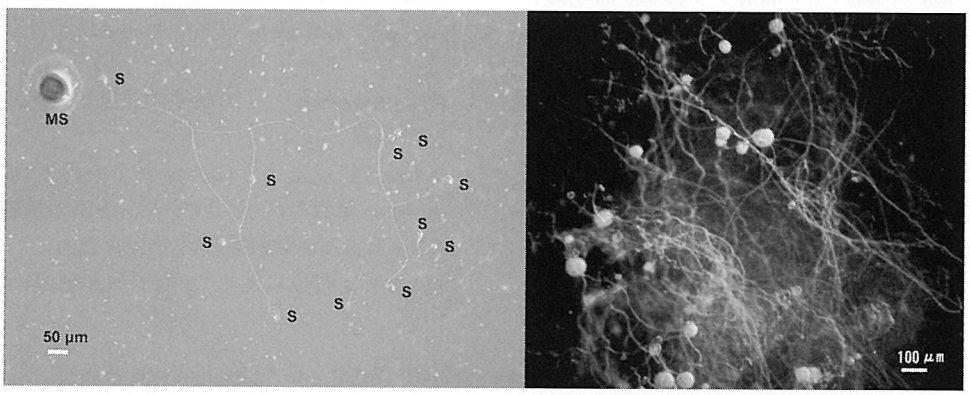


Fig. 3 New spore formation of *G. clarum* under axenic cultural conditions by using ethylenediamine (250 μM) and peptides (Trp-Trp, 10 ppm + Lue-Pro, 100 ppm).
Left: Gerlite (1.5%) culture, MS: mother spore, S: new spore, After 2 month-incubation under red LED radiation at 26℃.
Right: Liquid culture, A lot of new spores formed from a mother spore. After 3 month-incubation under red LED radiation at 26℃.

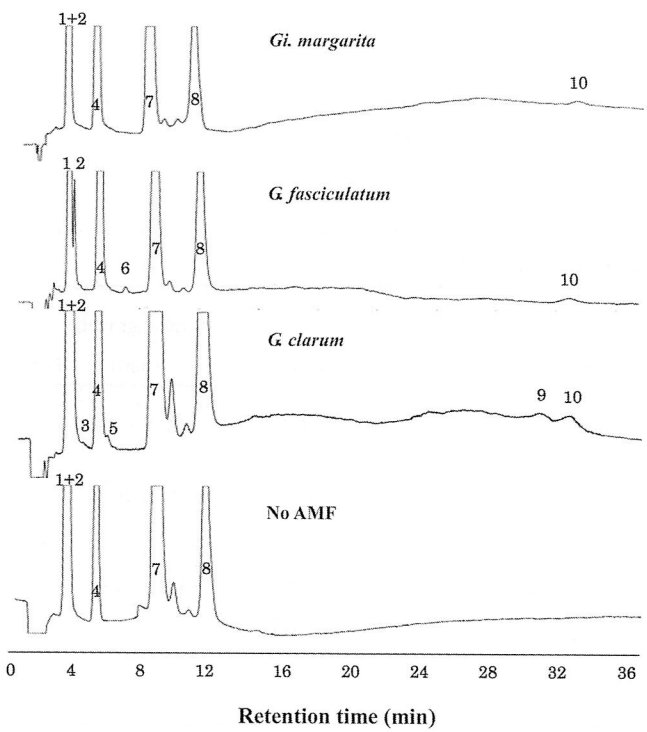


Fig. 4 Chromatographs of amines extracted from bahiagrass roots.
1: Na, 2: NH_4, 3: Diethanolamine, 4: K, 5: Dimethylamine, 6: Triethylamine, 7: Mg, 8: Ca, 9: 1,2-Propanediamine (PDA), 10: Ethylenediamine (EDA).

および *Ro. necatrix* に対して阻害作用が強かった．

さらに，これらの細菌と共存培養した *Gi. margarita* を，新型の走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ，発芽胞子およびその胞子から伸長した菌糸表面に多数の内在細菌が定着し（Fig. 5）．菌糸表面は細菌が生産する“ぬめり”で覆われていた（Fig. 5-a）．

一方，*G. clarum* の場合，UV 照射下で約 500 個の胞子から蛍光を示した胞子が 6 個検出された（出現頻度：約 1.2%）（Fig. 6）．この蛍光胞子内から分離した細菌（KCIGC01）の遺伝子解析を行ったところ，*Pseudomonas* 属に含まれる細菌であったが，最も高い相同性を示す菌種でも 96% であった．KCIGC01 は桿菌であり，そのサイズは 1-3μm であった．グラム染色結果は陰性であった．なお，*G. clarum* 胞子内からは KCIGC01 しか分離されなかった．

この内在細菌，KCIGC01 は，Table 5 に示すように，強力なリン溶解能，窒素固定能（ニトロゲナーゼ活性）を有していた．また，この細菌は *G. clarum* の菌糸生長を促進する作用を有しており，エチレン生成菌であった．

土壌病原菌に対する生長阻害効果を調査したところ，Table 6 に示すように，KCIGC01 は *Fu. oxysporum, Rh. solani* および *Ro. necatrix* に対する生長阻害作用を示した．特に *Rh. solani* に対する阻害作用は顕著であった．

Gi. margarita とその胞子内在細菌の併用接種とカラタチの生長

Fig. 7に示すように，カラタチの生長は，対照（*Gi. margarita* およびその胞子内在細菌の無接種）と比べて，*Gi. margarita* 単独接種区で良好であった．さらに，*Gi. margarita* 接種に加えて，胞子内在細菌それぞれ 1 種，あ

Table 2 The concentration of ethylenediamine (EDA) and 1,2-propanediamine (PDA) in bahiagrass roots infected by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF).

Treatment	EDA (ng/g root)	PDA (ng/g root)
Gi. margarita	194.0 ± 21.5 [z]	n.d.
G. fasciculatum	76.1 ± 11.4	n.d.
G. clarum	118.8 ± 11.1	98.2 ± 12.1
No AMF	n.d.	n.d.

[z] Mean ± SE, n=3. n.d.: not detected.

Table 3 Effects of AMF endobacteria from *Gi. margarita* spores on phosphorus solubilization ability, hyphal growth of *Gi. margarita*, ethylene production and nitrogenase activity.

Strain code	Bacterial treatment	Identification (%)	Gram test	P solubilization (ppm)	Hyphal growth (mm)	C_2H_4 Production (ppm)	Nitrogenase activity (C_2H_4, ppm)
	Control			7.5 ± 0.6 [z]	21.4 ± 1.8	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1
KTCIGME01	*Bacillus* sp.	99	+	70.8 ± 6.8 **[†]	102.8 ± 10.2 *	1.0 ± 0.1 *	0.6 ± 0.3 [n.s]
KTCIGME02	*B. thuringiensis*	100	+	78.7± 7.2 **	64.3 ± 5.4 **	3.2 ± 0.2 **	1.5 ± 0.5 *
KTCIGME03	*Paenibacillus rhizosphaerae*	99	+	196.4± 15.2 **	96.4 ± 8.7 **	0.3 ± 0.1 [n.s]	0.5 ± 0.2 [n.s]

[z] Mean ± SE, n=4.

[†] Significantly different at 95% (*) and 99% level (**) as compared with the control, using t-test.

[n.s.] Non-significantly as compared with the control.

るいは3種全てを併用接種した区では *Gi. margarita* 単独接種区よりも生長がさらに旺盛になった．特に，*Gi. margarita+Bacillus* sp. (KTCIGME01) 区および *Gi. margarita+B. thuringiensis* (KTCIGME02) 区の併用接種では生長促進効果が顕著であった．

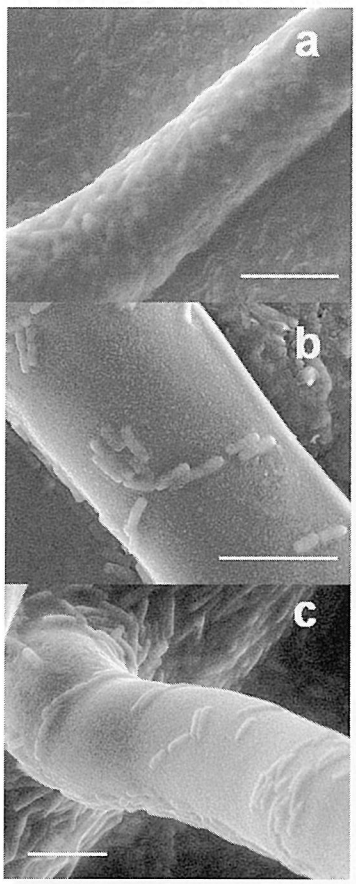


Fig. 5 In situ scanning electron microscopic images of *Gi. margarita* spores and hyphae colonized by AMF endobacteria.
a) *Bacillus* sp. (KTCIGME01), b) *Bacillus thuringiensis* (KTCIGME02), c) *Paenibacillus rhizosphaerae* (KTCIGM03). Bar=10μm.

考　察

AMF生長促進物質として，現在のところ，1) フラボノイド（Carr *et al.*, 1985; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Nair *et al.*, 1991; Ishii *et al.*, 1997），2) ポリアミン（El Ghachtouli *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 2000b; Ishii *et al.*, 2008），3) アルギン酸オリゴ糖（Ishii *et al.*, 2000b）および糖アルコール（Kuwada *et al.*, 2005），4) 核酸（5'-デオキシ-5'-メチルアミノアデノシン）(Kuwada *et al.*, 2006)，5) セスキテルペン（Akiyama *et al.*, 2005），6) ペプチド（Ishii *et al.*, 2003; 石井・堀井，2007a; Horii *et al.*, 2009）および7) エチレン（Ishii *et al.*, 1996b; Geil *et al.*, 2001; Geil & Guinel, 2002）が知られている．これらはAMFの菌糸生長を促進する作用を有しており，その中でもセスキテルペンは *Gigaspora* 属のAMF菌糸の分岐を促進することが知られている（Akiyama *et al.*, 2005）．しかし，*Glomus* 属のAMFでは菌糸の分岐促進効果が認められないものがある．また，エチレンは唯一のガス体のAMF生長促進物質であり，0.01- 0.1 ppmの濃度で菌糸生長を促進するが，0.2 ppm以上の濃度では阻害することが明らかとなっている（Ishii *et al.*, 1996b）．本研究において，胞子内在細菌であるKTCIGME01, KTCIGME02およびKCIGC01はエチレンを生成する菌であることから，共存培養において，これらの菌で生成された微量のエチレンが *Gi. margarita* および *G. clarum* の菌糸生長を促進させたと考えられる．ちなみに，Horii & Ishii (2006) は *Gi. margarita* 胞子表面に生息する微生物には菌糸生長を促進させるものが存在するが，それらにはエチレンを生成するものがいることを報告している．

ペプチド，特にTrp-Trpは胞子形成を誘発させる物質であり，またLue-ProはTrp-Trpの効果を強める補助剤であり（石井・堀井，2007b），菌根植物，非菌根植物のいずれにおいても広く生産されることが知られている（戸田ら，2009）．本研究ではさらにアミン，特に第一お

Table 4 Antagonism of AMF endobacteria from *Gi. margarita* spores to soil-borne plant pathogens.

Strain code	Growth inhibition [Z]			
	Pythium ultimum	*Fusarium oxysporum*	*Rhizoctonia solani*	*Roselinia necatrix*
KTCIGME01	1.8 ± 0.3 [Y]	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2.0± 0.4
KTCIGME02	0.6 ± 0.3	1.3 ± 0.4	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.7
KTCIGME03	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.2	NI

NI: no inhibition on growth.
[Z] Antagonism scale: 0-No; 1-Slightly; 2-Moderate; 3- Strong.
[Y] Mean ± SE, n=4.

よび第二アミンが菌根菌の胞子形成に重要な働きを持っていることや，これらの物質はAMFが感染した植物において生産されることを発見した．特に，菌根植物において生産されたアミンの中で，EDA, PDAなどはキレート物質であるので，菌根菌の感染によって生成されたEDA，PDAなどのアミンが菌根植物の養分吸収に密接に関与していることは非常に興味深い．今後，菌根共生におけるEDA，PDAなどのアミンの役割を詳細に調査する必要がある．なお，ポリアミン，特にプトレッシンは0.5 mM前後の濃度でAMFの菌糸生長を促進する（El Ghachtouli *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 2000b）が，0.1 mMの低濃度では胞子形成をわずかに促すかもしれない．

AMFの純粋培養において，EDAのようなアミンとペプチドの併用添加はそれぞれの単独添加よりも胞子形成を高めた．この傾向は液体培養下でも確認でき，この純粋培養技術を用いて，AMFの大量生産への実用化も図れるものと考えられた．また実用化に向かって，本研究ではEDAとペプチドを同時に添加する実験を行ったが，EDAなどのアミンは菌糸生長をわずかに阻害する傾向が認められたので，EDAは菌糸生長が旺盛になったときに添加する方が良いと思われ，今後，培地へのEDAの添加時の検討も必要である．さらには，アミンは様々の植物根でも生成されると考えられるので，AMFだけでなく，他の菌根菌培養においても活用できると思われる．現在，純粋培養が難しいと言われている外生菌根菌などについても検討している．

この純粋培養用培地への核酸塩基およびDNAの添加はAMFの菌糸生長や胞子形成に影響を及ぼさなか

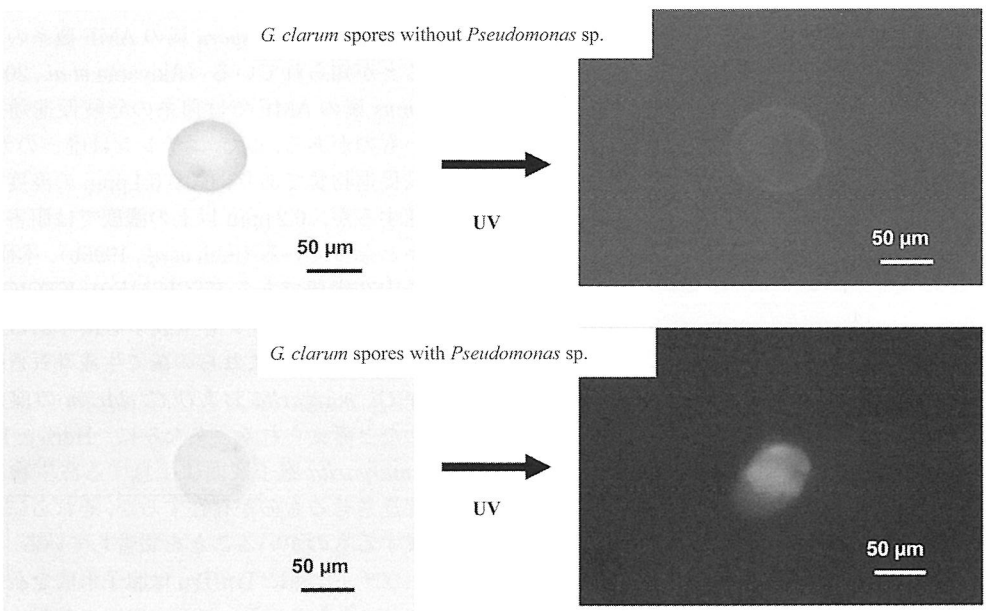


Fig. 6 *Pseudomonas* sp. (KCIGC01), an AMF endobacterium, in *G. clarum* spores using an UV (254 nm) detector. *Pseudomonas* sp. showed a strong blue fluorescence (the white area in the spore) under UV irradiation. The percentage of *G. clarum* spores with *Pseudomonas* sp. was around 1.2%.

Table 5 Effects of an AMF endobacterium from *G. clarum* spores on phosphorus solubilization ability, hyphal growth of *G. clarum*, ethylene production and nitrogenase activity.

Strain code	Bacterial treatment	Identification (%)	Gram test	P solubilization (ppm)	Hyphal growth (mm)	C_2H_4 Production (ppm)	Nitrogenase activity (C_2H_4, ppm)
	Control			27.1± 3.8 [Z]	3.2 ± 0.4	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
KCIGC01	*Pseudomonas* sp.	96	-	405.1 ± 23.7** [†]	6.2 ± 0.9 *	2.1 ± 0.3 **	1.1 ± 0.2 *

[Z] Mean ± SE, n=4.

[†] Significantly different at 95% (*) and 99% level (**) as compared with the control, using t-test.

Table 6 Antagonism of an AMF endobacterium from *G. clarum* spores to soil-borne plant pathogens.

Strain code	Growth inhibition [Z]		
	Fusarium oxysporum	*Rhizoctonia solani*	*Roselinia necatrix*
KCIGC01	2.1 ± 0.2 [Y]	3.8± 0.3	1.4 ± 0.1

[Z] Antagonism scale: 0 – No, 1 – Slightly, 2 – Moderate, 3 – Strong, 4 – Very strong.
[Y] Mean ± SE, n=4.

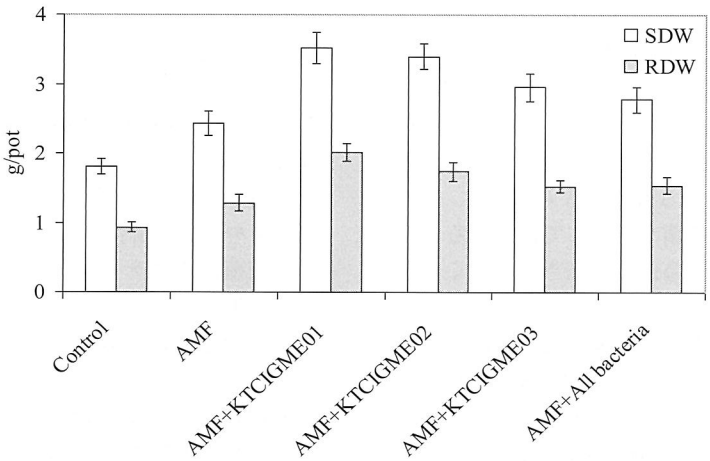


Fig. 7 Effect of AMF and their endobacteria on the growth of trifoliate orange seedlings.
SDW: Shoot dry weight, RDW: Root dry weight.
AMF used was *Gi. margarita*. AMF endobacteria used were *Bacillus* sp. (KTCIGME01), *Bacillus thuringiensis* (KTCIGME02) and *Paenibacillus rhizosphaerae* (KTCIGM03). Vertical bars represent mean ± SE (n=4).

ったが，高濃度の RNA は胞子数を増加させる作用を有していた（堀井・石井，2008）．また，AMF の核は多核で多型であるため，今のところ AMF のゲノム解析ができていない．これは，AMF が宿主の根に侵入し，細胞内に樹枝状体を形成するとその宿主の細胞核を奪っているためであり（石井ら，2011），そのことが，AMF の核が多核で多型であり，数多くの phenotype あるいは genotype の AMF を存在させているのだろう（Hijri & Sanders, 2005; Ehinger *et al.*, 2009）．AMF 共生における宿主植物からの核の収奪は宿主からの情報を得るための原始的で効率的な情報伝達方法であると考えられる．この情報伝達において，AMF は遺伝子組換え植物からの細胞核も奪ってしまうことが考えられるので，組換え遺伝子を持つ AMF による土壌環境汚染が非常に深刻な問題となることを物語っている．一方，AMF の増殖方法として，遺伝子組み換えの毛状根を宿主とした技術がある（Bécard & Fortin, 1988; St-Arnaud *et al.*, 1996）．この技術を用いれば in vitro での安全な AMF の生産が可能であるように思われる．しかし，前述したように，AMF は宿主から細胞核を奪うので，毛状根を用いた培養では，変異遺伝子による AMF への影響やその変異遺伝子の自然環境への流出・拡大が懸念される．それゆえ，AMF の増殖および保存を安心・安全に行うためには，本研究でさらに改良が加えられた AMF の純粋培養技術を用いて，世界の AMF の増殖や保存を進めていかなければならないと考えている．

一方，本研究で得られた AMF 胞子の内在細菌は，リン溶解能および窒素固定能を有しており，AMF の菌糸生長も促進した．また，これらの細菌はフザリウム，リゾクトニア，白紋羽病菌などの土壌病原菌に対して強力な抗菌作用を持っていることが明らかとなった．これらの中で，*B. thuringiensis* (KTCIGME02) は BT 剤として市販されている細菌と同種であるので，現在，本菌の殺虫効果を調査中である．さらに，共存培養下において *Gi. margarita* の菌糸表面がその胞子内在細菌による“ぬめり”で覆われていることを新型の走査型電子顕微鏡によって初めて観察することができた（Fig. 5-a）．この“ぬめり”はバイオフィルムと呼ばれ，土壌中で伸長する菌

糸を保護するための潤滑剤や防護剤として働いていると考えられる．

最近，AMF胞子内に細菌が存在しない胞子を前述の純粋培養技術で作製することに成功した．この無菌のAMFを用いて，AMFそのものの力について調査し，AMFとその胞子内在細菌との役割をさらに詳細に調査したいと考えている．

本研究では，AMFとその胞子内在細菌との役割を探るため，これらを一緒にカラタチ実生苗に接種したところ，いずれの内在細菌との併用接種においてもAMF単独での接種よりもカラタチの生育が非常に良好となったことは興味深い．しかし，AMF胞子における内在細菌の出現頻度は約1%程度であることから，一般にはこれらの細菌は胞子表面に生息し，胞子や菌糸が傷ついたとき，胞子内に侵入し，生存するものと考えられる．そこで，今後，AMFとその内在細菌を併用して活用するときは，あらかじめ内在細菌を人為的に増殖させておくことが望ましいと思われる．

また野外で，AMFとその内在細菌を効果的に増殖させるためには，作物と相性の良いナギナタガヤ，バヒアグラスのようなイネ科のパートナー植物を活用した土壌管理法の導入が非常に有益である（Ishii *et al.* 2000a; 石井，2007; 石井・Cruz，2010）．本研究では，バヒアグラスを用いた無菌培養によるAMF胞子の大量生産に成功しており，かつAMF胞子内在細菌もナギナタガヤおよびバヒアグラスの茎葉や根に生息しやすいことも明らかにしている（未発表）．これらの結果は，パートナー植物の活用がAMFとその内在細菌のような有益微生物をただ単に圃場に接種するよりも効能の安定性と持続性の向上が得られることを示唆している．さらには，これらの草から生成される揮発性物質は *Fu. oxysporum* f. sp. *lactucae, Rh. solani, Ro. necatrix* などの土壌病原菌の生長を著しく阻害するが，AMFや，それらの草の葉および根表面に生息する *Bacillus subtilis, Burkholderia cepacia, Paenibacillus polymyxa, Pseudomonas stutzeri* のような有益拮抗微生物をほとんど抑制せず，増殖させる生息環境を提供していることも明らかとなっている（Yu *et al.*, 2009）．なぜAMFにはさまざまな有益な微生物が集まり，有害な微生物がほとんど集まらないのかは現在のところ明らかにできていない．今後，この興味深い疑問についてさらに調査を進めたいと考えている．

要　約

本研究では，世界に先駆けて成功したAMFの純粋培養技術をさらに改良するために，新たな活性物質を探索した．また，AMF胞子内に生息する微生物の探索とその働きを調査した．さらに，AMFとその胞子内在細菌を活用する上で有効な草を活用した土壌改善法を検討した．その結果，菌根菌の胞子形成を著しく促進するアミンを新たに発見した．その中で，エチレンジアミン（EDA），1,2-プロパンジアミン（PDA）などは従来の純粋培養技術の改善に非常に有効であった．また，EDAおよびPDAは，菌根植物において胞子形成促進に効果のある濃度で検出されたが，非菌根植物では検知されなかった．これらのアミンはキレート物質であるので，菌根菌の感染によって生成されたアミンが植物の養分吸収に密接に関与していることは非常に興味深い．一方，AMF胞子内から発見した細菌（*Bacillus* sp.; *B. thuringiensis; Paenibacillus rhizosphaerae* および *Pseudomonas* sp.）は，土壌病原菌に対して抗菌作用を示すだけでなく，窒素固定作用やリン溶解作用を有する有益細菌であった．これらの細菌はナギナタガヤなどのイネ科植物の茎葉や根でよく生息することから，それらを用いた草生栽培は安心・安全な作物栽培の構築に極めて有効であると考えられた．また，新型の走査型電子顕微鏡（FEI Co., Quanta 250FEG）によって，これらの細菌が形成するAMF菌糸表面のバイオフィルムを観察できた．さらに純粋培養技術で，AMF胞子内に細菌が存在しない胞子を作製することにも成功した．現在，この無菌AMFを用いて，AMFそのものの力について調査を進めている．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 竹森広大，戸田雄太，林田和也，余 東，クルス アンドレ フレイリ，石井孝昭（2009）．アーバスキュラー菌根菌，*Gigaspora margarita* の胞子内および表面に生息する細菌の分離および土壌病原菌に対する阻害効果．園芸学研究 **8**（別 **1**）: 344.
2) クルス アンドレ フレイリ，竹森広大，清水一大，米田基人，石井孝昭（2010）．アーバスキュラー菌根菌，*Gigaspora margarita* の胞子から分離した細菌は菌根菌菌糸生長を促進し，リン溶解能および窒素固定能を有す．園芸学研究 **9**（別 **1**）: 265.
3) クルス アンドレ フレイリ，清水一大，佐藤修正，田畑哲之，石井孝昭（2010）．アーバスキュラー菌根菌，*Glomus clarum* の胞子から分離した *Pseudomonas* sp. が菌根菌の生長，土壌病原菌に対する抑制，リン溶解能および窒素固定能に及ぼす影響．園芸学研究 **9**（別 **2**）: 126.
4) 石井孝昭，松原智子，米田基人，クルス アンドレ フレイリ（2011）．アーバスキュラー菌根菌は宿主から細胞核を奪い，その多様性を高める．園芸学研究 **10**（別**1**）: 59.
5) 石井孝昭（2012）．アーバスキュラー菌根菌の胞子形成を促進するアミンと菌根植物におけるその存在．園芸学研究 **11**（別 **1**）: 46.

原著論文

1) Cruz, A. F., & Ishii, T. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that affect nutrient biodynamics and biocontrol of soil-borne plant pathogens. Biology Open **1**: 52-57.
2) Cruz, A. F. & Ishii, T. (2012). Sod culture management contributes to sustainable fruit growing through propagation of arbuscular mycorrhizal fungi and their helper-microorganisms, and decreasing of agricultural inputs. Acta Horticulturae **933**: 477-484.

総説

1) 石井孝昭，クルス アンドレ フレイリ (2010)．果樹栽培におけるパートナー植物を用いた草生管理は有益微生物を増殖させて化学肥料や化学合成農薬の使用量を削減させる．根の研究 **19**: 5-14.

保存機関に寄託した菌株

本研究助成により見出された菌株は，さらに詳細に効能試験を継続しており，今後保存機関に寄託予定である．

Bacillus sp. KTCIGME01
Bacillus thuringiensis KTCIGME02
Paenibacillus rhizosphaerae KTCIGME03
Pseudomonas sp. KCIGC01

謝　辞

本研究の遂行にあたり，多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に厚く御礼申し上げます．内在細菌の遺伝子解析に関してご協力いただいた，かずさDNA研究所佐藤修正氏および田畑哲之氏に深謝いたします．また本研究の実験を精力的に取組んでいただいた京都府立大学大学院生命環境科学研究科果樹園芸学研究室のクルス アンドレ フレイリ講師，米田基人特任助教，余 東君，竹森広大君，清水一大君，松原智子さん，戸田雄太君，細井裕太君に感謝いたします．

文　献

Akiyama, K., Matsuzaki, K. & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature **435**: 824-827.

Bécard, G. & Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on RiT-DNA transformed roots. New Phytol. **108**: 211-218.

Boddey, R., Urquiaga, S., Reis, V. & Döbereiner, J. (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil **137**: 111-117.

Bonfante, P., Balestrini, R. & Mendgen, K. (1994). Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker and Hall as revelead by high-pressure freezing and freeze-substitution. New Phytol. **128**: 93-101.

Carr, G. R., Hinkley, M. A., Le Tacon, F., Hepper, C. M., Jones, M. G. K. & Thomas, E. (1985). Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. New Phytol. **101**: 417-426.

クルス アンドレ フレイリ，堀井幸江，三輪由佳，落合彩織，石井孝昭 (2008)．アーバスキュラー菌根菌，*Gigaspora margarita* の胞子に内在する細菌が土壌病原菌の生物的防除および *G. margarita* の生長促進に及ぼす影響．園芸学研究 **7**(別 **1**): 90.

Ehinger, M,, Koch, A. M. & Sanders, I. R. (2009). Changes in arbuscular mycorrhizal fungal phenotypes and genotypes in response to plant species identity and phosphorus concentration. New Phytol. **184**: 412-423.

El Ghachtouli, N., Paynot, M., Martin-Tanguy, J., Morandi, D. & Gianinazzi, S. (1996). Effect of polyamines and polyamine biosynthesis inhibitors on spore germination and hyphal growth of *Glomus mosseae*. Mycol. Res. **100**: 597-600.

Geil, R. D., Peterson, R. L. & Guinel, F. C. (2001). Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. Mycorrhiza **11**: 137-143.

Geil, R. D. & Guinel, F. C. (2002). Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. Can. J. Bot. **80**: 114-119.

Gianninazzi-Pearson, V., Brazanti, B. & Gianninazzi, S. (1989). In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. Symbiosis **7**: 243-255.

Hijri, M. & Sanders, I. R. (2005). Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. Nature **433**: 160-163.

Horii, S. & Ishii, T. (2006). Identification of helper-microorganisms which promote the growth of *Gigaspora margarita*. Symbiosis **41**: 135-141.

堀井幸江，石井孝昭 (2007)．純粋培養によって生産されたアーバスキュラー菌根菌胞子の感染性および継代培養．園芸学研究 **6**(別 **2**): 137.

堀井幸江，松村篤，クルス アンドレ フレイリ，石井孝昭 (2007)．バヒアグラスを用いたアーバスキュラー菌根菌の簡便な胞子生産技術の開発．農業生産技術管理学会誌 **14**: 25-30.

堀井幸江，石井孝昭 (2008)．核酸が純粋培養におけるアーバスキュラー菌根菌の胞子形成に及ぼす影響．園芸学研究 **7**(別 **1**): 242.

Horii, S., Matsumura, A., Cruz, A. & Ishii, T. (2010). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and their helper microorganisms on root colonization and growth of trifoliate orange seedlings. Proc. Int. Soc. Citriculture **1**: 567-571.

Horii, S., Matsumura, A., Kuramoto, M. & Ishii, T. (2009). Tryptophan dimer produced by water-stressed bahia grass is an attractant for *Gigaspora margarita* and *Glomus*

caledonium. World J. Microbiol. Biotech. **25**: 1207-1215.
石井孝昭(1993). 栽培学習におけるパーソナルコンピュータによる画像処理の活用 －根長と葉面積の計測－. 日本農業教育学会誌 **24**: 25-36.
Ishii, T., Shrestha, Y. H. & Kadoya, K. (1996a). Effect of a sod culture system of Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügge.) on vesicular-arbuscular mycorrhizal formation of satsuma mandarin trees. Proc. Int. Soc. Citriculture **1**: 822-824.
Ishii, T., Shrestha, Y. H., Matsumoto, I. & Kadoya, K. (1996b). Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliate orange roots. J. Japan. Soc. Hort. Sci. **65**: 525-529.
Ishii, T., Narutaki, A., Sawada, K., Aikawa, J., Matsumoto, I. & Kadoya, K. (1997). Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügge.) roots. Plant Soil **196**: 301-304.
Ishii, T., Kirino, S. & Kadoya, K. (2000a). Sustainable citriculture using vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Introduction of new soil management techniques. Proc. Int. Soc. Citriculture **2**: 1026-1029.
Ishii, T., Kitabayashi, H., Aikawa, J., Matsumoto, I., Kadoya, K. & Kirino, S. (2000b). Effects of alginate oligosaccharide and polyamines on hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their infectivity of citrus roots. Proc. Int. Soc. Citriculture **2**: 1030-1032.
Ishii, T., Horii, S., Kuramoto, M. & Matsumura, A. (2003). Peptides as new growth stimulants for arbuscular mycorrhizal fungi. ICOM4 p. 697.
石井孝昭 (2007). 草生栽培と土壌微生物相. 農業技術大系果樹編 第８巻 (追録第22号). pp. 3-6の１の８, 農山漁村文化協会, 東京.
石井孝昭, 堀井幸江 (2007a). アーバスキュラー菌根菌の純粋培養技術の確立. 園芸学研究 **6**(別 **2**): 136.
石井孝昭, 堀井幸江 (2007b). 菌根菌培養方法. 特許第4979551号. 日本国特許庁.
Ishii, T., Motosugi, H., Nakano, M., Matsumura, A. & Horii, S. (2008). Flower abscission contributes to arbuscular mycorrhizal development in trifoliate orange and peach roots. Acta Horticulturae **773**: 57-61.
石井孝昭, Cruz, A. F. (2010). 果樹園におけるパートナー植物を用いた草生栽培は有益微生物を増殖させて化学肥料や化学合成農薬の使用量を削減させる. 根の研究 **19**: 5-14.
石井孝昭, 松原智子, 米田基人, クルス アンドレ フレイリ (2011). アーバスキュラー菌根菌は宿主から細胞核を奪い, その多様性を高める. 園芸学研究 **10**(別**1**): 59.
Kuwada, K., Kuramoto, M., Utamura, M., Matsushita, I., Shibata Y. & Ishii, T. (2005). Effect of mannitol in *Laminaria japonica*, other sugar alcohols, and marine alga polysaccharides on in vitro hyphal growth of *Gigaspora margarita* and root colonization of trifoliate orange. Plant Soil **276**: 279-286.
Kuwada, K., Kuramoto, M., Utamura, M., Matsushita, I. & Ishii, T. (2006). Isolation and structural elucidation of a growth stimulant for arbuscular mycorrhizal fungus from *Laminaria japonica* Areschoug. J. Appl. Phycol. **18**: 795-800.
Marschner, P., Crowley, D. & Lieberei, R. (2001). Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16 S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. Mycorrhiza **11**: 97-302.
Nair, M. G., Safir, G. R. & Siqueria, J. O. (1991). Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhizae-stimulatory compounds from clover (*Trifolium ripens*) roots. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 434-439.
Naumann, M., Schuüßler, A. & Bonfante, P. (2010). The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the *Mollicutes*, ISME J. **4**: 862-871.
Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya **17**: 362-70.
St-Arnaud, M. C., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. & Fortin, J. A. (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host root. Mycol. Res. **100**: 328-332.
竹森広大, 戸田雄太, 林田和也, 余 東, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭 (2009). アーバスキュラー菌根菌, *Gigaspora margarita* の胞子内および表面に生息する細菌の分離および土壌病原菌に対する阻害効果. 園芸学研究 **8**(別 **1**): 344.
戸田雄太, 余 東, 堀井幸江, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭(2009). アーバスキュラー菌根共生におけるシグナル物質としてのトリプトファンダイマーの普遍性. 園芸学研究 **8**(別 **1**): 61.
Yu, D., Toda, Y., Kuwada, K., Cruz, A. F. & Ishii, T. (2009). Effect of volatile compounds from shoots and leaves of bahiagrass, *Vulpia myuros* and *Vulpia megalura* on the growth of several kinds of soil-borne pathogens and beneficial microorganisms. J. Japan. Soc. Agric. Tech. Manage. **16**: 29-36.
Watanabe, F. S. & Olsen, S. R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and $NaHCO_3$ extracts from soil. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. **29**: 677-678.
Xavier, L. J. C. & Germida, J. J. (2003). Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. Soil Biol. Biochem. **35**: 471-478.

IFO Res.Commun. 26
101-111, 2012

新しいバイオマス利用法の開発に向けた放線菌群の共生的相互作用に関する研究

上　田　賢　志

日本大学生物資源科学部応用生物科学科
〒252-0880　神奈川県藤沢市亀井野1866

Studies on the symbiotic associations of actinomycetes and development of new biomass utilization techniques

Kenji Ueda

Department of Applied Biological Sciences, College of Bioresource Sciences, Nihon University
1866 Kameino, Fujisawa 252-0880 Kanagawa, Japan

Aiming at elucidating how the soil-dwelling gram-positive bacteria actinomycetes contributes to the construction of microbial community structure in the natural environment, a wide variety of ecological studies was carried out by focusing on the function of extracellular metabolites and enzymes produced by the group of bacteria. Ferrioxamines, a siderophore produced by some actinomycetes, showed diverged effects on the growth and functional expression in taxonomically diverged bacteria. *Streptomyces coelicolor* A3(2) excreted cobalamin, the cofactor utilized by diverged organisms ranging from prokaryotes to higher animals. The laccase activity of a saprophytic fungus *Coprinus* was promoted by cocultivating it with a soil actinomycetes isolate. The laccase-promoting activity of the actinomycetes isolate was identified to be a functionally unknown protein existing in its extracytoplasmic fraction. Some actinomycetes strains exhibited a marked humus-coagulating and decolorizing activity. The isolation of humus-decolorizing activity of *S. coelicolor* A3(2) showed the possible involvement of a membrane-associating diaphorase. The presence of similar extracytoplasmic diaphorase activity in the diverged actinomycetes strains suggested the wide occurrence of energy metabolism based on the reduction of a humic substance(s). Overall, the evidence suggests that some actinomycetes metabolites widely support the growth and expression of specific functions in other organisms, and that actinomycetes contributes to the construction of a global soil microbial community structure by effectively associating with the formation and dynamics of humus, the substance derived from dead plant that constitutes rich soil environment.

Key words: Actinomycetes, symbiotic associations, microbial community, biomass, humus

緒　言

グラム陽性の土壌細菌である放線菌は，発芽した胞子から基底菌糸と呼ばれる多核性の菌糸を伸長させて栄養増殖し，その後，栄養飢餓等のシグナルを感知することで空中に向かって気中菌糸と呼ばれる菌糸を伸長する（Chater, 2006）．*Streptomyces* 属に代表される典型的な放線菌においては，さらに気中菌糸に隔壁が形成され連鎖状の胞子が形成される．糸状性のカビに類似したこの複雑な生活環は，この細菌が遺伝的にプログラムされた高度な形態分化とその制御を司るメカニズムを保有していることを意味しており，生物分化の格好のモデルとして研究されている．

複雑な形態分化に加え，放線菌は抗生物質をはじめとする二次代謝産物を広く生産する能力をもつことでもよく知られる．ワクスマンによって *Streptomyces griseus*

E-mail: ueda.kenji@nihon-u.ac.jp
共同研究者：別府輝彦（東大名誉教授），天野昭一（日大・生物資源科学部），作田庄平（東大院・農学生命科学研究科），降旗一夫（東大院・農学生命科学研究科），高野英晃（日大・生物資源科学部），高野（白鳥）初美（日大・生物資源科学部），老沼研一（日大・生物資源科学部）

の培養液中にストレプトマイシンが発見されて結核の治療に利用されて以来，放線菌は抗生物質やその他の様々な生理活性物質の探索源として注目されてきた（Miyadoh, 1993）．さらに，代謝産物の構造的多様性と作用の多様性に加え，その生合成メカニズムならびに生合成遺伝子群の発現制御の問題など，放線菌の二次代謝能に焦点を当てた基礎研究が広くなされている．放線菌の二次代謝は，上述の形態分化と遺伝的に密接に関連していることから，形態上の分化に対して「生理的な分化」として捉えられている．

放線菌の特性である上述の形態分化と二次代謝については，実験室に於ける人工培地を用いた純粋培養を基礎とする研究手法を適用することで詳しい検証がなされ基礎的ならびに応用的な知見が広く収集されてきた．一方で，放線菌群が自然界において本来発揮していると考えられる腐生性の増殖能に着目した研究はきわめて少なく，知見に乏しい．土壌中において放線菌は，主に枯死した植物に由来する有機物を比較的酸素濃度が低く炭酸ガス濃度が高い環境下で代謝していると考えられる．さらに，そこでは他の生物との多様な相互作用が高頻度で起こっており，それらにも大きく影響を受けながら独自の生命活動を展開していることが想像される．この一連の代謝過程は，エネルギー問題への重要な施策として人類が掲げるバイオマスの利用に相当する天然の現象であると考えることができる．

そこで，本研究では，バイオマス利用の観点から放線菌の共生相互作用の実態とその役割・意義についての洞察を深めることを目的とした．特に，(1) 放線菌によって生産される低分子化合物が微生物コミュニティにおいて果たしている役割，ならびに (2) 放線菌が腐植質の代謝を介して及ぼす微生物群集構築への影響に焦点をあてることで，土壌に於けるグローバルな微生物共生構造についての詳しい検証を行った．

実験方法

使用菌株・プラスミド

Streptomyces coelicolor A3(2) M145 株は John Innes研究所（英国・ノーリッジ），*Streptomyces griseus* IFO13350 は発酵研究所，*Streptomyces avermitilis* は北里研究所からそれぞれ分与された．それ以外の放線菌株は，本研究において主に土壌から分離した．遺伝子クローニングや組み換え蛋白質の発現宿主には，タカラ酒造から購入可能な各種大腸菌株を用いた．*Pseudomonas putida* KT2440 は東京大学・野尻秀昭博士より分与された．*Lactobacillus delbrueckii* NBRC 3073 および *Coprinus cinereus* NBRC 30628 株は NBRC より分譲を受けた．ベクターとして利用した放線菌のプラスミドは John Innes 研究所（pIJ シリーズ）および北里大学・池田治生博士（pKU シリーズ）から分与された．

菌株の培養と観察

放線菌の培養ならびに遺伝的取り扱いの方法は基本的に Kieser ら（Kieser *et al.*, 2000）の記述によった．培地には，Bennett's 培地・R2YE 培地・最小培地（Fujimoto *et al.*, 2012）および腐植酸培地（Hayakawa *et al.*, 2000）を必要に応じて改変して用いた．固体培地には寒天を 1.5% 添加した．土壌試料からの放線菌株の分離は，早川ら（Hayakawa *et al.*, 2000）による腐植酸培地を用いた選択分離法によった．デスフェリオキサミン B（DFB）応答株の分離には，主に神奈川県藤沢市で採取した土壌や水圏の試料から Bennett's/maltose や LB 培地を用いて市販の DFB（desferrioxamine B または deferoxamine mesylate；シグマアルドリッチ社から購入）を 0.1 mM 添加した場合と添加しない場合で菌の形質の変化を観察した．コバラミンの定量は，B12 assay medium（Becton Dickinson and Company）とコバラミン要求性の *L. delbrueckii* を用いる方法（Difco および BBL マニュアル）によった．*C. cinereus* と放線菌の共培養によるラッカーゼ活性促進現象の探索には，potato-sucrose 培地（0.4% ポテトエキス，2.0% ショ糖，0.02% グアヤコール，および 1.5% 寒天）を用いた．細胞の観察には位相差顕微鏡 BX50（オリンパス）および走査型電子顕微鏡 VE8800（キーエンス）を用いた．電子顕微鏡試料の調製は既報（Fujimoto *et al.*, 2012）に記載の通り行った．

酵素活性検定，単離精製および組み換え体の調製

ラッカーゼ活性は，市販のラッカーゼ（ウルシ由来，50 U/mg；シグマアルドリッチ）50 μg を 0.1 mol グアヤコールと 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) の緩衝液中で混合し，混合後 10-40 秒間における 494 nm の吸収の増加を測定した．この反応に添加することで本酵素活性を 2-4 倍に促進させる放線菌 HT119 株の培養上清中の活性物質について，硫安沈殿，DEAE クロマトグラフィーおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex）を用いて粗精製した．クロマトグラフィーは ÄKTA（GE ヘルスケア）を用いた送液分取システムを利用して行った．

S. coelicolor A3(2) の培養上清に認められる腐植酸脱色活性については，0.2% 腐植酸と 20 mM NaH_2PO_4 を含む寒天プレート（pH 7.0，厚さ 0.5 cm）を用いた脱色アッセイによって活性を簡易検出することで，YMP/maltose 液体培地で培養（28℃，4 日，振盪 130 rpm）した *S. coelicolor* の培養上清液 1 *l* から単離を進めた．精製

は上記のラッカーゼ活性促進物質に対するものと同じ手法を用いた．SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動ならびにエドマン分解によるN-末端のアミノ酸配列決定は標準的な手法を用いた．

ジアホラーゼ活性（Reed *et al.*, 2001）は，ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）を用いた活性染色法（Blue Native PAGE）を用いて簡易検出した．また，ジクロロフェノールインドフェノール（DCIP）の還元による脱色を検出する手法も用いた．

遺伝子破壊

S. griseus における *hyaS* ならびに関連の遺伝子の破壊は，既報（Fujimoto *et al.*, 2012）に記載した通りの相同組み換えを利用した手法によって実施した．

結果および考察

デスフェリオキサミンB（DFB）応答株の分離と同定

以前の研究において筆者らは，*S. griseus* が生産するシデロフォア，デスフェリオキサミンEが*Streptomyces tanashiensis* の増殖と分化を顕著に誘発する現象を見いだした（Yamanaka *et al.*, 2005）．この現象は，シデロフォアの生産性が欠損ないしは低下している後者が，前者の生産するデスフェリオキサミンEを取り込むことでその欠損を補完していることを推測させる．そこで，放線菌によって広く生産されるこのタイプのシデロフォアが土壌中の他のバクテリアに及ぼす影響を広く調査する目的で，市販のDFBを用いた探索を実施した．その結果，Fig. 1に代表的な例を示すように，多様な応答が広く観察された．Table 1に応答を示した分離株の系統分類学的位置をまとめる．

KW016株に代表されるような，増殖をDFBに完全に依存する菌は，いずれも *Microbacterium* 属の細菌であった．同様の現象は *Microbacterium flavescens* の基準株においても観察された（データ示さず）ことから，DFB要求性は本グループの菌に広く認められる性質と予想された．おそらくこれらの菌はシデロフォアの合成能を欠損しており，DFBを取り込むことでそれを補填しているものと推測される．同様のことは，DA010に代表されるような増殖促進を受ける菌株についても推測された．また，増殖には影響しないが，DA021株では遊走性が，DA027株では紫色素の生産がそれぞれ誘発された．これらの現象は，DFBの利用性が特定の形質のスイッチに連携していることを示しており，栄養増殖への影響とは異なるメカニズムで作用していることを予想させる．DA027株が生産する色素は，ビオラセインであることが標品との簡易的な比較によって明らかになっている．本菌のビオラセイン生合成遺伝子 *vio* の一部のクローン化と配列決定に成功し，その転写レベルを測定したが，DFBによる影響は観察されなかった（データ示さず）．VioBがヘム要求性の酵素であることから，DFBはこの酵素に鉄を供給することでビオラセインの合成に正に作用しているものと推測される．

上述のような正の効果に対し，DFBはその添加によって分類学的に多様な菌群の増殖を顕著に抑制することも判明した（Fig. 1のKW009やKW112がその例；Table 1も参照）．この事実は，DFBを利用できるグループの外に，逆に利用できないグループが存在していることを示している．おそらくこれらの菌群は別なタイプのシデロフォアを生産するか，ないしは別な鉄の取り込みシステムを保有しているものと予想される．総じて，シ

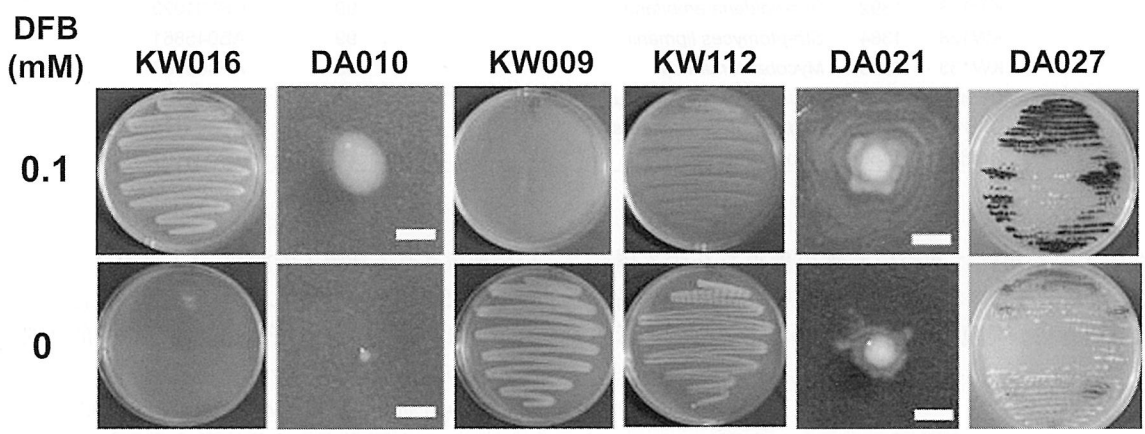


Fig. 1 Macroscopic view of representative DFB-dependent bacterial phenotypes observed in this study. Colony of strains were developed by cultivating them for 3 d at 28℃ on LB medium containing 10μM $FeCl_3$ without and with the supply of 0.1 mM DFB. Bar, 5 mm.

Table 1 DFB-dependent isolates obtained in this study

Strain Name	Read (nt)	Closest GenBank Relative		
		Taxon	Identity (%)	Accession no.
Isolates whose growth essentially required DFB				
KW016	1369	*Microbacterium phyllosphaerae*	98	EU714359
KW111	1381	*Groundwater biofilm bacterium*	99	FJ204420
KW080	1383	*Microbacterium flavescens*	98	EU714363
Isolates whose growth was promoted by DFB				
KW040	1402	*Burkholderia cepacia*	99	GQ383907
KW096	1369	*Gordonia* sp.	99	FJ975129
KW105	1388	*Burkholderia fungorum*	98	AB091188
DA010	1510	*Paenibacillus* sp.	96	AM162296
Isolates whose growth was completely inhibited by DFB				
KW009	1315	*Shewanella putrefaciens*	99	GQ359955
KW018	1363	*Bacillus* sp.	99	D84560
KW019	1405	*Sporosarcina aquimarina*	98	EU308120
KW031	561	*Dermacoccus nishinomiyaensis*	100	AJ627008
KW034	1400	*Staphylococcus epidermidis*	100	FJ768459
KW046	1351	*Bosea* sp.	99	DQ440827
KW047	1309	*Alpha proteobacterium*	99	DQ351731
KW049	1386	*Arthrobacter* sp.	99	AM922187
KW051	501	*Arthrobacter globiformis*	99	EF634027
KW055	1408	*Staphylococcus epidermidis*	99	FJ357583
KW060	1257	*Pseudoxanthomonas* sp.	99	GU122958
KW065	896	Drinking water bacterium	99	AY328836
KW066	1350	*Sphingopyxis* sp.	98	GQ131578
Isolates whose growth was partially inhibited by DFB				
KW032	989	*Lysobacter* sp.	99	GU385868
KW112	670	*Mycobacterium* sp.	99	AF408960
Isolates whose pigment production was promoted by DFB				
KW001	1353	*Pseudomonas* sp.	99	AB051692
KW003	1309	*Pseudomonas* sp.	100	DQ279321
KW122	1377	*Streptomyces* sp.	99	FJ263419
DA027	1495	*Janthinobacterium lividum*	99	EU275366
Isolates whose colony morphology was affected by DFB				
KW103	1392	*Burkholderia ambifaria*	99	CP001025
KW128	1384	*Streptomyces lipmanii*	99	AB045861
KW133	1366	*Mycobacterium* sp.	99	AF408960
DA003	1300	*Lysinibacillus sphaericus*	99	AB116123
DA018	1506	*Paenibacillus macerans*	96	AB363744
DA021	1489	*Geobacillus* sp.	98	CP001793

デロフォアの利用性に基づいた鉄の獲得を介する協調・競合の構造が自然界に介在しており，それが生態系における生物機能発現の基盤を形作っているものと考えられる．

S. coelicolor A3(2) の細胞外コバラミン生産

コバルトを配位したテトラピロール構造を有するコバラミンは，細菌から動物に至るまでの多様な生物において要求される補因子であり，ヒトにおける要求性に基づいてビタミン B12 としても知られる化合物である．コバラミンの生合成は好気的経路と嫌気的経路の 2 種類が知られるが，興味深いことにそれらは一部の原核生物にのみ分布している（Martens *et al.*, 2002）．すなわち，コバラミンを要求する生物は特定の原核生物が生合成したものを取り込むことでその要求性を充足している．つまり，コバラミンは生物界を越えて作用するグローバ

ルな共生因子であるということができる.

筆者らは,コバラミンをクロモフォアとして要求する新しいタイプの光センサーを発見し,それがバクテリアに広く分布していることをこれまでに明らかにしてきた（Takano *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2006; Takano *et al.*, 2011）. その発見の発端となった放線菌 *S. coelicolor* A3(2) について, そのコバラミンの生産性を定量したところ, Fig. 2 に示すように, 培養の早い時期から培地中のコバラミン蓄積量が上昇する現象が見いだされた. 蓄積の時期が早いことから, 観察されたコバラミンの蓄積は細胞の溶菌に起因するとは考えづらく, 特異的な輸送系を介して排出されている可能性が考えられた. 一方, 同様の測定を行った *S. avermitilis*（データ示さず）ならびに *P. putida* (Fig. 2) ではそうした蓄積は認められなかったことから, コバラミンの細胞外における蓄積は *S. coelicolor* A3(2) をはじめとする特定の菌株に認められる性質であることが推測された.

コバラミンはそのビタミンとしての需要のために, 古くからその発酵生産系の構築が進められてきた化合物の一つである. そうした開発研究における生産菌の探索において, *Streptomyces* 属をはじめとする放線菌群にコバラミン高生産株が多く得られることが観察されている（Martens *et al.*, 2002; Perlman, 1959; Wagman *et al.*, 1969）. 特に *Streptomyces* 属の分離株では, 上記のように培地中にもコバラミンが生産される現象が観察されている. 最近では, メタン資化性の菌にコバラミン要求性のものがあり, それらの増殖がコバラミンを細胞外に顕著に蓄積する根粒菌との共培養によって補填されるという報告が阪井らの研究グループによってなされている（Iguchi *et al.*, 2011）. コバラミンの排出は一見してエネルギーの浪費に思われるが, 高等動物まで多くの生物が広く要求する本物質を提供することは, 生産菌に間接的な利益をもたらす可能性を考えることができる. すなわち, 本物質を提供することでその生産菌の周囲にはそれを利用する様々な生物の活動が繰り広げられることになり, その結果として他に比較して代謝活性が高いコミュニティが形成される. そうしたコミュニティにおいて成立する物理化学的・生理学的な環境条件は, コバラミン生産者にとっても有用なものになり, コバラミンを生産・提供するに値する利益を与える可能性が考えられる. 同様の概念は, 前項のシデロフォアの生産についてもあてはめることができる. 共生のメカニズムは, 特定のパートナーについてその性質を補う特異的な物質の授受の観点から検証・議論されることが主であるが, 不特定な群集に対して利便性を提供するという生命活動も, 広い意味で共生系の構築に深く介在する共存原理となっていると考えることができる.

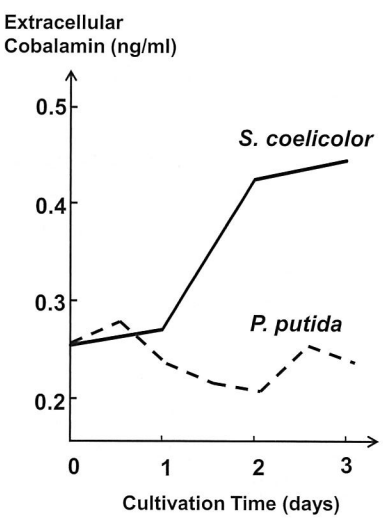


Fig. 2 Cobalamin content in bacterial culture. Cobalamin present in culture supernatant of *S. coelicolor* A3(2) and *P. putida* was quantified. Strains were grown at 28℃ in Bennett's/glucose liquid medium.

腐植質代謝に関わる共生相互作用

(i) 真菌のラッカーゼ活性を促進する放線菌分泌物

筆者らは以前の研究において, リグニン分解の主要なステップを担うことで知られるラッカーゼが, カビ・キノコだけでなく放線菌によっても生産されていることを明らかにした（Endo *et al.*, 2002; Endo *et al.*, 2003）. このことは, リグニンから腐植質を生成する段階に放線菌が関与していることを示している. そこで, 本研究では放線菌が腐植質の生成に対して果たしている役割に

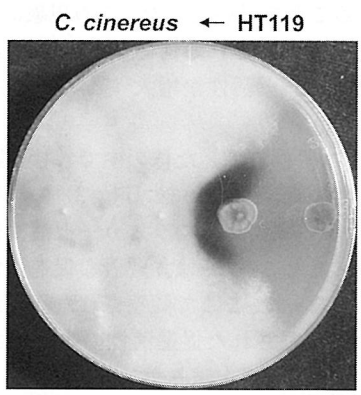
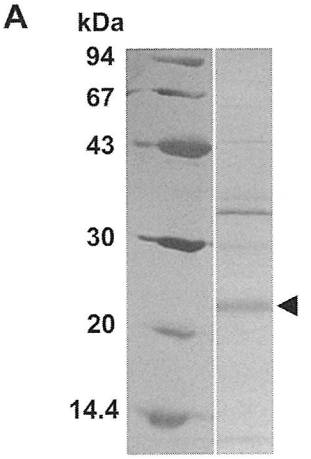


Fig. 3 Stimulation of laccase activity of *C. cinereus* by cocultivation with HT119 strain. *C. cinereus* (left colonies) and an actinomycetes strain HT119 (right colonies) were cocultured on potato-sucrose agar containing 0.02% guaiacol. Oxidation of guaiacol due to laccase activity of *C. cinereus* is visualized by the brown color of the oxidized product.



B

```
SEQ-1                    EAPGLTAVIVGLGDDVRTTTGxDFxL (23 kDa)
SEQ-2                    EAPGLTAVTVGLGADVETTxGxLFD  (23 kDa)
SCO2368 MGVSLSKGGNVSLTKEAPGLTAVIVGLGWDIRTTTGTDFDL (19 kDa)
SCO4277 MAVSLSKGGNVSLTKEAPGLTEVTVGLGWDVRTTTGTDFDL (19 kDa)
SCO0641 MGVSLAKGGNVSLSKEAPGLTAVLVGLGWDVRTTTGTDFDL (19 kDa)
SCO2367 MGVTLAKGGNVSLSKAAPNLTQVLVGLGWDARSTTGAPFDL (19 kDa)
                        ** ** * **** *   * *  *
```

Fig. 4 Isolation of the laccase-promoting activity of HT119. (A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the active fraction obtained by gel filtration chromatography. The 23 kDa protein corresponding to the laccase-promoting activity is indicated by an arrowhead. (B) N-terminal amino acid sequence of the 23 kDa protein. The two sequences (SEQ-1 and -2) obtained in the analysis of the 23 kDa band were compared with those of SCO2368 and homologs encoded in the *S. coelicolor* genome. x indicates the unidentified amino acid residues. The conserved amino acids are indicated by asterisks.

ついての洞察をさらに深めることを目的に，腐生担子菌 *C. cinereus* との共培養によってそのラッカーゼ活性を増強する放線菌株の探索を実施した．その結果，Fig. 3 に示すような顕著な促進活性を示す株が比較的頻度高く認められることを見いだした．この現象は，おそらく放線菌によって分泌される何らかの因子によって腐生担子菌のラッカーゼ活性が増大することを示していると考えられた．

そこで次に，陽性を示した株の中でも特に顕著な促進活性を示した放線菌 HT119 株（Fig. 3）の培養上清液について，ウルシ由来の市販のラッカーゼ活性に対する添加効果を調べたところ，やはり顕著な促進活性を示すことが明らかになった．ここで観察された活性が上記の共培養において観察された促進活性の本体であると考えられたため，その単離を試みた．当初，低分子と予想された活性物質は，透析を用いた簡易的な分子量分画実験によって高分子であることが判明したため，硫安沈殿とゲルろ過クロマトグラフィーにより粗精製した．得られたフラクションに認められた SDS ゲル電気泳動上の複数のバンドのうち，再現よく活性に連動していた 23 kDa 付近のバンドが促進活性の本体であると考えられた（Fig. 4A）．そこでこのバンドを切り出してエドマン分解法による N-末端のアミノ酸配列解析を実施したところ，ゲノム解読がなされている *S. coelicolor* A3(2) に複数存在する機能未知の蛋白質群に高い相同性を示す配列であることが判明した（Fig. 4B）．解読された配列は 2 種類（SEQ-1 および SEQ-2）存在したことから，精製蛋白はアイソザイムの混合物であると予想される．

解読されたアミノ酸配列は，*S. coelicolor* A3(2) の類縁蛋白群の N-末端から10アミノ酸下流の配列にほぼ一致していたことから，おそらく N-末端が切断されて活性化される性質の蛋白質であると考えられた．一方，見かけ上の分子量（23 kDa）が *S. coelicolor* A3(2) の相同配列のそれ（19 kDa）よりも大きいことから，分子長には多様性があるものと予想された．最も相同性の高い SCO2368 産物については立体構造の解析がなされており，金属が配位することが示唆されている．現在までにその機能に関する情報は得られていないが，ラッカーゼによる酸化反応に対して促進的に作用することから，配位金属による電子の受容に基づく酸化還元を司る蛋白質であることが予想される．

(ii) 腐植酸凝集・脱色活性

放線菌の有効な選択分離法に，山梨大学の早川らによって開発された腐植酸を添加した無機塩培地を利用する培養条件が広く利用されている（Hayakawa *et al.*, 2000）．これは，ひとつに上述のような腐植質関連物質に対する代謝活性の高さに基づく結果と捉えることができるが，ラッカーゼ活性の放線菌における分布は必ずしも普遍性が高いといえないことから，それ以外にも放線菌が腐植質を好む理由が存在する可能性が考えられた．そこで，選択分離に用いられるのと同様の条件で腐植酸を添加したBennett's/maltose液体培地を用いて自然界分離株および保存菌株を広く培養し，腐植酸の状態に顕著な変化を引き起こす株を探索した．その結果，いくつかの菌株において，顕著な腐植酸の凝集活性が認められることが判明した．

Fig. 5Aに示すように，凝集活性を示した株の細胞は，液体振盪培養の間に徐々に腐植酸を凝集させ，管壁に付着することでそこにコロニーを形成する現象が観察された．中でも顕著な活性を示した *Streptomyces ghanaensis* は，培地中の腐植酸をほぼ全て除去するという目覚ましい現象を再現よくひき起こした（Fig. 5A）．本菌の細胞は液体中には存在せず，管壁に付着した腐植酸の凝集体の表面に増殖していた．走査型電子顕微鏡による観察（Fig. 5B）では，腐植酸添加条件における細胞の様子は非添加の条件におけるそれとは大きく異なり，恐らく腐植酸の塊と考えられる粒子の表面に菌糸が旺盛に伸長している様子が認められた．本菌による腐植酸代謝に関する詳しい知見はまだ得られていないが，培地中からの顕著な除去活性はおそらく本菌が有する強力な腐植

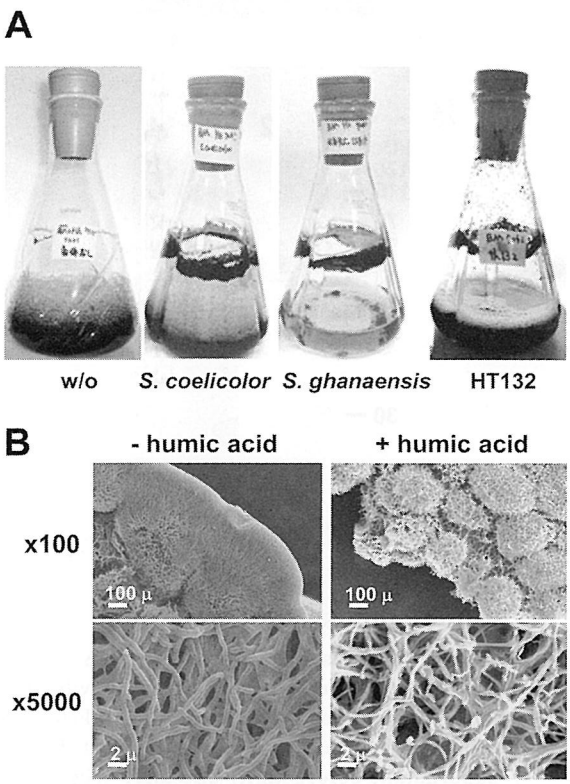


Fig. 5 Humus-coagulating activity of some *Streptomyces* strains. (A) Macroscopic view of shaking flasks. *S. coelicolor* A3(2), *S. ghanaensis*, and *Streptomyces* sp. strain HT132 were grown at 28℃ for 5 d with shaking at 180 rpm in Bennett's/maltose liquid medium containing 0.1% humic acid. A flask without inoculating bacteria (w/o) is also shown. (B) Scanning electron micrograph of the precipitate formed by *S. ghanaensis* in Bennett's/maltose liquid medium without (left) and with (right) humic acid.

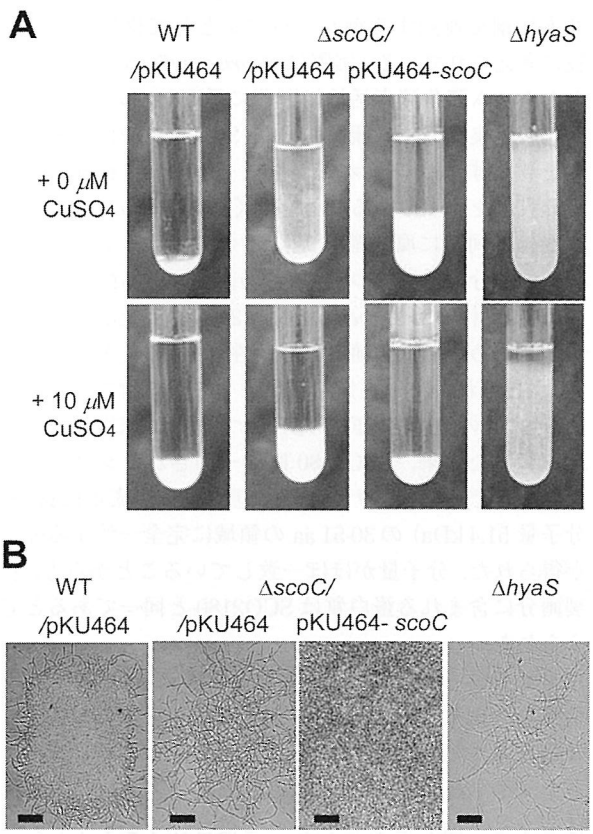


Fig. 6 Cell aggregation and precipitation in *S. griseus*. (A) Precipitation in the early growth phase. Culture broth containing the cells grown for 24 h in YMP/glucose liquid medium (without/with 10 mM $CuSO_4$) was collected from the shaking flask into a test tube, left to stand for 3 min and photographed. (B) Optical micrograph of the *S. griseus* cells grown for 24 h in YMP/glucose liquid medium. The wild type (WT) and *scoC* mutant (Δ*scoC*) harbouring the empty plasmid (pKU464) and pKU464 carrying the intact *scoC* (pKU464-*scoC*). A *hyaS* mutant (Δ*hyaS*) is shown. Bars, 20 μm.

酸の凝集・分解活性に起因するものと予想される．紫外線照射によって取得された本菌の胞子形成能欠損変異株の中に腐植酸除去活性を同時に失うものが高い頻度で認められることから(未発表データ)，本活性のもとになるメカニズムが細胞分化と制御的に連動している可能性が考えられる．

Koebsch ら（2009）は最近，*Streptomyces lividans* の細胞凝集にリジルオキシダーゼをコードする *hyaS* 遺伝子が重要な働きを持つことを報告している．そこで，*S. griseus* について相同遺伝子を破壊したところ，やはり液体培養における栄養増殖の前半で特異的に認められる菌糸の凝集・沈降性が失われることが判明した(Fig. 6)．同様の形質は，Sco1/SenC ファミリーに属する蛋白質をコードする *scoC* のノックアウト変異株においても認められた(Fig. 6)．ScoC は末端呼吸鎖のシトクロム酸化酵素に銅を運搬する銅シャペロンとして機能すると一般に考えられている．実際に *S. griseus* の *scoC* 破壊株のシトクロム酸化酵素活性は顕著に低下していた．一方，上記の凝集に関する観察結果は，ScoC が，やはり銅イオンを要求するリジルオキシダーゼ HyaS にも銅を運搬する役割を担っていることを強く示唆している．

凝集と同時に腐植酸代謝に深く関わると予想される腐植酸の分解活性について，その基礎になる酵素を同定するする目的で，*S. coelicolor* A3(2) の培養上清中に微弱ながら認められた腐植酸脱色活性（Fig. 7A）を単離精製した．得られた精製画分に再現よく主要に含まれていた約 50 kDa のバンド（Fig. 7B）について N-末端配列の解析を行った結果，SCO2180 にコードされるジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼと予想される酵素蛋白質（総分子量 51.4 kDa）の 30-51 aa の領域に完全一致する配列が得られた．分子量がほぼ一致していることからも，精製画分に含まれる蛋白質は SCO2180 と同一であると考えられた．

ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼは，リポアミド型酵素の再生に関わることで知られるフラビン結合性の酸化還元酵素であり，NAD^+ を補酵素としてリポアミドを酸化する反応を触媒する（Danson, 1988）．本酵素はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体や 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の構成成分としてよく知られている．一方，大腸菌におけるユビキノン依存的な NADH の酸化を伴う乳酸やアミノ酸の膜輸送においてこの酵素が関与しているとする報告（Stroobant & Kaback, 1975）があるなど，リポアミド型酵素複合体におけるそれとは異なる役割を担っている可能性も示唆されている．

ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼは，NADH 依存的な色素の還元活性であるジアホラーゼ活性を有することが知られる．そこで，大腸菌を用いて発現精製した SCO2180 組み換え蛋白質について，モデル基質 DICP の脱色を利用したジアホラーゼ活性を検証したところ，顕著な脱色が認められた(データ示さず)．また，NBT を基質に用いた活性染色法による活性検定においても，3 量体と考えられる位置のバンドに還元フォルマザン色素の顕著な沈着が認められた (Fig. 8, lane R)．この検定法を用いて種々の自然界分離株の細胞抽出液ならびに培養液中のジアホラーゼ活性を検証したところ，ほぼ全ての株において細胞抽出液内にジアホラーゼ活性が認められたことに加え，多くの株において培養液中にも顕著なフォルマザン色素生成活性が認められた

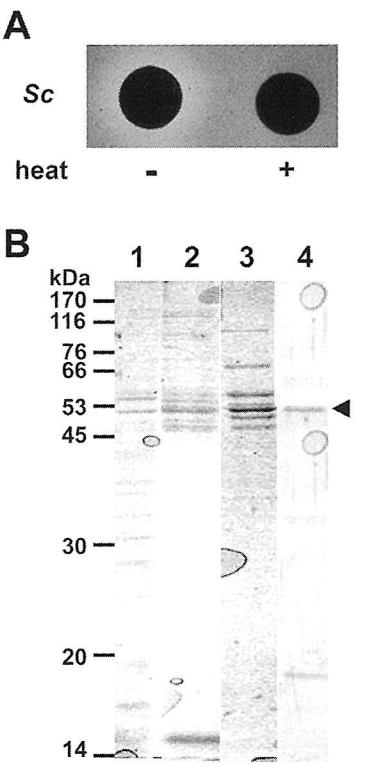


Fig. 7 Isolation of humus-decolorizing activity of *S. coelicolor* A3(2). (A) Humic acid-decolorizing activity of the culture supernatant of *S. coelicolor* A3(2). Filter discs containing the ammonium sulfate-precipitated culture supernatant before (left) and after (right) heat treatment at 95℃ for 15 min were placed onto the agar plate containing 2% humic acid and incubated at 28℃ for 17 h. (B) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the humic-acid decolorizing activity fractions. Total protein (lane 1) and activity fraction after ammonium sulfate (50-55%) precipitation (lane 2), ion exchange chromatography by DEAE cellulose (lane 3), gel filtration chromatography (lane 4) are shown. The 50 kDa protein corresponding to the lipoamide dehydrogenase is indicated by an arrowhead.

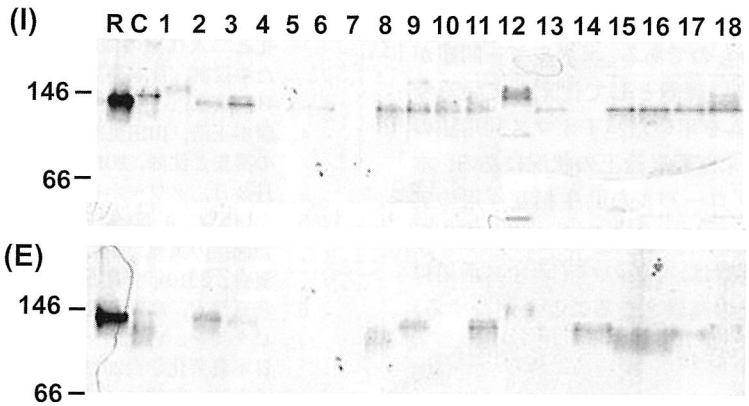


Fig. 8 Diaphorase activity of soil isolates. The intracellular (I) and extracellular (E) fractions of 18 independent strains isolated from soil and *S. coelicolor* A3(2) (C) are analyzed by Blue-Native PAGE. The recombinant protein of SCO2180 (R) is also analyzed.

(Fig. 8). いくつかの株においては，細胞外酵素の見かけ上の分子量に顕著な低下が認められた．これらの結果は，放線菌において広くジアホラーゼが細胞膜に移行していることを示している．ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼが膜に局在していることを示す観察は，上記の大腸菌におけるもの以外にも，シアノバクテリアでも報告がある（Engels *et al.*, 1997）．

放線菌の膜に局在するジアホラーゼの役割としては，腐植質中の特定のキノン分子種を還元することで NAD^+ を還元再生すること，ならびにそれを通じて膜輸送エネルギーを生み出すことが考えられる．ジアホラーゼ活性を示したSCO2180組み換え体は，顕著なDICPの還元・脱色活性を示したが，一方で腐植酸脱色アッセイ（Fig. 7A）における脱色は示さなかった．現在，その理由は不明であるが，大腸菌を用いた発現系には反映されていない何らかの追加因子が腐植酸の脱色に必要である可能性が考えられる．土壌生態圏において広く電子受容体として機能していることが議論されつつある腐植質は，放線菌の生理においても重要な役割を果たしている可能性が考えられる．

総　括

本研究では，放線菌細胞が細胞外に生産する代謝産物ならびに代謝酵素に着目し，特にその生態学的な役割に焦点をあてて検証を進めた．その結果，デフェリオキサミンやコバラミンの生産にみられるように，他の生物が利用可能な物質を環境に放出している可能性が強く示唆された．この一見してエネルギーの浪費に見えるような現象も，実は間接的に生産菌である放線菌に利益をもたらすとも考えられ，協調に基づいたコミュニティ形成の一側面を捉えている可能性がある．

本稿では取り上げなかったが，筆者らは，モネンシンに代表されるポリエーテル系抗生物質が，その抗生物質としての作用濃度より10-50倍低い濃度において，特定の放線菌の二次代謝を誘発する活性をもつことも見いだしている（Amano *et al.* 2011; Amano *et al.* 2011）．この事実は，イオノフォアとして作用することで抗菌活性を発揮すると理解されている本物質がそれとは異なる機能と役割も持っている可能性を想起させる．さらに，抗生物質として認識されている代謝産物も，その環境中での実際の作用は抗生物質にみられるそれとは異なる場合があるかもしれず，むしろ他の生物の機能を賦活化させるなど協調的に作用するものが存在している可能性が示唆される．このように，微生物群集の構築には，特異的な共生因子や抗生因子による顕著な増殖促進や阻止のみでなく，より普遍的かつ多様に作用する因子群も深く介在していると考えることができる．

筆者らはさらに，放線菌群が腐植質の生成と動態に深く関与することで，土壌微生物群集の生態基盤を形成していることを示唆する結果を得た．多くの生命を育む肥沃な土壌の重要構成要素である腐植質は，特定の土壌微生物によって電子受容体として利用されていることが示唆されつつある．筆者らの成果は，放線菌群もラッカーゼを生産するとともに，真菌が生産するラッカーゼの触媒反応を促進する活性を有することで，腐植質の生成に複合的に寄与している可能性を示した．さらに，逆に腐植質の特定の構造を還元的に代謝する未同定のエネルギー生成様式を保有していることを示唆する観察が得られた．これらの結果は，放線菌が示す腐生性の生理に関する全く新しい知見である．

主に枯死した植物に由来する腐植質の生成過程は，バイオマスの生物利用そのものである．エネルギー問題がより重要性と緊急性の高い課題として捉えらている今日にも，人工的なシステムを用いたバイオマス利用法の開発は，効率面において未だ発展途上の状況にある．本研究によって得られたグローバルな共生相互作用の実態に関する具体的な知見と，そこから深まる複合微生物系構築の原理に関する洞察は，今後のバイオマス活用に関する革新的な技術開発の基礎となることを期待する．

要　約

グラム陽性土壌細菌である放線菌が，微生物群集構造の構築にどのような役割を果たしているかを明らかにする目的で，特にそれが細胞外に生産する代謝産物や酵素の機能に着目した生態学的な検証を行った．一部の放線菌が生産するシデロフォアであるデフェリオキサミンは系統的に多様な細菌の増殖と特定の機能発現に対して多面的な効果を及ぼした．*Streptomyces coelicolor* A3(2) は原核生物から高等動物に至るまでの多様な生物が要求するコバラミンを細胞外に蓄積する性質を示した．腐生担子菌 *Coprinus* が分泌するリグニン分解酵素ラッカーゼの活性を増強する機能未知の蛋白質が，自然界分離放線菌の細胞外画分に存在することが見いだされた．一部の放線菌には腐植質を強力に凝集させる活性が認められ，また *S. coelicolor* が示す腐植酸脱色活性には細胞膜に局在すると推測されるジアホラーゼが関与している可能性が示唆された．同様のジアホラーゼ活性は多くの放線菌の細胞外画分に検出され，本酵素による腐植質の還元を介したエネルギー代謝系の存在が想起された．以上の成果から，多くの放線菌の代謝産物の中には，広く他の生物の生育や特定の機能を下支えしているものがあること，また放線菌は主に枯死した植物体に由来し肥沃な土壌形成に関与している腐植質の生成と動態に深く関わることでグローバルな土壌微生物共生体系を形作っていることが予想される．

本助成で得られた研究成果の報告

学会発表

1. Takano, H., Beppu, T. & Ueda, K. Pleiotropic role of cobalamin in *Streptomyces* physiology. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 2009年 8 月 23日，Shanghai，China.
2. 高野英晃，別府輝彦，上田賢志．細菌群集の光応答：ビタミン B12 が果たすグローバルな役割，日本農芸化学会2009年度関東支部大会，2009年10月31日，東京.
3. 藤本正浩，山田晃朗，高野英晃，上田賢志．放線菌の分化と二次代謝の開始においてシトクロム酸化酵素が果たす役割．日本農芸化学会2010年度大会，2010年 3 月28日，東京.
4. 藤本正浩，山田晃朗，高野英晃，上田賢志．放線菌細胞の凝集と沈降，2010年度日本放線菌学会大会．2010年 9 月 3 日，タワーホール船堀，東京.
5. 上田賢志，新しい生態学へ-多様な因子の作用にみる微生物群集の実態．日本放線菌学会～堀之内末治先生記念講演会，2010年 9 月 3 日，タワーホール船堀，東京.
6. 萩原健太，高野英晃，上田賢志．原核生物だけがつくるビタミン，VB12：一部の菌にみられる細胞外蓄積現象．日本農芸化学会2011年度大会，2011年 3 月26日，京都女子大学，京都.
7. 藤本正浩，山田晃朗，高野英晃，上田賢志．放線菌細胞の凝集現象：銅シャペロン Sco1 ホモログが果たす多様な役割．日本農芸化学会2011年度大会，2011年 3 月27日，京都.
8. Takano, H., Amano, S., Shiratori-Takano, H., Hagiwara, K., Saeki, H., Furihata, K., Sakuda, S. & Ueda, K. Microbial community structuring based on the supply of phores from *Streptomyces*. 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 2011年12月13日，Puerto Vallarta，Mexico.
9. Fujimoto, M, Yamada, A., Takano, H. & Ueda, K. Diverged role of Sco1/SenC family copper chaperon in the developmental physiology of *Streptomyces*, 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 2011年12月13日，Puerto Vallarta, Mexico.
10. 藤本正浩，高野英晃，上田賢志．放線菌 *Streptomyces griseus* における銅イオンに依存した転写抑制機構．日本農芸化学会2012年度大会，2012年 3 月23日，京都.

原著論文

1) Amano, S., Morota, T., Kano, Y., Narita, H., Hashidzume, T., Yamamoto, S., Mizutani, K., Sakuda, S., Furihata, K., Takano-Shiratori, H., Takano, H., Beppu, T. & Ueda, K. (2010). Promomycin, a polyether promoting antibiotic production in *Streptomyces* spp. J. Antibiot. **63**: 486-491.
2) Shiratori-Takano, H., Yamada, K., Beppu, T. & Ueda, K. (2011). *Longispora fulva* sp. nov., isolated from a forest soil, and emended description of the genus *Longispora*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **61**: 804-809.
3) Amano, S.I., Sakurai, T., Endo, K., Takano, H., Beppu, T., Furihata, K., Sakuda, S. & Ueda, K. (2011). A cryptic antibiotic triggered by monensin. J. Antibiot. **64**: 703.
4) Fujimoto, M., Yamada, A., Kurosawa, J., Kawata, A., Beppu, T., Takano, H. & Ueda, K. (2012). Pleiotropic role of the Sco1/SenC family copper chaperone in the physiology of *Streptomyces*. Microb. Biotechnol. **5**: 477-488.

特許

高岡一栄ら．活性汚泥処理法，活性汚泥処理剤，活性汚泥処理装置および活性汚泥処理システム．特願2011-244314 (2011. 11. 8)

保存機関に寄託した菌株

本研究により分離した以下の菌株を NBRC に寄託した.

Longispora fulva KZ0017^T = NBRC 105670^T
Glycomyces sp. HT159^T = NBRC 107167^T
Nonomuraea sp. HT229^T = NBRC 107168^T

謝　辞

本研究に対して3年間にわたり貴重な助成を頂いた公益財団法人発酵研究所に深く感謝申し上げます.

文　献

Amano, S., Morota, T., Kano, Y.K., Narita, H., Hashidzume, T., Yamamoto, S., Mizutani, K., Sakuda, S., Furihata, K., Takano-Shiratori, H., Takano, H., Beppu, T. & Ueda, K. (2011). Promomycin, a polyether promoting antibiotic production in *Streptomyces* spp. J. Antibiot. **63**: 486-491.

Amano, S.I., Sakurai, T., Endo, K., Takano, H., Beppu, T., Furihata, K., Sakuda, S. & Ueda, K. (2011). A cryptic antibiotic triggered by monensin. J. Antibiot. **64**: 703.

Chater, K.F. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. **361**: 761-768.

Danson, M.J. (1988). Dihydrolipoamide dehydrogenase: a 'new' function for an old enzyme? Biochem. Soc. Trans. **16**: 87-89.

Endo, K., Hosono, K., Beppu, T. & Ueda, K. (2002). A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. Microbiology. **148**: 1767-1776.

Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T. & Ueda, K. (2003). Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. J. Biochem. **133**: 671-677.

Engels, A., Kahmann, U., Ruppel, H.G. & Pistorius, E.K. (1997). Isolation, partial characterization and localization of a dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta. **1340**: 33-44.

Fujimoto, M., Yamada, A., Kurosawa, J., Kawata, A., Beppu, T., Takano, H. & Ueda, K. (2012). Pleiotropic role of the Sco1/SenC family copper chaperone in the physiology of *Streptomyces*. Microb. Biotechnol. **5**: 477-488.

Hayakawa, M., Otoguro, M., Takeuchi, T., Yamazaki, T. & Iimura, Y. (2000). Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. Antonie Van Leeuwenhoek **78**: 171-185.

Iguchi, H., Yurimoto, H. & Sakai, Y. (2011). Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by rhizobia. Appl. Environ. Microbiol. **77**: 8509-8515.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, United Kingdom: The John Innes Foundation.

Koebsch, I., Overbeck, J., Piepmeyer, S., Meschke, H. & Schrempf, H. (2009). A molecular key for building hyphae aggregates: the role of the newly identified *Streptomyces* protein HyaS. Microb. Biotechnol. **2**: 343-360.

Martens, J.H., Barg, H., Warren, M.J. & Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B12. Appl. Microbiol. Biotechnol. **58**: 275-285.

Miyadoh, S. (1993). Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. Actinomycetologica **7**: 100-106.

Perlman, D. (1959). Microbial synthesis of cobamides. Adv. Appl. Microbiol. **1**: 87-122.

Reed, D.W., Millstein, J. & Hartzell, P.L. (2001). H_2O_2-forming NADH oxidase with diaphorase (cytochrome) activity from *Archaeoglobus fulgidus*. J. Bacteriol. **183**: 7007-7016.

Stroobant, P. & Kaback, H.R. (1975). Ubiquinone-mediated coupling of NADH dehydrogenase to active transport in membrane vesicles from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **72**: 3970-3974.

Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T. & Ueda, K. (2005). Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. J. Bacteriol. **187**: 1825-1832.

Takano, H., Beppu, T. & Ueda, K. (2006). The CarA/LitR-family transcriptional regulator: Its possible role as a photosensor and wide distribution in non-phototrophic bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**: 2320-2324.

Takano, H., Kondo, M., Usui, N., Usui, T., Ohzeki, H., Yamazaki, R., Washioka, M., Nakamura, A., Hoshino, T., Hakamata, W., Beppu, T. & Ueda, K. (2011). Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. J. Bacteriol. **193**: 2451-2459.

Wagman, G.H., Gannon, R.D. & Weinstein, M.J. (1969). Production of vitamin B12 by *Micromonospora*. Appl. Microbiol. **17**: 648-649.

Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H.O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T. & Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. Microbiology **151**: 2899-2905.

IFO Res.Commun. 26
113-126, 2012

マイコバクテリアの薬剤耐性におけるマイコケチドの役割

松　永　　勇

京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野
〒606-0857　京都市左京区聖護院川原町53

Roles of mycoketide on drug resistance of mycobacteria

Isamu Matsunaga

Laboratory of Cell Regulation, Institute for Virus Research, Kyoto University
53 Shogoin-Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-0857, Japan

Because of intrinsic multi-drug resistance of *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), it is hard to treat human MAC diseases. In this study, we attempted to clarify roles of the mycoketide-producing polyketide synthase, Pks12, on the intrinsic drug resistance of MAC. Using 9 clinical isolates of *M. intracellulare*, we found that strong positive correlation between Pks12 enzyme activities and drug resistancy of MAC. The Pks12-deleted *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) strain, as well as the drug-susceptible MAC strain showed marked accumulation of ethidium bromide as compared to the BCG or MAC strains that highly express their Pks12 enzymes. This Pks12-dependent drug resistance is in part due to an efflux mechanism of the baceria. Serotype nonspecific glycopeptidolipids appear not to be involved in the intrinsic drug resistance of MAC. Comprehensive investigation for cell wall components revealed a unique lipidic compound designated as "Lipid X" which has not yet structurally determined. On the basis of these observations, it is suggested that the intrinsic multi-drug resistance of MAC would be due to both of efflux machinery and cell wall barrier that are regulated by a Pks12 enzyme.

Key words: *Mycobacterium avium-intracellulare* complex, Polyketide synthase, Mannose phosphomycoketide, Intrinsic drug resistance, Antibiotics.

緒　言

所謂鳥型結核菌である *Mycobacterium avium* と *M. intracellulare* は，化学分類学上区別できない一群の細菌として扱われ，*M. avium-intracellulare* complex（MAC）と総称される．MAC は水系，土壌，塵埃などの自然環境中に普遍的に存在し（Primm *et al.*, 2004），我々ヒトはそこから暴露を受けていると思われるが，MAC は一般に低病原性であるためヒトに疾病を起こす事は少ないと考えられてきた．しかし，エイズなどの免疫不全症の合併症として注目されるに至って，MAC 症に対する予防，診断，治療法の開発の重要性が認識されてきている．実際，結核症罹患率は我が国においても戦後減少してきたが，MAC 症については横這いの罹患率を示し，近年は増加傾向にある（露口 ・ 鈴木, 2007）．現在，マイコバクテリア症の約 10% が非結核性抗酸菌症であり，MAC 症はそのうちの約 8 割を占める．従来はエイズの合併症を代表例として，免疫能の低下したヒトに日和見感染を起こしていたが，最近では一見免疫学的欠損がないヒトにおける MAC 症例もめずらしいものではなくなってきた（Field *et al.*, 2004）．

MAC はヒトに肺結核症類似の病変を引き起こす．しかし結核と大きく異なる点は，MAC に対して臨床容量で殺菌効果のある抗生剤が，抗結核剤を含めても極めて限られている事である．その上，第一線の抗 MAC 剤であるクラリスロマイシン（CAM）やアジスロマイシンに対する耐性菌の出現が報告されており（Griffith *et al.*, 2006），近い将来 MAC 症治療がより困難になることが予想される．MAC の薬剤耐性機構は一般に，プラスミド性の耐性遺伝子導入ではない．またいくつかの薬剤に対してはゲノムの変異による耐性獲得も報告されているが（Inagaki *et al.*, 2011），ほとんどの場合，作用点の異なる複数の抗生剤に対して抵抗性を示す「薬剤自然耐

E-mail: i_matsun@virus.kyoto-u.ac.jp
共同研究者：前田伸司（結核予防会結核研究所）

性」がMAC症の治療を困難にしている最大の原因であると考えられる（Horan & Cangelosi, 2009）．MACの薬剤自然耐性の機構については不明な点が多い．多くの研究者は，脂質成分に富んだマイコバクテリア特有の超疎水性細胞壁による薬剤流入の阻止と，一旦細胞内に入った薬剤を汲み出す排出ポンプの存在にその理由を求めているが，こうした機構は何もMACに限ったことではなく，結核菌を含むマイコバクテリア全体について言えることである．しかし実際には結核菌やそのモデル菌である *M. smegmatis* に比べ，MACの薬剤自然耐性は対象になる薬剤の種類や耐性の程度において非常に幅広く強い．一体何がMACに本質的に耐性能を付与しているのかについては全くわかっていない．

マンノースリン酸マイコケチド（mannose phosphomycoketide, MPM）は，MACを含む遅発育性マイコバクテリアの糖脂質成分であり，CD1依存性のT細胞抗原として発見された（Moody *et al.*, 2000）．CD1分子は樹状細胞や活性化したマクロファージなどの抗原提示細胞上に発現する1型膜貫通蛋白質であり，主要組織適合抗原複合体（Major Histocompatibility Complex, MHC）クラスIと極めてよく似た構造をしている（Young & Moody, 2006）．MHCとの一番の相違点は，MHCが微生物蛋白質由来のペプチド抗原を結合し，抗原-MHC複合体を特異的に認識するT細胞受容体をもつT細胞を活性化するのに対し，CD1は抗原として脂質（特に結核菌由来の脂質）を結合して特異的T細胞を活性化する事にある．ヒトではこれまでに，CD1a，CD1b，CD1c（グループI CD1）とCD1d（グループII CD1）が抗原提示分子として知られている．MPMはその内CD1cに結合し，それに特異的なT細胞（CD8-1T細胞）を活性化して，インターロイキン2（IL-2）やインターフェロンγを放出させる．このT細胞活性化を指標にMPMは同定されたのだが，その特異な構造から発見当初はイソプレノイドをアルキル骨格にもつ物質であると誤認された（Fig. 1A）．その後の研究から，このアルキル鎖はイソプレン単位の縮合では合成されず，特殊なポリケチド合成酵素（polyketide synthase, Pks）であるPks12によって生合成されることが明らかになった（Matsunaga *et al.*, 2004）．Pks12は，適当な長さのプライマーに炭素鎖3つの伸長単位と炭素鎖2つの伸長単位を交互に縮合することで，マイコケチドに特有な4炭素毎のメチル側鎖を作っていく（Fig. 1B）．生成物はカルボン酸であるはずで，著者はこれをmycoketidic acidと名付けた．Mycoketidic acidは還元され長鎖アルコール（mycoketide）となり，更にリン酸化，マンノース付加をうけて最終生成物のMPMが生合成されると考えられる．興味深いことに，*pks12* 遺伝子は *M. tuberculosis*, *M. bovis*, MACなどの細胞内寄生性遅発育抗酸菌に見出されるにも関わらず，*M. smegmatis* やその他の迅速発育抗酸菌には存在しない（Matsunaga & Sugita, 2012）．

一方，Philalayら（Philalay *et al.*, 2004）はMACの薬剤耐性に関わる遺伝子を，トランスポゾンを用いた変異導入によって検索したところ，耐性が減弱した変異体のうち複数のものがpks12遺伝子領域に挿入されている

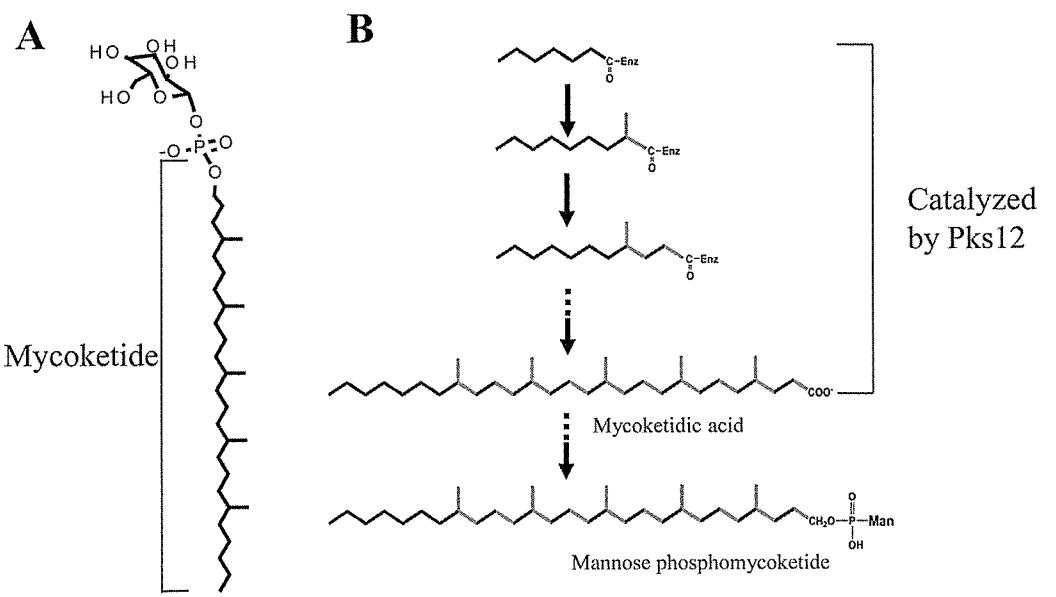


Fig. 1 Structure (A) and biosynthesis (B) of mannose phosphomycoketide.

ことに気がついた．この変異体は，CAM，シプロフロキサシン，ペニシリンに対して感受性を示した．Moodyと著者らはPhilalayらから供与を受けた*M. avium*変異体由来の総脂質について調べ，確かにMPM活性が失われていることが確認された（未発表）．著者らは既にMPM量がマイコバクテリア乾燥重量の1ppm以下であることを推定していたので，この極微量物質が薬剤自然耐性に関わるのは大きな驚きであった．しかしながらPhilalayらは，ただ1株の実験室株を用いて変異体を作成しただけであり，且つ変異体に*pks12*遺伝子を戻した補完株は作成していなかった．そこで本研究では，実際の*M. intracellulare*臨床分離株を用いて，薬剤自然耐性におけるPks12の関与を明らかにするとともに，*M. bovis* bacillus Calmette-Guárin（BCG）においてPks12酵素の有無によって物質論的に何が変化するのかを検討した．

実験方法

材料と菌株　実験に用いた試薬，材料は指定の無い限りナカライテスク（京都）より購入した．*M. intracellulare*各株（FK-8, FK-13, FK-24, FK-38, FK-42, FK-45, FK-64, FK-395, FK-436株）は，結核予防会結核研究所（東京）から，DNAプローブ法で種を決定したものを無作為に抽出し供与してもらった．*M. bovis* BCG Pasteur株も結核予防会結核研究所から供与頂いた．マイコバクテリア各株は1%小川斜面培地で維持培養した．実験によっては，100μg/mlのハイグロマイシンを含む，または含まない，10% OADC（Becton-Dickinson, BD）含Middlebrook 7H10培地（BD）で培養した．また菌体成分分析に供するため，増菌培地として0.05% Tween 80と10% ADC（BD）を含むMiddlebrook 7H9培地（BD）を用い，対数増殖期の菌を実験に使用した．

抗Pks12特異抗体の作成とPks12蛋白の検出　Pks12に対するポリクローナル抗体は，Pks12のN末近傍の配列（21-36番目のアミノ酸配列：ERLKRTNRALLERSSE）をキャリア蛋白に結合させ，それでウサギを免疫する事で抗血清を得た．このアミノ酸配列はMACとBCGで共通である．ペプチド合成とポリクローナル抗体の作成はオペロンバイオテクノロジー社（東京）に委託した．得られた抗血清は，免疫に用いたペプチドを結合させたCNBr Sepharose 4Bカラム（GE Healthcare UK Ltd., Bukinghamshire, UK）を用いてアフィニティー精製し以下の実験に供した．

Pks12蛋白はウエスタンブロット法により検出した．2×10^8のBCG又はMAC株を液体培養から回収し，1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.2mlで懸濁し，更にβ-メルカプトエタノールを含む2×Laemmli緩衝液（BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA）0.2mlを加えた．この細胞懸濁液をジルコニアシリカビーズ（0.1mm径）の入ったチューブに移し，ビーズ式細胞破砕機（Micro Smash MS-100，トミー精工，東京）を用い，4,000rpm，5分間処理した．遠心後，上清を回収し100℃，5分加熱処理を行った．上清中の蛋白濃度は，EZQ protein quantificationキット（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用い添付書に従って測定した．SDS-PAGEは3-8% Tris-acetateゲル（Invitrogen）を用い，各レーンには5μg相当の蛋白を添加，150V定電圧で泳動した．電気泳動の際には必ず2組同じ試料を泳動したもの作り，一方はウエスタンブロットに，他方はCoomassie brilliant blue（CBB）染色に供した．ゲルからPVDF膜への転写はiBlot Gel Transfer System（Invitrogen）を用いて行い，検出はWesternBreeze Chemiluminescent Detectionキット（Invitrogen）を用いて添付書に従い行った．1次抗体の抗Pks12特異抗体は，4.5μg/mlで用いた．Pks12蛋白の発光量は，ImageQuant LAS 4000mini（GE Healthcare）で定量した．

薬剤感受性試験　薬剤感受性試験はBrothMIC NTM（極東化学，東京）を用いて添付書に従い行った．感受性試験に供する菌は，予めMycoBroth（極東化学）中で前培養を行い，OD_{600}が0.26になった菌を感受性試験に供した．BCGに関しては，BrothMIC NTMと同時にBrothMIC MTBも用いて最少発育阻止濃度（MIC）を測定した．

菌体総脂質の抽出とT細胞アッセイ　菌体からの総脂質の抽出は，既報（Matsunaga *et al.*, 2004）に従い湿菌体の20倍容量以上のクロロホルム：メタノール混合溶媒を用いて行った．T細胞アッセイは，MPM特異的であるヒトCD8-1 T細胞のT細胞受容体α鎖及びβ鎖遺伝子を，J.RT3細胞に再構築した細胞をレスポンダー細胞として用い，抗原提示細胞としてはヒトCD1c分子を発現した，或いは発現させていないC1R Bリンパ芽球細胞株を用いた．それぞれの細胞を96穴プレート1ウェルあたり1×10^5個及び5×10^4個を，低濃度のphorbol myristate acetate存在下に加え，そこに総脂質を0.1mg/mlの濃度で添加し，24時間培養後の上清中のIL-2量をEnzyme-linked immune-sorbent assayキット（BD）を用いて測定した．実験ごとの測定誤差を標準化する為，いつも同じBCG総脂質を0-0.1mg/mlの濃度範囲で段階希釈した標品の活性を測定し，MAC脂質中

のMPM量をarbitrary unit（AU）で表した．

BCGにおける*pks12*遺伝子破壊株及び補完株の作成　BCG Pasteur株における*pks12*遺伝子の破壊は，既報（Matsunaga *et al.*, 2004）の変法で行った．まずBGGゲノムを鋳型として*pks12*遺伝子の5'端を含む部分（991 bp）を，プライマーPKS_UpF, 5'-GCCTTAAGCGACCATCAATGATACCGGG-3'とPKS_UpR, 5'-GCTCTAGAGCGTACGACTTATGGCGCAC-3'を用い増幅した．またそれより下流の部分（976 bp）もプライマーPKS 12_DnF, 5'-GCAAGCTTCCCGGTGTCACCGAATTC TC-3'とPKS12_DnR, 5'-GCACTAGTTATCGGCGATCACCTTGGCC-3'を用いて増幅した．これらの増幅フラグメントをファージミドphAE87中のPH101ゲノムDNAに挿入し，大腸菌で組換えファージミドを作成した．このファージミドを*M. smegmatis* mc²155株にエレクトロポレーションで導入し，30℃で培養し組換えファージを得た．次にこの組換えファージを*M. bovis* BCG Pasteur株（WT）に感染させ，ハイグロマイシン耐性株を得るとともに，*pks12*遺伝子の所定の部位が破壊されている事をPCRで確かめた．この株から*HygR*遺伝子を除去するため，プラスミドpYUB870を導入し，スクロースを含むMiddlebrook 7H10で培養する事で*HygR*遺伝子を除いた株を得た．更にこの*pks12*破壊株（Δ*pks12*）に，BCG WT株のゲノムDNA（*pks12*遺伝子とそのプロモーター部分を含む，bp 2261823 - 2299044）をコスミドpYUB412に挿入し補完株を作成した（Comp）．確認のため，Δ*pks12*株のPks12蛋白発現，MPM産生，mycoketidic acid産生を検討したが，すべて陰性であり，且つComp株ではそれらすべてがWT同等レベルまで回復していた．

Mycoketidic acidの検出　8×10^8のBCGを1 mlの25% KOHメタノール溶液に懸濁し，85℃，3時間処理後，1 mlのクロロホルムと0.75 mlの6 M塩酸を加え，二層に分配した．下層を採取し，乾固後少量の2% $KHCO_3$メタノール溶液で処理した後再び乾固した．この残渣からジエチルエーテルに溶解する画分を採取し，既報（Prados *et al.*, 1997）に従って脂肪酸を4-N, N-dimethylaminosulfonyl-7-N-(2-aminoethyl)amino-2,1,3-benzoadiazole（DBD-ED）で室温にて一晩蛍光標識した．この標識物を，島津RF-10蛍光検出器を装着した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）システム（島津，京都）で分離，分析した．使用したカラムは，Wakosil 5C4（ϕ2.0 mm×150 mm，和光純薬，大阪）．カラム温度は40℃．溶媒は水とメタノールを用い，最初の5分間，90%メタノールで維持，次の15分間でメタノール100%まで上げた．10分間，100%メタノールで洗浄した後，90%メタノールに戻した．流速は0.3 ml/分．質量分析は蛍光検出器の代わりに，島津LC-IT-TOF質量分析計を装着し測定を行った．

***pks12*遺伝子5'端領域の解析とmRNA発現量の測定**　FK-395株及びFK-436株からゲノムDNAをIsoplant IIキット（和光純薬，大阪）を用いて抽出した．得られたDNAを鋳型に用い，*pks12*遺伝子5'端の構造遺伝子部分とプロモーター領域を含む約2.3 kbpをforward primer, 5'-AGGGCTACTGCTTCCAGATCGACC-3'とreverse primer, 5'-GGATCCCCAGCACCGGATG-3'を用いてPCRで増幅し，ダイレクトシーケンシングを行った．

mRNAの発現量解析では4×10^8個の細胞を回収後，RNAprotect reagent（Qiagen）処理し，RNeasyキット（Qiagen）を用いてtotal RNAを得た．mRNA量は，一定量のtotal RNAを鋳型にRT-PCRキット（Qiagen）を用いて半定量的に推定した．半定量RT-PCRでのprimerは，*pks12* mRNAではforward primer，5'-GTGATGGTGGACCAACTCCAG-3'とreverse primer，5'-CATCCGGTGCTGGGGATCC-3'で385 bpを増幅し，対照に用いた16S rRNAではforward primer，5'-CGACGAAGGTCCGGGTTTTCTCGGATTGAC-3'とreverse primer，5'-GCCATGCACCACCTGCACACA GGCC-3'を用て606 bpを増幅した．またそれぞれのPCR反応条件はExTaq DNA polymerase（タカラ，東京）を用い，*pks12* mRNAでは94℃，20秒，52℃，20秒，70℃，45秒を35サイクル，16S rRNAでは94℃，30秒，68℃，45秒を12サイクルとした．

臭化エチジウム（EtBr）の取込み試験　MAC又はBCGをMiddlebrook 7H9培地で対数増殖期まで培養し，2×10^8の菌を回収，0.2% Tween 80を含むphosphate-buffered saline（PBS-T）で洗浄後，3 mlのPBS-Tに懸濁した．これを撹拌子入りのキュベットに移し，細胞を撹拌しながら蛍光分光度計（fluorospectrometer FP-3000, Jasco，東京）を用いて，25℃で5分間インキュベートした後，0.1 mM EtBr水溶液を30 μl加え，恒温でインキュベートしながら10秒おきに蛍光強度を測定した．励起波長及び吸収波長はそれぞれ，520 nmと600 nmとした．菌の排出ポンプ機能の阻害剤であるverapamilを用いる際には，EtBrを加える5分前に阻害剤を加えた．

MACにおける脂質分析　MACは，菌体脂質重量の20%にも及ぶ糖ペプチド脂質（Glycopeptidolipid, GPL）を有している（Chatterjee & Khoo, 2001）．MACの脂質分析を行う際には，まず既報（Matsunaga *et al.*, 2008）の

如く，アセトンに可溶なGPLを含む画分とアセトン不溶の画分に分けた．アセトン可溶画分は一定量（4×10^8菌体より回収された脂質量）をシリカゲルTLCプレートに添加し，クロロホルム：エタノール（92:8, v/v）で2回展開する事で，GPLの分析を行った．アセトン不溶画分は後述するLipid Xの二次元TLCによる分析に用いた．

BCG菌体の糖分析　BCG菌体全体の糖分析は既報（Naka *et al.*, 2011）に従い，菌体を2Mトリフルオロ酢酸（120℃，2時間）で処理し，切り出された単糖を10 mg/mlの$NaBH_4$で還元後，ピリジンと無水酢酸（100℃，1時間）でアルジトールアセテート誘導体して，ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）により解析した．

その他の菌体脂質分析とlipid Xの分離，精製　上述の如く，BCG質菌体（1×10^9）から総脂質を抽出した．クロロホルム：メタノール溶媒で抽出された総脂質は，それぞれリン脂質など極性脂質群，トレハロースジミコール酸など糖脂質群，中性脂肪など低極性脂質群を展開する溶媒を用いてシリカゲルプレート（Analtech Inc., Newark, DE, USA）を用いた薄層クロマトグラフィー（TLC）を行い，WT，Δ*pks12*，Comp株間で脂質プロファイルを比較した．TLC上の脂質は50%硫酸水溶液を噴霧した後，180℃で加熱する事で可視化した．

極性脂質群の二次元TLCはhigh performance TLC（HPTLC，10×10 cm, Whatmann International Ltd., Maidstone, UK）プレートを用い，一次元目をクロロホルム：メタノール（40:10, v/v）で展開し，よく乾燥させてから二次元目をクロロホルム：メタノール：水（30:15:3, v/v/v）で展開した．後述するように，二次元TLCでΔ*pks12*株に特異的に欠失している脂質（lipid X）を見出したので，その精製を次のように行った．

総脂質を窒素気流下に乾固させ，それを少量のクロロホルムに懸濁した．これを，予めクロロホルムで平衡化したシリカゲルカラム（Grace Davlson Discovery Science, Deerfield, IL, USA）の5%ベッド容量以下になるようにカラムに添加した．カラムを1ベッド容量のクロロホルム，次いで1容量のアセトン，更に1容量のクロロホルム：メタノール（2:1, v/v）で順次洗浄し，最後にクロロホルム：メタノール：水（60:30:6, v/v/v）でlipid Xを溶出した．溶出液を乾固し，適当量のクロロホルム：メタノール（4:1, v/v）に溶解しシリカゲルプレートに塗布した後，クロロホルム：メタノール：水（60:30:6, v/v/v）で展開，lipid Xをシリカゲルからクロロホルム：メタノール（4:1, v/v）で抽出した．この抽出液を再度シリカゲルプレートに塗布，クロロホルム：メタノール（40:10, v/v）で展開，lipid X部分を上と同じように回収した．窒素気流下に溶媒を除き，ヘキサン：イソプロパノール（7:3, v/v）に溶解し，予め同溶媒で平衡化したInertSep CN（ジーエルサイエンス，東京）に通すことで最終精製標品を得た．

結　果

臨床分離株における Pks12 発現量または酵素活性と薬剤耐性との相関　臨床分離株の薬剤耐性とPks12の関係を調べるために，著者はまず9株の*M. intracellulare*におけるPks12蛋白の発現量を定量した（Table 1）．発現量は株によって様々で，FK-395株で最も発現量が低く，それを1とした時の相対量は多いもので FK-45株とFK-13株で約26であった．次に各株の薬剤感受性を，ストレプトマイシン（SM），カナマイシン（KM），リファブチン（RBT），レボフロキサシン（LVFX），クラリスロマイシン（CAM），アミカシン（AMK）について測定し，先のPks12蛋白発現量と比較した．Table 1の(c)に示すように，ピアソンのパラメトリック法で算出した相関係数は，RBTを除いて他すべての薬剤に対し，P値が5%棄却域未満の有意な正の相関を示した．また，RBTについても弱い正の相関傾向があると推測された．

次に著者はPks12酵素活性が株間で異なるかも知れないと考え，蛋白量ではなく，Pks12経路の最終生成物であるMPMを，特異的T細胞を用いた高感度アッセイにより定量する事で，Pks12酵素活性を評価した．その結果，テストしたすべての薬剤について著しい相関係数の上昇を認めた（Table 1 (d)）．特にSMとLVFXについてはP値が0.1%棄却域未満の非常に強い正の相関を示した．またPks12蛋白発現量と比較した時には，弱い相関傾向しか認めなかったRBTについても$P<0.01$の強い正の相関を認めた．

***pks12* 遺伝子5' 端領域**　FK-395株は最もPks12の発現が弱く，テストしたすべての薬剤に対して最も低いMICを示した株である．FK-395 *pks12*遺伝子の5'末端領域のヌクレオチド配列を決定したところ，遺伝子の比較に汎用される104株と比べて開始コドンの直前に11 bpの欠失がある事がわかった（Fig. 2A）．一方，高度耐性株でPks12活性が最も高かったFK-436株では，基準株に比し1 bp挿入が認められるのみであった．MACの*pks12*遺伝子においてシャイン・ダルガノ配列は明瞭でないが，開始コドンの直前に欠失がFK-395株におけるPks12蛋白の低発現（無発現ではないところに注意せよ）に寄与している可能性が示唆された．次に，FK-

395及びFK-436株における*pks12* mRNA量を半定量RT-PCRで確認したところ，16S rRNA発現量が同じになる鋳型量を用いた時，*pks12*遺伝子の発現量も両株でほぼ同等であった（Fig. 2B）この時，逆転写をしない鋳型を陰性対照として同様のPCRを行ったが，いずれも増幅物を認めなかった．よって先に見られた*pks12*及びrRNA発現はゲノムのコンタミネーションではないことが確認された．これらの事から，FK-395株におけるPks12蛋白発現の低下は，転写レベルよりは翻訳レベルで起こっている可能性が示唆された．しかし他の可能性として，FK-395株のPks12蛋白の安定性が悪い事なども考えられたが，本研究ではそれを更に追及するべきものではないと判断し，以下の実験に移った．

MAC株におけるEtBrの蓄積とverapamilの効果

EtBrは抗生剤の代替として，菌への流入，菌からの排出及び貯留量を簡便に，且つ高感度に測定するのに良いツールである（Rodrigues *et al.*, 2011）．本研究においては，薬剤感受性が高かったFK-395株と薬剤感受性が低かったFK-436株及びFK-45株を用いて，大過剰のEtBr存在下に流入と排出が平衡に達した時のEtBr蓄積量を比較した．Fig. 3Aに示すように，定常期におけるEtBr蓄積量はFK-395株で最も多く，次いでFK-436，FK-45株であった．FK-45株はFK-395株に比して，約半分程度しかEtBrを蓄積しなかったが，ここに排出ポンプの阻害剤として知られているverapamilを加えると，濃度依存的に蓄積量が増し，0.4 mg/mlではFK-395株とほぼ同等の蓄積を示した（Fig. 3B）．それと呼応して，SM, KM, RBT, LVRX, CAM, AMKのいずれについても，verapamilの添加により薬剤感受性の上昇を認めた（Table 2）．ま

Table 1　Correlations between antibiotics susceptibility and Pks12 in the MAC clinical isolates

Strains	MICs of antibiotics (μg/ml)						Pks12	
	SM	KM	RBT	LVFX	CAM	AMK	Protein (Fold)[a]	Activity (AU)[b]
FK-8	2	2	0.06	2	0.25	1	17.6	59.8
FK-13	1	1	0.03	1	0.125	1	26.7	28.3
FK-24	1	2	0.06	2	0.125	2	20.8	34.6
FK-38	0.5	1	0.03	0.5	0.125	1	10.3	9.1
FK-42	1	2	0.06	2	0.125	1	6.7	41.9
FK-45	8	16	0.03	4	0.5	8	26.4	59.9
FK-64	1	1	0.06	1	0.125	1	14.5	19.8
FK-395	0.25	0.25	0.008	0.25	0.03	0.5	1.0	5.6
FK-436	8	4	0.25	4	0.25	4	22.9	240.2
r = (c)	0.737*	0.683*	0.460	0.693*	0.751*	0.714*		
r = (d)	0.901***	0.756*	0.850**	0.932***	0.762*	0.706*		

a, Relative Pks12 protein expression as compared to FK-395.

b, Pks12 activities estimated by MPM production.　See Materials and Methods.

c, Correlation coefficients as compared the relative expression of the Pks12 proteins to the $\log_{10}$(MIC) of each antibiotics.

d, Correlation coefficients as compared the $\log_{10}$(Pks12 activity) to the $\log_{10}$(MIC) of each antibiotics.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

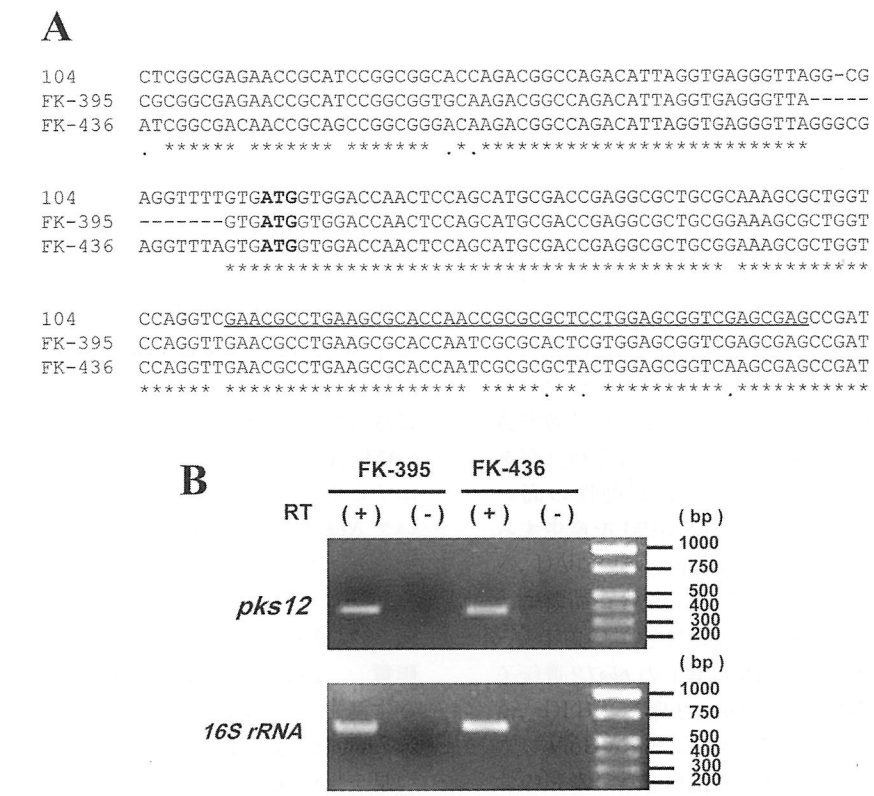


Fig. 2 Nucleotide sequences of the 5'-flankling region of *pks12* genes and *pks12* gene expression. A, The nucleotide sequences of MAC 104 type strain, MAC FK-395 strain, and MAC FK-436 strain. The start ATG codons are bolded. The identical or similar residues are shown by asterisks or dots, respectively. The sequences indicated by underline are corresponded with the region encoding the amino acid residues that was used for immunization, which are well conserved among the strains. B, mRNAs of *pks12* or *16S rRNA* genes were semi-quantitively measured by RT-PCR. Note that no amplification was detected when the templates without reverse transcribed reactions were used, indicating that all the detected signals are derived from mRNA, but not genome DNA.

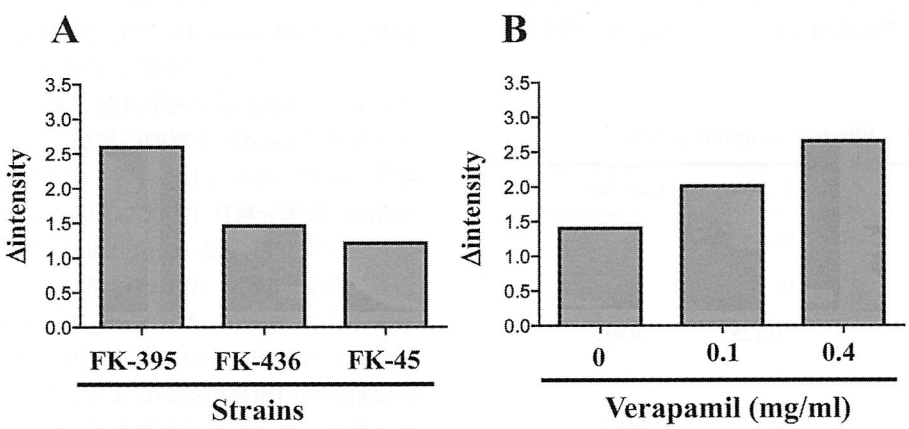


Fig. 3 Accumulation of EtBr in the MAC cells. A, The fluorescent intensities were measured at the equilibrium points for accumulation of EtBr in the FK-395, FK-436, and FK-45 strains. B, Effects of verapamil on the accumulation of EtBr in the FK-45 strain. The fluorescent intensities were measured at the equilibrium points. The measurements were carried out at least twice. The representative data were shown.

たこの濃度のverapamilでは単独で増殖の阻害は起こらなかった．

BCG Pks12変異体の作成とEtBrの蓄積　MAC株で見られた薬剤感受性株（FK-395）でのEtBr蓄積がPks12低下の原因か，Pks12が低下する事に起因する結果かを調べるために，FK-395株に*pks12*遺伝子をそのプロモーターと共に導入し，Pks12酵素を高発現する事を試みたが，原因不明の遺伝子欠失により成功しなかった．そこで著者らはMACの近縁菌であるBCGを用いて，Pks12蛋白の有無による表現型への影響を検討することを企図した．BCGはMACに比して非常に効率良く遺伝子変異体が作成できるという技術的な利点があるのみならず，MACの酵素と非常に相動性の高いPks12をもつとともに，MACと同様，MPMを産生することが知られている（Matsunaga & Sugita, 2012）．これらの事から著者は，両近縁菌の間で，Pks12が両菌において，少なくとも一部の性質を共通に付与するのであろうと考えた．そこで著者らは，BCG WTの*pks12*遺伝子を相同組換えにより破壊したΔ*pks12*株を作成すると共に，それを*pks12*遺伝子を含むゲノム部分で補完したComp株も作成した．抗Pks12特異抗体を用いたウエスタンブロティングで，Δ*pks12*株は完全にPks12を失っており，Comp株ではWT株と同等の蛋白発現を確認した（データ未掲載）．またWT株，Comp株ではCD1cに依存したMPM産生がある事をCD8-1 T細胞アッセイで確認したが，Δ*pks12*株ではそれが完全に失われていた（Fig. 4A）．更に，菌由来の脂肪酸を蛍光標識誘導体化してHPLCで調べたところ，Δ*pks12*株で特異的に完全欠失しているピークを検出し（Fig. 4B矢印），質量分析計を用いて測定すると，Pks12の直接の生成物であるmycoketidic acidである事がわかった（Fig. 4C）．以上の3つの検討から，Δ*pks12*株はPks12機能を完全に欠失しており，Comp株はそれらがすべて補完されている事が確認された．

そこで，これらの株を用いてEtBrの貯留実験を行った．Fig. 5に示すように，Δ*pks12*株でのみFK-395株に匹敵するEtBrの菌体内貯留を認めたが，Comp株ではWT株と同様それより低く，FK-45株とほぼ同等の貯留にとどまった．これらの事から，MAC株で見られたEtBrの貯留はPks12機能の低下が原因であることが示唆された．また，MACの場合はPks12機能が薬剤自然耐性に寄与している可能性が示唆された．しかし，非常に意外な事にBCGにおいては，SM, KM, RBT, LVFX, CAM, AMKやエタンブトール（EB），リファンピシン，エチオナミド，イソニアジド，シプロフロキサシンについてΔ*pks12*株がWTやComp株に比して感受性を示すことはなかった（データ未掲載）．

Table 2　Effects of verapamil on MICs

Antibiotics	FL-45/(-)	FK-45/VP[a]
SM	16	4
KM	16	4
RBT	0.125	0.015
LVFX	4	2
CAM	0.5	0.03
AMK	16	4

a, The final concentration of verapamil is 0.4 mg/ml.

MIC was expressed as μg/ml.

MAC臨床分離株における血清型非特異的糖ペプチド脂質　Khooら（Khoo *et al.*, 1999）は，MACに特徴的且つ最も主要な脂質成分であるGPLが薬剤感耐性菌で増加していると報告している．GPLは結核菌群には存在せず，MACや一部の非結核性マイコバクテリアに存在し，MACではその含有量が脂質重量の約20%にも及ぶ（Chatterjee & Khoo, 2001）．一般的にGPLは，フェニルアラニン（Phe）- アロスレオニン（*allo*-Thr）- アラニン（Ala）- アラニノール（Alaninol）の4残基からなるペプチド骨格に，脂肪酸といくつかの糖が付加した構造をしている（Fig. 6A）．GPLはMACの血清型を決める糖鎖を有した血清型特異的GPL（ssGPL）と，そうした糖鎖を欠いた血清型非特異的GPL（nsGPL）に分類され，GPL全体量の約4割がnsGPLである（Matsunaga *et al.*, 2008）．nsGPLはssGPLの生合成中間体であり，且つすべてのssGPLをもつMACに存在する．Khooらはこれらのうち，MAC症治療後EBに耐性になったMAC臨床分離株でnsGPLが劇的に増加しており，それが薬剤耐性の原因であるとしている．そこで著者は，今回用いたMAC臨床分離株すべてについて，nsGPLの分離パターンを分析した．*M. intracellulare*のレファレンス株として，血清型16型（ATCC 13950）を用いた．Fig. 6Bに示すように，nsGPLはラムノース（Rha）と6 - デオキシタロース（6-dTal）上のアセチル基やメチル基の個数，或いは脂肪酸の鎖長の違いにより，多数のバンドがクラスターをなしたように観察される．今回用いた臨床分離株のnsGPLクラスターのパターンは非常に多様で，その有様は薬剤耐性の度合いとは無関係であると考えられた．例えば，最も薬剤感受性の高かったFK-395株はnsGPLクラスターがはっきりと見られた．またレファ

レンス株に比して低極性のnsGPLが見られたが，高度耐性株のFK-45株でも量は少ないものの，低極性nsGPLを認めることができるし，比較的感受性の高いFK-38株ではそのようなものは認められない．

BCGの糖組成と糖脂質　それでは薬剤耐性を左右する壁成分は何であろうか．著者はマイコケチドとポリプレノールとの構造上の類似性に着目し，マイコケチドも糖のキャリアとして働くのではないかと考えた．そこでまず菌全体の糖組成を，菌体をアルカリ加水分解し，遊離してきた主に6または5単糖をアルジトールアセテート誘導体としてGC-MSで分析した（Table 3）．もしマイコケチドが糖のキャリアとして働くなら，BCG Δ*pks12*株で減少しComp株で回復するような単糖が見つかるはずである．ところが，調べたリボース，アラビノース，キシロース，マンノース，ガラクトース，グルコース，ミオ-イノシトール及びその他のペントースでΔ*pks12*株特異的に減少しているものはなかった．またBCGで主要なリポ多糖体である，lipoarabinomannan（LAM），lipomannan（LM）及びその前駆体であるphosphatidylinositol mannosides（PIMs）についてSDS-PAGEによって分離後，糖染色を施す事で検出したが，LAM，LM，PIMsのいずれもWT株，Δ*pks12*株，Comp株間で有意な差を見いだせなかった（データ未掲載）．更に菌体から蛋白質を抽出し，糖蛋白質の検出も行ったが，Δ*pks12*株で特異的に減少しているような蛋白を検出しえなかった（データ未掲載）．

BCGの脂質解析　そこで，有機溶媒で抽出可能な脂質画分の解析を行った．低極性脂質，糖脂質，極性脂質をそれぞれ分離できる溶媒系を用いてTLCで分析を行ったところ，Δ*pks12*株で特異的に欠失している脂質を

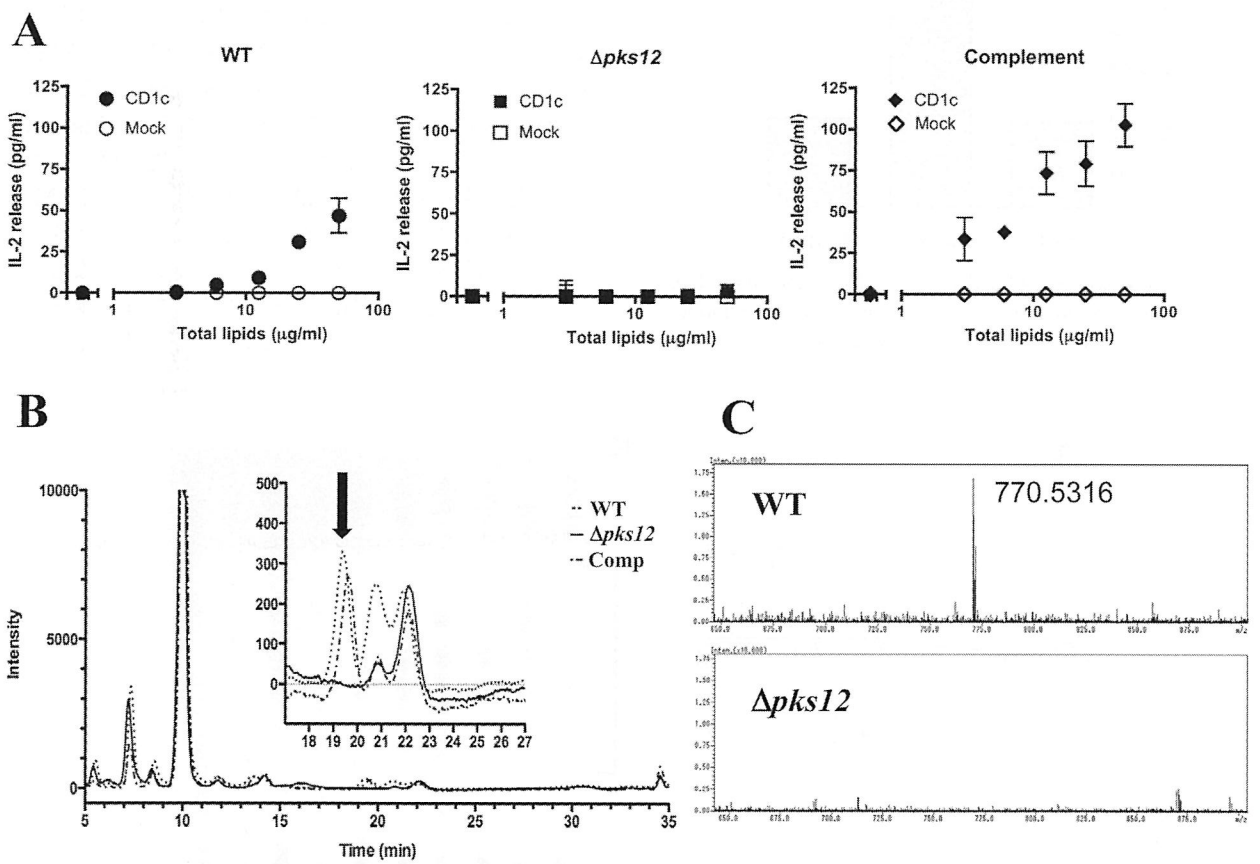


Fig. 4　Production of MPM and mycoketidic acid by the BCG WT, Δ*pks12*, and Comp strains. A, Production of MPM were measured by IL-2 release from the MPM-specific CD8-1 T cells in the presence of various concentration of extractable lipids from each BCG strain. Note that the responses of the CD8-1 T cells were seen only in the presence of CD1c-expressing antigen presentation cells. The mock cells do not express CD1c molecules. B, Mycoketidic acid was measured by HPLC with a fluorescent detector. An arrow shows the peaks of mycoketidic acid. Note that the Δ*pks12* mutant lacks the peak. C, Mass spectrometric analyses of the peak detected in the panel (B). The ion of *m/z* 770 is corresponded with DBD-ED-modified mycoketidic acid, that is absent in the Δ*pks12* mutant.

極性脂質群の中に唯一見出し（Fig. 7），この脂質を「Lipid X」と名付けた．Lipid X は MPM が菌体乾燥重量の 1 ppm 以下であるのに対し，その約 500～1000 倍程度の含有量であった．

Lipid X は，汎用されるクロロホルム：メタノール：水系溶媒でシリカゲル TLC 上，カルジオリピンに近接して展開された．BCG Δ*pks12* 株で完全欠失しており，MAC においても FK-436 株ではっきりと検出されるのに対し，FK-395 株ではほとんど検出されない．これらの事は Pks12 の存在と非常によく相関しているように見える．そこで Lipid X を精製し，構造解析を試みた．しかしながら，Lipid X は TLC 上極性脂質群に近く展開されるにも関わらず，イオン化の効率が異常に悪く，質量分析は困難を極めている．^{1}H-NMR の分析も試みたが，アルキル鎖と複数の二重結合の存在を示唆するパターンで，詳しい情報は得られていない．物性も異常で，比較的高い濃度ではアルコール系溶媒やエーテル，クロロホルム，ヘキサンなどの各種溶媒に不溶であったのに対し，ごく限られた混合溶媒，即ちクロロホルム：メタノール（4:1, v/v）またはヘキサン：イソプロパノール（7:3, v/v）にのみ高濃度で可溶であった．

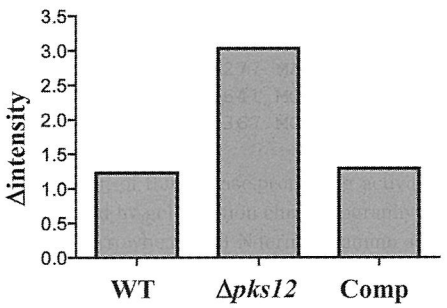


Fig. 5 Accumulation of EtBr in the BCG strains. The fluorescent intensities were measured at the equilibrium points. The representative data were shown.

考　察

我が国において非結核性抗酸菌症，特に MAC 症は近年増加傾向を示している（露口・鈴木, 2007）．この原因は未だ不明であるが，検査技術の発達もそれに寄与していると推察される．但し，MAC 症は結核のように全数把握されているわけでは無く，限られた定点での把握であることを考え合わせれば，統計よりもっと多くの患者が居ることが予想される．MAC の毒力は，結核には遥かに及ばないが，エイズをはじめ免疫不全状態にある患者，或いは慢性気管支炎，喘息，嚢胞性線維腫症などの基礎疾患のある人々にとっては脅威である（Glassroth, 2008）．それに加え，近年はこういった基礎疾患をもたない，一見健常な人々にも MAC 症が増加している．MAC は結核菌とは異なり，ヒト-ヒト間感染はないとされているが，飲料水，河川などの水系，土壌，塵埃など，あらゆる自然環境中に常在し，そこからヒトは暴露を受けていると考えられ，それ故に公衆衛生学的方法論で，こ

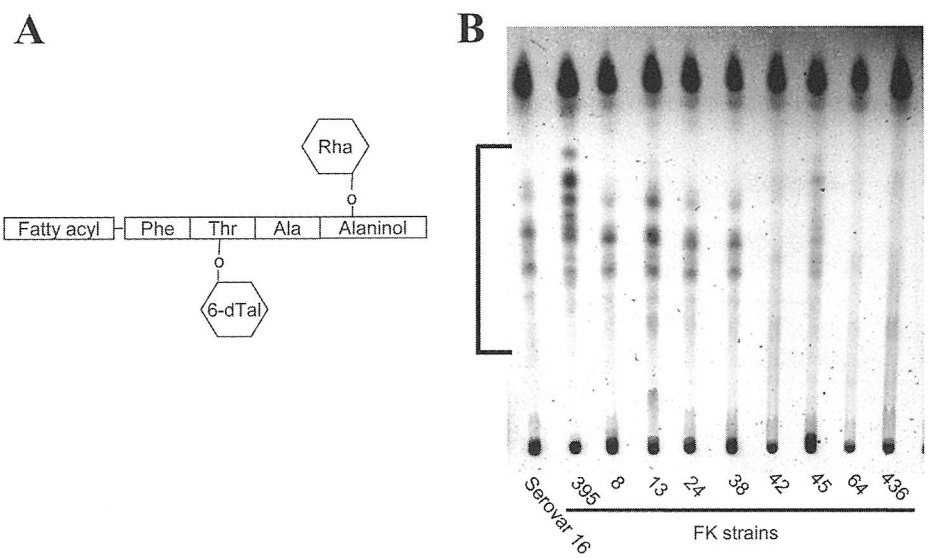


Fig. 6 Schematic representation of serotype-nonspecific glycopeptidolipid of MAC (A) and the expression in the MAC strains (B). Since the numbers of methyl groups or acetyl groups on the rhamnose (Rha) and 6-deoxytalose (6-dTal) vary, we can see several molecular species differentially migrated on a silica gel TLC plate. A bracket shows GPL clusters.

れらすべてを遮断する事は現実的に非常に困難だと考えられる．しかしながら，MAC 症は一旦発症すると結核と同様の病変をヒトに起こしうる．そして，最大の問題はヒト体内で増殖する MAC に対して臨床容量で効く抗生剤が極めて限られている，言い換えれば MAC はほとんどの抗生剤に対して多剤耐性を示すために治療が困難だという点にある．その上最近，第一線の抗 MAC 剤である CAM 等に耐性をもつ MAC の出現が報告されるようになってきた（Griffith *et al.*, 2006; Inagaki *et al.*, 2011）．

本研究で，著者は *M. intracellulare* 9 株について Pks12 蛋白発現と MIC，また MPM 量と MIC の間に正の相関を見出した（Table 1）．MPM 合成系で Pks12 による酵素反応は事実上律速と考えられるので，MPM 量との相関は Pks12 酵素活性との相関であると考えられる．しかもこの相関は，その作用点が異なる薬剤のいずれについて

Table 3 Compositions of sugars in the whole cells of the BCG strains

Sugar	Content [%]		
	WT	*Δpks12*	Comp
Ribose	4.3	6.0	4.9
Arabinose	24.2	28.1	28.9
Xylose	1.6	0.4	0.4
Pentose[a]	1.5	2.0	1.4
Mannose	17.6	19.6	21.0
Galactose	10.4	14.1	14.3
Glucose	36.0	24.6	23.5
myo-Inositol	4.4	5.2	5.7

a, Unidentified pentoses.

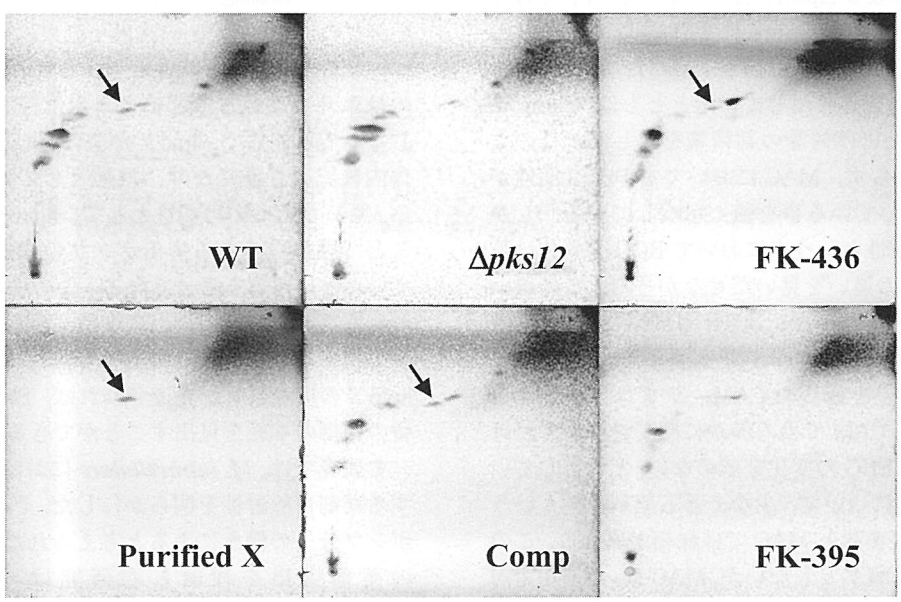


Fig. 7 Separation and purification of Lipid X by TLC. Arrows show "Lipid X" that is completely lacked in the *Δpks12* mutant. Only faint spot of Lipid X is seen in the FK-395 strain, whereas the spot is more clear in the FK-436 strain that highly expresses Pks12.

も有意な正の相関を示した．即ち，SM，KM と AMK は 30S リボゾームサブユニットを，CAM は 50S リボゾームサブユニットを標的とする．また，RBT は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを，LVFX は DNA ジャイレースの機能を阻害する．FK-45 や FK-436株のように Pks12 活性の高い株は，これらの薬剤のいずれについても耐性を示した事から，これらの耐性がゲノム特定部位の変異等によるとは考え難く，Pks12 活性は所謂 MAC の薬剤自然耐性と強く正に相関することが明らかになった．一方，本研究で用いたすべての薬剤に対し高度に感受性を示した FK-395 株は，Pks12 蛋白発現が著しく減少していた．この事も Pks12 の薬剤自然耐性への関わりを示唆している．

この薬剤自然耐性では，少なくともその機構の一部は菌体内での薬剤貯留能の違いによるものと思われる．排出ポンプの阻害剤である verapamil によって，FK-45 株の EtBr 貯留性が増し，それと同時に本研究で用いたすべての抗生剤に対して感受性が増した事は，それを示唆している（Fig.4, Table 2）．しかしながら，verapamil によって FK-45 株の EtBr 貯留が FK-395 株のそれとほぼ同等になった時でさえ，FK-45 株の各抗生剤に対する MIC は FK-395 株に比し未だ高値を示していたので，薬剤排出ポンプのみが FK-395 株の高度薬剤感受性に寄与しているわけではないと推測される．

一方，Pks12 は結核菌群をはじめとする遅発育性抗酸菌にのみが有している（Matsunaga & Sugita, 2012）．そこで著者らは，ウシ型結核菌弱毒株である *M. bovis* BCG の Δ*pks12* 株及び Δ*pks12* 株を *pks12* 遺伝子を含むゲノム領域で補完した Comp 株を作成し，それらの EtBr 蓄積能を検討した．予想通り，Δ*pks12* 株では EtBr の蓄積が WT 株に比べて増していたとともに，Comp 株においては WT とほぼ同等の蓄積量を示した．このことは BCG のみならず，MAC においても Pks12 活性が EtBr 蓄積を左右している事を強く示唆している．しかしながら，薬剤耐性という点において BCG 変異体は野生型と何ら MIC の違いを見いだせなかった．この違いは，Philalay ら（Philalay *et al.*, 2004）も観察している．彼らは人型結核菌の Δ*pks12* 株が野生型と比べて，MAC において MIC の差を認めた CAM，シプロフロキサシン，ペニシリンが，CAM でのみ僅かに感受性が増すだけで，残りのものは MIC の変化を認めない，と報告している．Pks12 の役割について，少なくとも薬剤耐性という点においては結核菌群と MAC では様相が異なる．この理由は現時点では判然としないが，MAC は，薬剤が菌内に貯留した時にそれに対する感受性を増強させるような，結核菌群が欠いている因子をもっているのかも知れない．

次に著者は，Pks12 を失うことによって物質論的に何が変化するのか，について検討を試みた．MAC に特徴的な細胞壁脂質成分として，GPL がある．Khoo ら（Khoo *et al.*, 1999）は，MAC 菌の薬剤耐性が増すと nsGPL が増加するとしているが，今回の検討では薬剤感受性と nsGPL の量及びパターンに相関は認められず，少なくとも *M. intracellulare* の薬剤自然耐性について，nsGPL の関与は少ないことが示めされた．Khoo らの報告と相反する理由は明確ではないが，彼らは CAM と EB に対する耐性をみているのみである事から，彼らが観察した現象は MAC の自然耐性とは異なるのかも知れない．

Pks12 活性の減弱或いは欠失によって，mycoketidic acid 及びそれを前駆体とする MPM は減少または消失する．けれども，それらは菌体のもつ脂質のうち僅か 1 ppm 程度のもので，それ自体が細胞壁の薬剤透過性に影響するとは考え難い．では何が変化するのか．著者は蛋白質成分，多糖体成分，それと脂質成分を系統的に比較検討した．その結果，唯一脂質成分の Lipid X を見出した．菌体は MPM の約 500～1000 倍程度の Lipid X を有しており，Δ*pks12* 株で完全欠失する．TLC 上の挙動からは mycoketidic acid を含む脂肪酸自体であるとは考えられない．質量分析でイオン化の効率が極めて悪い事や完全溶解する溶媒が限られている事を考え合わせると，リン脂質や単純な糖脂質とも考えられない．両親媒性を有しつつ，極性の低いアルキル鎖をもつユニークな物質であると考えられる．いずれにせよ，lipid X は有機溶媒で抽出可能な遊離脂質であり，マイコバクテリアの細胞膜或いは細胞壁に分布するものと推測される．Lipid X がどのように EtBr の流出・流入に影響を与えるかについては，2 つの可能性が考えられる．ひとつは細胞壁の疎水性を高めることにより水溶性薬剤の流入を阻止している可能性で，lipid X が失われれば水溶性薬剤は菌体内に流入し易くなり，結果として薬剤貯留性が高まる．もうひとつの可能性として，lipid X が膜に存在することで膜蛋白である排出ポンプの機能を正常に保持しているという事も考えられる．この場合は，lipid X が失われることで薬剤の排出に支障が起こり，菌体内に薬剤が貯留することになるであろう．このような点からも，lipid X の構造解析が完遂されれば，Pks12 による薬剤貯留の制御の本態を見出すことができると期待される．

本研究では，*M. intracellulare* における，Pks12 に依存する薬剤自然耐性を明らかにした．その一部は薬剤排出ポンプ分子の働きによると考えられた．これまで MAC の薬剤排出を検討した研究は非常に限られる（Rodrigues *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009）．多くの研究は，結核菌やモデル菌として *M. smegmatis* を用いたものである（Li *et al.*, 2004; Farrow & Rubin, 2008;

Lechner *et al.*, 2008; Domenech *et al.*, 2009). しかし, 上に述べたようにBCGを含む結核菌群の自然耐性とPks12に依存するMACの薬剤自然耐性は異なるものである可能性がある. またモデル菌である *M. smegmatis* はPks12をもたない (Matsunaga & Sugita, 2012). そもそも何故, 結核菌群とMACの薬剤自然耐性を同等のものとして考えなければならないのか. 今後もっとMAC特有の薬剤排出機構を探す努力が必要となろう. それとは別に, MACの薬剤耐性機構がどうであれ, Pks12そのものが治療の標的となり得ることが本研究により示唆された. Pks12自身は整えられた生育環境中での菌の生存にとって必須ではないので, Pks12活性を制御するような化合物は抗生剤とは成り得ないが, その制御が既存の抗生剤に対する感受性を上昇させることが期待され, 今まで臨床容量では使用できなかったような抗生剤とのコンビネーション治療も可能になるだろう事が期待される.

要　約

Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) における薬剤自然耐性は, MAC症の治療を困難にしている. 本研究ではMACの薬剤自然耐性におけるポリケチド合成酵素Pks12の役割を調べた. 9株のMAC臨床分離株を用い, それらのPks12酵素と薬剤自然耐性の関係を調べたところ, Pks12活性が薬剤自然耐性と強い正の相関関係にあった. MAC株及びBCGのPks12欠失株におけるEtBrの蓄積試験から, このPks12依存性の薬剤自然耐性の一部は菌からの薬剤排出による事が示唆された. この時, MACに特徴的且つ主要な脂質成分である血清型非特異的糖ペプチド脂質は, MACの薬剤自然耐性と関係が薄い事が示めされた. 更にPks12の存在に依存する細胞壁成分として, 極性脂質を分離するような薄層クロマトグラフィーで展開される構造未知のLipid Xを見出した. これらのことから, MACの薬剤自然耐性はPks12活性によって制御されており, その一部は薬剤排出機構を通じて, またそれ以外に細胞壁成分を変化させることによって耐性が獲得されている可能性が示唆された.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

松永勇 (2011) 宿主にモニターされる抗酸菌脂質とその多様性. 京都大学微生物科学寄付研究部門主催シンポジウム「微生物科学の現状と展望」. (京都).

Matsunaga, I., Maeda, S., Nakata, N., Naka, T., Fujiwara, N. & Sugita, M. (2011) Biosynthesis of mycoketide and the related compounds in mycobacteria. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. (Sapporo).

松永勇, 前田伸司, 中田昇, 中崇, 藤原永年, 杉田昌彦 (2011). マイコバクテリアのポリケチド合成酵素Pks12によるポリメチル脂肪酸の産生. 第84回日本生化学会大会, (京都).

総説

Matsunaga, I. & Sugita, M. (2011). New insights into lipidic secondary metabolites in mycobacteria. Curr. Chem. Biol. **5**: 52-63.

Matsunaga, I. & Sugita, M. (2012). Mycoketide: a CD1c-presented antigen with important implications in mycobacterial infection. DOI, 10.1155/2012/981821.

原著論文

Matsunaga, I., Maeda, S., Nakata, N. & Fujiwara, N. (2012). The polyketide synthase-associated multi-drug tolerance in *Mycobacterium intracellulare* clinical isolates. Chemotherapy **58**: 341-348.

保存機関に寄託した菌株

Mycobacterium bovis BCG NMM01 = JCM17628 (ΔPks12株)

Mycobacterium bovis BCG NMM02 = JCM17629 (Comp株)

謝　辞

3年間にわたり本研究に対して助成を頂きました公益財団法人発酵研究所に, 心から感謝いたします. 終始技術的な側面で貴重なアドバイスを頂きました国立感染症研究所ハンセン病研究センターの中田昇博士と大阪市立大学医学部細菌学教室の藤原永年博士及び中崇さんに感謝いたします. また最後に本研究を見守って頂いた京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野の杉田昌彦教授に感謝します.

文　献

Chatterjee, D. & Khoo, K. H. (2001). The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. Cell. Mol. Life Sci. **58**: 2018-2042.

Domenech, P., Kobayashi, H., LeVier, K., Walker, G. C. & Barry, C. E., 3rd. (2009). BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. **191**: 477-485.

Farrow, M. F. & Rubin, E. J. (2008). Function of a mycobacterial

major facilitator superfamily pump requires a membrane-associated lipoprotein. J. Bacteriol. **190**: 1783-1791.

Field, S. K., Fisher, D. & Cowie, R. L. (2004). *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients without HIV infection. Chest **126**: 566-581.

Glassroth, J. (2008). Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. Chest **133**: 243-251.

Griffith, D. E., Brown-Elliott, B. A., Langsjoen, B., Zhang, Y., Pan, X., Girard, W., Nelson, K., Caccitolo, J., Alvarez, J., Shepherd, S., Wilson, R., Graviss, E. A. & Wallace, R. J., Jr. (2006). Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **174**: 928-934.

Horan, K. & Cangelosi, G. A. (2009). Drug resistance by nontuberculous mycobaceria. Antimicrobial Drug Resistance. Clinical and Epidemiological Aspects. Mayer, D. L. (ed), p. 917-927, Springer, New York.

Inagaki, T., Yagi, T., Ichikawa, K., Nakagawa, T., Moriyama, M., Uchiya, K., Nikai, T. & Ogawa, K. (2011). Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in *Mycobacterium avium* complex isolates. J. Antimicrob. Chemother. **66**: 722-729.

Khoo, K. H., Jarboe, E., Barker, A., Torrelles, J., Kuo, C. W. & Chatterjee, D. (1999). Altered expression profile of the surface glycopeptidolipids in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium avium* complex. J. Biol. Chem. **274**: 9778-9785.

Lechner, D., Gibbons, S. & Bucar, F. (2008). Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. J. Antimicrob. Chemother. **62**: 345-348.

Li, X. Zhang, L. & Nikaido, H. (2004). Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 2415-2423.

Matsunaga, I., Bhatt, A., Young, D. C., Cheng, T. Y., Eyles, S. J., Besra, G. S., Briken, V., Porcelli, S. A., Costello, C. E., Jacobs, W. R. & Jr., Moody, D. B. (2004). *Mycobacterium tuberculosis pks12* produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. J. Exp. Med. **200**: 1559-1569.

Matsunaga, I., Komori, T., Ochi, A., Mori, N. & Sugita, M. (2008). Identification of antibody responses to the serotype-nonspecific molecular species of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection. Biochem. Biophys. Res. Commun. **37**: 165-169.

Matsunaga, I. & Sugita, M. (2012). Mycoketide: A CD1-presented antigen with important implications in mycobacterial infection. Clin. Dev. Immunol. **2012**: 1-7.

Moody, D. B., Ulrichs, T., Muhlecker, W., Young, D. C., Gurcha, S. S., Grant, E., Rosat, J. P., Brenner, M. B., Costello, C. E.., Besra, G. S. & Porcelli, S. A. (2000). CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Nature **404**: 884-888.

Naka, T., Maeda, S., Niki, M., Ohara, N., Yamamoto, S., Yano, I., Maeyama, J., Ogura, H., Kobayashi, K. & Fujiwara, N. (2011). Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 substrain. J. Biol. Chem. **286**: 44153-44161.

Philalay, J. S., Palermo, C. O., Hauge, K. A., Rustad, T. R. & Cangelosi, G. A. (2004). Genes required for intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 3412-3418.

Prados, P., Fukushima, T., Santa, T., Homma, H., Tsunoda, M., Al-Kindy, S., Mon, S., Yokosu, H. & Imai, K. (1997). 4-N,N-Dimethylaminosulfonyl-7-N-(2-aminoethyl)aminobenzofurazan as a new precolumn fluorescence derivatization reagent for carboxylic acids (fatty acids and drugs containing a carboxyl moiety) in liquid chromatography. Anal. Chim. Acta **344**: 227-232.

Primm, T. P., Lucero, C. A. & Falkinham, J. O., 3rd. (2004). Health impacts of environmental mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. **17**: 98-106.

Rodrigues, L., Ramos, J., Couto, I., Amaral, L. & Viveiros, M. (2011). Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. BMC Microbiol. **11**: 35.

Rodrigues, L., Sampaio, D., Couto, I., Machado, D., Kern, W. V., Amaral, L. & Viveiros, M. (2009). The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. Int. J. Antimicrob. Agents **34**: 529-533.

Rodrigues, L., Wagner, D., Viveiros, M., Sampaio, D., Couto, I., Vavra, M., Kern, W. V. & Amaral, L. (2008). Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. J. Antimicrob. Chemother. **61**: 1076-1082.

露口一成，鈴木克洋（2007）．肺 *M. avium* complex（MAC）症の診断と最近の動向．日本胸部臨床 **66**: 541-548.

Young, D. C. & Moody, D. B. (2006). T-cell recognition of glycolipids presented by CD1 proteins. Glycobiology **16**: 103R-112R.

IFO Res.Commun. 26
127-136, 2012

微生物間シグナル伝達機構を標的とした抗生物質に代わる新しい病原性抑制技術の開発

諸　星　知　広

宇都宮大学大学院　工学研究科
〒321-8585　栃木県宇都宮市陽東7-1-2

Development of novel approaches to pathogen control by targeting a bacterial signaling mechanism

Tomohiro Morohoshi

Graduate School of Engineering, Utsunomiya University
7-1-2 Yoto, Utsunomiya, Tochigi 321-8585, Japan

Quorum sensing is a cell-cell communication mechanism that depends on cell population density in bacteria. In many gram-negative bacteria, several kinds of *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL) have been identified as signal compounds involved in this mechanism. In general, AHL-negative mutants show defects in pathogenicity, so it is expected that disrupting or manipulating quorum-sensing signals could inhibit the expression of virulence and infection of host cells. We have reported that *Microbacterium testaceum* StLB037, which was isolated from the leaf surface of potato, has AHL-degrading activity. In this study, we cloned the *aiiM* gene from the genomic library of StLB037, which has AHL-degrading activity and shows high homology with the α/β hydrolase fold family from actinobacteria. Purified AiiM as a maltose binding fusion protein showed high degrading activity of AHLs with both short- and long-chain AHLs with or without substitution at carbon 3. HPLC analysis revealed that AiiM works as an AHL-lactonase that catalyzes AHL ring opening by hydrolyzing lactones. In addition, expression of AiiM in plant pathogen *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* reduced pectinase activity markedly, and attenuated soft rot symptoms on potato slices. In conclusion, this study indicated that AiiM might be effective in quenching quorum sensing of gram-negative pathogens.

Key words: quorum sensing, *N*-acyl-L-homoserine lactone, gram-negative pathogen, AHL lactonase, quorum quenching

緒　言

細菌感染症対策は，人類の歴史を語る上でも避けて通れない問題である．フレミングによる抗生物質の発見は，細菌感染症の治療技術を飛躍的に向上させ，現代においても，抗生物質の使用は細菌感染症の治療の大部分を占めている．その一方で，現在のような抗生物質の過度な使用は，薬剤耐性菌の出現や蔓延を引き起こしており，新たな抗生物質の開発とそれに対する耐性菌の出現のイタチごっこを繰り返しているのが現状である．そのため，従来の抗生物質に代わる新しい細菌感染症対策が広く求められている．

これまで細菌は単独で行動していると考えられてきたが，多くの細菌が周囲の細菌と互いに連携を取り合い，集団として生命活動を行っていることが明らかとなってきた．これらの細菌間のコミュニケーションの一つに，クオラムセンシングと呼ばれる機構が存在する．クオラムセンシングとは，細菌がオートインデューサーと呼ばれるシグナル物質を介して周囲の細胞密度を感知し，一定の細胞密度を超えたところで様々な遺伝子の発現を活性化させる機構のことである（Greenberg, 1997）．オートインデューサーの構造は，細菌種によって様々であるが，本研究で対象としたグラム陰性細菌の場合，アシル化ホモセリンラクトン（AHL）が主に用いら

E-mail: morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp
共同研究者：池田　宰（宇都宮大学大学院工学研究科），加藤紀弘（宇都宮大学大学院工学研究科），伊藤智志（宇都宮大学大学院工学研究科）

れていることが明らかとなっている（Fig. 1）. AHLを介したグラム陰性細菌のクオラムセンシング機構の概要をFig. 2に示す．まず，AHLはAHL合成酵素であるLuxIファミリータンパク質により合成される．合成されたAHLは細胞内外を行き来し，細菌の増殖に従ってその局所濃度が増大する．AHL濃度がある一定値を超えると，細胞内のAHLレセプタータンパク質であるLuxRファミリータンパク質と複合体を形成し，AHL-LuxR複合体は*lux* boxと呼ばれる特定のプロモーター以下の遺伝子の発現を活性化させる（de Kievit & Iglewski, 2000）．クオラムセンシングが注目されている理由として，多くの病原性細菌が自身の病原性因子の発現をクオラムセンシングにより制御する点が挙げられる．そのため，グラム陰性病原性細菌のAHL合成遺伝子を破壊すると，多くの場合で病原性因子の発現が見られなくなり，宿主への感染及び病気の発症が見られなくなる．このことから，クオラムセンシング阻害技術は，新しい感染症予防技術として注目を集めつつある．さらに，クオラムセンシングの阻害は抗生物質の作用とは異なり，病原性細菌の増殖及び生死に直接関与することはない．そのため，抗生物質の過剰な投与による薬剤耐性菌の蔓延といったリスクが生じる可能性は非常に低いものと思われる．

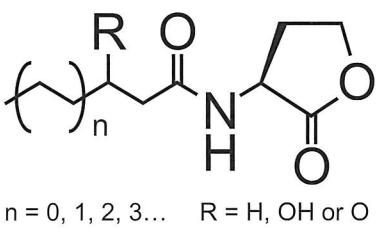


Fig. 1 Structure of *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL).

我々のグループでは，AHL分解遺伝子及び酵素を利用する方法，AHLを包接可能なホスト分子を用いる方法，AHLをトラップする素材を用いる方法の三種類の戦略でAHLを介したクオラムセンシングの阻害技術の開発を行ってきた．これらの戦略の中でも，特にAHL分解遺伝子及び酵素を利用する方法は，様々なグループにより研究が行われており，クオラムセンシング阻害に有効であることが実証されてきた（Uroz *et al.*, 2009）. AHLの分解には主に二種類の機構が知られている（Fig. 3）. 最初に*Bacillus*属細菌から発見されたAHLラクトナーゼは，AHLのラクトン環部位を加水分解することにより開裂させる（Dong *et al.*, 2000）. AHLラクトナーゼは，*Bacillus cereus*グループで広く保存されているだけでなく，*Agrobacterium tumefaciens*，*Arthrobacter*属細菌，*Rhodococcus*属細菌など様々な細菌から単離されており（Lee *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2008），哺乳類においても，ヒトやマウスのパラオキソナーゼ-1がAHLラクトナーゼ活性を有することが報告されている（Ozer *et al.*, 2005）．もう一つのAHL分解酵素であるAHLアシラーゼは，AHLのアミド結合部位を切断することでホモセリンラクトンと脂肪酸に分解する．これらのAHL分解酵素により分解されたAHLはシグナル物質としては認識されず，クオラムセンシングは活性化しなくなる．

本研究に先駆けて，我々のグループでは健康なジャガイモ葉表面に生息する細菌群からAHL分解細菌のスクリーニングを行なってきた．日本各地で採取したジャガイモ葉から単離した109株の細菌から16株のAHL分解細菌の単離に成功し，16S rRNA系統解析の結果，10株がこれまでにAHL分解細菌としての報告がなかった*Microbacterium testaceum*の近縁種であることが明らかとなった（Morohoshi *et al.*, 2009）. *M. testaceum*は，宿主植物に病

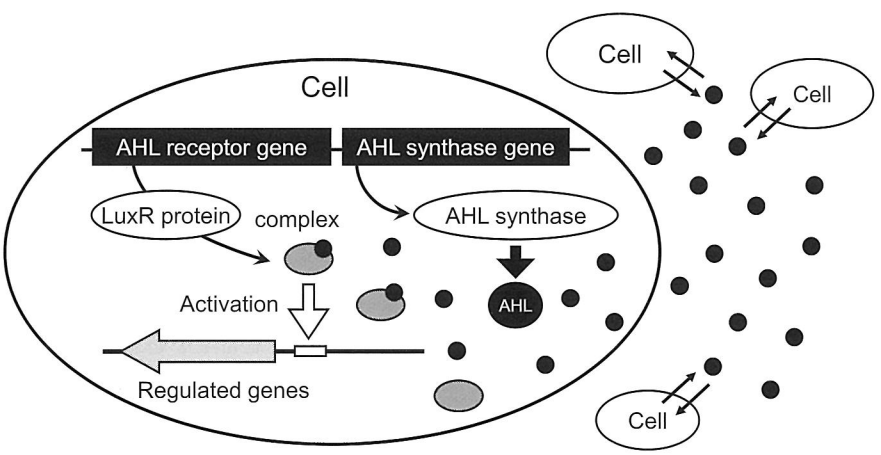


Fig. 2 AHL-mediated quorum sensing system in Gram-negative bacteria.

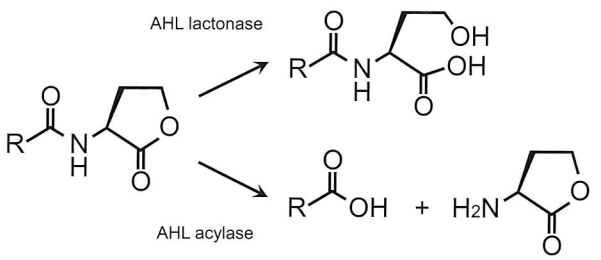


Fig. 3 AHL degradation by AHL-lactonase and AHL-acylase.

原性を引き起こすことなく共生関係にあることが報告されており（Zinniel *et al.*, 2002），安全性が高い細菌種として知られている．本研究では，ジャガイモ葉由来 *M. testaceum* から新規 AHL 分解遺伝子をクローニングするとともに，クオラムセンシング阻害技術への応用の検討を行った．

実験方法

使用菌株，培地及び試薬　AHL 分解遺伝子のクローニングにはジャガイモ葉由来 AHL 分解細菌 *M. testaceum* StLB037 株を使用した．遺伝子操作に用いた大腸菌 *Escherichia coli* DH5α の培養には LB 培地（Sambrook *et al.*, 1989）を使用し，それ以外の細菌についてはトリプチケースソイ培地（TSB）を使用した．本研究で使用した *N*-ヘキサノイル-L-ホモセリンラクトン（C6-HSL），*N*-オクタノイル-L-ホモセリンラクトン（C8-HSL），*N*-デカノイル-L-ホモセリンラクトン（C10-HSL），*N*-ドデカノイル-L-ホモセリンラクトン（C12-HSL），*N*-3-オキソヘキサノイル-L-ホモセリンラクトン（3OC6-HSL），*N*-3-オキソオクタノイル-L-ホモセリンラクトン（3OC8-HSL），*N*-3-オキソデカノイル-L-ホモセリンラクトン（3OC10-HSL），*N*-3-オキソドデカノイル-L-ホモセリンラクトン（3OC12-HSL）は既存の手法により合成した（Chhabra *et al.*, 2003）．

AHL 分解遺伝子のクローニング　AHL 分解遺伝子の探索を簡便に行うために，AHL 分解を発光強度の減少によって検出可能なレポータープラスミドの構築を行った．海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* ES184 株の AHL 合成遺伝子（*luxI*），AHL レセプター遺伝子（*luxR*）及び発光遺伝子クラスター（*luxCDABEG*）を pHV200 プラスミド（Gray & Greenberg, 1992）から *SalI* 消化により切り出し，pSTV28 ベクターの *SalI* サイトにクローニングし，AHL レポータープラスミド（pLux28）を構築した．次に，StLB037 株の染色体ライブラリーを作成するために，StLB037 株より抽出した染色体を *Sau*3AI で部分消化し，3 kbp から 10 kbp の断片をアガロースゲル電気泳動により切り出し，*Bam*HI で消化した pUC118 とライゲーションさせ，StLB37 株染色体ライブラリーを作成した．StLB037 株染色体ライブラリーと pLux28 の両プラスミドを *E. coli* DH5α に形質転換してコロニー形成させ，各コロニーを96穴発光アプリケーションプレートに分注した 200 μl の LB 液体培地に植菌し，30℃ で一晩静置培養を行った．各ウェルの発光強度は，発光プレートリーダーで測定し，発光強度が著しく減少したコロニーをポジティブクローンとし選択した．ポジティブクローンに挿入された StLB037 株染色体断片の塩基配列決定には BigDye Terminator ver 3.1 Kit 及び ABI Prism 3100 Genetic Analyser（Applied Biosystems）を用い，DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベース（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/）と BLAST プログラムを用いて相同性検索を行った．

***aiiM* 遺伝子のクローニング**　*aiiM* 遺伝子は，StLB037 染色体をテンプレートとし，*Bgl*II サイト及び *Hin*dIII サイト（下線部）を付与した 2 種類のプライマー（5'-AGA TCT AGG GTG GTC GAC ATC GAG GCA TCC-3' 及び 5'-AAG CTT TCG ACG ACG ACA TCC AGC TCC ACG-3'）を用いた PCR により増幅させた．PCR 産物は pGEM-T easy クローニングベクター（プロメガ）を用いてクローニングした．*aiiM* 遺伝子は *Bgl*II と *Hin*dIII により切り出し，*Bam*HI と *Hin*dIII で切断した広宿主範囲ベクター pJN105Z（Morohoshi *et al.*, 2008b）に挿入し，pJN105Z-aiiM プラスミドを作成した．

AiiM の発現及び精製　AiiM はマルトース結合タンパク質（MBP）との融合タンパク質として発現及び精製を行った．*aiiM* 遺伝子は，*Bgl*II サイト及び *Hin*dIII サイト（下線部）を付与した 2 種類のプライマー（5'-AGA TCT ATG ATC CTC GCC CAC GAC GTG TCG-3' 及び 5'-AAG CTT TCG ACG ACG ACA TCC AGC TCC ACG-3'）を用いた PCR により増幅させた．PCR 産物は pGEM-T easy cloning vector を用いてクローニングした．*aiiM* 遺伝子は *Bgl*II と *Hin*dIII により切り出した．MBP 融合タンパク質発現ベクターである pMAL-c2X（New England Biolabs）は *Bam*HI と *Hin*dIII で切断し，*aiiM* 断片を挿入して pMAL-aiiM プラスミドを作成した．

MBP-AiiM 融合タンパク質を発現させるため，*E. coli* DH5α に pMAL-aiiM を形質転換し，LB 培地を用いて 37℃ で一晩培養を行った．新しい 100 ml の LB 培地に一晩培養液を 1 ml 植菌し，37℃ で 2 時間培養を行った．最終濃度 0.1 mM となるようにイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加し，さらに 37℃ で 8 時間

培養を行った．遠心分離により菌体を回収し，250μg/mlの卵白由来リゾチームを加えたカラムバッファー（20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.4）を用いて再懸濁し，37℃で4分間インキュベートを行った．菌体は超音波により破砕し，遠心分離により細胞残渣を除いた．タンパク質の精製はAKTAprime plusとMBPTrapアフィニティークロマトグラフィーカラム（GEヘルスケア）を用いて行った．ネガティブコントロールとして用いたMBP-LacZαは，*E. coli* DH5αにpMAL-c2Xを形質転換することで発現させ，同様の方法で精製を行った．

AHLレポーター株を用いたAHL分解アッセイ　AHL分解の*in vivo*アッセイでは，プラスミドを導入した大腸菌を0.1 mM IPTGを添加したLB培地を用いて37℃で一晩培養し，新しいLB培地で一晩培養液を100倍に希釈した．最終濃度が10μMとなるようにC10-HSLを添加し，37℃で2時間インキュベートを行った．遠心分離により菌体を除去し，上清をサンプルとした．AHL分解の*in vitro*アッセイでは，精製したMBP融合タンパク質と当量の200μM C10-HSLを混合し，37℃で2時間インキュベートを行い，サンプルとした．残存AHLは*Chromobacterium violaceum*をベースとしたAHLレポーター株を用いたバイオアッセイにより検出を行った．*C. violaceum* CV026株（McClean *et al.*, 1997）及びVIR07株（Morohoshi *et al.*, 2008a）は，外部のAHLに応答して紫色色素（ビオラセイン）を生産することでAHLの存在を視覚的に確認できるAHLレポーター株であり，CV026株はアシル鎖長が4から8の短アシル鎖AHLに，VIR07株はアシル鎖長が10から18の長アシル鎖AHLにそれぞれ応答してビオラセインを生産する．CV026株またはVIR07株は30℃で一晩培養し，LB寒天培地と混合してプレートを作製した．プレート上に配置したペーパーディスクにサンプルをスポットして30℃で一晩培養し，紫色色素生産の有無でAHLの存在を確認した．

HPLCを用いたAHL分解物の構造解析　AiiMにより分解されたAHLの構造解析を行うため，逆相カラムを用いたHPLCを行った（Teiber *et al.*, 2008）．AHL分解反応を行うために，50μlの精製AiiM溶液，49μlのカラムバッファー，1μlの200 mM C10-HSLを混合し，37℃で15分間インキュベートを行った．AHL分解反応は当量のアセトニトリルを混合することで停止した．C10-HSLの加水分解物は，最終濃度10 mMの水酸化ナトリウムを混合し，室温で30分間反応させることで調製した．Crestpak C18T-5逆相カラム（日本分光）を取り付けたHPLCシステム（日本分光）は，移動相である水/アセトニトリル/酢酸（32/68/0.2）で平衡化した．20μlのサンプルをインジェクトし，移動相を1 ml/minの流速で送液し，205 nmの吸収を測定することにより紫外吸収を測定することにより検出を行った．

病原性阻害アッセイ　モデル病原菌として軟腐病菌*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NBRC 3830株を使用した．pJN105Zベクターまたは作製したpJN105Z-aiiMはエレクトロポレーション法によりNBRC 3830株に形質転換した．病原性因子であるペクチナーゼ活性の検出は，ポリガラクツロン酸を基質とした既存の手法を用いて行った（Chatterjee *et al.*, 1995）．ジャガイモスライス上で病原性アッセイを行うため，NBRC 3830株形質転換体はTSB培地に植菌して30℃で一晩培養した．ジャガイモスライスは保湿した滅菌シャーレ内に置き，NBRC 3830株培養液を5μlスライス表面に滴下し，30℃で24時間インキュベート後に腐敗症状を観察した．

結果と考察

***M. testaceum* StLB037株からのAHL分解遺伝子のクローニング**　AHL分解遺伝子のクローニングには，独自に構築した大腸菌/pLux28スクリーニングシステムを用いた．pLux28プラスミドには，海洋性発光細菌*V. fisheri* ES184株の生物発光遺伝子群が導入されており，このプラスミドを有する大腸菌は，自ら生産したAHLに応答して生物発光を示す．この大腸菌にpUC118をベースとしたStLB037株の染色体ライブラリーを導入し，もしAHL分解遺伝子を含むクローンが導入されると，AHLが自己分解されることで発光強度が大幅に減少することから，発光強度をモニタリングするだけでAHL分解遺伝子のスクリーニングが可能となる（Fig. 4）．本システムを用いて約3,000クローンを調べたところ，1つのポジティブクローンを得ることに成功し，このクローンをpST37-1と命名した．本クローンを導入した大腸菌を10μMのC10-HSLとともに培養し，2時間後に培養上清中の残存C10-HSLをAHLレポーター株である*C. violaceum* VIR07株により検出したところ，C10-HSLはほぼ完全に分解されていることが明らかとなった（Fig. 5A）．pST37-1に挿入されているStLB037株の染色体断片の塩基配列を決定したところ，全長が4,398 bpで，推定上のORFが4つ存在していた（Fig. 5B）．その中でも，最初のORF（*orf1*）は295アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており，相同性検索により，α/β hydrolase fold familyに属するタンパク質であるこ

とが明らかとなった．この *orf1* のみを PCR により増幅して pJN105Z ベクターにクローニングし，大腸菌に導入したところ，*orf1* のみで C10-HSL が分解されることが明らかとなった（Fig. 5A）．以上より，*orf1* が AHL 分解遺伝子であると断定し，この遺伝子を *aiiM*（autoinducer inactivation gene from *M. testaceum*）と命名した．

AiiM による AHL 分解機構の解析　AiiM の機能解析を行うために，AiiM を MBP との融合タンパク質として発現させる系を構築した．精製した MBP-AiiM を SDS-PAGE により解析したところ，約 74 kDa のシングルバンドとして生成することに成功した（Fig. 6A）．精製タンパク質を C10-HSL と混合して分解活性を調べたところ，ネガティブコントロールである MBP-LacZα では C10-HSL は全く分解されなかったのに対し，MBP-AiiM の場合は C10-HSL が完全に分解されていた（Fig. 6B）．我々のグループによる以前の研究では，StLB037 株は AHL ラクトナーゼ活性を有することが明らかとなっている（Morohoshi *et al.*, 2009）．そこで，AiiM による AHL 分解機構を明らかにするため，AiiM により分解された AHL の構造を HPLC を用いて解析を行った．逆相カラムクロマトグラフィーにより C10-HSL およびその分解物を解析したところ，未処理の C10-HSL は保持時間が約 4.2 分のピークとして検出された（Fig. 7A）．次に，ラクトン環部位が加水分解された C10-HSL の保持時間を調べるため，C10-HSL を 10 mM NaOH で加水分解した化合物について HPLC 解析を行ったところ，保持時間が約 3.3 分のピークが検出された（Fig. 7B）．ネガティブコントロールである MBP-LacZα と C10-HSL を混合し，37℃ で15分間インキュベートしたサンプルについて HPLC 解析を行ったところ，未処理の C10-HSL と同じ保持時間が約 4.2 分のピークが検出され，C10-HSL の分解は見られなかった（Fig. 7C）．一方で，MBP-AiiM で処理した C10-HSL を解析したところ，保持時間が約 4.2 分のピークが大幅に減少し，新たに保持時間が約 3.3 分のピークが現れた（Fig. 7D）．以上より，AiiM は AHL のラクトン環を加水分解して分解する AHL ラクトナーゼとして機能することが明らかとなった．

AiiM の AHL 分解活性に対する諸特性を調べるため，基質特異性，至適 pH，至適温度について解析を行った．基質特異性を調べるため，アシル鎖長が 6，8，10，12の AHL 及びその 3-オキソ体について分解活性を測定した．その結果，C10-HSL に対する分解活性を 100% とした場合，アシル鎖長の違いによる大きな分解活性の違いは

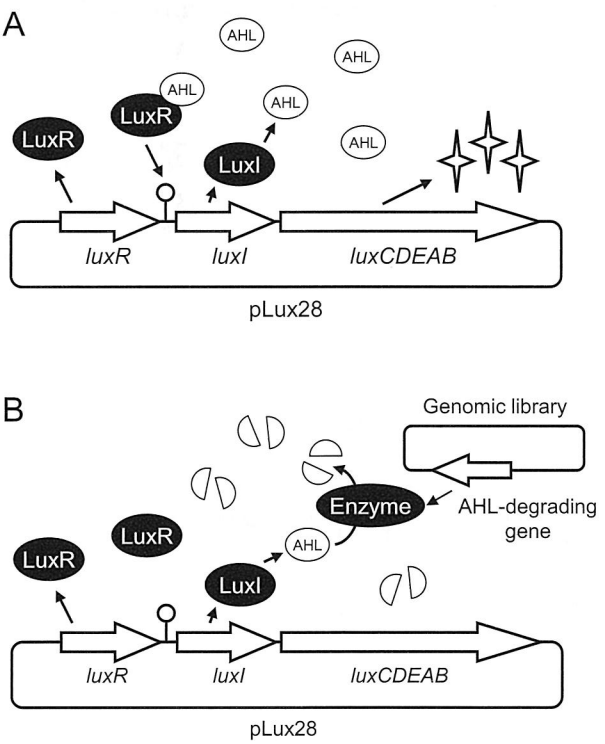


Fig. 4 Intracellular screening system for cloning AHL-degrading gene. (A) *E. coli* DH5α harboring pLux28 produces AHL and expresses luminescence under AHL-mediated regulation. (B) *E. coli* DH5α harboring pLux28 and AHL-degrading clone show the reductions in luminescence activities resulted from degrading AHL.

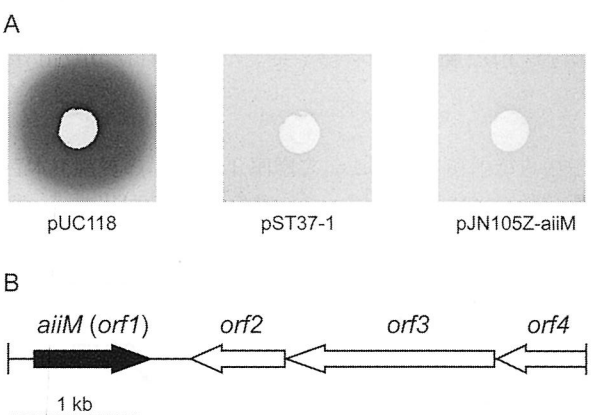


Fig. 5 (A) AHL-degrading activity of *E. coli* DH5α harboring pUC118, pST37-1, and pJN105Z-aiiM. Subculture of *E. coli* DH5α was mixed with 10μM C10-HSL and incubated at 37℃ for 2 h. The residual AHL was detected by *C. violaceum* VIR07 which produced the purple pigment violacein in response to the presence of AHL. (B) Arrangement of predicted ORFs on the original genomic clone pST37-1. The scale represents 1 kb length of nucleotides. The filled arrow indicates *aiiM* gene and the open arrows indicate the other ORFs.

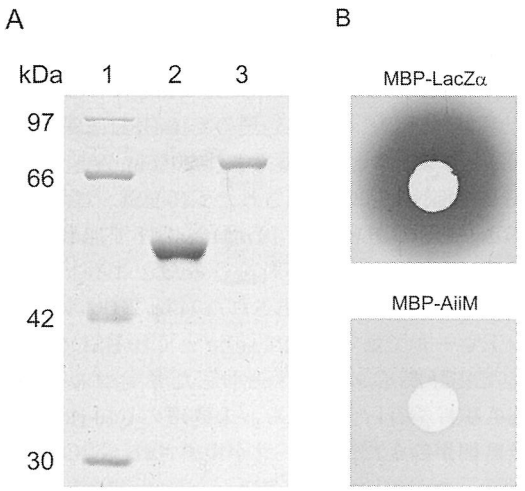


Fig. 6 (A) Purification of MBP-LacZα and MBP-AiiM fusion proteins. Lane 1, protein molecular weight marker; lane 2, purified MBP-LacZα; and lane 3, purified MBP-AiiM from *M. testaceum* StLB037. Samples were analyzed by SDS-PAGE in a 10% polyacrylamide gel. (B) AHL-degrading activity of MBP-AiiM. The solutions of purified MBP-LacZα and MBP-AiiM were mixed with equal volume of 1mM C10-HSL solutions and incubated at 37℃ for 15min. The residual AHL was detected by *C. violaceum* VIR07.

見られなかった. 3-オキソ体については全体的に分解活性が高く, 特にアシル鎖長が長くなるに従ってより高い分解活性を示すことが明らかとなった (Fig. 8). また, AHL 骨格の一部である γ-ブチロラクトンと L-ホモセリンラクトンについても分解活性を調べたが, L-ホモセリンラクトンについては C10-HSL に対する分解活性のの 20% 程度, γ-ブチロラクトンについてはほとんど分解活性を示さなかったことから, AiiM は AHL に対する基質特異性が高いことが明らかとなった. 次に, 至適 pH について調べたところ, 中性付近で高い活性を示すことが明らかとなった (Fig. 9A). また, 至適温度について調べたところ, 20℃ から 60℃ の範囲では安定して高い酵素活性を示すことが明らかとなり, 70℃ から 80℃ の高温域でも 50% 前後の活性を保持していることが明らかとなった (Fig. 9B).

AiiM は新規 AHL ラクトナーゼファミリーである AiiM のアミノ酸配列を国際塩基配列データベース上で相同性検索を行ったところ, AiiM は既知の AHL ラクトナーゼである *Bacillus* sp. 240B1 株由来 AiiA とは 9.6%, *Agrobacterium tumefaciens* C58 株由来 AttM とは 9.9%, *Arthrobacter* sp. IBN110 株由来 AhlD とは 11.7%,

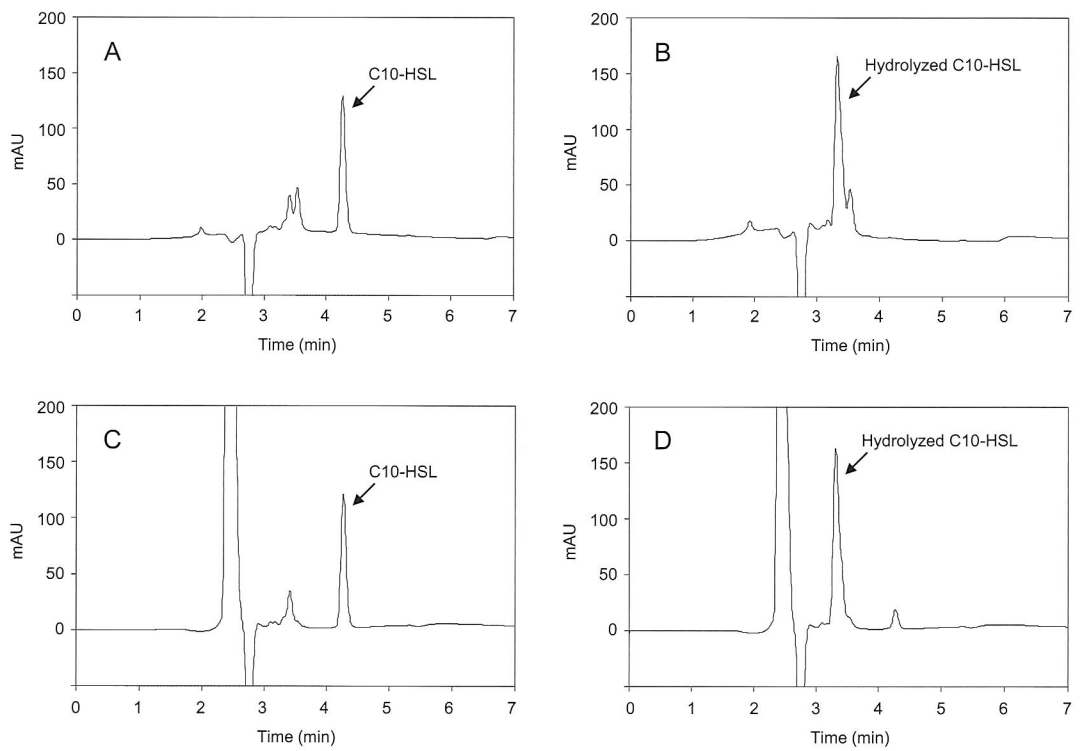


Fig. 7 HPLC profiles of C10-HSL (A), C10-HSL hydrolyzed by 10 mM NaOH (B), C10-HSL treated with MBP-LacZα (C), and C10-HSL treated with MBP-AiiM (D). The peaks corresponding to C10-HSL (a retention time of about 4.2 min) and hydrolyzed C10-HSL (3.3 min) are indicated by arrows.

Rhodococcus erythropolis W2 株由来 QsdA とは 12.5%，メタゲノム由来 QlcA，BpiB01，BpiB04，BpiB07 とはそれぞれ 14.9%，12.9%，13.3%，12.4% といずれも低い相同性しか示さなかった．多くの AHL ラクトナーゼは metallo-β-lactamase superfamily に特有の亜鉛イオン結合ドメインである HXHXDH 配列を有しているが，AiiM にはこのような金属結合部位の存在は見つからなかった．AiiM が属する α/β hydrolase fold family は幅広い構造のタンパク質を含むファミリーで，エステラーゼ，プロテアーゼ，リパーゼなど，様々な酵素がタンパク質ファミリーに属している（Holmquist, 2000）．AiiM は *Kineococcus radiotolerans* SRS30216 株，*R. erythropolis* PR4 株，*R. opacus* B-4 株由来の α/β hydrolase fold family タンパク質とそれぞれ 26.2%，21.3%，20.2% とある程度の相同性を示す．その中から，*R. erythropolis* PR4 株，*R. opacus* B-4 株由来の α/β hydrolase fold family タンパク質をコード

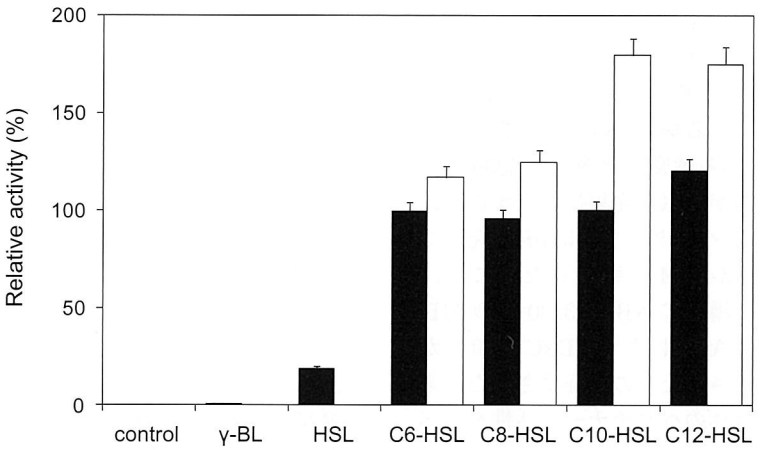


Fig. 8 Substrate specificity of purified MBP-AiiM. 1 μl of purified MBP-AiiM was mixed with 89 μl of the column buffer (pH 7.4) and 10 μl of 20 mM AHL solution, γ-butyrolactone (γ-BL), or L-homoserine lactone (HSL). After incubation for 1 min, the residual substrate was quantified by HPLC. The activity toward C10-HSL was defined as 100%. The C10-HSL-degrading activity without MBP-AiiM is represented as control. Filled and open bars represent 3-unsubstituted and 3-oxo-substituted AHLs, respectively. The results were reproduced at least three times and error bars indicate standard deviations.

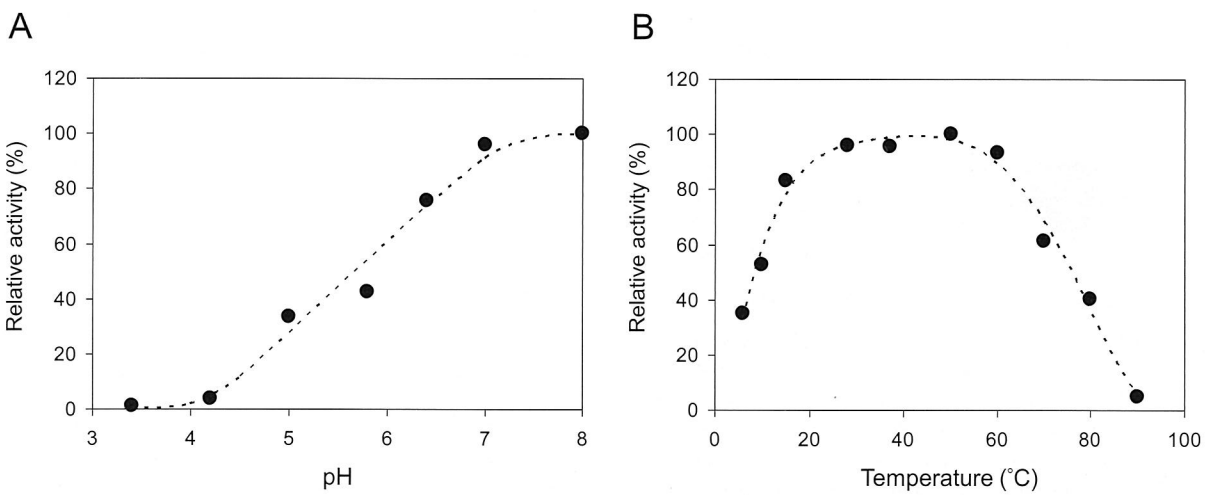


Fig. 9 (A) Optimal pH of AHL-degrading activity of purified MBP-AiiM. 1 μl of purified MBP-AiiM was mixed with 89 μl of the buffer ranging from pH 3 to pH 8 and 10 μl of 20 mM AHL solution. (B) Optimal temperature of AHL-degrading activity of purified MBP-AiiM. 1 μl of purified MBP-AiiM was mixed with 89 μl of the buffer ranging from pH 3.4 to pH 8 and 10 μl of 20 mM AHL solution. After incubation for 1 min, the residual substrate was quantified by HPLC. The maximum activity was defined as 100%.

する遺伝子をPCRにより増幅して大腸菌にクローニングし，AHL分解活性を調べたが，これらの遺伝子を有する大腸菌は明確なAHL分解活性を示さなかった（data not shown）．以上より，AiiMが既知のAHLラクトナーゼとは系統的に異なる新規AHLラクトナーゼとして分類できることが明らかとなった．

***aiiM*による植物病原菌の病原性阻害効果**　グラム陰性細菌である軟腐病菌 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* は様々な植物に感染し，軟腐症状を引き起こす植物病原菌である．軟腐病菌は，AHLを介したクオラムセンシングにより病原性因子であるペクチナーゼなどの様々な腐敗酵素の生産を活性化している（Chatterjee *et al.*, 1995）．そこで，*aiiM* による病原性抑制効果を検証するため，モデル病原菌である軟腐病菌NBRC 3830株に *aiiM* を導入し，AHL分解が病原性発現に及ぼす影響について調査した．pJN105Zベクターまたは *aiiM* 発現プラスミドであるpJN105Z-aiiMを導入したところ，pJN105Z-aiiMを導入した場合にNBRC 3830株のAHL生産が消失したことから，AiiMによりNBRC 3830株が生産するAHLが自己分解されたものと推察された（未発表）．これらの形質転換体のペクチナーゼ活性を調べたところ，pJN105Zベクターを導入したNBRC 3830株のサンプルからは，アッセイプレート上でペクチナーゼ活性を示すクリアゾーンが見られたが，pJN105Z-aiiMを導入したNBRC 3830株ではクリアゾーンを確認することができなかった（Fig. 10A）．さらに，形質転換体をジャガイモスライス上に接種して腐敗活性を調べたところ，pJN105Zベクターを導入したNBRC 3830株では明確な腐敗症状の進行が観察されたが，pJN105Z-aiiMを導入したNBRC 3830株では全く腐敗症状は観察されなかった（Fig. 10B）．以上より，*aiiM* を病原性細菌に導入することでAHLの自己分解を引き起こし，AHLを介したクオラムセンシングにより制御される病原性因子の発現を抑制可能であることが明らかとなった．

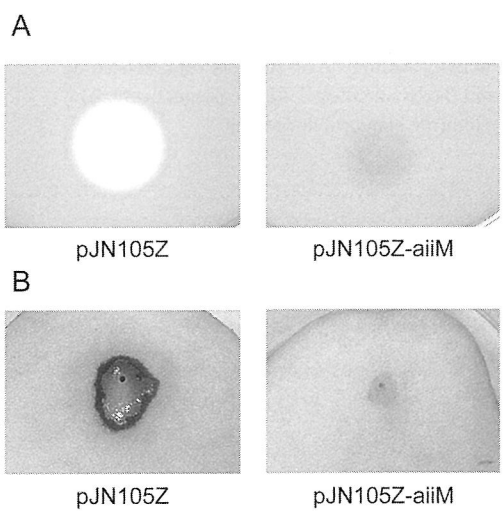


Fig. 10 Characterization of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* NBRC 3830 harboring pJN105Z and pJN105Z-aiiM. (A) Extracellular pectinase activity in the culture supernatants of NBRC 3830. For agar plate assays of pectinase, 50 μl of culture supernatant was applied to the paper disks. Clear zones around the paper disks indicate pectinase activities. (B) Plant tissue maceration activities in NBRC 3830. The full-grown culture (5 μl) of NBRC 3830 was inoculated on the potato slices. The inoculated potato slices were incubated for 24 h at 30℃.

まとめ　本研究では，ジャガイモから単離したAHL分解細菌である *M. testaceum* StLB037株から新規AHL分解遺伝子 *aiiM* をクローニングすることに成功し，*aiiM* を用いて軟腐病菌の病原性因子の発現を阻害することに成功した．本研究では，モデル病原菌として植物病原菌の軟腐病菌を用いたが，これまでの報告では，AHLを介したクオラムセンシングにより病原性因子の発現を制御する細菌は植物病原菌だけではなく，ヒトや魚の病原菌など多岐に渡っていることが明らかとなっており，AHL分解系を用いた病原性阻害技術は様々な細菌感染症対策への応用が期待できる．AiiM等を用いたAHL分解系を利用する利点はいくつか考えられるが，まずAHLの分解は基本的に病原性細菌の増殖には影響を及ぼさないため，無差別に細菌を殺す抗生物質の投与と比較して，薬剤耐性菌の蔓延を引き起こす可能性は非常に低い．また，前述のとおりAiiMの基質特異性はAHLに特化しているため，生体や環境中に投与することで生理活性物質等を誤って分解するリスクも低いと予想される．今後はAiiMの具体的な利用方法を研究することで，抗生物質投与に代わる新しい細菌感染症予防技術の開発につながると期待できる．

要　約

薬剤耐性化が問題となっている病原性細菌の多くは，クオラムセンシングと呼ばれる細胞密度応答性の病原性発現機構を有している．グラム陰性細菌の場合，シグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介して周囲の菌体密度を認識し，菌体密度がある一定値を越えると一斉に病原性を発現する．クオラムセンシングの阻害は，細菌を殺すことなく病原性発現を抑制することが可能であることから，抗生物質と比較して薬剤耐性菌発

生のリスクが低いと考えられる．本研究では，ジャガイモ葉から単離した新規AHL分解細菌 *Microbacterium testaceum* StLB037株からAHL分解遺伝子をクローニングし，クオラムセンシング阻害技術への応用を検討することを目的とした．StLB037株の染色体ライブラリーからAHL分解活性を示すクローンを取得したところ，α/β hydrolase fold familyに属する新規AHL分解遺伝子（*aiiM*）をクローニングすることに成功した．AiiMをマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現，精製し，HPLCシステムを用いてAHL分解産物の構造解析を行ったところ，AiiMはAHLのラクトン環を加水分解して開環するラクトナーゼとして機能することが明らかとなった．また，AiiMの基質特異性を調べたところ，AiiMはAHLのアシル鎖の構造の違いに関わらず高い分解活性を示すことが明らかとなった．次に，*aiiM* 遺伝子を用いた病原性抑制効果を検証するために，AHLを介して病原性因子の発現を制御する軟腐病菌に *aiiM* 遺伝子を導入したところ，ジャガイモスライス上で腐敗活性を示さず，AHLの生産も消失していることが明らかとなった．以上より，本研究で取得した新規AHL分解遺伝子 *aiiM* は，抗生物質投与に代わる病原性抑制技術への応用の可能性が示唆された．

本研究助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1) 池野谷仁，王文昭，諸星知広，染谷信孝，池田宰（2009）．バレイショ葉面単離菌によるアシル化ホモセリンラクトン分解機構の解析．日本生物工学会2009年度大会（名古屋）．
2) 諸星知広，王文昭，池野谷仁，染谷信孝，池田宰（2009）．バレイショ葉面からのアシル化ホモセリンラクトン分解細菌の単離と分解機構の解析．第25回日本微生物生態学会大会（東広島）．
3) 諸星知広，王文昭，Rumana Rasid，池野谷仁，染谷信孝，池田宰（2010）．植物表面からのアシル化ホモセリンラクトン分解細菌の探索と応用．環境バイオテクノロジー学会2010年度大会（仙台）．
4) Wang, W. Z., Ikenoya, M., Morohoshi, T., Someya, N. & Ikeda, T. (2010). Identification of *N*-acylhomoserine lactonase from *Microbacterium testaceum* and its application for quorum quenching. 2010 International Symposium on Advanced Biological Engineering (Beijing, China).
5) 池野谷仁，王文昭，諸星知広，染谷信孝，池田宰（2010）．バレイショ葉面菌 *Microbacterium testaceum* 由来アシル化ホモセリンラクトン分解遺伝子のクローニングと機能解析．日本生物工学会2010年度大会（宮崎）．
6) Wang, W. Z., Ikenoya, M., Morohoshi, T., Someya, N. & Ikeda, T. (2011). Identification and characterization of a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from leaf-associated *Microbacterium testaceum* and the application for quorum quenching. Asian Congress on Biotechnology 2011 (Shanghai, China).

原著論文

1) Wang, W. Z., Morohoshi, T., Ikenoya, M., Someya, N. & Ikeda, T. (2010). AiiM, a novel class of *N*-acylhomoserine lactonase from the leaf-associated bacterium *Microbacterium testaceum*. Appl. Environ. Microbiol. **76**: 2524-2530.

謝　辞

本研究に対し，3年間研究助成をして頂いた公益財団法人発酵研究所に心より御礼申し上げます．また，本研究で使用したジャガイモ葉由来 *M. testaceum* StLB037株の分譲並びに数々の御助言を頂いた北海道農業研究センターの染谷信孝博士に御礼申し上げます．最後に，本研究を学位論文の一部として実施して頂いた王文昭君，池野谷仁君をはじめとする宇都宮大学大学院工学研究科生物工学研究室の学生諸氏に深く感謝致します．

文　献

Chatterjee A, Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C. K. & Chatterjee, A. K. (1995). Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1959-1967.

Chhabra, S. R., Harty, C., Hooi, D. S., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D. I. & Bycroft, B. W. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. J. Med. Chem. **46**: 97-104.

de Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect. Immun. **68**: 4839-4849.

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z. & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 3526-3531.

Gray, K. M. & Greenberg, E. P. (1992). Physical and functional maps of the luminescence gene cluster in an autoinducer-deficient *Vibrio fischeri* strain isolated from a squid light organ. J. Bacteriol. **174**: 4384-4390.

Greenberg, E. P. (1997). Quorum sensing in gram-negative bacteria. ASM News **63**: 371-377.

Holmquist, M. (2000). Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. Curr. Protein Pept. Sci. **1**: 209-235.

Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T. & Lee, J. K. (2002). Genes encoding the *N*-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3919-

3924.

McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycrof, B. W., Stewart, G. S. & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. Microbiology **143**: 3703-3711.

Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N. & Ikeda, T. (2008a). *N*-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC12472. FEMS Microbiol. Lett. **279**: 124-130.

Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N. & Ikeda, T. (2008b). Identification and characterization of *N*-acylhomoserine lactone-acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. Biosci. Biotech. Biochem. **72**: 1887-1893.

Morohoshi, T., Someya, N. & Ikeda, T. (2009). Novel *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. Biosci. Biotech. Biochem. **73**: 2124-2127.

Ozer, E. A., Pezzulo, A., Shih, D. M., Chun, C., Furlong, C., Lusis, A. J., Greenberg, E. P. & Zabner, J. (2005). Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. FEMS Microbiol. Lett. **253**: 29-37.

Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y. & Lee, J. K. (2003). AhlD, an *N*-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. Microbiology **149**: 1541-1550.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Teiber, J. F., Horke, S., Haines, D. C., Chowdhary, P. K., Xiao, J., Kramer, G. L., Haley, R. W. & Draganov, D. I. (2008). Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. Infect Immun. **76**: 2512-2519.

Uroz S., Dessaux, Y. & Oger, P. (2009). Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. Chembiochem **10**: 205-216.

Uroz, S., Oger, P. M., Chapelle, E., Adeline, M. T., Faure, D. & Dessaux, Y. (2008). A *Rhodococcus qsdA*-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases. Appl. Environ. Microbiol. **74**: 1357-1366.

Zhang, H. B., Wang, L. H. & Zhang, L. H. (2002). Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 4638-4643

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G. & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 2198-2208.

平成22年度大型研究助成の研究報告

助成期間：平成22年４月～平成24年３月

IFO Res.Commun. 26
137-147, 2012

分断されたtRNAから解析するアーキアの系統分類と遺伝暗号の進化

金　井　昭　夫

慶應義塾大学先端生命科学研究所
〒997-0017　山形県鶴岡市大宝寺日本国403-1

Disrupted tRNAs in Archaea and evolution of the genetic code

Akio Kanai

Institute for Advanced Biosciences, Keio University
403-1 Nipponkoku, Daihoji, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan

Transfer RNA (tRNA) is one of the classical noncoding RNAs and is essential for decoding the genomic sequence into proteins. In recent years, we have been studying disrupted tRNA genes in the genomes of the Archaea, and have found unique examples, including multiple-intron-containing tRNAs and split tRNAs. During this research, we also noted that frequent intron transpositions might have occurred among the tRNA genes in the Archaea. Because these tRNAs are encoded as precursor forms (pre-tRNAs) in the genome, they must be processed to yield mature functional tRNAs. In this report, I summarize our most recent findings, especially regarding the enzymes involved in the different steps of pre-tRNA processing. A possible evolutionary scenario for the disrupted tRNAs and their introns is also discussed. Further study of disrupted tRNAs should open new doors in our understanding of the origin of the genetic code.

Key words: Archaea, tRNA, Intron, Pre-tRNA, RNA ligase

緒　言

転移RNA (transfer RNA, tRNA) は機能性のRNA分子 - タンパク質にならずにRNA分子のままで働く非翻訳型RNA (non-coding RNA, ncRNA) - であるが，その機能は塩基配列に内在された情報をタンパク質に変換するために，直接の基盤を翻訳段階で提供することにある．すなわちtRNAは特定のアミノ酸と結合し，タンパク質合成の工場であるリボソームで，伝令RNA (messenger RNA, mRNA) の情報に従って並び，これを受けてリボザイムであるリボソームRNAがアミノ酸を重合する．また，ある種のウイルスではゲノムDNAが複製する時のプライマーとして宿主由来のtRNAが用いられることが知られている (Kleiman, 2002)．となると，tRNAは遺伝情報の流れであるセントラルドグマを構成するDNA，RNA及びタンパク質の各段階に密接に関与しているといってよい．従って，tRNA分子の起源や進化的な成り立ちを追求していくことで，遺伝暗号成立の過程を明らかにできる可能性がある．

tRNAの2次構造は，クローバーの葉のように見えるためにクローバーリーフ構造と呼ばれている．本RNAの長さは70～100塩基長程度であるが，それが分子内で綿密に規定された塩基対を作り，先の2次構造を作り出す．一方，tRNAの種類によっては，その内部にイントロンを持つものが知られている．特にtRNAのアンチコドンが存在するループ (アンチコドンループ) 領域には，生物の3大ドメインである，バクテリア，アーキア (Archaea，古細菌) そして真核生物のいずれに由来するtRNAにおいてもイントロンを持つものがあり，この領域に存在するイントロンには，進化的に古い起源をもつ

E-mail: akio@sfc.keio.ac.jp
共同研究者：藤島皓介（慶應義塾大学，現 米国NASA Ames Research Center），菅原潤一（慶應義塾大学，現 スパイバー㈱），佐藤朝子（慶應義塾大学），曽我朋義（慶應義塾大学），浜島聖文（慶應義塾大学），村上慎之介（慶應義塾大学），増田豪（慶應義塾大学），布浦拓郎（海洋研究開発機構），高木善弘（海洋研究開発機構），高井研（海洋研究開発機構），高見英人（海洋研究開発機構），Miller, C.S.（米カルフォルニア大），Baker B.J.（米カルフォルニア大），Banfield, J.F.（米カルフォルニア大），Di Giulio, M.（伊 CNR），伊藤隆（理化学研究所）

ものがあると考えられている．ここで，新しいt RNA分子種に関する重要な発見は，2005年，米国エール大のグループによる *Nanoarchaeum equitans* からの split tRNA の報告に始まると考えられる（Randau *et al.*, 2005）．著者らは1つのtRNA遺伝子がアンチコドンの部分で2分された独立の2つの遺伝子から生成されることを示した．この split tRNA の一般性については，当初 *N. equitans* が寄生性のアーキアで，ゲノムの縮小が起こっていたことにより，幾分か疑問視されたが,我々のグループが寄生性ではない好熱好酸性のアーキア *Caldivirga maquilingensis* から split tRNA を，さらには3つの遺伝子に分断された tri-split tRNA を発見するに至り（Fujishima *et al.*, 2009），同遺伝子がゲノムの縮小に伴う副産物ではないことが明らかとなった．なお，*C. maquilingensis* は理化学研究所の伊藤によりフィリピンの火山性酸性温泉から単離されたものである（Itoh *et al.*, 1999）．現在では，米カルフォルニア大学サンタクルーズ校のグループが，より多くのアーキアの種で split tRNA を報告し，その存在が定着している（Chan *et al.*, 2011）．また，我々はアーキアのゲノムを解析していく過程で，tRNA のわずか100塩基長程度の中に複数の（最高3個まで）のイントロンが含まれる場合があることを明らかにした（Sugahara *et al.*, 2009; Sugahara *et al.*, 2008）．さらに，立教大学や東京大学との共同研究を通し，tRNA の前半部と後半部がゲノム上で逆転し，環状の転写物を介して成熟型の tRNA となる permuted tRNA を，原始紅藻である *Cyanidioschyzon merolae* や数種の光合成真核生物に発見した（Maruyama *et al.*, 2010; Soma *et al.*, 2007）．この permuted tRNA も，先のカルフォルニア大学のグループにより，アーキアゲノム中に見いだされている．すなわち，アーキアは非常にユニークな分断型の tRNA 分子の宝庫だと云うことができる．

一方，このような分断された tRNA が成熟型の機能性 tRNA になるためにはイントロンの切り出しと連結を行なう RNA プロセシングのステップが必須になる．まず，イントロン切り出しの過程は特異的なエンドヌクレアーゼである tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼによって遂行される．アーキアでは tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼのタイプが，tRNA イントロンを多く持つような種の分化と共進化することが提唱されている（Sugahara *et al.*, 2009; Sugahara *et al.*, 2008）．すなわちユーリアーキオータ（Euryarchaeota）門に属する種の tRNA では，比較的分断化が少なく，あっても1つのイントロンが tRNA のアンチコドンループの領域に存在するものが主である．一方で，クレンアーキオータ（Crenarchaeota）門に属する種の tRNA では，分子の様々な位置にイントロンが挿入され，分断化されたものが数多く観察される（特にサーモプロテウス目に属するアーキアでこの傾向が顕著である）（Sugahara *et al.*, 2008）．ここで，前者の tRNA イントロンは，ユーリアーキオータ門に属する種が有する $\alpha 2$ や $\alpha 4$ といったタイプの tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼで切り出すことができるが，後者のうち，アンチコドンループ以外の領域に存在するようなイントロンを除去するには，クレンアーキオータ門に特異的な $(\alpha\beta)2$ タイプの酵素が必要である．

また最近，我々のグループの研究を含め，欧米の2-3の研究機関から，アーキアの有する RNA 連結酵素（RNA リガーゼ）の同定が報告された．その結果，アーキアには少なくとも3種の RNA リガーゼが存在することが明らかとなった．ここで，tRNA リガーゼの活性はそれを繋ぎ合わせる RNA 鎖の末端構造に大きく依存することが知られている．例えば，tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼが tRNA のイントロンを切り取った後の RNA 鎖末端は，3' 末端側にリボースの2' と3' の位置で環状型になったリン酸基ができ（cyclic P），また，5' 末端側はリボースの5' の位置に水酸基（-OH）ができるので，この形状を連結できるものが tRNA リガーゼである．まず，大腸菌に感染する T4 ファージの有する RNA リガーゼの相同タンパク質として，米国の2つのグループが，*Pyrococcus abyssi*（Brooks *et al.*, 2008）と *Methanobacterium thermoautotrophicum*（Torchia *et al.*, 2008）から2量体を形成する RNA リガーゼを同定した．このリガーゼに必要な RNA 鎖末端は，3' 末端側の水酸基（-OH）と5' 末端側の直鎖状のリン酸基であるので，これ単独で候補とはなり得ない．次に，我々の研究グループは超好熱性アーキアである *Pyrococcus furiosus* を用いた発現クローニング法で，強い CPDase 活性（環状型のリン酸基を直鎖状にする酵素活性）と RNA リガーゼ活性をあわせ持つタンパク質を同定した．本酵素は，tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼが tRNA のイントロンを切り取った後の RNA 鎖末端である3' 末端側の cyclic P と，5' 末端側の水酸基を連結することができる．しかし，その連結のジャンクションは，通常の核酸のように3'-5' 結合ではなく，2'-5' 結合であることが示唆された（Kanai *et al.*, 2009）．従って，これも適切な tRNA リガーゼではない．最後に米国エール大学のグループは，tRNA からイントロンが除去された末端構造をプローブとして，これを連結させる活性を *Methanopyrus kandleri* から精製し，その構造を決めることで，まったく新しいタイプ（RtcB タイプ）の RNA リガーゼを発見し，本酵素が tRNA リガーゼの実態であることを証明した（Englert *et al.*, 2011）．さらに，ウイーンの研究グループはヒトにおいても RtcB タイプのtRNAリガーゼが存

在することを示した（Popow *et al.*, 2011）.

本稿では，アーキアの進化を，分断型tRNA遺伝子そのものに加え，分断型のtRNAを成熟型にするために必要不可欠なRNAプロセシング因子の側面からも考察する．また本研究では，完全長のゲノム情報ばかりでなく，近年その発展が著しいメタゲノム法を用いた解析情報を利用したことで，分断型tRNA遺伝子の進化に関する幾つかの新事実を明らかにできた.

実験方法

tRNA遺伝子の予測

tRNA遺伝子の予測は基本的に，我々の開発したSPLITSのプログラムを用いた（Sugahara *et al.*, 2006）．また，アーキアのtRNA遺伝子とそのイントロンの配列をSPLITSdb（Sugahara *et al.*, 2008）からダウンロードした.

アーキアゲノムからの遺伝子のクローニングと組換え体酵素の産生

米カルフォルニア大バークレー校の研究グループはカリフォルニア鉱山の廃水に生育する極小のアーキアを同定し，ARMAN（Archaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganisms）と命名した（Baker *et al.*, 2006）．ARMANには，幾つかの株（ARMAN-1から-5までが報告されている）があり，各々のゲノムのほぼ全長にわたる塩基配列が決定されている．このうち，ARMAN-2に富んだ環境から調製したゲノムDNAを同研究グループより分与された（Fujishima *et al.*, 2011）．また，超好熱性のアーキアである*P. furiosus*は理研バイオリソースセンターより購入し，培養後ゲノムDNAをG NOME kit（BIO101）により調製した．次に，RNAプロセシングに関係する酵素遺伝子群（*PF0027, PF0112, PF0353, PF1549*及び*PF1615*詳細は本文参照）を，それぞれの塩基配列に対応する特異的なオリゴヌクレオチドを用いて，上記のゲノムDNAよりPCR法により増幅し，基本的にpET-23bプラスミドベクター（Novagen）の*NdeI*と*XhoI*サイトの間にクローニングした．その結果，発現誘導される組換え体の酵素のC末端側にHis x 6のタグ配列が付加されることになる．最終的に構築した発現プラスミドのインサートとなる塩基配列をシークエンスし，NCBI（National Center for Biotechnology Information）のデータベースに登録されている塩基配列と一致することを確認した.

組換え体酵素の産生は，構築した発現プラスミドを導入した大腸菌BL21(DE3)株やBL21(DE3)pLysS株を用い，LB培地中で0.4 mMのイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド（IPTG）を誘導剤に，30℃にて一晩発現誘導することにより行なった．菌体を超音波処理にて破壊し，熱処理後，HisTagに対するアフィニティーカラムクロマトグラフィーにて精製した．また必要に応じ，陰イオン交換カラムクロマトグラフィーであるRESOURCE-Qカラムにてさらに精製した．精製した組換え体タンパク質はSDS-PAGE上CBB染色にてほぼ均一のバンドとなった（Fujishima *et al.*, 2011: Sato *et al.*, 2011）.

環境由来サンプルのメタゲノム及びメタトランスクリプトーム解析

（独）海洋研究開発機構の布浦拓郎らは，深海底熱水環境に生息する未培養性アーキアのゲノムをメタゲノムの手法を用いて再構築し，*Caldiarchaeum subterraneum*と命名した（Nunoura *et al.*, 2011）．本研究では，同アーキアに富んだメタゲノムライブラリーを構成するFosmidの塩基配列をNCBIのデータベースよりダウンロードし用いた．また，必要に応じて同ライブラリーから，さらなるFosmidのクローンを調製し，そのインサートの塩基配列を決定した.

上記に加え，山形県鶴岡市の湯野浜温泉源泉水を用いたメタトランスクリプトーム解析を実施した．温泉水は地下250～1000 mから汲み上げられており，サンプリング時の温度は57℃，pHは8.1であった．まず3リットルの温泉水から遠心法により微生物を濃縮し，培養を介さず直接に20-200 base程度の低分子RNA画分を調製した．これらのRNAに対し，オリゴRNAタグ（PCR法で用いるプライマーの足場となる）を連結した後で，逆転写反応PCRを行い，環境サンプル低分子RNA由来のcDNAライブラリーを構築した．このライブラリーを用いて，Roche社の次世代シーケンサーGS FLXにより，ライブラリーのインサートに対応する塩基配列を約8万種決定した．さらに，同温泉水から，UltraClean water DNA isolation kit（MO BIO Lab）を用いてDNA画分を調製した．このDNA画分に対し，アーキア用とバクテリア用の各々の16S rRNA遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドを用いて，PCR法により同遺伝子を増幅し，その塩基配列を決定した（Murakami *et al.*, 2012）.

結　果

アーキアの種分化にともなうtRNAの断片化と転位性イントロン

アーキアのtRNAを網羅的に調べてみると，アンチコドンループ以外の領域にも非常に多くのイントロンを

持つ分子がある（Sugahara *et al.*, 2008）. Fig. 1 に示したのは, 米カルフォルニア大バークレー校の研究グループにより明らかにされた極小のアーキア ARMAN-2 のゲノム中に, 我々が見いだしたユニークなイントロン含有型の tRNA である. Fig. 1 A, B のいずれにおいても, アンチコドンでない領域（ここでは, T アームと呼ばれる領域）に 1 つあるいは 2 つのイントロンが挿入されている. 図中で BHB とあるのは, バルジ-ヘリックス-バルジ構造のことで, スプライシング時にイントロンを切り出す tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼが基質を認識するための足場となる. また, BHB 構造には, その 2 次構造によって分類される 3 タイプ（hBHBh', HBh' 及び hBH）がある（Fujishima *et al.*, 2010）.

イントロンに富んだ tRNA を数多く持つユーリアーキオータ門の中でも, サーモプロテウス目に属する種（例えば, 前述の *C. maquilingensis* や *Pyrobaculum calidifontis, Thermoproteus neutrophilus* など）は極めて分断化が進み, より多くのイントロンを含んだ tRNA を有すると云って良い. 種特異的なイントロンの増加を明らかにするため, サーモプロテウス目に属する種において, 300 弱の tRNA イントロンを抽出して, その配列, 由来した tRNA の種類, 及びイントロンの挿入されていた位置等を詳細に解析した. その結果, イントロンの一部が, 進化的に異なるバックグランドを持つ tRNA から, 別の tRNA へ（例えば $tRNA^{Thr}$ から $tRNA^{Val}$ へ）, または, 同じ tRNA 中で, 異なる部域に転位しているという結果が得られた（Fujishima *et al.*, 2010）. イントロンの塩基配列の相同性が 70% 以上で, この「転位」のクライテリアを満たすものは少なくとも 16 種見いだされ, このようなイントロンを「転位性イントロン」と名付けた. また, このイントロンの転位には, スプライシング時におけるイントロン除去の構造的な条件である BHB 構造を, 転位先の tRNA 上で構成できるか否かが制限要因となっていた. さらに,「転位性イントロン」をアーキアの系統樹上にマップしたところ, サーモプロテウス目では非常に頻繁に tRNA イントロンの挿入と欠失が起こっていることが明らかとなった（Fujishima *et al.*, 2010）. また *C. maquilingensis* は, 進化の過程でイントロン型の tRNA を分断して split tRNA を創出したと考えられた.

新たなタイプの tRNA イントロンスプライシング酵素の発見

前章にて言及したように ARMAN-2 のゲノムには, 通常のユーリアーキオータ門のアーキアには見られないようなイントロンを含んだ tRNA が存在している. これは, ユーリアーキオータ門のアーキアが有する α_4 や α_2 タイプの tRNA スプライシングエンドヌクレアーゼでは切断できないはずである. Fig. 2 に示すように ARMAN-2 は 16S rRNA の配列からユーリアーキオータ門に属すると考えられたので, そのゲノム配列の中から情報学的に tRNA スプライシングヌクレアーゼの遺伝子を探し出し, アミノ酸配列を解析した結果, α_4 や α_2 タ

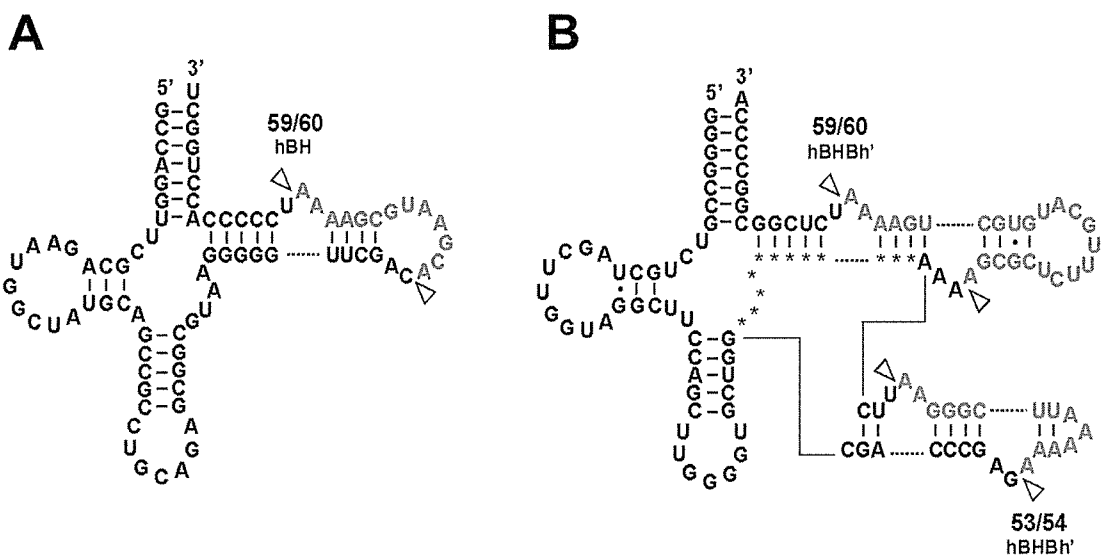


Fig. 1 Schematics representation of the unique intron-containing tRNAs found in the ARMAN-2 genome. (A) Pre-$tRNA^{Cys}$ (GCA) with an intron located at noncanonical position 59/60 forming a relaxed BHB motif (hBH type). (B) Pre-$tRNA^{Pro}$ (GGG) with introns located at two adjacent positions (53/54 and 59/60) within the T-loop, forming a strict BHB motif (hBHBh' type). Intron sequences are indicated by gray letters. See text for details.

イプでもなく，また$(\alpha\beta)_2$タイプでもない新しいタイプの酵素の配列が見いだされた．Fig. 3は新しい酵素について模式的に示している．まず，この酵素は3つの構造ユニットからなっており，それはαシュード（α^0，活性を担うアミノ酸を欠いている），αそしてβユニットの順に並んでいた．さらに，この酵素は近縁のARMAN-1にも見いだされたが，ARMAN-4や-5ではα_4タイプの酵素が存在していた（Fig. 2）．ARMAN-4や-5はtRNAイントロンが少ないことからもα_4タイプで十分なのであろう．2量体の形成に重要なL10ループがβユニットに，そこと相互作用するポケット領域がαユニットに存在していた．また，β-βストランド相互作用ドメイン（β-β strand interaction domain）というのは，βユニットとαシュードユニットを固定させるのに必要な領域と考えられる．そこで，この新しい酵素をε_2タイプと命名し，本酵素の特徴を実験的に明らかにすることにした．

まず，カルフォルニア大学バークレー校のグループより提供されたゲノムDNAサンプルからε_2タイプをコードする遺伝子を単離し，発現ベクターを介して，大腸菌にて組換え体酵素を産生，SDS-PAGE上でほぼ均一な成分までに精製した．本酵素を生化学的に解析した結果，次のことが明らかとなった．(1) ARMAN-2のtRNAスプライシングエンドヌクレアーゼは，少なくとも試験管内にて，アンチコドンにイントロンを有するtRNAで

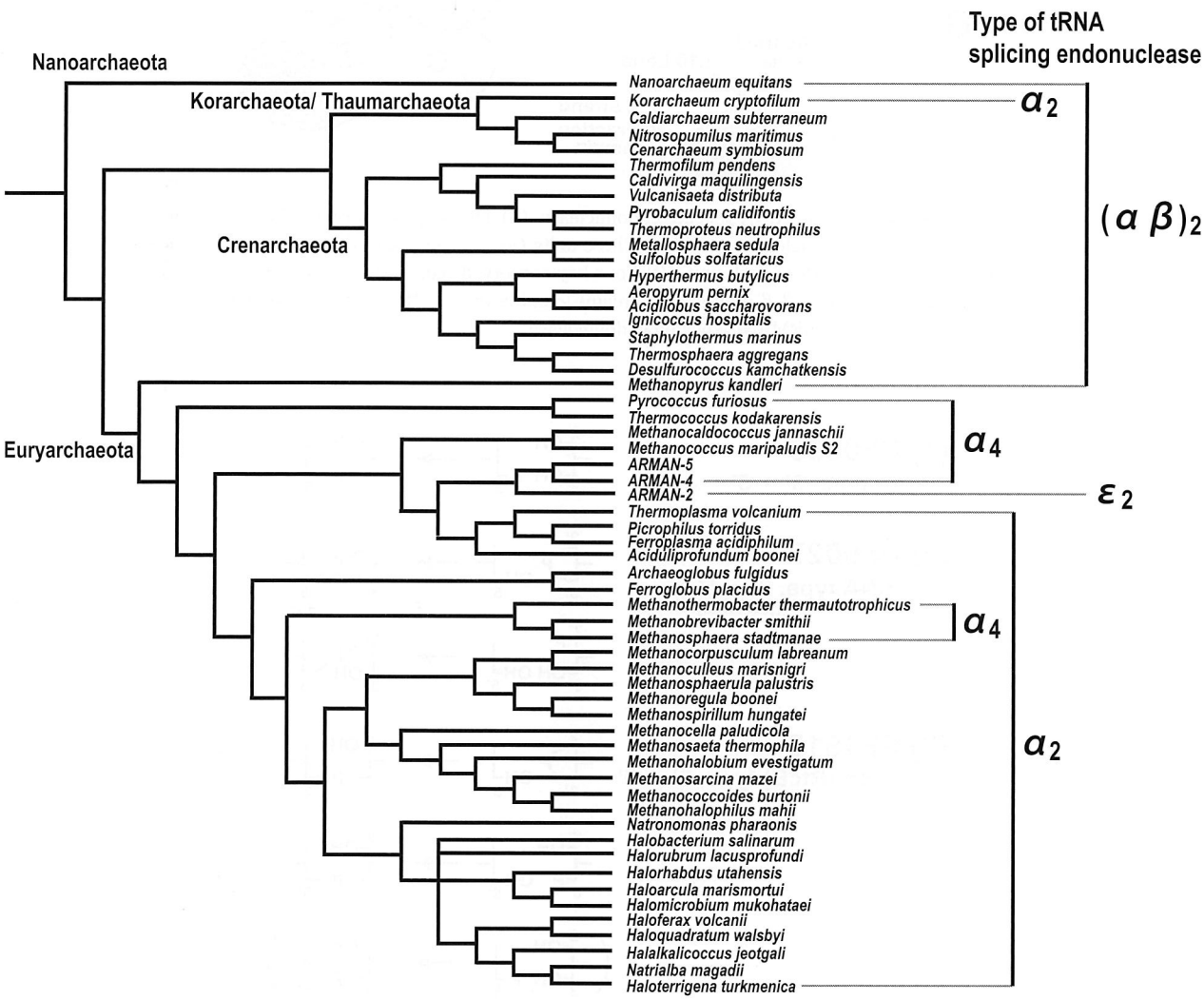


Fig. 2 Phylogenetic tree of representative archaeal species and their types of tRNA splicing endonucleases. The 16S rRNA phylogenetic tree of 55 representative archaeal species (one species per genus) is shown, with the types of tRNA splicing endonuclease of each species. Phylum names are indicated on the branches. Four types of splicing endonucleases [α_4, α_2, $(\alpha\beta)_2$, and ε_2] are denoted with the corresponding archaeal species.

も，それ以外の領域にイントロンを有するtRNAでも，そのイントロンを正確な位置で切断できる．(2) 化学架橋剤を用いた実験により，本酵素は2量体を形成する．なお，本酵素の結晶構造解析が共同研究を介して行なわれ，その立体構造が原子レベルで解析された（Hirata *et al.*, 2012）．

さて，ARMANはArchaeal Richmond Mine Acidophilic Nanoorganismsという名前が示すように，これまで酸性の環境でしか報告されていない．ところが，偶然にも，全く予想もしていなかった環境サンプルからARMANと極めて相同性の高い16 S rRNA遺伝子の配列が得られた．それは，我々の研究所がある山形県鶴岡市の湯野浜温泉の源泉から得たサンプルからである．この環境の微生物を解析した結果，弱アルカリ性の環境から初めて

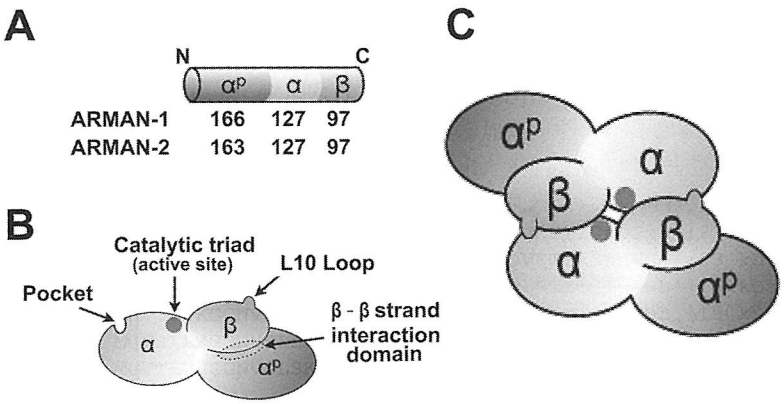


Fig. 3 Structural model of ε_2 tRNA splicing endonuclease. (A) The proposed structural model of the ε_2 tRNA splicing endonuclease, comprising three units (α^p, α, and β), is shown. Numbers indicate the amino acid length of each unit. (B) Four key conserved regions (catalytic triad, pocket, loop L10, and intrasubunit β-β interaction domain) found in the ε_2 tRNA splicing endonuclease. (C) Dimeric form of the ARMAN-2 splicing endonuclease.

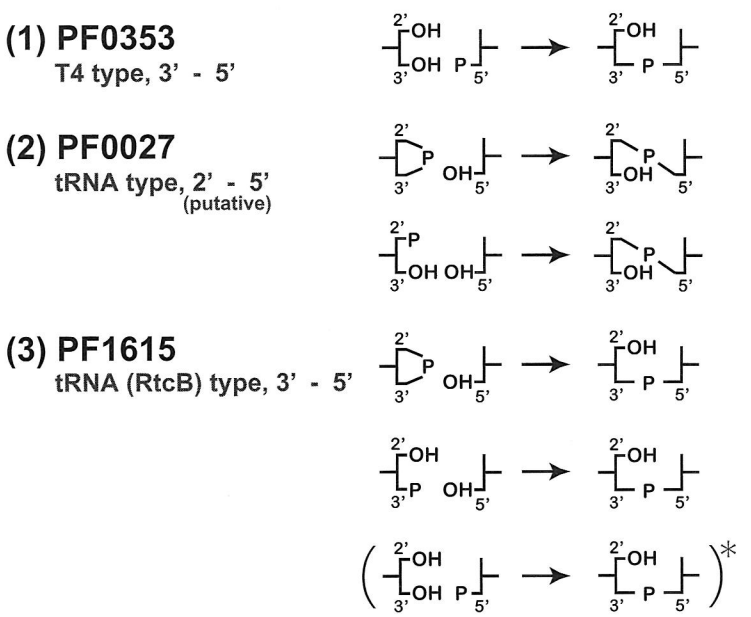


Fig. 4 Three RNA ligases found in the hyperthermophilic archaeon *P. furiosus*. Joining reactions performed by the three archaeal RNA ligases are shown with different junction structures. *A weak enzymatic activity for this reaction has been reported (Desai & Raines, 2012).

ARMANの16 S rRNA遺伝子の配列がPCR法により増幅された．ちなみに，この環境で一番種類が多かったのは，アーキアでなくβプロテオバクテリアである（Murakami *et al.*, 2012）．また，メタトランスクリプトーム解析の結果，このバクテリアに由来すると考えられるtRNAおよびその断片が，膨大に得られた．詳細に配列を解析してみると，tRNA断片は，単なる非特異的な分解物でなく，特定のアミノ酸に対応するtRNAが決まった配列で切断されたものであることを明らかにできた．バクテリアにおいてもtRNAを分断化するような特別な未知のヌクレアーゼがあるものと考えられた（Murakami *et al.*, 2012）．

tRNA前駆体スプライシングにおけるRNA鎖末端構造の重要性とRNAリガーゼ

これまで別々のアーキアで解析されていたRNAリガーゼ3種とRNAプロセシングに関わるような酵素を，超好熱性アーキアである*P. furiosus*をモデル生物として，この種の中でシステマチックに解析した．まず，RNAリガーゼ3種全てに対応する酵素遺伝子を*P. furiosus*のゲノムDNAから単離し（Fig. 4），その組換え体タンパク質を，大腸菌を用いて産生し，SDS-PAGE上でほぼ均一な成分にまで精製した．この3種の酵素名は，PF0027タンパク質（2'-5'様RNAリガーゼ），PF0353タンパク質（T4タイプのRNAリガーゼ）及びPF1615タンパク質（RtcBタイプのRNAリガーゼ）である．各酵素はRNAの連結反応において，それぞれ特異的なRNA鎖の末端構造を必要としていることを確かめた（Fig. 4）．また，PF0027タンパク質とPF1615タンパク質はRNAの連結反応にGTPを補因子として要求することを明らかにした．

一方，RNA鎖の連結を解析していく過程で，RNA鎖の3'末端に存在するリン酸基を環状型にする新しいRNA 3'末端リン酸サイクラーゼ（RNA 3'-terminal phosphate cyclase; *Pf-Rtc*と命名）を見いだした．*Pf-Rtc*をコードするPF1549遺伝子は，アーキアはもとより，大腸菌からヒトに至るまで非常に良く保存されていた．これまでに報告された酵素は皆，ATPにより，そのサイクラーゼ活性が活性化することが分かっているが，*Pf-Rtc*はATPの1/10のGTP濃度（5μM）で十分な活性を示した．さらにdGTPを用いた時も，わずかな活性の上昇が認められ，他のdNTPでは，まったく影響がなかったことより，本酵素におけるグアニン塩基の重要性が明らかとなり，世界初のGTP依存性RNA 3'末端リン酸サイクラーゼとして報告した（Sato *et al.*, 2011）．本酵素の大腸菌ゲノム上の位置を調べてみると，上述したPF1615 RNAリガーゼに対応するRtcBと，PF1549 RNAサイクラーゼに対応するRtcAの各遺伝子がオペロンを形成している（Fig. 5）．

さらに，PF0353タンパク質とPF1615タンパク質を特異的に認識するペプチド抗体を作成し，*P. furiosus*の全タンパク質をゲル濾過した画分を解析したところ，PF0353タンパク質が約440 kDaの複合体中に，PF1615タンパク質は，モノマーと考えられる約40 kDaのピークの他に約160 kDaの複合体中に存在するという結果を得た．これは，RNAリガーゼが，まだ未同定のタンパク質も含め，さらなる高次の段階で制御されうることを示唆している．実際，我々はRNA鎖の5'末端をリン酸

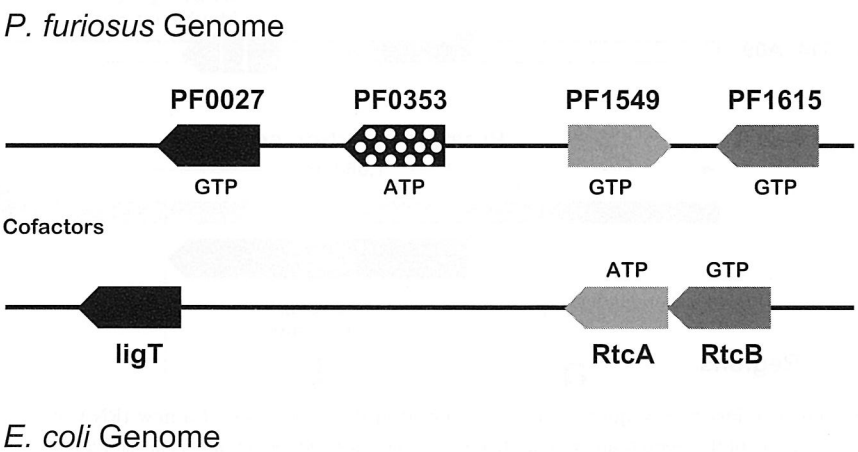


Fig. 5 Genomic organization of RNA ligase genes and an RNA cyclase gene in the genomes of *P. furiosus* and *E. coli*. Homologous genes in the two species are indicated by the same symbols or gray images. Nucleotide cofactors required for enzymatic activation are shown. Note that no gene homologous to PF0353 occurs in the *E. coli* genome. Also see Figure 4.

化する酵素（PF0112タンパク質）とPF0353タンパク質が協調的に働けば，tRNAスプライシングエンドヌクレアーゼがtRNAのイントロンを切り取った後のRNA鎖末端を連結できることを，試験管内の再構成系を用いて示した（未発表）．

メタゲノム解析から見いだされたアーキア tRNA のイントロン獲得機構モデルの提唱

未培養性アーキア *Caldiarchaeum subterraneum* のゲノム配列はメタゲノムの手法を用いて再構築されたが（Nunoura *et al.*, 2011），我々は配列解析に使用したFosmidクローンライブラリーを詳細に解析することにより，$tRNA^{Thr}$（GGU）のゲノム領域には少なくとも3種の異質性があることを見いだした（Sugahara *et al.*, 2012）．本異質性はtRNAの分断化に関連しており，具体的には，ライブラリーを構成するFosmidクローン中に，再構成ゲノムと同様にイントロンを2個含むtRNAタイプの他，イントロンを1個含むタイプ，および同tRNAの5'断片のみからなる領域が存在するようなクローンが，どれも複数存在していた．これらクローンの塩基配列を詳細に比較検討した結果，tRNAのイントロンが1個から2個へ増加するに伴い，トランスポゾン様の因子がゲノムに入り込んでいることが明らかとなった．Fig. 6は，上述の$tRNA^{Thr}$（GGU）遺伝子をコードする2種のFosmidクローンのインサート領域に関して模式的に示してある．アーキアのゲノム中では原則として1つのコドンに対応するtRNA遺伝子は1つだけなので，これら2種の領域を両方含むようなゲノムは存在しないことになる．図中下段のaとbがトランスポゾン様因子と相同性がある領域である．特にbの領域は270アミノ酸残基の読み枠（ORF）を有しているが，ここはDNA結合タンパク質やDNA組換え酵素に相同性が認められることから，新しいイントロン獲得時の組換え酵素として機能していると考えられた．

考　察

本稿ではアーキアゲノムにおける断片化したtRNA遺伝子とイントロンの進化，また，tRNAプロセシングに関わる酵素群の最新について述べた．一方で，本研究の表題にかかげた遺伝暗号の進化に関しては，まだ十分には踏み込んでいない．といってもこの研究の方向性が間違っていたわけでは決してない．先に，tRNAのアンチコドン部分に存在するイントロンは非常に古い起源を持つ可能性があることに言及したが，このこととsplit tRNAの存在理由などを勘案して，我々は，tRNAが独立した半分ずつの転写産物の組み合わせで進化したのではないのかという仮説を既に提案している（Fujishima *et al.*, 2008）．また，この解析過程で，遺伝子進化の初期に存在したであろうtRNAの種類も推定可能なことを

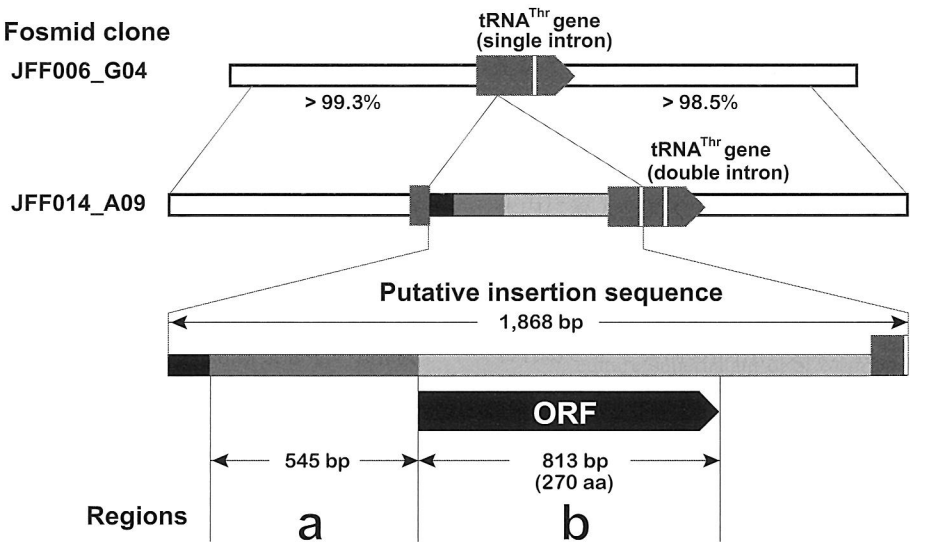


Fig. 6 Putative insertion sequence may be involved in the acquisition of a new tRNA intron in the genome of the deep-branching archaeon *C. subterraneum*. Schematic representations of fosmid clones JFF006_G04 and JFF014_A09, and the enlarged putative insertion sequence. Homologous regions between the cloned sequences are linked by thin lines and the similarity scores are shown. The two regions 'a' and 'b' are shown, together with their respective lengths. See text for details.

示したが，当時は，数種類のアーキア完全長ゲノムを解析の対象にしただけであった．本稿からも明らかなようにtRNAに関する情報はここ数年を見る限りでも，増加の一途をたどっている．まして，次世代の塩基配列決定装置や，メタゲノム，メタトランスクリプトームの時代である．遺伝情報に直接関わるtRNAの配列やゲノム上での頻度，進化上での位置等を統計的に計算すれば，「遺伝暗号の進化」に関するより具体的な概念が提出されることに疑いはない．

RNAリガーゼに関しても幾つかの新しい知見を見出すことができた．特にRNA連結反応におけるヌクレオチドの依存性についてであるが，我々がPF0027タンパク質のGTP依存性を報告した時点（Kanai *et al.*, 2009）では，他のほとんどのRNAリガーゼはATP依存性と考えられていた．ここで，RtcBタイプのRNAリガーゼ（PF1615タンパク質に相応）については，2012年に米ウイスコンシン大のRaines博士のグループ（Desai and Raines, 2012）と，米スローンケタリング研究所のShuman博士のグループ（Chakravarty *et al.*, 2012）もGTP依存性を報告した．さらに我々はRNA鎖末端に存在するリン酸基を環状型にするGTP依存型RNA 3' 末端リン酸サイクラーゼ（*Pf-Rtc*）のRNAプロセシング反応における重要性についても報告した．実際，3' 末端リン酸環状化活性を持つRtcAのファミリー遺伝子の一つを酵母で過剰発現すると18S rRNAのプロセシングが阻害されるとの報告がある（Billy *et al.*, 2000）．

一方，メタゲノム解析を駆使することによりtRNA遺伝子の分断化に関わると考えられる一要因はトランスポゾン様因子であることを見出した．そして，tRNAのイントロン獲得は，同じか，あるいは非常に近い種内において，トランスポゾン様因子を媒介する形で進行する可能性を示し，tRNAのイントロンが新たに獲得される機構を説明するモデルを提唱した（Sugahara *et al.*, 2012）．興味深いことに，このトランスポゾン様の因子は再構築した*C. subterraneum*のゲノム上で，他8カ所の領域に相同な塩基配列が見いだされ，そのうちの1カ所は異なるコドンに対応する$tRNA^{Thr}$遺伝子であった．これは，これまでにも知られている，ウイルスが宿主細胞の特定のtRNA遺伝子を標的とする事実と矛盾しない．

本研究ではアーキアを進化の対象としたが，本研究課題を遂行し，同時にその裏を確認するような形で，真核生物の線虫類で特異的に進化した奇妙なtRNA群を見いだすことができた（Hamashima *et al.*, 2012）．極めて興味深いことに，このtRNAはアンチコドンがグリシンやイソロイシンに対応するにも関わらずロイシンをチャージして，リボソームに入り込み，タンパク質合成に使用可能である．いわば，遺伝暗号の例外と云っても良いかもしれない．考えてみれば，断片化したtRNAも立派な例外として見いだして来たものだった．そして，このような「例外tRNA」を研究することから，より本質的な生物学上の意味が見えてくるのではないかと期待している．

要　約

tRNAは古典的なnon-coding RNAの一種であり，ゲノムに書き込まれた塩基配列をアミノ酸配列（タンパク質）に書き換えるために要となる分子である．近年，我々は，主にアーキアの完全長ゲノムを用いて，その短い100塩基程度の遺伝子に複数のイントロンが介在したtRNAや，split tRNAと呼ばれる2-3の独立した遺伝子に分断されたtRNA等を見いだして来た．また，これらの遺伝子をアーキアの系統樹上で解析することで，tRNAイントロンのなかには，あるtRNAから別のtRNAに，頻繁な転位を行なっているものがあることを明らかにした．さらに，進化の過程でsplit tRNAとなったtRNA分子が存在することを示唆した．一方，このような分断型のtRNAは前駆体tRNA（Pre-tRNA）の形でゲノム上にコードされているので，機能的な，成熟型のtRNAになるためにはRNAのプロセシングを正確に遂行する必要がある．そこで，Pre-tRNAプロセシングに関わる酵素群（tRNAスプライシングエンドヌクレアーゼ，tRNAリガーゼ及びRNAサイクラーゼ等）にも焦点をあて，特にその進化的な側面を論じた．最後に，ある種の転位因子（トランスポゾン様の因子）が，アーキアのtRNAイントロン獲得に寄与している例を提示した．分断されたtRNA分子を研究することで，極めて初期の生命体において如何に遺伝暗号が成立したかという問題にも迫れる可能性がある．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

1. 金井昭夫（2010）．超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* のPre-tRNAプロセシングに関わる酵素群の解析．第23回日本Archaea研究会講演会　名古屋．
2. 金井昭夫（2010）．RNAのバイオインフォマティックス：構造機能と分子進化．第20回感染研シンポジウム　ゲノム情報と感染症研究　東京．
3. 金井昭夫，佐藤朝子，冨田勝（2010）．アーキア由来核酸関連酵素におけるRNAとDNAの曖昧な認識について．日本進化学会 第12回東京大会　東京．
4. 藤島皓介，菅原潤一，冨田勝，金井昭夫（2010）．アーキアゲノムにおけるtRNAの多様性と進化．日本進化学会第12回東京大会　ワークショップWS6ゲノムから見る

微生物進化　東京.
5. 金井昭夫 (2010). 情報科学と実験科学の手法に基づく機能性 RNA 研究. 第58回日本ウイルス学会学術集会　イブニングシンポジウム　徳島.
6. Fujishima, K., Sugahara, J., Tomita, M. & Kanai, A. (2010). Large-scale intron transposition has contributed to the late gain of introns in the deep-branching Archaea. The 4th Asian Young Researchers Conference on Computational and Omics Biology, Singapore.
7. 金井昭夫 (2010). Pre-tRNA プロセシングと siRNA の制御を結ぶ酵素の解析. ワークショップ 「機能性 RNA とその制御タンパク質から考える生命科学」 BMB2010 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会合同大会　神戸.
8. 金井昭夫 (2011). 機能性 RNA とその制御タンパク質から考える生命科学. 富山大学 第72回生命科学先端研究センター学術セミナー　富山.
9. 佐藤朝子, 曽我朋義, 五十嵐香織, 竹末可奈子, 冨田勝, 金井昭夫 (2011). 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* 由来 RNA 3'-terminal phosphate cyclase は GTP 依存にリン酸基の環状化を触媒する. 日本 Archaea 研究会　第24回公演会　鶴岡.
10. 金井昭夫 (2011). RNA 鎖の末端構造と RNA 連結の酵素について. 第10回新しい RNA/RNPを見つける会 沖縄.
11. 金井昭夫, 竹末可奈子, 佐藤朝子, 増田豪, 冨田勝 (2011). 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* における 3 種の RNA ligase の性状解析. 第84回日本生化学会大会　シンポジウム「アーキア研究の最前線」京都.
12. Kanai, A. (2011). Systematic analysis of non-coding RNAs and their regulatory proteins. 大阪大学蛋白質研究所および iFReC (免疫学フロンティア研究センター) 合同セミナー (Multilevel Systems Biology: Genomes, Structures, and Networks) 大阪.
13. Kanai, A. (2011). Evolution of disrupted transfer RNA genes and their introns in Archaea. 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム「A new frontier of computational analysis of functional RNAs」横浜.

原著論文

1. Fujishima, K., Sugahara, J., Tomita, M. & Kanai, A. (2010). Large-scale tRNA intron transposition in the archaeal order Thermoproteales represents a novel mechanism of intron gain. Mol. Biol. Evol. **27**: 2233-2243.
2. Fujishima, K. & Kanai, A. (2011). Diversity, function and processing of archaeal non-coding RNAs. in "*Archaea: Structure, Habitats and Ecological Significance*" Nova Science Publishers, Inc. New York. pp. 69-94.
3. Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G.-J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., Takai, K. & Takami, H. (2011). Insights into the evolution of archaea and eukaryotic protein modifier systems reveled by the genome of a novel archaeal group. Nucleic Acids Res. **39**: 3204-3223.
4. Fujishima, K., Sugahara, J., Miller, C.S., Baker B.J., Di Giulio, M., Takesue, K., Sato, A., Tomita, M., Banfield, J.F. & Kanai, A. (2011). A novel three-unit tRNA splicing endonuclease found in ultrasmall archaea possesses broad substrate specificity. Nucleic Acids Res. **39**: 9695-9704.
5. Sato, A., Soga, T., Igarashi, K., Takesue, K., Tomita, M. & Kanai, A. (2011). A GTP-dependent RNA 3'-terminal phosphate cyclase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Genes Cells **16**: 1190-1199.
6. Hamashima, K., Fujishima, K., Masuda, T., Sugahara, J., Tomita, M. & Kanai, A. (2012). Nematode-specific tRNAs that decode an alternative genetic code for leucine. Nucleic Acids Res. **40**: 3653-3662.
7. Murakami, S., Fujishima, K., Tomita, M. & Kanai, A. (2012). Metatranscriptomic analysis of microbes in an ocean-front deep subsurface hot spring reveals novel small RNAs and type-specific tRNA degradation. Appl. Environ. Microbiol. **78**: 1015-1022.
8. Sugahara, J., Fujishima, K., Nunoura, T., Takaki, Y., Takami, H., Takai, K., Tomita, M. & Kanai, A. (2012). Genomic heterogeneity in a natural archaeal population suggests a model of tRNA gene disruption. PLoS ONE **7**: e32504.

保存機関に寄託した菌株

なし

謝　辞

本研究は, 公益財団法人発酵研究所の助成により行われました. ここに深く感謝いたします. 本研究の過程で慶應義塾大学先端生命科学研究所のスタッフの皆様及び RNA 研究グループの皆様には, 多くの技術的な支援や議論をいただきました. また, 同研究所の冨田勝所長からは, 素晴らしい研究環境を提供していただきました.

文　献

Baker, B.J., Tyson, G.W., Webb, R.I., Flanagan, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E. & Banfield, J.F. (2006). Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis. Science **314**: 1933-1935.

Billy, E., Wegierski, T., Nasr, F. & Filipowicz, W. (2000). Rcl1p, the yeast protein similar to the RNA 3'-phosphate cyclase, associates with U3 snoRNP and is required for 18S rRNA biogenesis. EMBO J. **19**: 2115-2126.

Brooks, M.A., Meslet-Cladiere, L., Graille, M., Kuhn, J., Blondeau, K., Myllykallio, H. & van Tilbeurgh, H. (2008). The structure of an archaeal homodimeric ligase which has RNA circularization activity. Protein Science **17**: 1336-1345.

Chakravarty, A.K., Subbotin, R., Chait, B.T. & Shuman, S. (2012). RNA ligase RtcB splices 3'-phosphate and 5'-OH ends via covalent RtcB-(histidinyl)-GMP and polynucleotide-(3')pp(5')G intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**:

6072-6077.

Chan, P.P., Cozen, A.E. & Lowe, T.M. (2011). Discovery of permuted and recently split transfer RNAs in Archaea. Genome Biology **12**: R38.

Desai, K.K. & Raines, R.T. (2012). tRNA ligase catalyzes the GTP-dependent ligation of RNA with 3'-phosphate and 5'-hydroxyl termini. Biochemistry **51**: 1333-1335.

Englert, M., Sheppard, K., Aslanian, A., Yates, J.R., 3rd. & Soll, D. (2011). Archaeal 3'-phosphate RNA splicing ligase characterization identifies the missing component in tRNA maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**: 1290-1295.

Fujishima, K., Sugahara, J., Kikuta, K., Hirano, R., Sato, A., Tomita, M. & Kanai, A. (2009). Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**: 2683-2687.

Fujishima, K., Sugahara, J., Tomita, M. & Kanai, A. (2008). Sequence evidence in the archaeal genomes that tRNAs emerged through the combination of ancestral genes as 5' and 3' tRNA halves. PLoS One 3, e1622.

Hirata, A., Fujishima, K., Yamagami, R., Kawamura, T., Banfield, J.F., Kanai, A. & Hori, H. (2012). X-ray structure of the fourth type of archaeal tRNA splicing endonuclease: Insights into the evolution of a novel three-unit composition and a unique loop involved in broad substrate specificity. Nucleic Acids Res. **40**: 10554-10566.

Itoh, T., Suzuki, K., Sanchez, P.C. & Nakase, T. (1999). *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**: 1157-1163.

Kanai, A., Sato, A., Fukuda, Y., Okada, K., Matsuda, T., Sakamoto, T., Muto, Y., Yokoyama, S., Kawai, G. & Tomita, M. (2009). Characterization of a heat-stable enzyme possessing GTP-dependent RNA ligase activity from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. RNA **15**: 420-431.

Kleiman, L. (2002). tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. IUBMB life **53**: 107-114.

Maruyama, S., Sugahara, J., Kanai, A. & Nozaki, H. (2010). Permuted tRNA genes in the nuclear and nucleomorph genomes of photosynthetic eukaryotes. Mol. Biol. Evol. **27**: 1070-1076.

Popow, J., Englert, M., Weitzer, S., Schleiffer, A., Mierzwa, B., Mechtler, K., Trowitzsch, S., Will, C.L., Luhrmann, R., Soll, D., *et al.* (2011). HSPC117 is the essential subunit of a human tRNA splicing ligase complex. Science **331**: 760-764.

Randau, L., Munch, R., Hohn, M.J., Jahn, D. & Soll, D. (2005). *Nanoarchaeum equitans* creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. Nature **433**: 537-541.

Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, M., Kawamura, F. & Sekine, Y. (2007). Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. Science **318**: 450-453.

Sugahara, J., Fujishima, K., Morita, K., Tomita, M. & Kanai, A. (2009). Disrupted tRNA gene diversity and possible evolutionary scenarios. J. Mol. Evol. **69**: 497-504.

Sugahara, J., Kikuta, K., Fujishima, K., Yachie, N., Tomita, M. & Kanai, A. (2008). Comprehensive analysis of archaeal tRNA genes reveals rapid increase of tRNA introns in the order Thermoproteales. Mol. Biol. Evol. **25**: 2709-2716.

Sugahara, J., Yachie, N., Sekine, Y., Soma, A., Matsui, M., Tomita, M. & Kanai, A. (2006). SPLITS: a new program for predicting split and intron-containing tRNA genes at the genome level. In Silico Biology **6**: 411-418.

Torchia, C., Takagi, Y. & Ho, C.K. (2008). Archaeal RNA ligase is a homodimeric protein that catalyzes intramolecular ligation of single-stranded RNA and DNA. Nucleic Acids Res. **36**: 6218-6227.

IFO Res.Commun. 26
149-157, 2012

担子菌類ハラタケ亜門の再分類に基づく真菌メタゲノム解析の基盤構築: Trichosporonales 目を用いた菌類再分類モデルの開発

高 島 昌 子

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室
〒351-0198 和光市広沢2－1

Development of a platform contributing to fungal metagenome analyses: a case study based on the reclassification of species in the order Trichosporonales, Agaricomycotina, Basidiomycota

Masako Takashima

Microbe Division / Japan Collection of Microorganisms RIKEN BioResource Center
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan.

In spite of the fact that fungus acts as an important component in the environment, the analysis of fungal metagenome unquestionably lags behind that of bacteria. DNA-based studies are now increasing and yet-unidentified diversity of yeasts or fungi is gradually being disclosed; however, there are still serious problems in the classification system of yeasts or fungi, because some of these genera are completely polyphyletic. Under these circumstances, identification of yeasts and the measurement of their diversity at the level of genus or even higher taxonomic rank remain difficult. In this study, we sought to establish the genus level definition using whole genome data in order to resolve the taxonomic problem, and to develop a platform contributing to fungal metagenome analyses.

Draft genomes of 13 selected species in the order Trichosporonales were determined using 454 FLX and/or illumina next generation sequencer. After the de novo assembly, auto annotation was carried out using MiGAP (http://www.migap.org/index.php/en). In the case of *Trichosporon asahii* JCM 2466, 1671 contigs (average length 16,652 bp) were obtained, the genome size was around 24 Mb, and 9,711 CDS regions were identified. For other species, 905-6957 contigs were obtained after the draft genome analyses by illumina. A blast search was performed against the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genomes, and 59 CDSs that showed high identity values were selected. Fifty-nine phylogenetic trees based on these CDSs showed that species consisting of a clade with high bootstrap value in a D1/D2 LSU rRNA gene tree were also included in the same cluster, and that each of the 8 clades in the Trichosporonales should be treated as a distinctive genus. These will be assigned as respective genera after confirming the genus level definition.

Key words: draft genome, yeast, systematics, fungal metagenome, Trichosporonales

緒　言

微生物（細菌，アーキア，真菌等）は，環境中に多く存在するため，微生物を知ることは環境を知ることに直結すると断じてよいほど環境科学において重要な位置を占める．また，これらの中にはバイオエンジニアリング等に有用な株もあると推定され，重要な遺伝子資源である．それにもかかわらず，菌類のメタゲノム解析はバクテリアのそれに比べて致命的に遅れている．その2大要因として，①レファレンスとなるゲノムデータが少ないこと，および②「分類体系に問題のある部分が多い」ため，「どの群の菌類」が機能しているのか推定できないこと，が考えられる．

「レファレンスとなるゲノムデータの少なさ」については，例えば，本課題申請時において，細菌・アーキアでは

E-mail: masako@jcm.riken.jp
共同研究者：杉田 隆（明治薬科大学・微生物学教室），眞鍋理一郎（独立行政法人理化学研究所・オミックス基盤研究領域），大熊盛也（独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター・微生物材料開発室）
研究協力者：菅原秀明（国立遺伝学研究所・生命情報 DDBJ研究センター），大山 彰（インシリコバイオロジー（株））

700種の解析が行われていたのに対し，菌類では80種（モデル生物やヒトおよび植物の病原菌が中心）であった．現在では，菌類においてもドラフト配列を含め公開されているデータは200種を超えているが，バクテリア（種の数：1万1千種）では'Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea'（http://www.jgi.doe.gov/ programs/ GEBA/）などの各種プロジェクトが進行中であり，種の数（菌類は7万）に対するゲノム解析率の差は広がる一方である．

2番目の「分類体系の不備」に関しては，現在の菌類の分類体系は系統関係を反映していない部分が多く，特にアナモルフの属（例：*Candida, Cryptococcus, Rhodotorula*）では，1つの属がその目（order）の中の複数の系統枝に散らばって存在したり，あるいは目の境を越えて複数の目にわたって存在している，というのが現実である．即ち，既知の種と同定された株以外の新規株では，属レベルの帰属が難しく，結果として，環境中の「どのような属が」「どのような菌群が」役割を果たしているか等，群集としての役割を認識することが不可能な状態にある．

我々は平成19－21年度の（財）発酵研究所の特定研究（酵母班）において，利尻島と西表島のサンプルから，約1000株の酵母を分離・簡易同定し，分離株中に200種以上の種が含まれ，そのうち100種以上が新種であることを報告した（高島，2010）．これら新種候補は子嚢菌系酵母（Saccharomycotina）および担子菌系酵母（Agaricomycotina, Pucciniomycotina, および Ustilaginomycotina）の系統的に広い範囲にあるものの，現在の分類体系の下では，多くは *Candida, Cryptococcus, Rhodotorula* という属名であらわすしか方法がない．我が国のみならずグローバルな観点で菌類の多様性を示すためには，そしてそれを共通の認識として共有するためには，種レベルだけではなく，属以上のレベルの分類体系の再構築は「必須」のものである．

系統関係を反映した分類体系の再構築のためには，「信頼性の高い系統樹」と識別のための「表現型」が必要である．系統樹の作成には，菌類においても細菌やアーキアと同様に，rRNA遺伝子が最もよく用いられているが，一種類の遺伝子では系統樹の基部に近い部分等では高いブーツストラップ値が得られず，クラスターとしての信頼度が高くない場合が多い．近年では，多遺伝子解析（multi locus sequence analysis, MLSA）が個々の系統枝の信頼性を高める方法として用いられており，NSFのファンドによるAssembling the Fungal Tree of Life（AFTOL, <aftol/org/>）プロジェクト（第一期プロジェクト）では，rRNA遺伝子を含む数個の遺伝子が用いられた．これに参加した子嚢菌系酵母では，テレオモルフの分類に関してこの結果に基づく再分類が行われ，その成果は2011年に発行された酵母分類学の成書The Yeasts, A Taxonomic Study第5版（Kurtzman *et al.*, 2011, 以下，The Yeasts第5版）にも反映された．一方，これとは別にmulti locus sequence typing（MLST）では，塩基配列そのものがタイピングのツールとして，同一種内もしくは近縁種を識別するために用いられている．

そこで我々は，①属の範囲を示すのに十分な信頼性の高い系統樹を作成，および②属レベルの識別ができるマーカープライマーの開発と検証により，それぞれの属を定義し識別することを考え，そのモデル系（ゲノム分類モデル系）を構築することを最終の目的として本課題を設定した．具体的には，子嚢菌系酵母に比べて問題が多い担子菌系酵母の中からハラタケ亜門を選び，その中でモデル系の開発を行う事とした．

本研究で対象とする菌群の選定にあたり，以下のことを条件とした：①適度な大きさのグループであり，②必要とする株が入手可能であること（糸状菌は標本や線画により命名基準（type）が保存されているため，type由来の株やこれに類する分類学の研究に必要なauthenticな株が存在しない場合がある），および③グループ内にコドンの読み替えがない．この結果，Trichosporonales目とMalasseziales目を候補としたが，培養の容易さと表現型の情報の豊富さからTrichosporonales目を選択した．Trichosporonales目においては，ゲノム解析された株がないため，ゲノム解析から出発することとした．なお，系統樹については，遺伝子を20個用いた系統樹では，ゲノム全体に基づく系統樹と同じ結果が得られたというRokas *et al.* (2003) に従い，20個の遺伝子を用いて系統樹を作成することを目標とした．

実験方法

供試菌株と DNA の調製　当初，代表的1株についてドラフトゲノム解析を行い，そのデータを基に *Cryptococcus neoformans* 等他の担子菌類のデータと合わせてプライマーを作成することを計画したが，効率のよいドラフトゲノムの取得方法（使用する次世代シーケンサーの機種をかえるなど）についても検討することが必要と考え，合計13株のドラフトゲノム解析を行った．供試する株は，rRNA遺伝子に基づく系統樹の各系統枝の代表株を中心に選び（Fig. 1），独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（Japan Collection of Microorganisms, JCM）から入手した．ゲノム解析用DNAはTakashima & Nakase (2000) に従い調製した．

ドラフトゲノム解析　本課題を開始した当初，Trichosporonales 目に近縁でゲノム配列が入手可能な種は *Cryptococcus neoformans* および *C. gattii* のみ（完全長配列は *C. neoformans*（Loftus *et al.* 2005）のみ）で，その大きさは約 20 Mb であった．本目の菌株には，核型解析等ゲノムサイズが推測できるデータが存在しないため，ゲノムの解析量を試算するにあたっては，これをベースとして行った．10倍以上のカバレッジでのドラフトゲノム解析を行うため，最初の 1 株は Roche 454FLX シーケンサーを使用した．具体的には，当該株から抽出した精製 DNA を用いてシーケンス用鋳型を調製し，454FLX シーケンサーにより 400 塩基長内外のリード配列を得，これを 454 シーケンサーの de novo assembly プログラム GS De Novo Assembler によりつなぎ，全ゲノムドラフト配列を作成した．他の株については illumina シーケンサーを用いた．シーケンシングは，454FLX および illumina ともにシングルエンドで行った．

自動アノテーションとマーカー候補遺伝子の抽出　ドラフトゲノム配列を MiGAP（http:// www. migap. org/）により自動アノテーションの後，IMC（インシリコバイオロジー（株））を用いてマーカー候補遺伝子を抽出した．具体的には，*C. neoformans, C. gattii* および *T. asahii* の 3 株の CDS 領域をカバレッジとアイデンティティーを60から 80% まで変えて共通の CDS を検索した．次に，*C. neoformans* の *C. gattii* とアイデンティティーが高い（98% 以上）ものから，CDS の長さや含有されるイントロン数を指標に，マーカー候補遺伝子を選択し

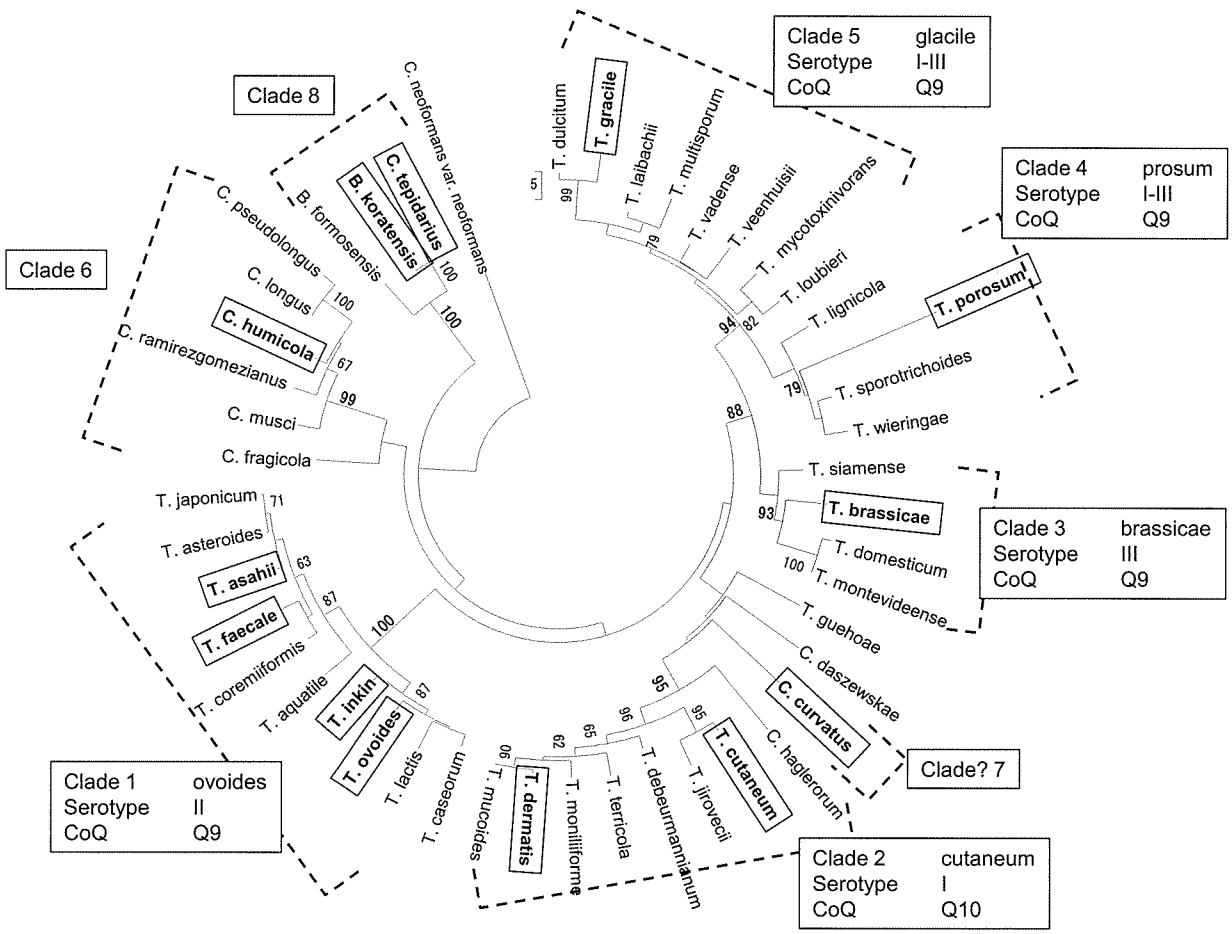


Fig. 1 Phylogenetic tree of species in the order Trichosporonales based on the D1/D2 domain LSU rRNA gene.
The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to each branch (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the number of differences method (Nei & Kumar, 2000) and are in units of the number of base differences per sequence. Clade name and data of serotype and CoQ were obtained from Sugita (2011). Boxed species were used for genome analyses.

た．その後，*T. asahii* 以外の種についても相同性検索により当該領域のCDS配列を得た．比較には，*C. neoformans* var. *grubii* JEC21 (PRJNA10698) および *C. gattii* WM276 (PRJNA13692) をデータベースからダウンロードして使用した．

系統樹の作成　得られたCDS配列をMEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) の中のClustal W (Thompson *et al.*, 1994) によってアラインメントの後，目視によって修正をおこなった．CDS配列が得られない株があった場合は，その株は除いて系統樹を作成した．ギャップを除いたのち，遺伝学的距離はZuckerkandl & Pauling (1965) に従って計算し，Neighbor-joining法（Saitou & Nei, 1987）により系統樹を作成した．枝の信頼性の検定にはブートストラップ法（Felsenstein, 1985）を用いた．

結果と考察

対象とする菌群の選択について　Trichosporonales目は，上記に述べた選択基準を満たしており，18S rRNA遺伝子の遺伝距離から推定するとSaccharomycotina亜綱（子嚢菌系酵母）とほぼ同じ範囲の大きさを有する．GC含量はSaccharomycotina亜綱が34－62%であるのに対し，Trichosporonales目では55－63%でその差も少なく，コドン使用も同一である（Sugita & Nakase, 1999）ため，DNAベースの解析が容易であり，モデル系として優れていると思われる．また本菌群には以下の通り様々な活性を有する菌株が存在する：深在性トリコスポロン症および夏型過敏性肺炎の主要な起因菌あるいは原因抗原である *Trichosporon asahii*，マイコトキシンを分解する *T. mycotoxinivorans*，パルプから分離の *T. lignicola*，セルラーゼを産生する *Cryptococcus humicola* および *C. pseudolongus* 等である．これに加えて，Trichosporonales目の菌群は，表現性状データから一般に，α-およびβ-グルコシド，α-およびβ-ガラクトシド，β-フルクトシド，ペントース類，グルコン酸類，アミン類，アルコール類，芳香族および脂肪族化合物類を資化することができるため，各種代謝経路の解明に，また機能遺伝子をターゲットとしたメタゲノム解析に貢献すると推定できる．

ドラフトゲノム解析および自動アノテーション　Table 1にドラフトゲノム解析および自動アノテーションの結果を示した．代表株とした *T. asahii* JCM 2466では，454FLXを用いて平均冗長度約15倍の配列データの解析を行い，de novo assemblyの結果，1,671個のcontigを得た．他の12株はilluminaによって解析し，905～6,957個のcontigを得た．ゲノムサイズは *T. asahii* は約24 Mbで，他の種もほぼ同様であったが，*T. ovoides* は他より大きかった．ゲノム解析の冗長度から推定して，本解析は飽和していると思われるが，本目においては，核型解析等ゲノムサイズを推定できるデータは未だ報告されていないため，今後，検証が必要である．

自動アノテーションの結果，*T. asahii* JCM 2466では9,711個のCDSが同定された．これは完全長配列である *C. neoformans* var. *grubii* の6,594遺伝子，およびほぼ完全長の *C. gattii* の6,208遺伝子の約1.5倍であることから，一つの遺伝子が複数のcontigに存在していることが予測される．またこの結果は他の12株でも同様であり，ゲノムデータの精度を上げるためには，さらなる解析が必要である．

尚，次世代シーケンサーのうち，illuminaによる解析は，454FLXに比べてリード長が短いため（100塩基長），解析が浅くなりcontig数は多くなると予測したが，本結果ではFLXによる解析と遜色ない結果が得られた．

マーカー候補遺伝子の抽出　自動アノテーション結果を基に，IMCを用いて *T. asahii*，*C. neoformans* var. *grubii* および *C. gattii* の3者間の比較を行うため，カバレッジおよびアイデンティティを60から80%と段階的に変えてベン図を作成した．いずれのカバレッジ値においても，*C. neoformans* と *C. gattii* 間ではアイデンティティを60%から80%に上げた場合，共通CDS数に大きな減少はなかった．一方，*T. asahii* を加えた3者間では，アイデンティティ80%の場合の共通CDS数は60%の場合の1/5以下となり，極めて大きな差があった（Table 2）．この結果から *T. asahii* JCM 2466のドラフトゲノム配列は，当初の推定通り，*C. neoformans* や *C. gattii* と大きく異なっていることが示された．

C. neoformans と *C. gattii* は現在は別の種とされているが，過去には同じ種として扱われていた極めて近縁な種である．本課題の目的である属レベルを識別する遺伝子は，同じ属内では保存されていることが必要でため，3者間の比較でカバレッジ60%，アイデンティティ60%で抽出された1,234個のCDSのうち，*C. neoformans* と *C. gattii* の間のアイデンティティが98%以上の238個のCDSを第一段マーカー遺伝子候補とした．その後，*T. asahii* を加えた3者間で，CDS長やイントロンの有無とその数を目視で比較し，プライマーの設定を行いやすいことを考慮して59個のCDSを選んだ．これらの59のほとんどはオーソログ遺伝子であった（Fig. 2）．この59の *T. asahii* のデータを基本とし，他の12株に対して相同性検索を行い，当該領域のCDS配列を得た．

CDS 配列に基づく系統樹による各クレードの評価
CDS 毎にアラインメントの後，系統樹を作成し，LSU rRNA 遺伝子の D1/D2 領域に基づく系統樹（Fig. 1）と，クレード(clade)内および clade 間のトポロジーを比較した．本系統樹の 8 つの clade のうち，clade 1 から clade 5 はすべて *Trichosporon* 属の種から形成されており，clade の名称等は The Yeasts 第 5 版（Sugita, 2011）に従った．Clade 6 から clade 8 は *Trichosporon* 属以外の属（*Bullera* 属および *Cryptococcus* 属）から構成されている．尚，Fig. 1 において，*C. curvatus*，*C. daszewskae*，および *T. guehoae* は近縁であるように見えるが，ブーツストラップ値は低く，また系統樹作成法等によって後者は clade 2 に含まれる場合もあることから，ここでは *C. curvatus* のみを clade 7 とした．

Table 1 Summary of draft genome sequences and auto-annotation in this study

Strain	JCM no.	# Contigs	All bases	N50 contig	Longest contig	Average length	# CDS
T. asahii	2466^T	1,671	24,277,140	30,281	167,526	11,652	9,711
T. brassicae	1599^T	1,522	23,525,625	29,317	121,557	15,457	7,798
T. cutaneum	1462^T	5,103	22,415,634	8,011	73,485	4,392	9,901
T. dermatis	11170^T	2,120	23,239,303	21,577	210,233	10,961	9,011
T. faecale	2941^T	1,294	24,457,826	37,890	197,193	18,900	9,175
T. gracile	10018^T	3,389	23,932,376	14,584	124,998	7,061	9,089
T. inkin	9195^T	5,051	19,526,276	11,709	97,593	3,865	7,645
T. ovoides	9940^T	6,957	39,462,962	16,012	227,351	5,672	15,249
T. porosum	1458^T	3,046	25,874,919	19,237	112,559	8,494	9,764
B. koratensis	12878^T	1,899	25,067,473	24,882	137,381	13,200	9,547
C. curvatus	1532^T	905	18,140,082	43,419	229,415	20,044	6,878
C. humicola	1457^T	5,695	22,067,017	8,035	88,277	3,874	9,267
C. tepidarius	11965^T	3,982	22,075,599	9,432	53,993	5,543	7,235

T., Trichosporon; B, Bullera; C. Cryptococcus
^{T}, type strain

Table 2 Number of shared CDSs among *Trichosporon asahii, Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*

Coverage	Identity	No. of shared CDSs among the three species	No. of shared CDSs between *C. neoformans* and *C. gattii*
60	60	1234	5321
	70	599 (49%)	5176 (97%)
	80	209 (17%)	4668 (88%)
80	60	1178	5283
	70	574 (49%)	5130 (98%)
	80	197 (17%)	4630 (88%)

まず，rRNA遺伝子に基づく系統樹において，同一cladeを形成する種は他の遺伝子を用いてもクラスターを作るかどうか確認した（対象：clade 1, 2, および8）．Clade 1では，本clade内のCDSデータがすべて得られた54中53の系統樹で *T. asahii* は *T. faecale* と最も近縁で，さらに *T. inkin* と *T. ovoides* の4種でクラスターを形成した．残りの1つもブーツストラップ値は50%に満たなかったが系統枝を形成した．Clade 2では，本clade内のCDSデータがすべて得られた55中54の系統樹で *T. cutaneum* と *T. dermatis* は系統枝を形成し，残りの1つもブーツストラップ値は50%に満たなかったが系統枝を形成した．Clade 8では，本clade内のCDSデータがすべて得られた52の系統樹すべてで系統枝を形成した．この結果から，rRNA遺伝子に基づく系統樹において同一clade内の種は，他の遺伝子を用いても極めて高い比率で系統枝を形成したといえる．

次に，ブーツストラップ値の高いclade間（clade 3, 4, および5）について，rRNA遺伝子に基づくトポロジーが再現するかどうかを見た．CDSデータがすべて得られた55の系統樹について確認したところ，rRNA遺伝子に基づく系統樹と同じトポロジー（(clade 4 : clade 5) : clade 3）を示したのは1系統樹であり，ブーツストラップ値も低かった．一方，*T. brassicae* と *T. gracile* が先にクラスターを形成する（(clade 3: clade 5) : clade 4）が29系統樹（ブーツストラップ値が低いものも含む），((clade 3 : clade 4) : clade 5）は1系統樹で，24個（44%）の系統樹でclade 3-4-5は系統枝を形成しなかった．本結果から，clade 3-4-5はrRNA遺伝子に基づく系統樹ではブーツストラップ値が高く，またcladeを特徴づけるCoQ（すべてのcladeでQ-9）および血清型（clade 3はIII型，clade 4および5はI-III型）が似ているため，単系統の可能性が推定されたが，rRNA遺伝子に基づく系統樹を再現したとはいえず，各々独自のグループであると推定された．尚，本実験においては各cladeから1株ずつしか選んで行っていないため，供試株を増やしての検証が必要である．

Trichosporonales目全体としては，clade 8は85%（50/59）の系統樹で *Trichosporon* 属の基準種を含むclade 1と別クラスターとなった．Clade 7はrRNA遺伝子に基づく系統樹ではブーツストラップ値が低く，どのcladeと系統枝を形成するか不明であったが，本解析においては45%（25/55）でclade 2と系統枝を形成した．また，clade 6は87%（48/55）の割合でclade 8を除くクラスターに入ったが，その位置はまちまちであった．

以上の結果から，clade 1から8はそれぞれ独自のグループ（属）として考えるのが妥当であり，clade 1は *Trichosporon* 属の基準種である *T. ovoides* が含まれることからこれを *Trichosporon* 属とし，clade 2から8はそれぞれ別の属とするのが妥当であると結論した．*C. humicola* を含むclade 6については，すでに本種を基準株として *Vanrija* 属（Moore, 1980）および *Asterotremella* 属（Prillinger *et al.*, 2007）が提唱されている．属名としては *Vanrija* に優先権があるが，*Vanrija* 属提唱時に本属に含まれるとされた種は分子系統学的には多系統であるため，今後属の定義を明確にすることが必要である．また，clade 8に関しては近縁に *Cryptotrichosporon* 属（Okoli *et al.*, 2007）が提唱されているため，この属との識別も含めた検討が必要である．

59遺伝子は属の指標候補に適当か？　抽出したマーカー候補遺伝子が属レベルの指標として適当かどうかを考察するため，遺伝子毎にTrichosporonales目内の平均遺伝距離を計算し，その分布を調べた．59遺伝子の間ではp-distanceが0.075から0.175の間のものが多く66%を占めた（Fig. 3）．

現在までに菌類の多遺伝子解析に用いられている遺

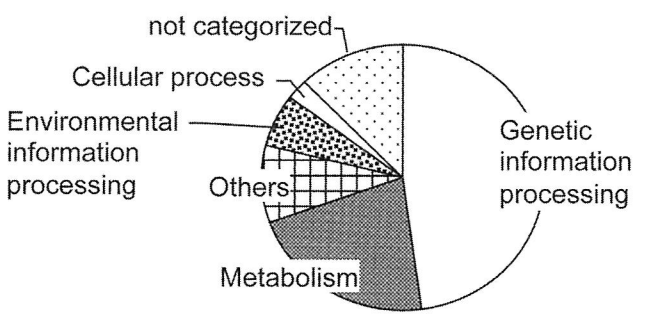


Fig. 2　59CDSs used in this study
The CDSs were categorized according to the Microbial Genome Database for Comparative Analysis (http://mbgd.nibb.ac.jp/).

伝子と比較すると，AFTOL（第一期）プロジェクトで使用された遺伝子（Translation elongation factor1，RPB2，tubulin）のTrichosporonales目内平均遺伝距離はそれぞれ0.057，0.1，0.023であり，今回抽出したCDS領域より保存性が高い．これらの遺伝子を使用したAFTOLの報告は，目レベルのデータの整理にとどまっている（Hibbet *et al.*, 2007）．一方，主に疫学調査等の目的で種内の多様性解析に用いられているMLSTの遺伝子について調べると，種によって使用されている遺伝子は異なるものの，*C. albicans* と *C. neoformans* で使用されている遺伝子を見た場合，Trichosporonales目内平均遺伝距離は0.15以上で大きいものでは0.4を超えるものもあった．本課題により抽出した遺伝子は，AFTOL遺伝子よりも多様性が大きく，かつMLST遺伝子よりも保存性が高いことから，属レベルのマーカー遺伝子候補として適当であると思われる．

Clade 2から8を属として明確に定義するため，今後，これらの遺伝子の塩基配列を取得，cladeを特徴づける配列からマーカー候補を設計し，ゲノム配列を決定していない株を使用して（約30株）検証することを予定している．また，遺伝子そのものの配列と位置を確認するため，現在，*T. asahii* および *T. faecale* のmRNAの配列を決定中であり，既に得られているドラフトゲノムにマッピングすることを予定している．これにより，本目の中の属の再定義・再分類を行い，モデルとして発展させることができる．

国際植物命名規約の改訂が菌類の分類に与える影響とそれに対する本研究の寄与　菌類が従っていた国際植物命名規約（International Code of Botanical Nomenclature）は“国際藻類・菌類・植物命名規約”（International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants）と改称され，2012年1月1日より，ラテン語または英語による新種記載が可能となり（実質的には今まで必須であったラテン記載が必要でなくなる），電子出版も有効と認められるようになった．また，2013年1月1日からは新学名は認定された登録機関への登録が必要となるなど，変更点が多い．この中で特に酵母を含む菌類の分類について影響が大きいと思われるのは，高等菌類（子嚢菌類および担子菌類）のみに用いられていた二重命名法が廃止され，統一命名法が採用されたことである．この命名規約に従って，学名のリスト化が行われる予定である（岡田，2011）．

その作業の一環として，*Candida*，*Cryptococcus*，*Rhodotorula* などアナモルフ酵母は，多くがテレオモルフと混じって存在するため，真の *Candida* 属，*Cryptococcus* 属，*Rhodotorula* 属は（その属が有効であるかどうかも含めて）どの範囲であるか，またそれ以外の系統枝に位置する種をどの属に帰属させるか，を明確にしていかなければならない．この際，すでに有効な属が定義されていて，その系統枝に属する場合は，当該の属に移すことで対応可能である．しかしながら，まだ属が定義されていないクラスターには，属とするのが適当であるかを確認した上で，新属の提唱を行っていくことが必要である．

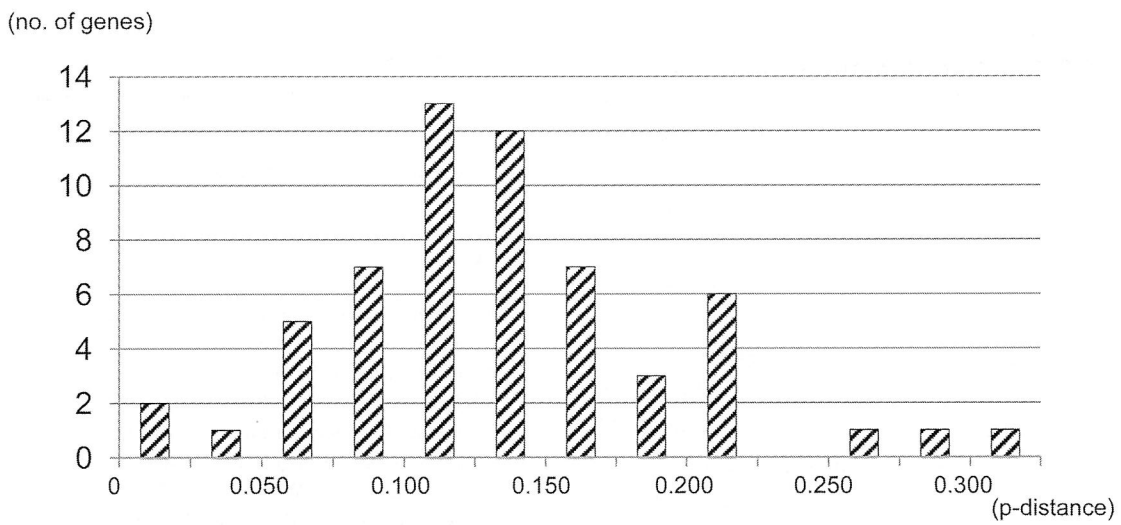


Fig. 3　Distribution of average evolutionary divergence value of genes used in this study
The number of amino acid substitutions per site from averaging overall sequence pairs is shown.
Analyses were conducted using the Poisson correction model (Zuckerkandl & Pauling, 1965).

さらに，系統樹で高いブーツストラップ値が得られない，系統樹の基部に近い場所や，他と系統的に離れて出現している株に対しては，また別の対応が必要であると推定する．一方，「属」の範囲を規定する指標としては，従来から形態学的指標と化学分類学的指標が主に用いられており，これらが系統関係に必ずしも対応していないことは明らかとなっている．属の範囲を定義するために，新しい指標の導入が必要なのは自明である．

本課題においては，rRNA遺伝子以外の遺伝子（CDS領域のアミノ酸配列）を用いて，推定される各cladeの単系統性について論じることを試みた．今後さらに発展させ，他の表現型を考慮しつつ，ゲノムデータ（関連するオミックスデータを含む）をTrichosporonales目の再分類に導入してゆくことにより，本目をモデルとして他の分類群にも波及させていく予定である．また，未だ分離されていない株やDNAレベルだけで確認できる株についても，その存在を確認し，周知するための方法を確立することができれば，メタゲノム解析への道が大きく開けると思われる．

昨年，JGI DOEのサポートにより1000 Fungal Genomes Project（http://1000.fungalgenomes.org/ home/）の開始が発表された．本課題の成果がこのようなプロジェクトに貢献することも視野にいれて，今後再分類を行っていく予定である．

要　約

真菌類は，環境中の重要な一大構成要素であるにも関わらず，メタゲノム解析は細菌に比べて決定的に遅れている．その原因の一つは，各種サンプルからシーケンスデータを得ても，分類体系の不備により既知種以外は帰属を明確にできない場合が多いため，環境中の「どの菌群が」役割を果たしているか等，全体としての把握を行うことが困難な状態であることに因る．そこで問題を多く含む分類群の分類体系の再構築を通して，環境中の重要な一大構成要素である真菌類のメタゲノム解析の基盤構築を行うため，本研究は分類体系再構築のためのゲノム解析・モデル作成を行うことを目的とした．

Trichosporonales目（Tremellomycetes綱，ハラタケ亜門，担子菌門）に位置する13株からDNAを調製し，次世代シーケンサーを用いて解析，de novo assemblyによりドラフトゲノム配列を得た．MiGAPにより自動アノテーションの後，系統解析に使用する遺伝子配列はIMCを用いて抽出した．

代表株とした*T. asahii* JCM 2466では，平均冗長度約15倍の配列データの解析を行いde novo assemblyの結果，1,671個のcontigを得た（ゲノムサイズは約24 Mb）．他の12株は905～6,957個のcontigを得た．担子菌酵母*Cryptococcus neoformans*および*C. gattii*のゲノムデータを参考に，属識別のためのマーカー候補遺伝子として59個のCDSを選択し，相同性検索により，各ドラフトゲノムから当該領域を抽出，CDS毎の系統樹を作成した．rRNA遺伝子に基づく系統樹と比較したところ，ブーツストラップ値の高い各clade内は同じclade内に入った．今回比較したTrichosporonales内の8つのcladeはすべて別個の属とするのが妥当と判断し，今後属として提唱していく予定である．

本助成で得られた研究成果の報告

【口頭発表】

高島昌子．医真菌学領域におけるMultilocus sequence typing（MLST）の活用．第54回日本医真菌学会学術集会，2010年10月，東京，要旨集 p. 49.

高島昌子，杉田隆．次世代シーケンサーによる*Trichosporon asahii* JCM 2466のドラフトゲノム解析．第55回日本医真菌学会学術集会，2011年10月，東京，要旨集 p. 106.

Takashima, M., Manabe, R., Sugawara, H., Ohyama, A., Ohkuma, M. and Sugita, T. Phylogeny in the order Trichosporonales based on genome sequence data. Session Basidiomycete systematics, The 13th International Congress on Yeasts, Madison, Aug. 2012 Abstract p.12.

Takashima, M. Current Anamorphic Basidiomycete Genera, Pre-Conference Workshop on Yeast Systematics and Classification, Madison, Aug. 2012.

高島昌子，杉田隆．ドラフトゲノム解析に基づく*Trichosporon*属および関連菌株の系統関係．第56回日本医真菌学会学術集会，2012年11月，東京，要旨集 p.74.

謝　辞

本研究の遂行にあたり，助成していただいた公益財団法人発酵研究所に深く感謝いたします．

文　献

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791.

Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D.,

Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J. & Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol. Res. **111**: 509-547.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds.) 2011. The Yeasts, A Taxonomic Study, 5th edn., Elsevier, Amsterdam.

Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I.J., Fraser, J.A., Allen, J.E., Bosdet, I.E., Brent, M.R., Chiu, R., Doering, T.L., Donlin, M.J., D'Souza, C.A., Fox, D.S., Grinberg, V., Fu, J., Fukushima, M., Haas, B.J., Huang, J.C., Janbon, G., Jones, S.J., Koo, H.L., Krzywinski, M.I., Kwon-Chung, J.K., Lengeler, K.B., Maiti, R., Marra, M.A., Marra, R.E., Mathewson, C.A., Mitchell, T.G., Pertea, M., Riggs, F.R., Salzberg, S.L., Schein, J.E., Shvartsbeyn, A., Shin, H., Shumway, M., Specht, C.A., Suh, B.B., Tenney, A., Utterback, T.R., Wickes, B.L., Wortman, J.R., Wye, N.H., Kronstad, J.W., Lodge, J.K., Heitman, J., Davis, R.W., Fraser, C.M. & Hyman, R.W. 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. Science **307**: 1321-1324.

Moore, R.T. 1980. Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts. Bot. Mar. **23**: 361-373.

Nei, M. & Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

岡田元. 2011. 第18回国際植物学会議 (IBC2011, Melbourne) で採択されたアナモルフ菌類および多型的生活環をもつ菌類の統一命名法. 日本菌学会会報 **52**: 82-97.

Okoli, I., Oyeka, C.A., Kwon-Chung, K.J., Theelen, B., Robert, V., Groenewald, J.Z., McFadden, D.C., Casadevall, A. & Boekhout, T. 2007. *Cryptotrichosporon anacardii* gen. nov., sp. nov., a new trichosporonoid capsulate basidiomycetous yeast from Nigeria that is able to form melanin on niger seed agar. FEMS Yeast Res. **7**: 339-350.

Prillinger, H., Lopandic, K., Sugita, T. & Wuczkowski, M. 2007. *Asterotremella* gen. nov. *albida*, an anamorphic tremelloid yeast isolated from the agarics *Asterophora lycoperdoides* and *Asterophora parasitica*. J. Gen. Appl. Microbiol. **53**: 167-175.

Rokas, A., Williams, B.L., King, N. & Carroll, S.B. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. Nature **425**: 798-804.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. **4**: 406-425.

Sugita, T. 2011. *Trichosporon* Behrend (1890). *In* Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds). The Yeasts, A Taxonomic Study 5th edn. pp. 2015-2061, Elsevier, Amsterdam.

Sugita, T. & Nakase, T. 1999. Nonuniversal usage of the leucine CUG codon in yeasts: investigation of basidiomycetous yeast. J. Gen. Appl. Microbiol. **45**: 193-197.

Takashima, M. & Nakase, T. 2000. Four new species of the genus *Sporobolomyces* isolated from leaves in Thailand. Mycoscience **41**: 357-369.

高島昌子, 日本の亜熱帯域および冷温帯域の酵母相の多様性とその比較. IFO Res. Commun. 24: 157-168, 2010.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher ,G., Nei, M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. **28**: 2731-2739.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **22**: 4673-4680.

Zuckerkandl, E. & Pauling, L. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In* Bryson, V. & Vogel, H.J. (eds). Evolving Genes and Proteins, pp. 97-166. Academic Press, New York.

IFO Res.Commun. 26
159-173, 2012

放線菌ゲノムの再構成による新たな物質生産系の開発

池　田　治　生

北里大学北里生命科学研究所
〒252-0373　神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

Designing of *Streptomyces* host for secondary metabolite production

Haruo Ikeda

Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-0373, Japan

A prominent property of members of the genus *Streptomyces* belonging to the order *Actinomycetales* is the ability to produce numerous secondary metabolites, including antibiotics and other biologically active compounds of proven value in human and veterinary medicine, agriculture, or useful as biochemical tools. These structurally diverse metabolites possess not only antibacterial, antifungal, antiviral and antitumor activity but also antihypertensive and immunosuppressant properties. *Streptomyces* have been a rich source of pharmaceutical compounds in which common cellular intermediates, including amino acids, sugars, fatty acids, and terpenes, are combined to give more complex structures by defined biochemical pathways. Genomic analysis of three species of *Streptomyces, S. avermitilis* MA-4680, *S. coelicolor* A3(2) and *S. griseus* IFO 13350, has revealed that these microorganisms each have a large linear chromosome that harbors over twenty secondary metabolic gene clusters encoding the biosynthesis of polyketides by polyketide synthases (PKSs), peptides by nonribosomal peptide synthetases (NRPSs), bacteriocins, terpenoids, shikimate-derived metabolites, aminoglycosides, and other natural products .

The identification and characterization of biosynthetic gene clusters have proved to be an invaluable tool for the elucidation of the biosynthesis of secondary metabolites and a rich potential source of cryptic metabolites, which appear to be encoded by silent biosynthetic pathways. Controlled genetic engineering of these biosynthetic gene clusters has in certain cases allowed the production of novel analogs by combinatorial biosynthesis. A critical requirement for such applications is the availability of the relevant biosynthetic gene clusters controlling the production of a secondary metabolite of interest as well as appropriate genetic systems for the *in vivo* manipulation of the corresponding genes in heterologous hosts. Furthermore, successful production of the desired products requires an optimum relationship of the timing and flux between primary and secondary cellular metabolism, since all secondary metabolites are ultimately derived from primary metabolic building blocks and require an adequate source of energy and reducing equivalents derived from primary metabolism such as ATP and NAD(P)H.

There has been considerable recent interest in the development of engineered bacterial strains for the efficient heterologous production of secondary metabolites. *S. avermitilis*, which is used for the industrial producer of the important anthelmintic agent avermectin, has already proved to be a highly efficient producer of secondary metabolites. Since this strain is already optimized for the efficient supply of primary metabolic precursors and biochemical energy to support multistep biosynthesis, it is therefore an attractive host for the heterologous production of secondary metabolites. In the presentation, I would like to present the construction of a versatile host for the efficient production of natural products by the controlled minimization of the genome of the *S. avermitilis*.

Key words: genome, heterologous expression, biosynthetic gene, metabolite production, *Streptomyces*

E-mail: ikeda@ls.kitasato-u.ac.jp
共同研究者：小松　護（北里大学北里生命科学研究所）

緒　言

広く土壌に生息する放線菌は，その複雑な形態分化の研究対象であるとともに，抗生物質をはじめとする多くの生物活性物質を生産する微生物として工業的に利用されている重要な産業微生物である．S. A. Waksman によるストレプトマシンの発見から約半世紀におよぶ放線菌からの生物活性物質の探索研究によって，放線菌の物質生産に関する多様性が認識されてはいたが，その生物学的および遺伝学的な検証はゲノム解析が行われるまでは推測の域に留まっていた．ゲノム解析は生物の設計図を明らかにすることであり，特に産業微生物のゲノム解析は物質生産といった極めて複雑な生成過程を理解することのみならず，物質生産を工業レベルにまで効率的に進める手だてや新規化合物創製への糸口を得るといった応用面に関しても重要な情報を得ることが期待できる．

今日，数多くの医薬品が使用されているが，それらのうち抗菌薬，抗真菌薬，抗腫瘍薬，抗寄生虫薬あるいは免疫抑制薬などに放線菌の２次代謝産物が利用されている．これらの物質は１次代謝産物である糖質，アミノ酸，ヌクレオチド，脂肪酸などとは異なり構造が複雑でかつ多様であることが多い．１次代謝と２次代謝の根本的に異なる点は，１次代謝が生育に必須な代謝であるのに対し，２次代謝は生育にとって必須な代謝ではないことである．また，２次代謝は，特定の培養条件下でのみ観察されることが少なくない．微生物における２次代謝の生物学的意義に関しては，ゲノム解析が完了した現在でも明確な回答を得ることはできていない．２次代謝産物は1次代謝産物あるいはこれらから導かれる物質を前駆物質として，さらに１次代謝経路で得られるエネルギーや補酵素を利用して生合成されるが，２次代謝産物の生合成の経路が明らかにされていくにしたがって，１次代謝産物との生合成上の関連も明確になり，極めて複雑，または特異的な構造を有するものであっても１次代謝産物をそのまま，あるいは修飾し，その骨格に組み込みながら生合成が行われていくことが理解できる．放線菌の生産する２次代謝産物は多様な構造を有しているが，これらの化合物も基本的にはいくつかの共通した生合成経路によって合成される．これらは利用される前駆物質（１次代謝産物）によって５つの経路（糖質経路，脂肪酸・ポリケチド経路，アミノ酸経路，シキミ酸経路，メバロン酸および非メバロン酸経路）に分類することができ，各経路単独もしくはこれらが複数組み合わされた経路を経て生合成される．２次代謝産物の生合成の過程では１次代謝産物が前駆物質として利用されるだけではなく，多くのエネルギーや補酵素を消費して２次代謝産物を生成している．このように２次代謝は１次代謝から導かれる前駆物質を材料として，さらに１次代謝で得られるエネルギーや補酵素を効率良く利用して化合物を作りだすという，１次代謝の基盤の上に成り立っている代謝経路である．従って，２次代謝への前駆物質の供給が満たされている１次代謝系が存在する生物に，それに見合う２次代謝系が存在することによって２次代謝産物が安定に生成されるものと理解できる．

２次代謝産物の生合成遺伝子群の詳細な解析は，多様な２次代謝産物の生成過程を理解するだけではなく，その生成過程を人為的に改変することが可能となり，非天然型の２次代謝産物創製への期待がもたれる．また，近年ゲノム解析の革新的な技術進歩によって，10 Mb 以下の微生物ゲノム情報は極めて迅速かつ容易に得ることが可能となってきた．これまで微生物ゲノム解析は病原微生物や極限環境微生物が対象として行われてきたが，今世紀のはじめから産業微生物ゲノム解析が相次いで報告されてきた．*Streptomyces avermitilis* MA-4680, *S. coelicolor* A3(2) および *S. griseus* IFO 13350 のゲノム解析の結果，*Streptomyces* 属菌株のゲノム上には我々の予想を上回る，少なくとも20種以上の生合成遺伝子群の存在が確認されたが，それらのほとんどは休眠状態であると理解されている（Nett *et al.*, 2009）．したがって，これら休眠状態の生合成遺伝子群を人為的に発現させることによって，新たな２次代謝産物の発見が期待できる．人為的な生合成遺伝子群の発現制御や生合成遺伝子群の詳細な解析には遺伝子導入や遺伝子破壊など分子遺伝学的な方法が必須ではあるが，すべての *Streptomyces* 属の菌株でこれらの方法が利用できるわけではない．多くの菌株では DNA の導入すら容易ではなく，全く導入できない場合も少なくない．このような場合，比較的扱いやすくかつ DNA の導入が良好な *Streptomyces* 属宿主を用いた異種発現によって解析を行うことが考えられる．しかしながら，２次代謝産物生合成遺伝子群の異種発現による物質生産といった観点からすると，宿主として使用する菌株は，先にも述べたように前駆物質およびエネルギー供給源である１次代謝と２次代謝との連携，同調性の良好な菌株を利用することが望まれる．

我々が解析を行った抗寄生虫抗生物質エバーメクチンの生産菌 *S. avermitilis*（Burg *et al.*, 1979）は実用に供されている抗生物質生産のための産業微生物では初めてのゲノム解析が行われた菌株である（Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003）．また，その解析結果から２次代謝の多様性を遺伝子レベルで明らかにした最初の例でもある．放線菌は多くの２次代謝産物を生産するという

2次代謝の多様性が注目されるが，もう一つの重要な特徴は，物質生産を安定かつ工業生産レベルにまでに達成させることのできる前駆物質，エネルギーおよび補酵素の供給のための1次代謝系を保有しているということである．*S. avermitilis* は工業的なエバーメクチン生産に利用されており，1次代謝系とそれに引き続く2次代謝への連携，同調性の極めて良好な菌株であると推測できること，さらに同菌株は遺伝子導入，遺伝子破壊などの分子遺伝学的な手法が適用可能な数少ない *Streptomyces* 属菌株の一つでもある．これらのことを考慮に入れ，工業生産に利用されゲノム解析がなされ，かつ分子遺伝的な手法が整備されたエバーメクチン生産菌 *S. avermitilis* をモデルとし，物質生産のための汎用宿主の構築および異種2次代謝産物の生合成遺伝子群の発現および生成について検討を行った．

実験方法

大腸菌の培養方法　形質転換および λ-Red による組換えは大腸菌 DH5α，GM2929*hsdS*::Tn*10*（Ikeda *et al.*, 1998），pKD78 あるいは pKD119 を導入した DB10B および BW25141 を使用した．なお，pKD78 および pKD119 は pKD46（Datsenko & Wanner, 2000）の耐性遺伝子 *bla* を *cat* あるいは *tetA* に交換した誘導体であり，Yale 大学 The Coli Genetic Stock Center（ http://cgsc.biology.yale.edu/）より分与された．これらの大腸菌の培養は LB（トリプトン 10 g，酵母エキス 5 g，塩化ナトリウム 5 g を 1,000 ml の水に溶解し，pH 7.2 に調整後，121℃ で15分間の高圧蒸気滅菌）を用い，抗生物質の選択には上記培地に寒天を 15 g 加えた LA 培地を使用した．また，λ-Red による組換え（Zhang *et al.*, 1998; Datsenko & Wanner, 2000）に用いるコンピテンス細胞の調製は LB 培地で OD_{600}=0.25 程度まで培養した後，L-アラビノース（10 mM～100 mM）を加えて誘導させた．その後，OD_{600} が 0.5 になるまで培養した菌体を用いてエレクトロポレーション用細胞を調製した．

放線菌の培養方法　*S. avermitilis* の野生株（Ikeda *et al.*, 1987）および大規模欠失株（Komatsu *et al.*, 2010）の胞子形成ならびに薬剤耐性選択には YMS^{++} 培地（酵母エキス：Difco 社製 4 g，麦芽エキス：Difco 社製 10 g，可溶性デンプン 4 g を 1,000 ml の水に溶解し，2 N の水酸化カリウムで pH 7.4 に調整後，寒天を 2% になるように添加し，121℃ で15分間の高圧蒸気滅菌，用時，別滅菌した 1 M 塩化マグネシウムおよび 1 M 硝酸カリウムをそれぞれ 10 mM，8 mM となるように添加）を使用した（Ikeda *et al.*, 1987）．*S. avermitilis* のプロトプラストの調製は菌体を P10（ショ糖 103 g，硫酸カリウム 0.25 g，塩化マグネシウム 6 水和物 2.03 g，微量元素溶液（塩化亜鉛 6 水和物 40 mg，塩化第二鉄 6 水和物 200 mg，塩化第二銅 2 水和物 10 mg，塩化マンガン 4 水和物 10 mg，ホウ酸ナトリウム10水和物 10 mg，モリブデン酸アンモニウム 4 水和物 10 mg を 1,000 ml の水に溶かしてフィルターろ過滅菌したもの）2 ml を水 800 ml に溶解し，高圧蒸気滅菌．用時，0.5% リン酸一カリウム 10 ml，3.68% 塩化カルシウム 2 水和物 100 ml，0.25 M MES（2-モルホリノエタンスルホン酸 pH 6.5）100 ml）に懸濁し，さらに 1 mg/mL となるように卵白リゾチームを加え 30℃ およそ45分処理した．生成したプロトプラストの洗浄は P20（P10 のショ糖を 200 g としたもの）を用いた．形質転換はプロトプラストに DNA を加え，さらに 25% ポリエチレングリコール #1,000 を加えることによって行った（Ikeda *et al.*, 1993）．形質転換後のプロトプラストは RM14 培地（ショ糖 200 g，硫酸二カリウム 0.25 g，塩化マグネシウム 6 水和物 10.12 g，グルコース 10 g，カザミノ酸：Difco 社製 0.1 g，L-プロリン 3 g，酵母エキス：Difco 社製 2 g，微量元素溶液 2 ml を水 870 ml に溶解し，オートミール寒天培地：Difco 社製 3 g，寒天 20 g を加え高圧蒸気滅菌．用時，0.5% リン酸一カリウム 10 ml，3.68% 塩化カルシウム 2 水和物 80 ml，0.25 M MES 40 ml を添加）を含む平板に 45℃ に保温した RM14 軟寒天（RM14 の寒天組成を 5 g としたもの）を重層し広げた．30℃ で 15～24 時間保温した後，抗生物質を含む RM14 軟寒天を重層し，30℃ で 5～7 日培養した．

異種生合成遺伝子群を導入した形質転換体の生産は，形質転換体の胞子懸濁液を種培地（グルコース 5 g，脱脂大豆粉 15 g，酵母エキス：Difco 社製 5 g を 1,000 ml の水に溶解し，2 N 水酸化カリウムで pH 7.4 に調整後，121℃ で15分間の高圧蒸気滅菌）に移植後，30℃ で 2 日間振とう培養した．得られた培養液を生産培地（グルコース 60 g，炭酸カルシウム 5 g，塩化ナトリウム 2 g，リン酸水素二カリウム 0.5 g，0.5% 硫酸鉄七水和物 10 ml，0.5% 硫酸亜鉛七水和物 10 ml，0.5% 硫酸マンガン四水和物 10 ml，1% 硫酸マグネシウム七水和物 10 ml，硫酸アンモニウム 2 g，酵母エキス 2 g を 1,000 ml の水に溶解し，2 N 水酸化カリウムで pH 7.0 に調整後，110℃ で10分間の高圧蒸気滅菌）に 1% となるように移植し，28℃ で 3～7 日間振とう培養した（Cane *et al.*, 2006）．それぞれの代謝産物の確認および定量は HPLC によって行った．

生物情報学的解析　生物情報学的な解析は UNIX ワークステーションを用い，BLAST (Altschul *et al.*, 1997), FASTA (Pearson & Lipman, 1988), ClustalW (Thompson

et al., 1994), Mafft (Katoh, 2010), HmmPfam (Finn *et al.*, 2011), Primer3 (Rozen, & Skaletsky, 2000) などのアプリケーションはソースコードをコンパイルしたものを用いた. なおBLASTおよびFASTAで使用したデーターベースは米国NCBI（ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/）よりダウンロードしたnrおよびswissprotを用いた. 各種配列変換などは独自にPerl言語によって作成したスクリプトを用いた.

結　果

完全長2次代謝産物生合成遺伝子群のクローン化

S. avermitilis の大規模欠失株における数種の異種2次代謝産物生合成遺伝子群の発現, および代謝産物の生成を確認している. さらに多くの異種2次代謝産物生合成遺伝子群を導入し, 大規模欠失株の汎用宿主としての評価を行うため, 完全長の2次代謝産物生合成群のクローン化を試みた. ゲノム解析から多くの2次代謝産物生合成遺伝子群を保有すると推測される *S. clavuligerus* ATCC 27065 (Medema *et al.*, 2010) のコスミドライブラリーから数種の生合成遺伝子群, また *S. avermitilis* ではシキミ酸経路から生合成される化合物の生成に関する情報がほとんど無いため, *S. venezuelae* ATCC 10712 のクロラムフェニコールの生合成遺伝子群, さらにプロテアソーム阻害活性を有するラクタシスチンなど10数種の完全長の生合成遺伝子群の単離を行った. *S. clavuligerus* ATCC 27065 の染色体DNAから常法に従

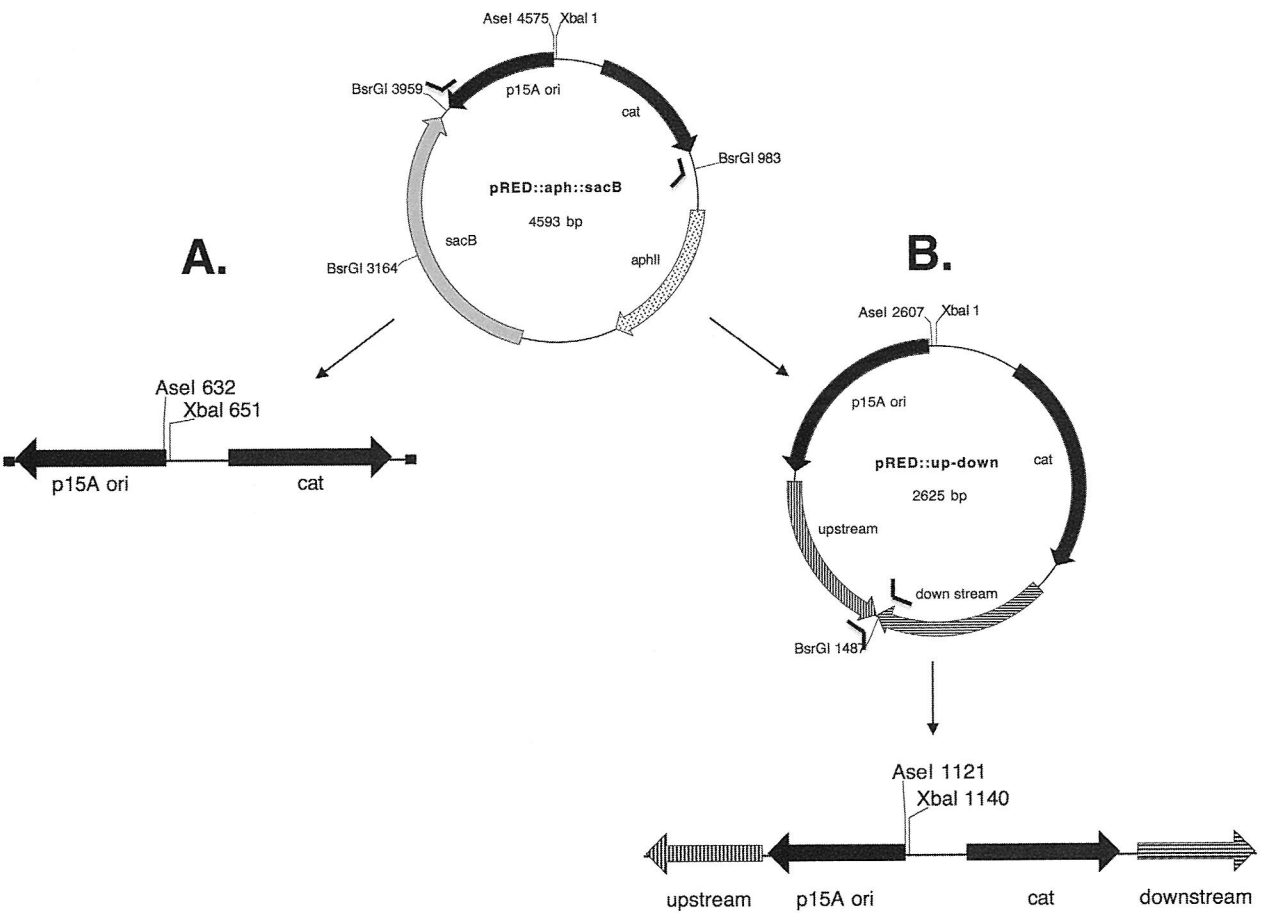


Fig. 1 Amplification of vector pRED (Komatsu *et al.*, 2010) carrying homologous regions. (A) When the size of the gene cluster is less than 10 kb was cloned by λ-Red recombination system, the vector was amplified using 21-mer primer pair adding 41 to 50 nt homologous sequences corresponding to upstream and downstream at 5'-ends by PCR. (B) To clone more than 10 kb gene cluster, 250 - 500 bp segments corresponding to upstream and downstream regions of the gene cluster were amplified and subcloned into pRED vector. The resultant recombinant plasmid was linearized and amplified using a primer pair (reverse primer of upstream region and forward primer of downstream region) by PCR.

って，pKU402（Ikeda *et al.*, 1999）をベクターとしてコスミドライブラリーを作製した．完全長クローンの選択は生合成遺伝子群の上流および下流側の配列から設計したプライマーを用い，コスミドライブラリーからスクリーニングを行った．その結果，スタウロスポリン様生合成遺伝子群（*sclav_p1108 - sclav_1122*），モエノマイシン様生合成遺伝子群（*sclav_p1274 - sclav_1290*），ホロマイシン合成遺伝子群（*sclav_5267 - sclav_5278*），ツニカマイシン合成遺伝子群（*sclav_4267 - sclav_4287*），クラブラン酸生合成遺伝子群（*sclav_4180 - sclav_4197*）を含むコスミドクローンを得た．同様に *S. lactacystinaeus* OM-6519 の染色体 DNA からラクタシスチン生合成遺伝子群（*ltcA - ltcE*）を得た．それぞれの生合成遺伝子群はコスミドクローンとして単離しているため 40 kb 程度の DNA 断片から成る．しかしながら，完全長の生合成遺伝子群はそれ以下の大きさであり，かつ今後の遺伝子改変や機能付加を考慮し，最少単位の断片をサブクローン化することとした．一般にサブクローン化は生合成遺伝子群内を切断しない制限酵素を使って行うが，10 - 25 kb 程度の断片を無傷に取り出す適当な制限酵素部位を見いだすことは極めて困難である．一方，近年大腸菌の *recE/recT* およびλファージの *gam, bet, exo* 遺伝子による相同的組換え（Zhang *et al.*, 2000）は効果的に目的 DNA 断片を取り出すことが可能であるため，本法を用いてそれぞれの最少単位の生合成遺伝子群を取り出すこととした．Fig. 1 に示したように PCR で増幅が可能なベクター pRED（1.6 kb; Komatsu *et al.*, 2010）にクローン化したい領域の上流および下流の相同配列をクローン化した．なお相同領域が 50 bp 以下であれば pRED を増幅するプライマーの 5' 領域に相同配列を配置したもので pRED プラスミドを増幅した（Fig. 1-左）．それ以上の長さの相同領域（～500 bp）を用いるときは，一度 pRED に相同領域をクローン化し，さらにクローン化した相同領域の 3' 側と相補なプライマーの組み合わせで全長を増幅した（Fig. 1-右）．増幅した線状 pRED プラスミドと *Ase*I あるいは *Dra*I で切断（コスミドベクター部分のみが切断される）したコスミドクローンの DNA とを混ぜておき，pKD78 あるいは pKD119 を保有しかつ L-アラビノースで *gam, bet* および *exo* の発現を誘導した BW25141 あるいは DH10B にエレクトロポレーショ

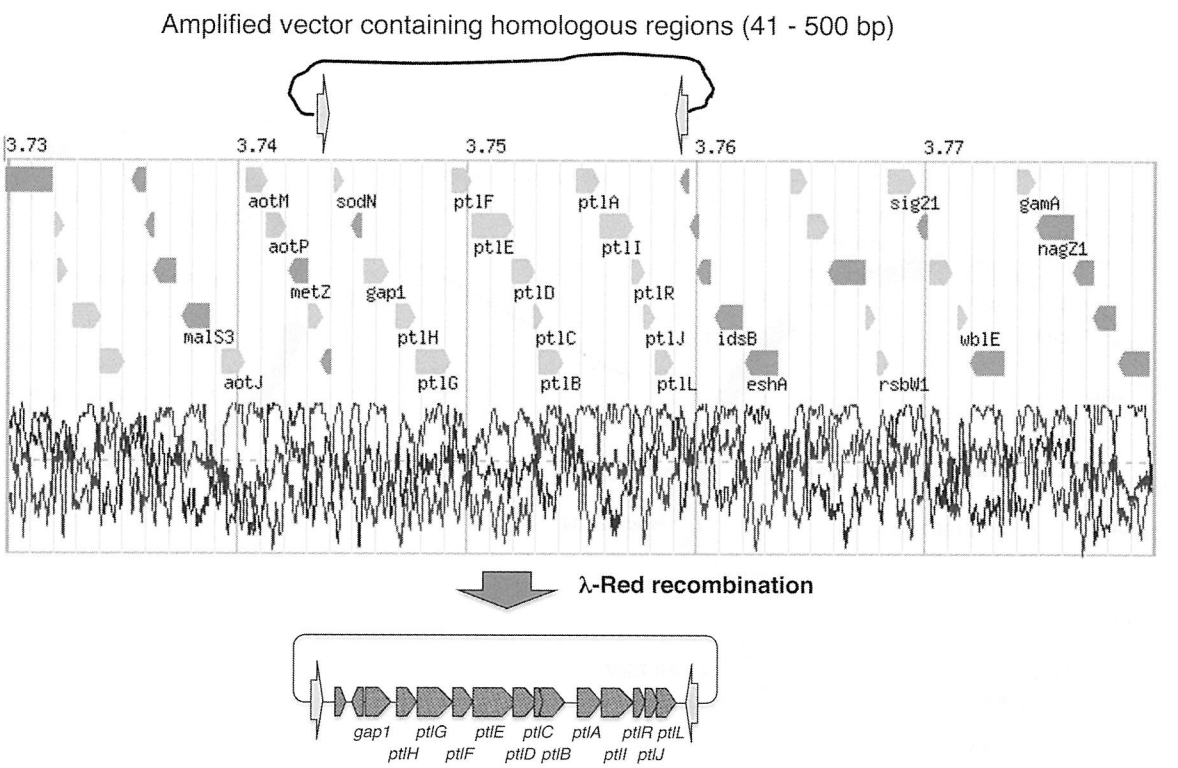


Fig. 2 Method for *in vivo* cloning of the gene cluster using λ-Red recombination. Competent *E. coli* BW25141 or DH10B carrying pKD78 or pKD119 induced *gam, bet* an *exo* genes by L-arabinose was subjected to electroporation with a linearized pRED vector containing homologous regions and cosmid clone or chromosomal DNA digested with appropriate restriction enzyme(s), which did not cut inside of the gene cluster. Recombinant plasmids carrying the gene cluster were selected by resistance to 30 μg/ml of chloramphenicol.

ンで導入し，相同領域で組換えを生じさせた（Fig. 2）．pRED の選択マーカーであるクロラムフェニコールで選択し，保有するプラスミドの大きさをアガロースゲル電気泳動で確認し目的の領域を含むものを確認した．最終的に汎用宿主 *S. avermitilis* SUKA 株に導入するため，染色体組込型ベクター（pKU492A*aac(3)IV*）に導入した（Fig. 3）．

このような方法で，12-30 kb 程度の大きさの生合成遺伝子群の完全長をクローン化した．Fig. 4 は *S. clavuligerus* ATCC 27065 のモエノマイシン様生合成遺伝子群のクローン化を示したもので，全長 28 kb を効率よくクローンすることができた．Fig. 5 は同じ *S. clavuligerus* ATCC 27065 のクラブラン酸生合成遺伝子群 24 kb のクローン化を示した．さらに小型の生合成遺伝子群では相同領域の長さを短くすることか可能であり，ラクタシスチン生合成遺伝子群は全長 10 kb 程度と推定されたため，目的の領域の上流および下流の 41 bp を相同配列として用いクローン化することができた（Fig. 6）．

異種 2 次代謝産物生合成遺伝子群導入による物質生産

S. avermitilis のゲノム情報から一次代謝に関する遺伝子は改変せず，主代謝産物の生合成遺伝子群を順次欠失させた大規模欠失株 SUKA17（Fig. 7; Komatsu *et al.*, 2010）を宿主として，これまで総数20種の異種 2 次代謝産物生合成遺伝子群を導入した．検討した半数以上の異種 2 次代謝産物生合成遺伝子群を導入した SUKA17 株は，それぞれの 2 次代謝産物を生産した（Fig. 8）．これらの中でプラジエノライドやラクタシスチンの生合成遺伝子群を導入した形質転換体ではそれぞれの化合物の生産が認められなかった．プラジエノライドでは生合成遺伝子群を正に調節する制御遺伝子（*pldR*）の発現が認められなかったため，*pldR* を *ermE* のプロモーターで発現させた場合，プラジエノライドの生成が確認された．一方，ラクタシスチン生合成遺伝子群には生合成遺伝子群を制御する調節遺伝子が存在しないこと，また 5 つの遺伝子は同一の転写単位として転写されていると考えられるため，初発の遺伝子 *ltcA* に構成的に発現するリボソームタンパク質（S10）の遺伝子のプロモーター

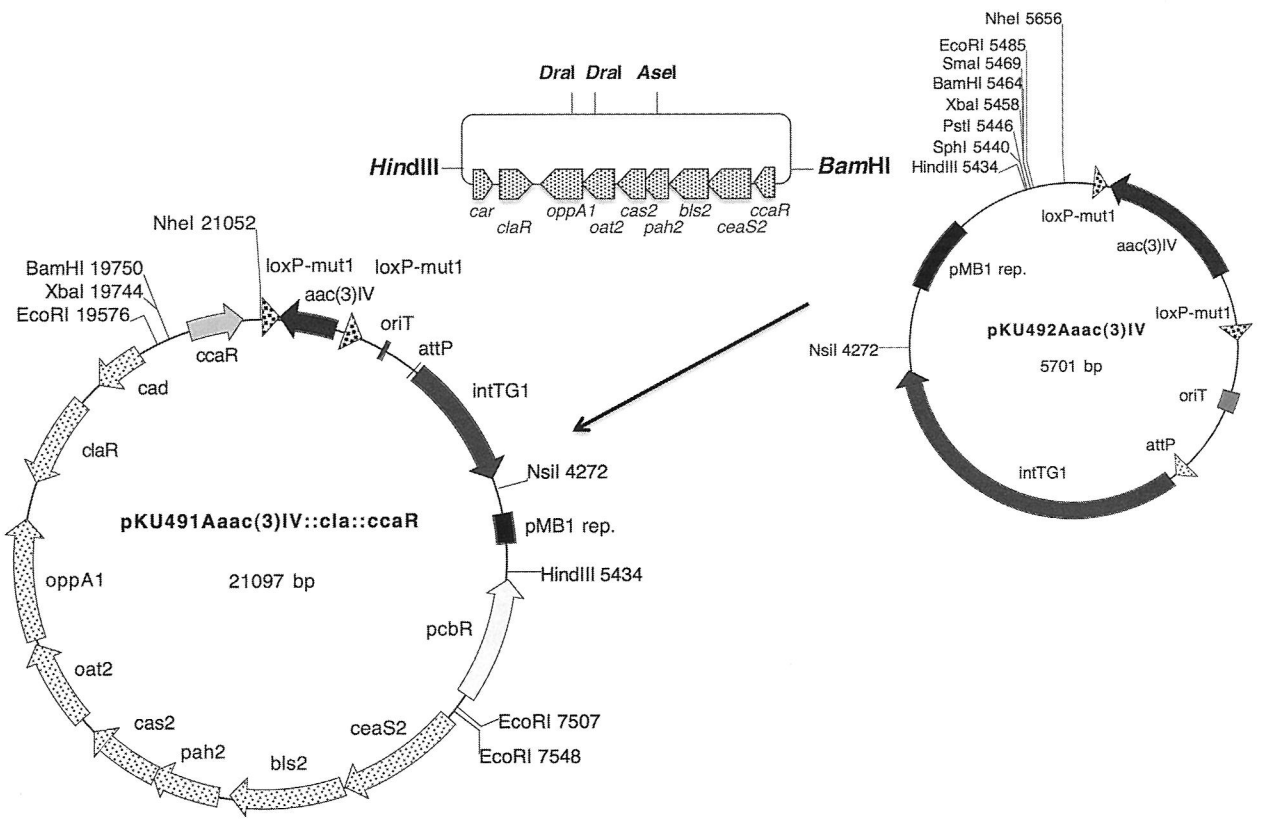


Fig. 3 Subcloning of a gene cluster to integrating vector pKU492A*aac(3)IV*. The recombinant plasmid constructed by *in vivo* cloning using λ-Red recombination was digested with *Bam*HI and *Hin*d III. A large fragment containing the gene cluster was ligated with large fragment of *Bam*HI/*Hin*dIII-pKU492A*aac(3)IV*. Recombinant plasmids carrying the gene cluster were selected by resistance to 25 μg/ml apramycin and forming white colonies in the presence of X-gal.

をλ-Red組換え系で連結させた．得られた強制発現株は原株である *S. lactacystinaeus* OM-6519と同等かあるいはそれ以上のラクタシスチンを生産した．

それぞれの生物の遺伝子のコドン使用頻度は，DNAのGC含量によって偏りが観察される．放線菌の多くはDNAのGC含量が70%近くにもなり，コドン利用率は偏っている．多くの真核細胞生物のDNAのGC含量は放線菌に比べ圧倒的に低い．植物や糸状菌は多くの2次代謝産物を生産する生物として知られている．植物由来のアルテミシニンの中間体アモルファジエン，タキソールの中間体タキサジエンおよびギンコライドの中間体レボピマラジエン，それぞれの合成酵素遺伝子を放線菌のコドン使用頻度に見合う人工遺伝子を作製し，構成的発現プロモーターによってSUKA17株で発現させたところ，上記の中間体を菌体内に蓄積した（Fig. 8，右下の3つの化合物）．

S. avermitilis 大規模欠失株SUKA17の形質転換体では多くの異種2次代謝産物生合成遺伝子群が安定に発現することが観察された．多くの場合，SUKA17株形質転換体では原株と同等あるいは若干生産量が低下したものが観察されたが，いくつかの生合成遺伝子群では原株（2次代謝産物生合成遺伝子群をクローン化した時の供与菌株）での生産量と比較すると興味ある知見が観察された．アミノグリコシド系抗生物質ストレプトマシン生合成遺伝子群を含む染色体組込型プラスミドpSM1を導入した *S. avermitilis* の野生株のストレプトマシン生産量は原株である *S. griseus* IFO 13350の生産量のおよそ半分程度であった．一方，pSM1を導入した *S. avermitilis* SUKA17株の生産量は *S. avermitilis* 野生株形質転換体の5倍以上であり，かつ *S. griseus* IFO 13350の生産量の2倍以上であった（Fig. 9-A）．β-ラクタム抗生物質セファマイシンC生合成遺伝子群を含むプラスミドpCEF2を導入した *S. avermitilis* 野生株のセファマイシンCの生産量は原株である *S. clavuligerus* ATCC 27065のおよそ半分であった．また，SUKA17株の形質転換体は *S. clavuligerus* ATCC 27065の生産量の2倍のセファマイシンCを生産した．なお，*S. clavuligerus* ATCC 27065ではセファマイシンCの生産は2日目で最大になり，それ以降は減少する傾向であったが，*S. avermitilis* 野生株およびSUKA17株の形質転換体では5日以降も生産量が増加する傾向であった（Fig. 9-B）．なお，本実験は7日まで行ったが，セファマイシンCの生産は減少することはなかった．一方，クロラムフェニコール生合成遺伝子群を含むプラスミドpAH91を形質転換した *S. avermitilis* 野生株では，クロラムフェニコールの生産量は原株の *S. venezuelae* ATCC 10712よりも5倍程度であり，さらにSUKA17株の形質転換体は *S. avermitilis* 野生株の2倍以上の生産量を示した．これ

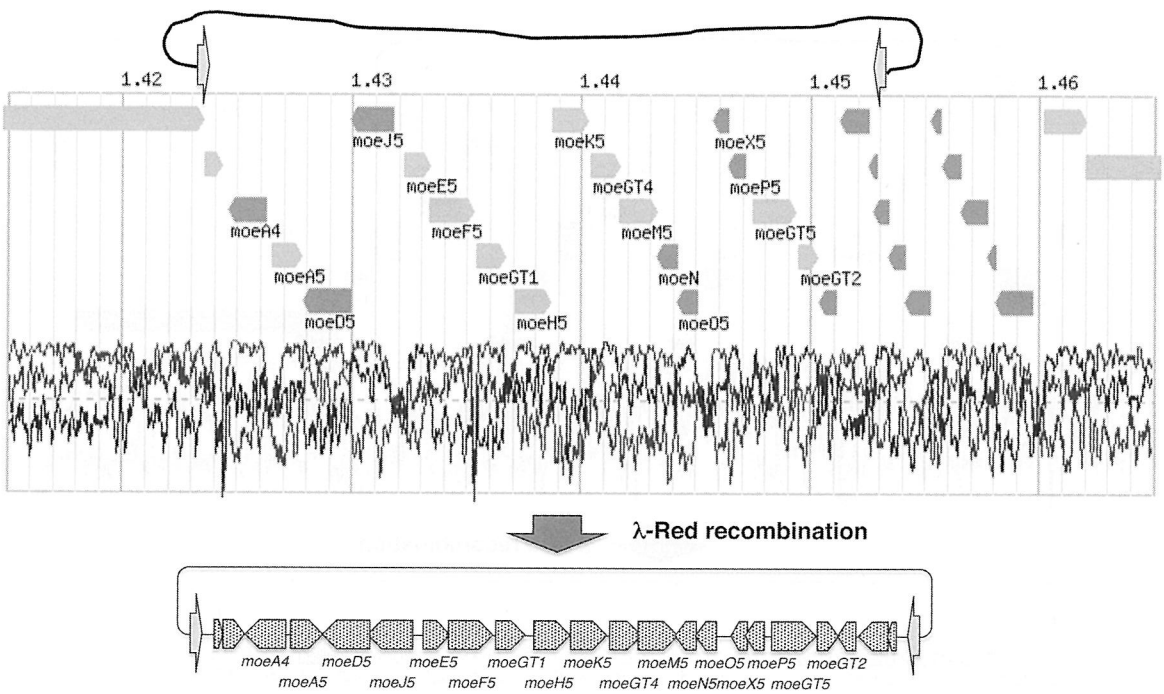


Fig. 4 Subcloning of minimized gene cluster for moenomycin-like compound biosynthesis of *S. clavuligerus* ATCC 27064. Two homologous regions corresponding to upstream of *moeGT2* and downstream of *moeA4* were used for *in vivo* cloning.

は原株の *S. venezuelae* ATCC 10712 の生産量の10倍以上であった（Fig. 9-C）．*S. venezuelae* ATCC 10712 も *S. clavuligerus* ATCC 27065 と同様に増殖の早い菌株である．また，クロラムフェニコールの生産も2〜3日目が最大でそれ以降は *S. clavuligerus* ATCC 27065 でのセファマイシンCの生産と同様，減少する傾向であった．一方，*S. avermitilis* の形質転換体も培養2日目でクロラムフェニコールの生産量は最大になったが，それ以降はほとんど分解することはなかった．

ゲノム解析の結果から新たに2次代謝産物生合成遺伝子群が見いだされた例は，*S. avermitilis* のゲノム解析で，既に我々が報告した（Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003）．*S. clavuligerus* ATCC 27604 に関してもゲノム解析から多数の生合成遺伝子群が見いだされている（Medema *et al.*, 2010）．これらのうち，グリコリピド系の化合物モエノマイシン様の生合成遺伝子群が見いだされている．*S. clavuligerus* ATCC 27604 はセファマイシンC（Nagarajan *et al.*, 1971）およびクラブラン酸（Brown *et al.*, 1976）生産菌として知られているが，これまで変異株でホロマイシンおよびツニカマイシンの生産（Kenig & Reading, 1979）が報告がされていた．しかしながら，モエノマイシン様のグリコリピド系の物質生産はいまだ報告されていない．*S. clavuligerus* ATCC 27604 の *sclav_p1274 - sclav_1290* はモエノマイシン生産菌 *S. ghanaensis* ATCC 14672 の保有するモエノマイシン生合成遺伝子群（Ostash *et al.*, 2007）に極めて類似していた．*S. clavuligerus* ATCC 27065 からクローン化したモエノマイシン様化合物生合成遺伝子群を導入した *S. avermitilis* SUKA17 形質転換株はモエノマイシン様化合物を菌体内に著量蓄積した．一方，種々の培地で *S. clavuligerus* ATCC 27065 を培養したが，モエノマイシン様のグリコリピド化合物を検出することはできなかった（Fig. 10）．

考　察

S. avermitilis は医薬品素材（エバーメクチン）の供給源としての本質的な機能を有しており，2次代謝系に関わる前駆物質の供給をはじめとする代謝調節機構が工業生産に耐えうる十分な機能を備えている微生物と言える．産業微生物は物質生産という形質のみならず種々の遺伝形質が安定であることが重要な要件でもある．放線菌は継代によって形態分化という形質のみならず2次代謝産物生産の形質も消失することがたびたび観察される．このような不安定性は工業的な2次代謝産物の安定供給にとって致命的である．不安定性に関する要因についての結論はいまだ得られてはいないが，一つの要因として染色体構造が挙げられる．*Streptomyces* 属の染

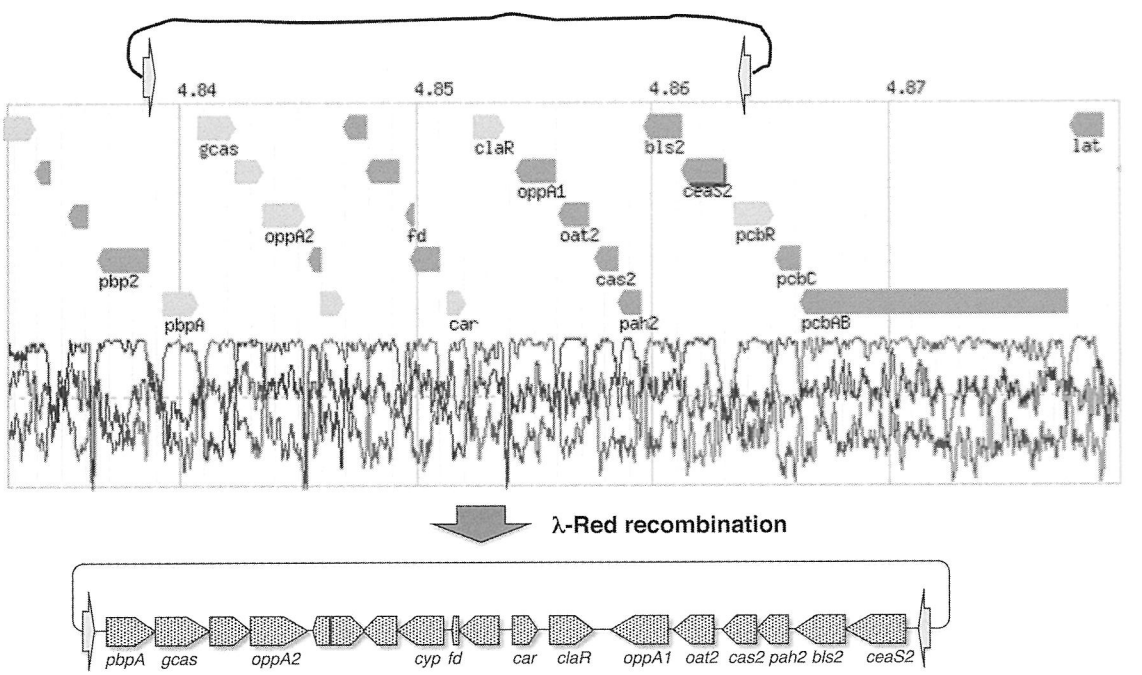


Fig. 5 Subcloning of minimized gene cluster for clavulanic acid biosynthesis of *S. clavuligerus* ATCC 27064. Two homologous regions corresponding to upstream of *pbpA* and downstream of *ceaS2* were used for *in vivo* cloning.

色体はゲノム解析および末端構造解析をおこなった菌株すべてで線状構造である．染色体両末端は互いに逆向き相同配列を有しており，この部分（テロメア）での相同組換えによって欠失・転座等が引き起こされ，形質の不安定性さが現れるものと推察される．菌種にもよるがこの部分の相同配列はテトラサイクリン生産菌の *S. rimosus* では 500 kb（Pandza *et al.*, 1998）にも及ぶ．*S. avermitilis* は *S. coelicolor* A3(2) やストレプトマシン生産菌 *S. griseus* IFO 13350 などと比べて，その遺伝形質は非常に安定である（37℃ での高温培養や数代の植え継ぎによって胞子形成の消失などの形態的な変化や 2 次代謝産物の生産の消失が極めて低頻度）．*S. avermitilis* のテロメア領域の完全な相同配列は 49 bp（Ikeda *et al.*, 2003）であるが，*S. coelicolor* A3(2) では 21,653 bp（Bentley *et al.*, 2002），*S. griseus* IFO 13350 においては 132,910 bp の相同配列（Ohnishi *et al.*, 2008）が存在しており，このような長い相同配列が不安定性の原因であると思われる．したがって，*S. avermitilis* の形質の安定性の一つの要因は，テロメア配列が極めて短いことであると推察される．このことは産業微生物として適した染色体構造を有していると理解できる．

一般的に，酵素の中には mRNA から翻訳されポリペプチドを生成した後に修飾を受けてはじめて酵素活性が現れるものがある．大環状ラクトン型ポリケチド化合物およびペプチド化合物（リボソームを使わずにアミノ酸を ATP で活性化した後，ペプチド結合を形成し生成する化合物）の生合成過程におけるアシルあるいはペプチド鎖の伸長反応は，I 型ポリケチド合成酵素のアシルキャリアータンパク質（ACP）あるいは非リボソームペプチド合成酵素のペプチジルキャリアータンパク質（PCP）ドメインのセリン残基にリン酸エステルで結合している 4'-ホスホパンテテイン残基の末端の SH 基を介して行われる（Katz, 1997; Marahiel *et al.*, 1997）．これらのアポ型合成酵素の翻訳後修飾は CoA を基質として 4'-ホスホパンテテイン転移酵素（PptA）によって触媒される．大腸菌では本酵素の遺伝子が染色体に存在しないため，大腸菌でポリケチドおよびペプチド化合物を生合成させるには枯草菌の非リボソームペプチド合成酵素を翻訳後修飾する Sfp 遺伝子（Quadri *et al.*, 1998）を共発現（Pfeifer *et al.*, 2001）させなければならない．*S. avermitilis* のゲノム解析から，本菌には少なくとも 8 種のポリケチド化合物の生合成遺伝子群（I 型ポリケチド合成酵素遺伝子を

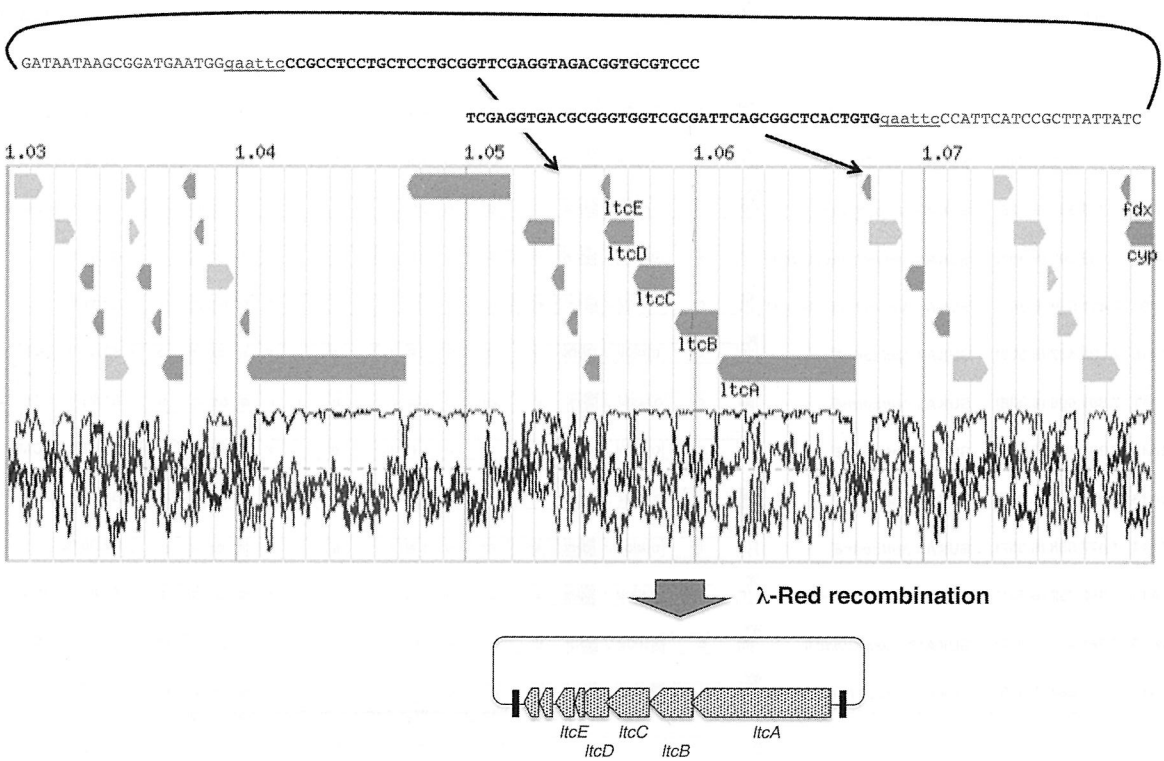


Fig. 6 Subcloning of minimized gene cluster for lactacystin biosynthesis (*ltc* cluster) of *S. lactacystinaeus* OM- 6519. Two homologous sequences (41 nt) corresponding to upstream of *ltcA* and downstream of *ltcE* were used for *in vivo* cloning. Bold and lowercase characters indicate homologous sequences of flanking region of *ltc* cluster in *S. lactacystinaeus* OM-6519 and restriction sites. Grayed characters are primer sequences of pRED vector.

含む）と8種のペプチド化合物の生合成遺伝子群が存在することが明らかとなっている（Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003）．これまでの比較解析の結果，本菌には4つの *pptA* 遺伝子の存在が示唆されており，上記のアポ型合成酵素の翻訳後修飾を行っているものと推察される．このような *pptA* の多様性は異種菌株由来のポリケチドおよびペプチド合成酵素の翻訳後修飾を効率良く達成することも期待でき，本菌を宿主とした各種のポリケチドおよびペプチド化合物の生産も期待できる．

一般に2次代謝産物生合成遺伝子群には生合成遺伝子群の個々の遺伝子の発現を活性化する調節遺伝子が存在する場合が多く，さらにこれらの調節遺伝子の発現を制御する上位の制御系は多くは不明である．最も詳細に検討されたストレプトマシン生産菌 *S. griseus* IFO 13350 ではストレプトマシン生合成遺伝子群の調節遺伝子 *strR* は AraC-family 制御タンパク質に分類される AdpA によって制御されており，*adpA* の転写は通常，上流に結合する ArpA によって停止している．低分子遺伝子発現調節物質である A-factor の細胞内濃度が上昇し ArpA に結合し，そして DNA から ArpA が解離して *adpA* の転写が活性化されることが明らかにされている（Ohnishi *et al.*, 1999）．セファマイシン C 生産菌 *S. clavuligerus* ATCC 27065 では，セファマイシン C 生合成遺伝子群内に調節遺伝子 *ccaR* が存在する．*ccaR* はある種の σ-因子によって転写が調節されている．培養前期では anti-σ-因子タンパク質（SCLAV_2541）が σ-因子に結合し，複合体を形成するため *ccaR* の転写は開始されない．対数増殖後期に anti-σ-因子アンタゴニスト（SCLAV_2542）の遺伝子が発現し，σ-因子/anti-σ-因子タンパク質複合体が解離する．遊離した σ-因子によって *ccaR* の転写が開始され，セファマイシン C の生合成遺伝子全体の転写が開始される（Bignell *et al.*, 2005）．この

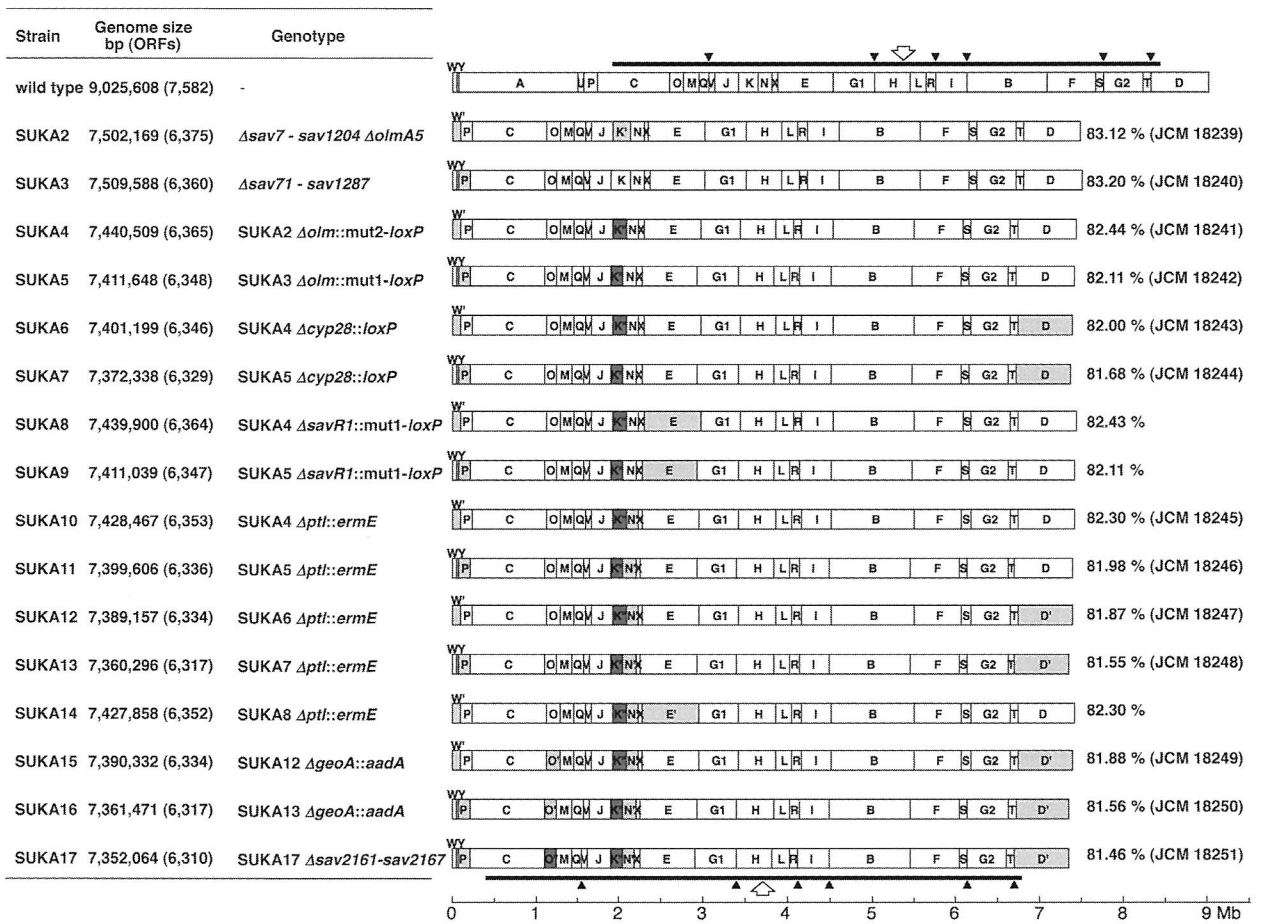


Fig. 7 *Ase*I-physical maps of *S. avermitilis* wild-type and its large deletion mutants. Right column indicates percentage of the genome size compared with that of wild-type and deposit numbers of RIKEN bioresource center, Japan. Thick bars at the top and bottom of physical maps correspond to the central core region. Opened arrows and filled triangles indicate the replication origin and 16S-23S-5S rRNA operons, respectively. SUKA is abbreviated to ***S****pecial* ***U****se of* ***K****itasato* ***A****ctinobacteria*.

ように異種生合成遺伝子群の発現には，個々の生合成遺伝子群内の調節遺伝子の転写を制御する上位の制御系が原株と等しく稼働していることが必須である．*S. avermitilis* にはAdpAと相同性の高いAraC-family制御タンパク質の遺伝子 *bdpA* が存在し，その遺伝子産物BdpAがAdpAと同様な働きをするため，*strR* を活性化しストレプトマシンを生産する．なお，*bdpA* の発現は *adpA* とは異なり，内在性の低分子遺伝子調節物質アベノライド（Kitani *et al.*, 2011）によって制御されることはなく，培養初期から発現しているため，SUKA17株でのストレプトマシンの生産は *S. griseus* IFO 13350よりも早く開始され，2日目から生産が観察されるものと思われる（Fig. 9-A）．同様に *S. avermitilis* でのセファマイシンCの生合成は，anti-σ-因子タンパク質遺伝子（*sclav_2541*）およびそのanti-σ-因子アンタゴニスト（*sclav_2542*）のそれぞれのオルソログ *rsbW2*（*sav4615*）および *rsbV*（*sav4614*）が *S. avermitilis* に存在し，それぞれの遺伝子産物がSCLAV_2541およびSCLAV_2542と同様な機能を有しているため，セファマイシンCが生産されると考えられる．実際に，*rsbV* 欠失株ではセファマイシンCの生産は停止する（Komatsu *et al.*, 2010）．これらのことから，*S. avermitilis* SUKA17株に異種2次代謝

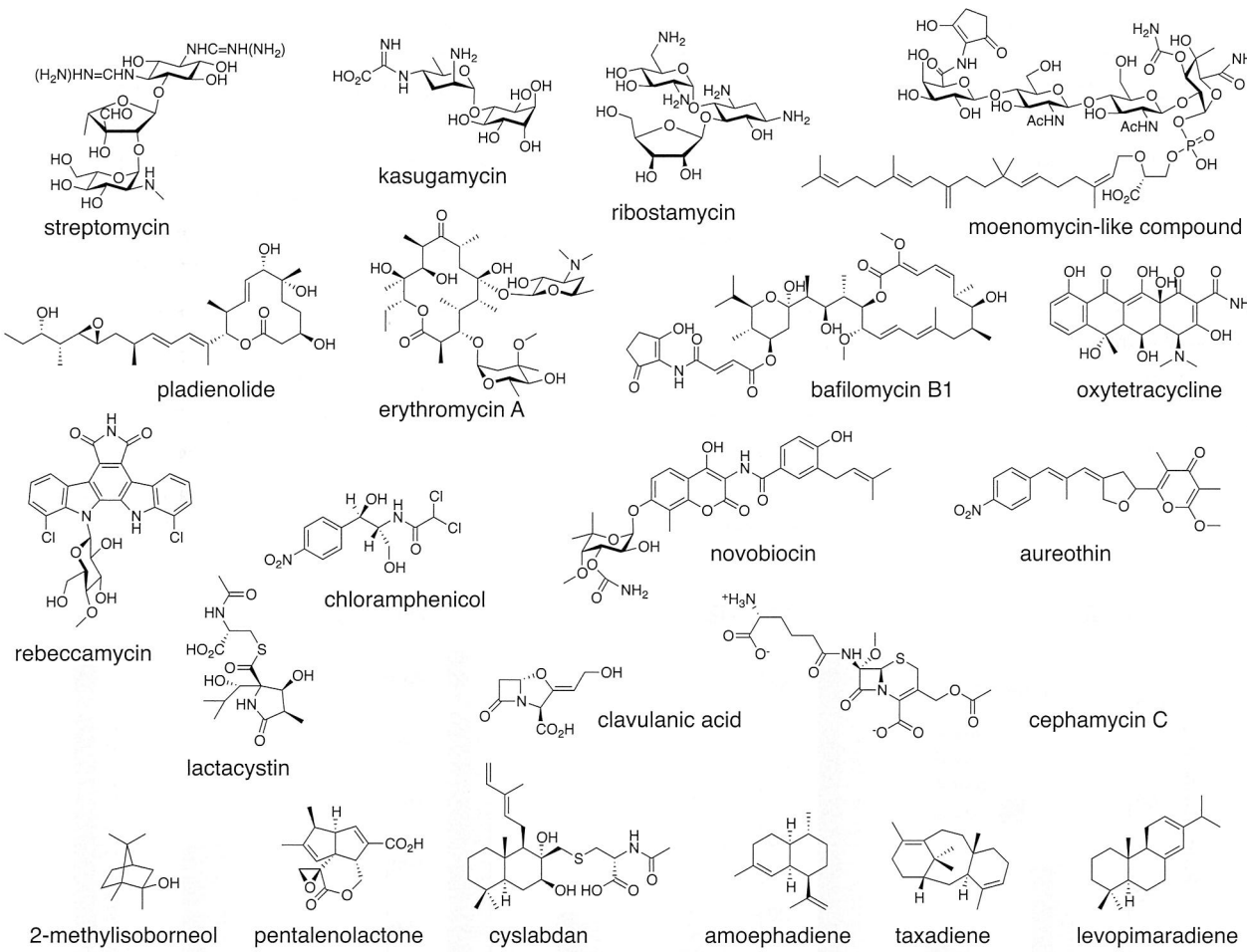


Fig. 8 Heterologous expression of biosynthetic gene clusters in *S. avermitilis* SUKA derivatives. Transformants carrying biosynthetic gene clusters for pladienolide, lactacystin and clavulanic acid did not produce corresponding metabolites. Pladienolide was produced by introducing an additional copy of regulatory gene, *pldR*, controlled by alternative promoter *ermEp* (promoter of erythromycin resistance gene of *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338). Transformants carrying lactacystin gene cluster controlled by alternative promoter, *rpsJp* (promoter of gene encoding ribosomal protein S10), produced abundant lactacystin. Clavulalic acid production was performed by introducing a regulatory gene, *ccaR*, in the gene cluster for cephamycin C biosynthesis of *S. clavuligerus* ATCC 27064. Synthetic genes, which were optimized by codon usage in *S. avermitilis*, of amorpha-4,11-diene synthase (accession # Q9AR04), taxa-4(5),11(12)-diene synthase (accession # Q41594) and levopimaradiene synthase (accession # Q947C4) were expressed using *rpsJ* promoter of *S. avermitilis*.

産物生合成遺伝子群内の調節遺伝子を制御する調節遺伝子のオルソログが存在しなければ異種生産は達成できない．*S. platensis* Mer-11107 のプラジエノライド生合成遺伝子群およそ 75 kb を SUKA 株に導入したが，プラジエノライドの生産は全く観察されず，さらに生合成遺伝子群の制御遺伝子 *pldR* の発現も確認されなかった（Komatsu *et al.*, 2010）．おそらく *S. avermitilis* には *pldR* の転写を活性化するオルソログが存在しないためと思われる．しかしながら *pldR* を別途，強制発現させる（*ermE* プロモーターを利用）ことによって SUKA 株でプラジエノライドの生成が確認することができた（Komatsu *et al.*, 2010）．このように上位の制御系のオルソログが存在しない場合でも生合成遺伝子群を制御する遺伝子が同定されていればその調節遺伝子の強制発現という方法で異種生合成遺伝子群を発現させることも可能である．一方，*S. lactacystinaeus* OM-6519 のラクタシスチン生合成遺伝子群には調節遺伝子が存在しない．また，ラクタシスチン生合成遺伝子群を SUKA17 株に導入してもラクタシスチンは全く生産されなかった．ラクタシスチン生合成遺伝子群の制御に関する情報は全く無いが，生合成遺伝子群の遺伝子すべてが単一転写単位であることから，先頭の遺伝子を *S. avermitilis* 内で構成的に発現するプロモーターと交換することによって転写を開始させることが可能である．このような方法によってラクタシスチンの生成を確認することができた．さらに *S. clavuligerus* ATCC 27065 のモエノマイシン様生合成遺伝子群は，おそらく本菌株では，転写量が低いかあるいはほとんど転写が行われていないものと推察される．*S. avermitilis* SUKA17 株では *S. clavuligerus* ATCC 27065 には存在しない調節機構で同遺伝子群の転写を調節しているものと思われる．この結果は極めて興味あるもので，多くの生合成遺伝子群が休眠状態であることから（Nett *et al.*, 2009），これら休眠状態の遺伝子群を *S. avermitilis* SUKA17 あるいは他の *Streptomyces* 菌株に導入することによって，代謝産物の生成を開始させることが期待できる．

異種生合成遺伝子群を *S. avermitilis* SUKA17 株で発現させ，ほとんどの生合成遺伝子群は発現し，それに対応する 2 次代謝産物の生成が確認された．ところで，それぞれの生合成遺伝子群をクローニングするときの染色体供与株である原株は探索スクリーニングで発見され，その後工業生産のために育種改良されていった菌株である．したがって，それぞれの生合成遺伝子群の発現および代謝産物の生成は原株が最も良い状態であると思われる．しかしながら，*S. avermitilis* SUKA17 株に異種生合成遺伝子群を導入した形質転換体では，ストレプトマシン生産菌 *S. griseus* IFO 13350，セファマイシン C 生産菌 *S. clavuligerus* ATCC 27064 およびクロラムフェニコール生産菌 *S. venezuelae* ATCC 10712 におけるそれぞれの代謝産物の生成量において，原株の 2 倍から10倍に達している（Fig. 9）．これらの結果は，*S. avermitilis* SUKA17 株が上記の代謝産物の生合成遺伝子群の発現および生合成過程が，原株よりも最適化されていると考えられる．しかしながら，*S. avermitilis* にはストレプトマシンなどの糖質経路から供給される前駆体で生合成されるアミノグリコシド化合物およびクロラムフェニ

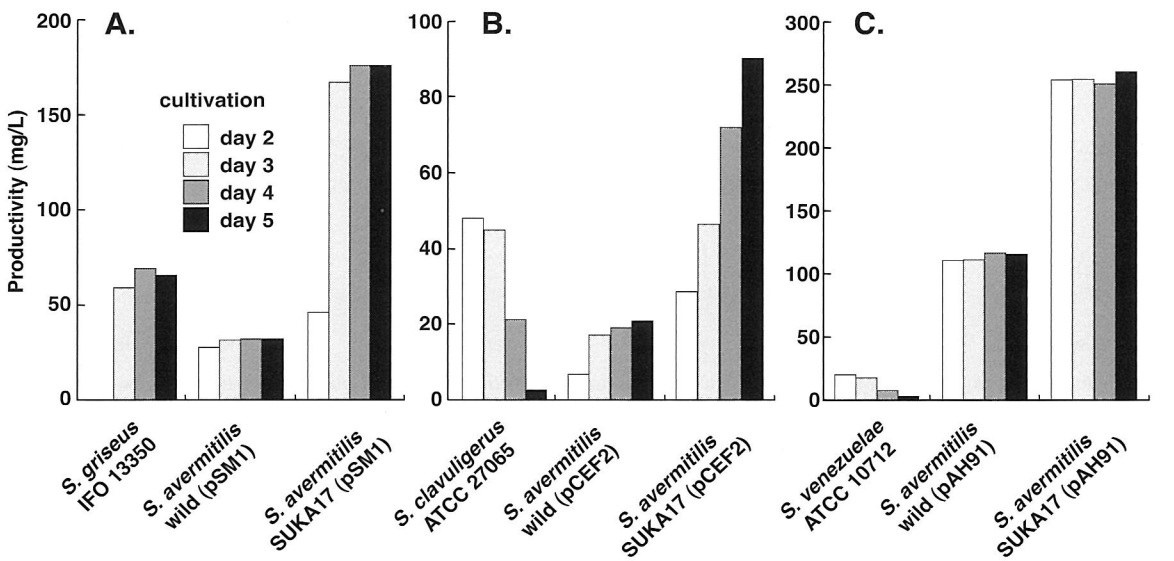


Fig. 9 Heterologous expression of biosynthetic gene clusters for (A) streptomycin of *S. griseus* IFO 13350, (B) cephamycin C of *S. clavuligerus* ATCC 27064 and (C) chloramphenicol of *S. venezuelae* ATCC 10712.

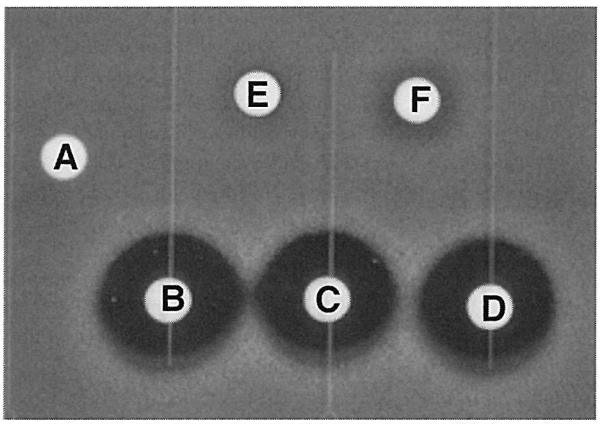


Fig. 10 Production of antimicrobial glycolipid compound (moenomycin-like) in *S. clavuligerus* ATCC 27064 and *S. avermitilis* SUKA17 carrying biosynthetic gene cluster for moenomycin-like compound (*moe* cluster) of *S. clavuligerus* ATCC 27064. After cultivation, the culture was separated by centrifugation. Mycelia sedimented were extracted with methanol and antimicrobial activity in the methanol-extract was analyzed by paper-disc method using *Bacillus subtilis* PCI 219 as an indicator microorganism. (A) *S .avermitilis* SUKA17 carrying pKU492A*aac(3)IV* (vector control), (B - D) *S. avermitilis* SUKA17 carrying pKU492A*aac(3)IV::moe* cluster #1～#3, (E) *S. clavuligerus* ATCC 27064, and (F) *S. ghanaensis* ATCC 14672 (moenomycin producer).

コールなどのシキミ酸経路から供給される前駆体で生合成される化合物の生合成遺伝子群は保有していないため，それらの生合成遺伝子の発現や前駆体の供給が最適化されていたわけではない．SUKA株のような大規模欠失による人為的な内在性2次代謝産物生合成遺伝子群の欠失によって，本来内在性の化合物の生合成に利用されていた前駆体（1次代謝産物）が，新たに導入した生合成遺伝子群の発現によって生成した生合成酵素群によって効果的に利用されたため高生産が達成されたものと考えられる．

要　約

放線菌は原核細胞生物の中でも比較的複雑な形態分化が観察されるが，これらの菌群の最も重要な特徴は抗生物質や生物活性物質を含む多種多様な2次代謝産物を生産することである．これまで放線菌は，2次代謝産物のソースとして，およそ半世紀にもおよぶ探索研究が行われてきた．また，これらの2次代謝産物のいくつは医薬，動物薬，農薬あるいは生化学試薬として利用されており，さらにそれらの代謝産物を工業的なレベルにまで生産できることである．放線菌 *Streptomyces* 属のゲノム解析から（*S. avermitilis* MA-4680, *S. coelicolor* A3(2) および *S. griseus* IFO 13350），これらの菌株の線状染色体には20種以上の2次代謝産物生合成遺伝子群の存在が示唆された．2次代謝産物生合成遺伝子群の同定ならびに解析は2次代謝産物の生合成過程の解明において重要であるとともに休眠状態の遺伝子群の活性化による物質生産の開始や新規な生合成経路の発見にも繋がる．さらにコンビナトリアル生合成のような人為的な生合成遺伝子群の改変は，新規な非天然型誘導体生成への期待が持たれる．これらの研究には遺伝子操作技術が整備されている宿主での異種発現が効果的であり，さらに物質生産を考慮した場合，1次代謝による前駆物質，エネルギーおよび補酵素の供給と2次代謝との連携，同調性の効果的な宿主が求められる．抗寄生虫・抗昆虫抗生物質エバーメクチンの工業生産に利用されている放線菌 *S. avermitilis* のゲノム解析の結果から，本菌の物質生産を最大限に利用し自身の2次代謝産物のみならず異種菌株の2次代謝産物の生成のための汎用宿主の構築を行い，各種異種生合成遺伝子群を本汎用宿主に導入しそれらの生合成遺伝子群の発現およびそれぞれの生合成によって生成される代謝産物の生成を確認した．多くの異種2次代謝産物生合成遺伝子群導入株はそれに対応する2次代謝産物の生成が観察された．これらのことから本研究で作製した汎用宿主は異種菌株の2次代謝産物の生産および解析に適したものと考察された．さらに，これらのうちのいくつかは原株（クローン化に使用したDNA供与株）の2次代謝産物の生成量を上回っており，極めて効率良い前駆物質の供給と2次代謝が形成されているものと思われる．これらの結果から，これまで生成量が低い，あるいは休眠状態に近い状態の生合成遺伝子群を効果的に発現，さらに物質生産へと導くことが可能と考えられる．

研究成果の報告

Cane, D.E. & Ikeda, H. (2012). Exploration and Mining of the Bacterial Terpenome. Accounts Chem. Res. **45**: 463-472.

Uchida, M., Takamatsu, S., Arima, S. ,Miyamoto, K.T. ,Kitani, S. ,Nihira, T., Ikeda, H. & Nagamitsu, T. (2011). Total synthesis and absolute configuration of avenolide, extracelluar factor in *Streptomyces avermitilis*. J. Antibiot. **64**: 781-787.

Kitani, S., Miyamoto, K.T. ,Takamatsu, S., Herawati, E., Iguchi, H., Nishitomi, K., Uchida, M., Nagamitsu, T., Omura, S., Ikeda, H. & Nihira, T. (2011). Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **108**: 16410-16415.

Seo, M-J., Zhu, D., Endo, S., Ikeda, H. & Cane, D.E. (2011). Genome mining in *Streptomyces*. Elucidation of the role of Baeyer-Villiger monooxygenases and non-heme iron-dependent dehydrogenase/oxygenases in the final steps of the biosynthesis of pentalenolactone and neopentalenolactone. Biochemistry **50**: 1739-1754.

Zhu, D., Seo, M-J., Ikeda, H. & Cane, D.E. (2011). Genome mining in *Streptomyces*. Discovery of an unprecedented P450-catalyzed oxidative rearrangement that is the final step in the biosynthesis of pentalenolactone. J. Am. Chem. Soc. **133**: 2128-2131.

Takamatsu, S., Lin, X., Nara, A., Komatsu, M., Cane, D.E. & Ikeda, H. (2011). Characterization of a silent sesquiterpenoid biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis* controlling epi-isozizaene and albaflavenone biosynthesis and isolation of a new oxidized *epi*-isozizaene metabolite. Microb. Biotechnol. **4**: 184-191.

Takamatsu, S., Xu, L-H., Fushinobu, S., Shoun, H., Komatsu, M., Cane, D.E. & Ikeda, H. (2011). Pentalenic acid is a shunt metabolite in the biosynthesis of the pentalenolactone family of metabolites: Hydroxylation of 1-deoxypentalenic acid mediated by CYP105D7 (SAV_7469) of *Streptomyces avermitilis*. J. Antibiot. **64**: 65-71.

Chou, W.K.W., Fanizza, I., Uchiyama, T., Komatsu, M., Ikeda, H. & Cane, D.E. (2010). Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: Cloning and characterization of SAV_76, the synthase for a new sesquiterpene, Avermitilol. J. Am. Chem. Soc. **132**: 8850-8851.

保存機関に寄託した菌株

菌株名	遺伝子型	寄託番号
Streptomyces avermitilis SUKA2	*Δsav7-sav1204 ΔolmA5*	JCM 18239
Streptomyces avermitilis SUKA3	*Δsav71-sav1267*	JCM 18240
Streptomyces avermitilis SUKA4	SUKA2 *Δolm::loxP(m)*	JCM 18241
Streptomyces avermitilis SUKA5	SUKA3 *Δolm::loxP(m)*	JCM 18242
Streptomyces avermitilis SUKA6	SUKA4 *Δcyp28::loxP*	JCM 18243
Streptomyces avermitilis SUKA7	SUKA5 *Δcyp28::loxP*	JCM 18244
Streptomyces avermitilis SUKA10	SUKA4 *Δptl::ermE*	JCM 18245
Streptomyces avermitilis SUKA11	SUKA5 *Δptl::ermE*	JCM 18246
Streptomyces avermitilis SUKA12	SUKA6 *Δptl::ermE*	JCM 18247
Streptomyces avermitilis SUKA13	SUKA7 *Δptl::ermE*	JCM 18248
Streptomyces avermitilis SUKA15	SUKA12 *ΔgeoA::aadA*	JCM 18249
Streptomyces avermitilis SUKA16	SUKA13 *ΔgeoA::aadA*	JCM 18250
Streptomyces avermitilis SUKA17	SUKA16 *Δsav2161-sav2167*	JCM 18251
Streptomyces avermitilis SUKA18	SUKA17 *rpsL* (G129C; K43N)	JCM 18252
Streptomyces avermitilis SUKA19	SUKA17 *rpsL* (A128T; K43M)	JCM 18253
Streptomyces avermitilis SUKA20	SUKA17 *rpsL* (A128G; K43R)	JCM 18254
Streptomyces avermitilis SUKA21	SUKA17 *rpsL* (A262G; K88E)	JCM 18255

謝　辞

本研究は公益法人発酵研究所の研究助成によって行われたものであり，心から感謝いたします．また貴重な研究材料を提供していただきました英国John Innes Centre, Prof. M. J. Bibb，富山県立大学工学部・尾仲宏康准教授，独立行政法人産業総合研究所臨海副都心センター・新家　一男主任研究員および学校法人北里研究所・大村　智名誉理事長に感謝いたします．

文　献

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schåffer, A.A., Zhang, J., Zhang , Z., Miller , W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucl. Acids Res. **25**: 3389-3402.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cereño-Tàrranga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Crolin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidakgo, J., Homsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., T. Kiser, Larke,L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. & Hopwood, D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature **417**: 141-147.

Bignell, D.R.D., Tahlan, K., Colvin, K.R., Jensen, S.E. & Leskiw, B.K. (2005). Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*. Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 1529-1541.

Brown, A.G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J.D., Reading, C. & Rolinson, G.N. (1976). Naturally-occurring β-lactamase inhibitors with antibacterial activity. J. Antibiot. **29**: 668-669.

Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.-L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J.B., Wallick, H., Stapley, E.O., Oiwa, R. Omura, S. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. Antimicrob. Agents Chemother. **15**: 361-367.

Cane, D.E., He, X., Kobayashi, S., Omura, S. & Ikeda, H. (2006). Geosmin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. J. Antibiot. **59**: 471-479.

Datsenko, K.A. & Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 6640-6645.

Finn, R.D., Clements, J. & Eddy, S.R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. Nucl. Acids. Res. **39**: W29-W37.

Ikeda, H., Kotaki, H. & Omura, S. (1987). Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. J.

Bacteriol. **169**: 5615-5621.

Ikeda, H., Takada, Y., Pang, C.-H., Tanaka, H. & Omura, S. (1993). Transposon mutagenesis by Tn*4560* and applications with avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. J. Bacteriol. **175**: 2077-2082.

Ikeda, H., Wang, R.-L., Ohta, T. & Omura, S. (1998). Genetic analysis of avermectin B *O*-methyltransferase in avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. Gene **206**: 175-180.

Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Ohta, T. & Omura, S. (1999). Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. Proc. Natl. Acad, Sci. USA. **96**: 9509-9514.

Ikeda, H. Ishikawa, J. Hanamoto, A. Shinose, M. Kikuchi, H. Shiba, T. Sakaki, Y. Hattori, M. & Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nat. Biotechnol. **21**: 526-531.

Katoh, T. (2010). Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. Bioinformatics **26**: 1899-1900.

Kattz, L. (1997). Manipulation of modular polyketide synthases. Chem. Rev. **97**: 2557-2576.

Kenig, M. & Reading, C. (1979). Holomycin and antibiotic (MM19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. J. Antibiot. **32**: 549-554.

Kitani, S., Miyamoto, K.T. ,Takamatsu, S., Herawati, E., Iguchi, H., Nishitomi, K., Uchida, M., Nagamitsu, T., Omura, S., Ikeda, H. & Nihira, T. (2011). Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **108**, 16410-16415.

Komatsu, M., Uchiyama, T., Omura, S., Cane, D.E. & Ikeda, H. (2010). Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **107**: 2646-2651.

Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. Chem. Rev. **97**: 2651-2674.

Medema, M.H., Trefzer, A., Kovalchuk1, A., Berg, van den M., Muller, U., Heijne, W., We, L., Alam, M.T., Ronning, C.M., Nierman, W.C., Bovenberg, R.A.L., Breitling, R. & Takano, E. (2010). The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. Genome Biol. Evol. **2**: 212-224.

Nagarajan, R., Boeck, L.D., Gorman, M., Hamill, R.L., Higgens, C.E., Hoehn, M.M., Stark, W.M. & Whitney, J.G. (1971). β-Lactame antibiotics from *Streptomyces*. J. Am. Chem. Soc. **93**: 2308-2310.

Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B.S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. Nat. Prod. Rep. **26**: 1362-1384.

Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H. & Horinouchi, S. (1999). The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: Identification of a target gene of the A-factor receptor. Mol. Microbiol. **34**: 102-111.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. J. Bacteriol. **190**: 4050-4060.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. & Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**: 12215-12220.

Ostash, B., Saghatelian, A. & Walker, S. (2007). A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A. Chem. Biol. **14**: 257-267.

Pandza, S., Biuković, G., Paravić, A., Dadbin, A., Cullum, J. & Hranueli, D. (1998). Recombination between the linear plasmid pPZG101 and the linear chromosome of *Streptomyces rimosus* can lead to exchange of ends. Mol. Microbiol. **28**: 1165-1176.

Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**: 2444-2448.

Pfeifer1, B.A., Admiraal, S.J., Gramajo, H., David, E. Cane, D.E. & Khosla, C. (2001). Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. Science **291**: 1790-1792.

Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. & Walsh, C.T. (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. Biochemistry **37**: 1585-1595.

Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. & Misener, S. (eds). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. **22**: 4673-4680.

Zhang, Y., Buchoholz, F., Muyrers , J.P.P. & Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. Nat. Genet. **20**: 123-128.

Zhang, Y., Muyrers, J.P.P., Testa, G. & Stewart, A.F. (2000). DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. Nat. Biotechnol. **18**: 1314-1317.

IFO Res.Commun. 26
175-185, 2012

難培養微生物種の全ゲノム配列取得による遺伝子資源化

本　郷　裕　一

東京工業大学大学院生命理工学研究科
〒152-8550　東京都目黒区大岡山 2-12-1-W3-48

Development of methods to acquire the complete genome sequences of unculturable microorganisms as bioresources

Yuichi Hongoh

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology
2-12-1-W3-48 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

The majority of microbes on the Earth are as yet unculturable. Hence, their functions are almost unknown, and the exploitation of these microbes as bioresources has been hampered. The development of molecular taxonomy based on small subunit rRNA sequences has enabled us to reveal the spatial and phylogenetic structure of unculturable microbiota. Furthermore, the functions of a whole microbial community can be predicted by metagenomic analysis. However, the functions of and interactions among the individual microbial species remain almost unknown, and therefore, it is yet difficult to deeply understand the ecological system and to utilize those unculturable microbes for industrial use. To overcome this situation, it is necessary to develop novel methodology for functional analysis of unculturable microbes. In the present study, I attempted to optimize the methods to physically isolate bacterial cells from environments and to enzymatically amplify their whole genomic DNA using phi29 DNA polymerase. In addition, I performed the census of bacterial communities that were physically associated with the cells of several protist species in termite guts as the initial step to analyze their genomes. It was demonstrated that a fluorescence-activated cell sorter and a micromanipulation system are available for single-cell genomics of unculturable bacteria though further improvement is required. On the other hand, attempts to apply a laser micro-dissector to single-cell genomics were failed because of the difficulty in both cell collection and whole genome amplification. From the cells of termite gut protists, diverse eubacteria, up to 10 prokaryotic classes, were discovered by 16S rRNA analysis. The genomes of these symbiotic bacteria will be analyzed using the optimized method of whole genome amplification.

Key words: uncultivable, gut bacteria, termite, symbiosis, multiple displacement amplification

緒　言

伝統的な微生物学は単離培養を前提としており，培養不能微生物種については，形態学以外の研究はほとんどなされてこなかった．しかし，1990年代に small subunit (SSU) rRNA 塩基配列に基づく微生物群集構造解析が可能になると，様々な環境中の大多数の配列が，これまで全く培養されたことがない微生物系統群のものであることが判明した（Rappe & Giovannoni, 2003）．これにより，難培養微生物研究の重要性が強く認識されるようになった．

難培養微生物種を単離培養するための，様々な試みもなされてきた．貧栄養培地やゲランガムの使用といった培地組成の工夫，抗生物質の添加，複数種の共培養，単離細胞の個別培養，などの手法により，未培養分類群から単離培養株を取得する努力が続けられている（鎌形洋一，2010）．しかし未培養分類群は，真正細菌の門レ

E-mail: yhongo@bio.titech.ac.jp
共同研究者：大熊盛也（理化学研究所），佐藤朋之（理化学研究所），間渕貴子（東京工業大学大学院生命理工学研究科），望月悠司（大学大学院生命理工学研究科），中鉢　淳（大学大学院生命理工学研究科）

ベルでも40以上は存在しており（Hongoh *et al.*, 2006），培養に依存しない機能解析法が希求されてきた．

培養非依存的に微生物の機能を解明するには，ゲノム情報を取得して，その遺伝子構成から代謝系を推定するしかない．しかし，ゲノム完全長配列を得るには，ゲノムサイズが小さい原核生物の場合でも100億個以上の細胞数が必要であり，培養を介さない限り不可能である．例外的に，昆虫細胞内共生細菌においては培養不能種のゲノム完全長配列取得に成功し，多くの重要な成果が得られてきた（Moran, 2006）．これは，共生細菌が培養不能でも，宿主昆虫1個体あるいは同親由来の個体群から多数の共生細菌を回収可能であり，また多くの場合，共生細菌のゲノムが数十～数百倍に多倍数化していたためである（Komaki & Ishikawa, 1999）．

こうした事例をのぞけば，培養不能微生物種のゲノム完全長配列取得は不可能であった．そこで登場したのが，環境中の微生物群集から抽出したDNAを網羅的に解析するという方法論である．当然，複数種・複数系統の微生物由来のゲノムDNAが混在（メタゲノム）している．初期のメタゲノム解析は，群集DNAからメタゲノムライブラリーを作成し，特定の機能遺伝子をPCR（polymerase chain reaction）増幅やサザン・ハイブリダイゼーション，あるいは異種発現でスクリーニングして，特定のゲノム断片を選別して配列解析するものであった（Rondon *et al.*, 2000）．ちなみに，分類マーカーとしてのSSU rRNA遺伝子をPCR増幅して群集構造解析する場合は，メタ16S（あるいは18S）解析と称し，メタゲノム解析とは言わない．

2004年にVenterらは，海洋微生物群集のランダムかつ網羅的なメタゲノム配列解析を行った（Venter *et al.*, 2004）．これは，未培養種を含む環境微生物群集の，初めての網羅的機能解析であった．厳密には，単離培養株由来ではない上述の昆虫細胞内共生細菌の場合もメタゲノム解析の一種ではあるが，ほとんど変異がない系統群が対象であり，一般的にはメタゲノム研究例としては扱わない．いずれにせよ，ハイスループットな次世代シーケンサーの開発とともに2000年代後半にメタゲノム配列解析が普及すると，海洋・土壌・動物消化管など，様々な環境中の微生物群集の網羅的機能推定と群集間比較が行われ，大きな成果がもたらされてきた．

しかしながら，メタゲノム配列解析は，微生物群集全体の機能の推定・比較には威力を発揮するものの，個々の微生物種の生理・生態はほとんど未知のままであり，より詳細な研究に発展させるのは困難である．筆者らが研究対象とするシロアリ腸内共生微生物群集についても，（Warnecke *et al.*, 2007）がメタゲノム配列解析結果を発表しているが，明らかになった群集としての機能は，虫個体を用いた過去の生理化学実験により既知のものばかりで，それらを遺伝子レベルで確認した，という以上の意義は薄かった．また，現在のメタゲノム解析は，短い断片を大量に産するハイスループット・シーケンサーによって行われるため，得られる遺伝子も断片状であり，応用研究にも繋げにくい．

このような状況において，筆者らは，個々の培養不能微生物種のゲノム配列取得を目指してきた．種ごとの機能が解明されなければ，種間相互作用も不明であり，生態系を真に理解することはできないからである．また，種ごとにゲノム情報を得ることによって，協調して作用する遺伝子をセットとして同定できるため，異種発現系などを通じた，より詳細な機能解析を展開しやすい．代謝系が解明できれば，単離培養条件の最適化にも役立つであろう．

培養不能微生物種のゲノムを解析するには，ごく少数の細胞から，培養を介さずに，十分量（マイクログラム）のDNAを調製する必要がある．筆者は，Deanら（Dean *et al.*, 2002）が発表したPhi29 DNA polymeraseを用いた等温全ゲノム増幅法に着目し，培養不能細菌種のゲノム配列解析への応用を試みてきた．最初の標的には，シロアリ腸内原生生物の細胞内に共生する培養不能細菌種Rs-D17（旧Termite Group1門）とCfPt1-2（*Bacteroidales*目）を選んだ（Noda *et al.*, 2005; Ohkuma *et al.*, 2007）．宿主原生生物も培養不能であるが，宿主1細胞内に数百～数万個の細菌が共生するため，これらがもし単一系統に近ければ，数百細胞以上のゲノムを鋳型として使用できる．また，細胞内共生細菌は一般にゲノムサイズが小さいため，ゲノムの完全長配列を取得できる確率が高いと考えた．

取得するゲノム配列は，可能な限り完全長に近づけなければいけない．培養不能微生物種の機能を生理化学実験で確認することは困難なので，機能推定はゲノム情報に依存することになる．したがって，ゲノム情報に欠損が多いと，推定される機能の正確性が著しく低下してしまう．また，標的以外の細胞やDNA断片が混入している可能性も高く，得られたゲノムが断片状である場合，混入した配列との区別は困難である．上記2種の培養不能細菌種においては，通常の細菌ゲノムの数倍量の配列解析を行うことで，最終的に，いずれも約1.1 Mbのゲノム完全長配列取得に成功した．これにより，原生生物細胞内共生細菌の機能の全容を初めて明らかにすることができた（Hongoh *et al.*, 2008a; Hongoh *et al.*, 2008b）（Fig. 1）．

このように，数百個以上の細胞からゲノム完全長配列を取得する系は，ある程度確立することができた（Hongoh & Toyoda, 2011）．しかしながら，より少数，究

極的には単一の細胞からのゲノム完全長取得には，いくつもの大きな障害がある．特に標的細胞の回収時とゲノム増幅反応時に，ゲノム解析を困難にする様々な問題が発生する．①外来 DNA の混入，②ゲノム領域間での増幅バイアス，③キメラ配列の形成，などである（本郷・大熊盛也，2010）．出発点の細胞数（ゲノムコピー数）が少ない程これらの影響は大きくなるため（Hutchison *et al.*, 2005），特に単一細胞しか回収できない難培養微生物種を対象とするには（シングルセル・ゲノミクス），実験・解析系のさらなる最適化が必要である．

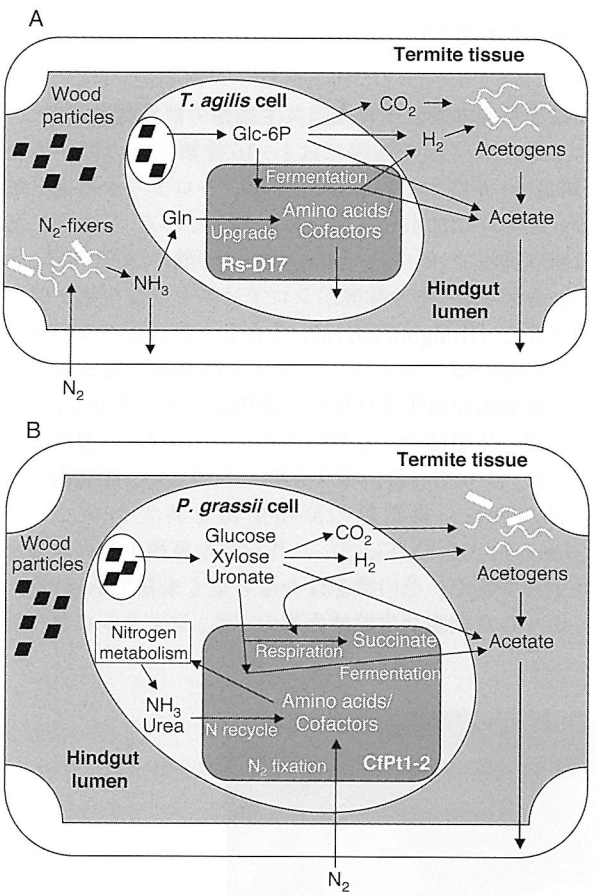


Fig. 1 Outline of the symbiotic roles of symbiotic bacteria within the cells of cellulolytic protists in termite gut, predicted by genome analysis. **A**, symbiotic roles of phylotype Rs-D17 within the cells of the protist *Trichonympha agilis* in the gut of *Reticulitermes speratus*. The original figure was published in supporting information of a paper (Hongoh *et al.*, 2008a). **B**, symbiotic roles of Bacteroidales phylotype CfPt1-2 ("*Candidatus* Azobacteroides pseudotrichonymphae") within the cells of the protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of *Coptotermes formosanus*. The original figure was published in supporting online material of a paper (Hongoh *et al.*, 2008b).

本研究では，筆者らが確立した従来の難培養微生物種ゲノム取得法を改良し，より広範な微生物種に適用できる実験系確立を試みるとともに，シロアリ腸内原生生物に細胞共生する培養不能細菌種の新規ゲノム配列取得の準備を進めてきたので，現状を報告する．

実験方法

材料

実験には，シロアリ腸内微生物と大腸菌 K12 株を使用した．ヤマトシロアリ（*Reticulitermes speratus*）は埼玉県，オオシロアリ（*Hodotermopsis sjoestedti*）は鹿児島県，コウシュンシロアリ（*Neotermes koshunensis*）とタカサゴシロアリ（*Nasutitermes takasagoensis*）は沖縄県，イエシロアリ（*Coptotermes formosanus*）は静岡県と沖縄県，ダイコクシロアリの近縁種（*Cryptotermes cavifrons*）は米国フロリダ州から採集した．これらのうちタカサゴシロアリは高等シロアリと呼ばれ，腸内共生原生生物を保有しない食材性シロアリ種であり，蛍光セルソーター（fluorescence-activated cell sorter: FACS）によるシングルセル・ゲノミクスの最適化に使用した．他の種類は全て下等シロアリと呼ばれ，腸内原生生物を保有する食材性シロアリ種群である．採集後，実験室内で食害木とともに飼育し，実験に供する 3 日前にオートクレーブ滅菌したセルロース粉末（ナカライ）上で飼育して，腸内の木片および摂食された微生物細胞を除去・低減した．腸内微生物を実験に使用する際には，ピンセットで腸を摘出し，緩衝液 Solution U（Trager, 1934）に懸濁した．

全ゲノム増幅反応

等温全ゲノム増幅には，GenomiPhi V2 および HY（Roche），Repli-g ultrafast および Midi キット（Qiagen），RepliPhi（Epicenter）のいずれかを使用した．各製品のマニュアルを基本としながら，種々の最適化を行った．全ての場合において，90℃ 以上による熱変性ではなく，0.2-0.4 N の KOH によるアルカリ変性を行った．熱変性を行った場合，非特異的増幅は生じにくいが，鋳型が極微量だと増幅成功率が著しく低下することが知られており（Stepanauskas & Sieracki, 2007），筆者らも確認している（データ未掲載）．ゲノム増幅産物は一般的なエタノール沈殿法によって精製し，PCR 反応などに用いた．

PCR と DNA 配列解析

PCR は，*Ex*-Taq polymerase（タカラ）を基本的に使用したが，microdiversity の評価など，PCR エラーを最小化したい場合には，校正機能が高い Phusion（Finnzyme）

を用いた．真正細菌 16S rRNA 遺伝子増幅用のプライマーには，27F-mix（5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3'）と，1390R（5'-ACGGGCGGTGTGTACAA-3'）あるいは1492R（5'-GGHTACCTTGTTACGACTT-3'）を用いた（Thongaram *et al.*, 2005）．真核生物 18S rRNA 遺伝子増幅には，Euk18F（5'-GATCCMGGTTGATYCTGCC-3'）と1722R（5'-CWDCBGCAGGTTCACCTAC-3'）を用いた（Ohkuma *et al.*, 1998）．サーマルサイクラーにはバイオラッドの C1000 あるいは S1000 を用い，95℃ 1 分の変性後，95℃15秒，50℃ 1 分，72℃ 4 分を 15～20 サイクル行い，最後に 72℃10分間伸長させた．Phusion を使用した場合は，変性を98℃で行った．PCR 増幅産物は，TOPO TA クローニングキットあるいは ZERO Blunt TOPO PCR クローニングキット（Invitrogen）で大腸菌に導入してクローニングした．得られたコロニーをランダムに選び，Big-Dye Terminator（Applied Biosystems）で反応させて，ABI 3730 で配列解析した．

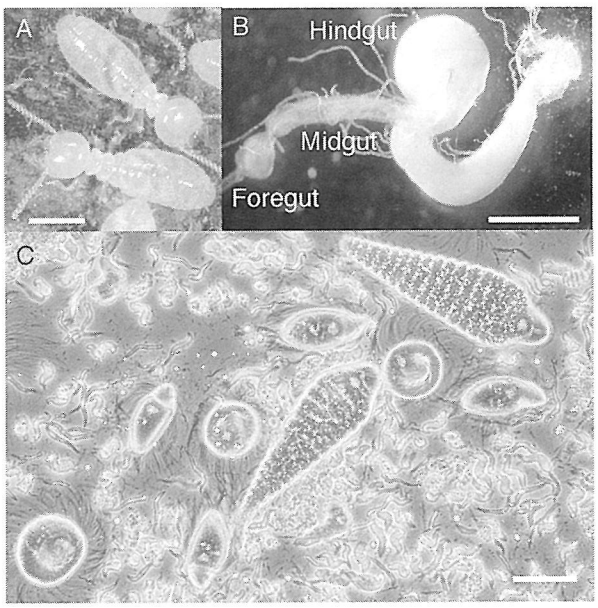


Fig. 2 Termites and its gut microbiota. **A**, the termites *Reticulitermes speratus*. **B**, the entire gut of *R. speratus*. **C**, the gut microbiota of *R. speratus*. Bars = 1 mm in panels A and B; 50 μm in panel C.

結果と考察

シロアリ腸内原生生物細胞共生細菌の群集構造解析

下等シロアリの後腸には1～10種類以上の原生生物（鞭毛虫）が共生しており（Fig. 2），シロアリが摂食・破砕した木片の加水分解・発酵を担っている．腸内中心部は嫌気環境で，餌中のセルロースは酢酸，二酸化炭素，水素に分解され，その酢酸がシロアリの主要な炭素・栄養源となる（Hongoh, 2011a）．しかし，これらパラバサリア門あるいはプレアクソスティラ門に属するシロアリ腸内特異的な原生生物種の培養例はほとんどなく，詳細な生理・生態は全く不明のままである．また，興味深いことに，シロアリ腸内原生生物の大多数は，細胞内あるいは表面に，複数種の原核生物を共生させている（Hongoh, 2011b）（Fig. 3）．これら共生原核生物の培養成功例は皆無で，その機能はやはり全く未知であった．

こうした細胞共生原核生物のうち，ヤマトシロアリ腸

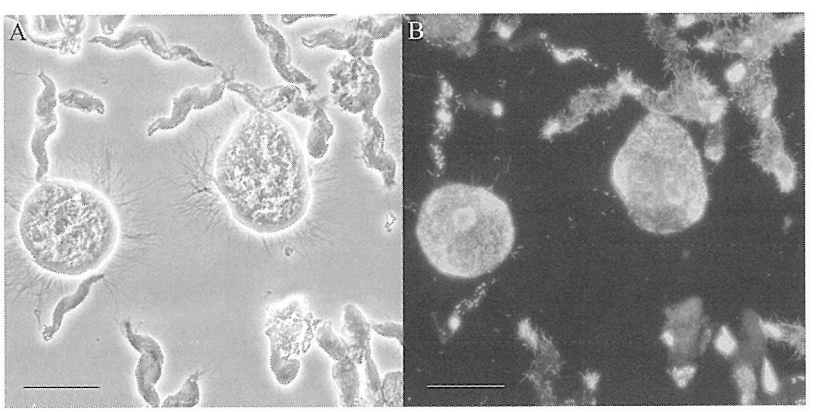


Fig. 3 Bacterial symbionts of protists in the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. **A**, phase contrast microscopy of protists in the gut of *R. speratus*. These protists were fixed in 4% formaldehyde and dehydrated with ethanol series. **B**, fluorescent microscopy of the microbiota. DNA in the bacterial cells and nuclei of protists were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). All of the protist cells harbored endo- and/or ectosymbiotic bacteria. Bar = 50 μm. The original figure was published in a paper (Hongoh, 2011b).

内に共生する原生生物 *Trichonympha agilis* と，イエシロアリ腸内に共生する原生生物 *Pseudotrichonympha grassii* の細胞内に各々共生する真正細菌，Rs-D17 と CfPt1-2 については全ゲノム配列解析を終えたことは既に記した（Hongoh *et al.*, 2008a; Hongoh *et al.*, 2008b）．ゲノム解析結果によると，これら細胞内共生細菌の主要な役割はアミノ酸とビタミン合成であり，特に CfPt1-2 は空中窒素固定能も有することが示唆された．シロアリは窒素分をほとんど含まない木片のみを餌とするため，共生細菌による窒素固定・窒素化合物合成は，宿主原生生物とシロアリの栄養に，極めて重要な貢献をしているものと考えられる．

しかしながら，シロアリ腸内原生生物には多様な真正細菌系統群と（Fig. 4），さらにメタン生成古細菌（主に *Methanobrevibacter* 属）が細胞共生しており（Hongoh & Ohkuma, 2011），こうした細胞共生体を１種ごとにゲノム解析することで，なぜ複数の原核生物種が１つの原生生物細胞に常に同時共生しているのか，それらの種間相互作用はどうなっているのか，また細胞共生体と一体になった原生生物にはどのような機能が付加されているのか，といった謎を解明したいと考えている．そこで本研究では，各種原生生物にどのような真正細菌が共生しているかを，16S rRNA 遺伝子配列に基づいて解析した．

まず，マイクロマニピュレーター（Eppendorf Transferman NK2）でシロアリ腸内の主な原生生物を，種ごとに10細胞回収した．基本的には Hongoh & Toyoda（2011）の方法に従い，それぞれ全ゲノム増幅して DNA サンプルを調製した．PCR で 16S rRNA 遺伝子を増幅し，約90クローンずつ配列解析し，16S rRNA 配列解析ソフト ARB を用いて門あるいは綱レベルで分類した結果，Table 1 のようになった．１種類の原生生物に複数種の細菌が共生するのは，これまでの知見と一致している．また，こうして検出された真正細菌種の多くは，宿主原生生物に種特異的で，再現性良く，これまでにも配列が得られている．

今回，新規に明らかになったのは，既に報告されているスピロヘータ門，バクテロイデス綱，*Elusimicrobia* 門（旧 Termite Group 1 門），*Synergistetes* 門，*Deltaproteobacteria* 綱に加えて，*Verrucomicrobia* 門，*Alphaproteobacteria* 綱，*Mollicutes* 綱，*Clostridia* 綱，*Actinobacteria* 門など，予想以上に多様な細菌系統群が細胞共生していたことである．これらのうち，*Alphaproteobacteria* 綱のものは細胞内共生細菌，*Mollicutes* 綱は細胞内と細胞表面の２タイプが存在することを蛍光ハイブリダイゼーション（fluorescent *in situ* hybridization: FISH）解析によって明らかにした（未発表，論文作成中）．*Verrucomicrobia* 門という，土壌に多く見られる細菌門の複数種も，細胞内共生細菌であることを確認した（論文作成中）．現在，これら各種細胞共生細菌，特に Fig. 4 の細胞表面共生細菌 “*Candidatus* Tammella caduceiae”（Hongoh *et al.*, 2007b）と細胞表面

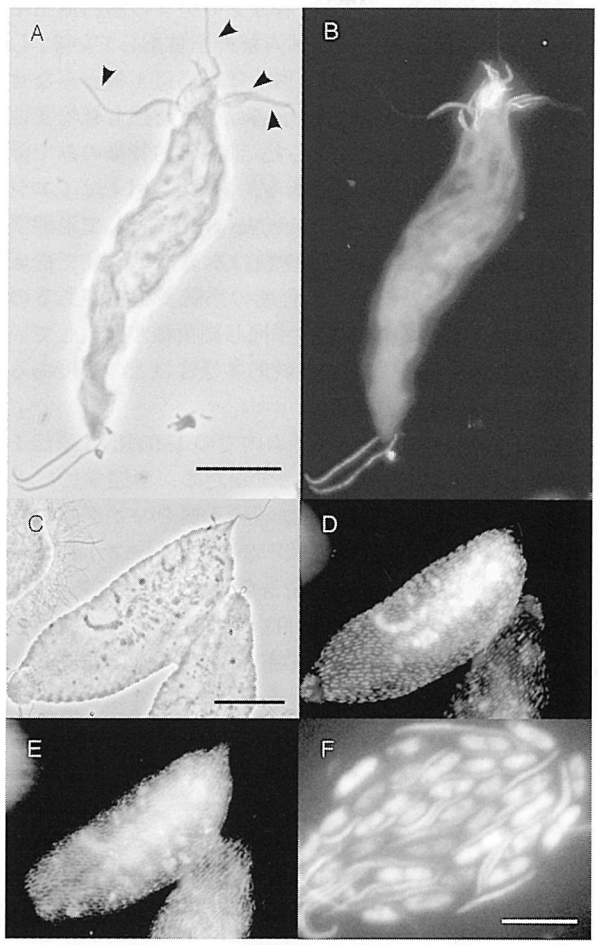


Fig. 4 Ectosymbiotic bacteria on the surface of protist cells in termite guts. **A**, phase contrast image of the protist *Dinenympha porteri* from the gut of the termite *Reticulitermes speratus*. **B**, detection of the ectosymbiotic spirochetes and *Bacteroidales* bacteria by FISH analysis using taxon-specific probes. All the bristle-like structures were ectosymbiotic bacteria except the true flagella of the protist host indicated by arrowheads in panel A. Bar = 10μm in panel A. **C**, phase contrast image of the protist *Caduceia versatilis* from the gut of the termite *Cryptotermes cavifrons*. **D**, FISH analysis of the ectosymbiotic "*Candidatus* Tammella caduceiae" in the phylum *Synergistetes*. **E**, FISH analysis of ectosymbiotic *Bacteroidales* bacteria. Bar = 50μm in panel C. **F**, DAPI-stained ectosymbiotic bacteria on the surface of a *Caduceia versatilis* cell. Bar = 5μm. Panels A and B were originally published in a paper (Hongoh *et al.*, 2007a). Panels C-F were originally published in a paper (Hongoh *et al.*, 2007b).

共生バクテロデイスのゲノム配列については，Hongoh & Toyoda（2011）の方法で取得し，解析中である．

シロアリ腸内原生生物と細胞内共生細菌の microdiversity 解析

筆者らの研究チームでは，各種シロアリの腸内原生生物とその細胞共生細菌のゲノム解析を目指している．しかし，そもそも各原生生物「種」は本当に１種とみなせるのか，という疑問があった．各原生生物種も難培養性のため，生理学的実験は行えず，形態学的特徴のみで分類されてきたという経緯がある．つまり，例えばイエシロアリ腸内の，*Pseudotrichonympha grassii* として形態学的に分類されている原生生物種は本当に単一種で構成されているのか，またどの程度の系統多様性があるのか，さらにその細胞内には必ず同じ細菌種が共生しているのか，その細菌種内での系統的多様性はどの程度あるのか，などは未知であった．

まず，原生生物の単一ゲノム内での 18S rRNA 遺伝子のコピー間変異の程度を評価するため，形態学的に *P. grassii* と同定される原生生物細胞１個をマイクロマニピュレーターで回収し，全ゲノム増幅を行った．同遺伝子を PCR 増幅し，塩基配列全長を決定したところ，ほぼ全てのクローンの配列が100% 相同であった．別の *P. grassii* 細胞でも同様の結果であった．さらに，より変異の生じやすい 18S rRNA 遺伝子と 28S rRNA 遺伝子間の非コード領域（Internal transcribed spacer: ITS）を，新たに作成したプライマー（未発表）で PCR 増幅して塩基配列を解析したところ，やはりほぼ全てが100% 相同であった．別の細胞でも同様であった．つまり，*P. grassii* の同一ゲノム内では，18S rRNA 遺伝子および隣接する ITS 配列にほとんどコピー間の差異がないことを明らかにした．

これを踏まえて，*P. grassii* 細胞間での 18S rRNA 遺伝子と ITS の配列多様性を解析した．一つの腸内に存在した *P. grassii* 細胞のうち96個をマイクロピペットで吸い取って PCR 用プレートに１個ずつ分取した．これらを各々全ゲノム増幅して調製した DNA を鋳型として，PCR で 18S rRNA 遺伝子と ITS を増幅してダイレクトシーケンス法によって解析したところ，ほぼ全ての細胞の配列が100% 相同であった．別のイエシロアリ個体でも同様の結果が得られ，さらにシロアリ個体間での *P. grassii* 配列の比較でも，ほとんど相違がなかった．つまり，イエシロアリ腸内の *P. grassii* は，一つの腸内でも，宿主個体が異なっていても，ほとんどその系統に差異が無いことがわかった．

また，*P. grassii* の細胞内共生細菌の優占種である CfPt1-2 は既にゲノム完全長配列を決定して発表済みだが（Hongoh *et al.*, 2008b），全ての *P. grassii* 細胞が同共生細菌を保有するのかどうか，またその共生菌がゲノムレベルでどの程度の変異を有するかは不明であった．これについて，上で単離回収した *P. grassii* 細胞を用いて検証した．CfPt1-2 のゲノム上には窒素固定関連オペロンが存在する．その内部の非コード領域を PCR 増幅して比較したところ，異なる宿主 *P. grassii* 細胞間では相

Table 1 Taxonomic composition (%) of symbiotic bacteria associated with the cells of protists in termite guts

Taxa*	RsTa	HsT1	HsT2	HsT3	HsEu	RsTm	CfPg	CcCv	CcSn	NkDv
Elusimicrobia	63	46	82	49				9	4	
Bacteroidia							86	57	36	79
Spirochaetes	2	6	5	35	35	82			5	
Alphaproteobacteira		2				11		4	23	3
Deltaproteobacteria	8	23								
Verrucomicrobia	28								21	15
Mollicutes		21	9	12	43	8		2	10	3
Clostridia							13			
Actinobacteria		2	2	5	22		1			
Synergistetes								28	2	

* The species of protists and their host termites are indicated by abbreviations. Host termites: *Reticulitermes speratus* (Rs), *Hodotermopsis sjoestedti* (Hs), *Coptotermes formosanus* (Cf), *Cryptotermes cavifrons* (Cc), *Neotermes koshunensis* (Nk). Protists: *Trichonympha agilis* (Ta), *Trichonympha* species (T1 – T3), *Eucomonympha* sp. (Eu), *Teranympha mirabilis* (Tm), *Pyrsonympha grandis* (Pg), *Caduceia versatilis* (Cv), *Snyderella* sp. (Sn), *Devescovina* sp. (Dv).

同性99.7%以上，異なるシロアリ個体間での比較でも99.3%以上相同であった．これらのことから，シロアリ腸内原生生物の細胞内共生細菌は，宿主原生生物の細胞が異なっていても，配列の変異が非常に小さいゲノムを持つことが示唆された．

つまり，原生生物細胞共生細菌のゲノム解析結果は，その宿主原生生物種の個体群とそれらが持つ同種の共生細菌個体群全体に対して適用可能だということが示唆された．このように，全ゲノム増幅法でDNAサンプルを調製することによって，同一の培養不能微生物細胞に対して，異なる実験を何度も繰り返すことができる．これらの結果の詳細については，現在論文作成中である．

培養不能微生物種ゲノム解析法の最適化の試み

培養不能微生物種のごく少数の細胞，特に単一の細菌細胞から全ゲノム配列を取得するには，依然として多くの障害がある．これまでに，マイクロマニピュレーターや蛍光セルソーターを使用した細菌細胞単離法は報告されているが（Woyke *et al.*, 2009; Woyke *et al.*, 2010），レーザーマイクロダイセクターを使用した系はほとんど知られていない．ここでは，ネガティブデータではあるが，参考にレーザーマイクロダイセクター3機種（Zeiss PALM MicroBeam，Leica LMD7000，Arcturus XT）を試した結果を簡単に報告しておきたい．前2機種については，単一細菌細胞の回収自体が困難であった．透明なプラスチック膜上に撒いた大腸菌やシロアリ腸内細菌をある程度乾燥させ，細胞を中心に直系10-25μm径程度にUVレーザーで切り出したが，静電気の影響が強すぎるため，回収率が極めて低かった．回収できた細胞についても，PCR増幅は可能な場合があったが，全ゲノム増幅には失敗した．ゲノム増幅が見られた場合は，明らかにコンタミネーションDNA由来のもののみであった．試料の切り出しや回収時の跳ね上げ（PALMの場合）にUVレーザーを使用しているため，その影響でゲノムが損傷しているのかもしれないが，原因は不確かである．またArcturusについては，IRレーザーで回収用の膜を突出，サンプルに付着させるという独特な方式によって，細菌細胞であっても回収は容易だったが，回収後はDNA抽出して使用する仕様になっており，単一の細菌細胞を全ゲノム増幅反応させるのは現時点では困難である．したがって，レーザーマイクロダイセクターの，単一細菌細胞の全ゲノム増幅への応用は，現在のところ難しそうである．

FACS（Beckman Coulter, MoFlo）を使用した系の最適化も進めてきたが，複数の米国チームが既にMoFloやARIA（BD）を使用したシングルセル・ゲノミクスの論文を発表しており（Heywood *et al.*, 2011; Siegl *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2011; Martinez-Garcia *et al.*, 2012），それ以上の新知見はほとんどなかったので，ここでは詳細に述べない．FACSはハイスループットに細菌細胞を単離できるという大きな長所があり，環境微生物群集から

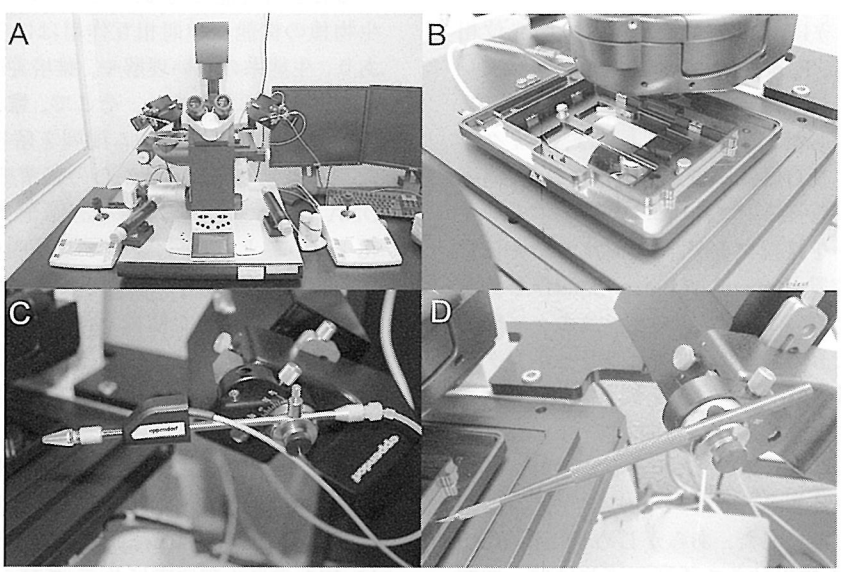


Fig. 5 Micromanipulation system used for single-cell genomics. **A**, a Leica AM6000 inverted microscope with micromanipulators on both sides. **B**, a customized stage equipped with a humid-thermocontrol chamber. **C**, a capillary holder with a vibrator, Piezo Expert. **D**, a scalpel for microsurgery.

ランダムに細胞を単離し，全ゲノム増幅を経て，多様な未培養細菌種を網羅的に配列解析する，という大型のプロジェクトには向いている．また，生細菌細胞あるいはエタノール固定した細菌をFISHして使用すれば，特定の細菌種のみを回収することも可能である（Yilmaz *et al.*, 2010）．ただ，現時点では，そのようにして特定細菌種のゲノム配列を決定した報告例はない．FISHを介さずにランダムな回収をする手法だと，特定細菌種を解析したい場合には，かえって非効率的になる可能性もある．これまでに，海洋細菌や海洋性原生生物に対して使用例がある．筆者らが使用しているシロアリ腸内細菌においては，サンプルを事前にDNase処理（Promega）しておくことによって，MoFloによる単離回収サンプルの約3割において，シロアリ腸内細菌の単一の16S rRNA遺伝子を，PCR増幅と配列解析で確認できた．DNase処理をしなかった場合では，全サンプルで失敗し，単一の16S rRNA遺伝子配列増幅が見られなかった．さらに最適化を続ければ，より効率的に使用できるかもしれない．

筆者らが特に力を入れてきたのは，マイクロマニピュレーターを用いた系の最適化である．マイクロマニピュレーターは作業に集中力と経験，器用さが必要であり，一種の職人芸が要求される．時間もかかるため，同時に多くのサンプルを処理することはできない．その一方で，顕微鏡で対象を観察しながら回収できるので，特定の細菌種や原生生物種のゲノム解析が目的ならば，FACSよりも確実である．以下，現時点最適と考えられる方法を記す．

Fig. 5に示したように，Leicaの全自動倒立蛍光位相差微分干渉顕微鏡に，Eppendorfのマイクロマニピュレーター Transferman NK2を2台装着したAM6000システムを設置して使用した．このシステムでは，マイクロマニピュレーターと全自動顕微鏡が連動しており，両方の操作をスムースに行える．マニピュレーターには，キャピラリーホルダーを接続するが，キャピラリーを任意に振動させられる装置（Eppendorf Piezo Expert）を装着することで（Fig. 5C），細胞やゴミのガラスキャピラリーへの付着を低減できる．また，キャピラリーホルダーの代わりに，眼科用のマイクロメスを装着すれば，例えばシロアリ腸内原生生物の細胞を切開して，核を取り出す，といったことも可能である．ステージには特注の保湿・保温チャンバーを置き，ステージ上で全ゲノム増幅反応させることを可能にした．あらかじめSYBR Green Iなどの二重鎖DNA検出試薬を添加しておけば，増幅量を一定時間おきにモニタリングすることもできる．

全ゲノム増幅反応の問題点であるコンタミネーションと増幅バイアスの問題は，反応液量を極小化することで，低減されるとの報告がある（Marcy *et al.*, 2007）．理想的には，微細流路とチャンバーからなるチップを作成し，できるだけ自動化してナノリットルあるいはサブナノリットルスケールで反応させるのが効率的であるが（Blainey *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2012），そういったチップの作成技術がなければ難しい．しかし，マイクロマニピュレーターを使用すれば，非効率ではあるが，サブナノリットルの反応系を簡単につくることができる．ミネラルオイルをスライドガラス上に添付し，その中に微小液滴をつくれば良い．筆者らのチームでは，同手法を使用して，極少数の細胞から，一晩の反応でゲノム解析用サンプルを調製している．増幅したDNAサンプルは，16S rRNA遺伝子をPCR増幅し，配列解析して確認する．現在，本手法により調製したサンプルのゲノム解析を進行させている．

要　約

環境中の大多数の微生物種は現時点で培養不能であり，その生理・生態は未知のままで，産業利用も困難である．rRNA遺伝子配列に基づく分子生態学的解析により，そうした難培養微生物種を含む群集の構造を明らかにすることは可能であり，またメタゲノム解析によって，群集全体としての機能を遺伝子レベルで推定・比較することも可能である．しかしながら，個々の難培養微生物種の機能や種間相互作用はほとんど不明のままであり，生態系の深い理解や，難培養微生物種の産業利用はあまり進んでいない．そこで，難培養微生物種のごく少数の細胞から全ゲノム配列を解析する必要がでてきた．本研究では，環境からの細菌細胞単離法と，Phi29 DNA polymeraseを用いた等温全ゲノム増幅法の最適化を試みるとともに，シロアリ腸内原生生物に細胞共生する細菌の新規ゲノム配列取得のための準備を進めてきた．実験を重ねた結果，蛍光セルソーター（FACS）やマイクロマニピュレーターを使用して細菌を単離，全ゲノム増幅する手法は，最適化の余地は多くあるものの，ある程度の成功が見込めた．一方，レーザーマイクロダイセクターを使用する系は，細菌細胞の回収が困難であり，標的からの全ゲノム増幅反応産物も得られなかった．シロアリ腸内原生生物と細胞共生する細菌については，10もの真正細菌綱に及ぶ，多様な系統群が16S rRNA遺伝子解析により見いだされた．これらは順次ゲノム配列解析を行う予定である．

本助成で得られた研究成果の報告

口頭・ポスター発表

1) Bodington, D., Segawa, T., Takeuchi, N., Hongoh, Y. & Kohshima, S. (2010) . Altitudinal change in bacterial communities on a Himalayan glacier, analysed by 16S rRNA gene sequencing and fluorescence *in situ* hybridization. 日本雪氷学会雪氷研究大会2010（仙台）.
2) 塚越光，松井真，小田切正人，守屋繁春，本郷裕一，西田有一郎，北本勝ひこ，有岡学（2011）．シロアリ腸内共生系由来マンナナーゼの生産および解析．2011年度日本農芸化学会大会（京都）.
3) Kawafune, K., Hongoh, Y., Hamaji, T. & Nozaki, H. (2011). Molecular identification of Rickettsiacean endosymbionts in the Volvocaleans, *Carteria cerasiformis* and *Plecorina japonica* (Chlorophyta). Annual Meeting for Phycological Society of America (PSA) (Seattle, USA).
4) 川船かおる，本郷裕一，浜地貴志，野崎久義（2011），緑藻ボルボックス目の細胞内から発見されたリケッチア科バクテリア．日本植物学会第75回大会（東京）.
5) 瀬川高弘，Kirill, K.，斎藤成也，本郷裕一，本山秀明（2011）．氷床コアにおける微生物解析．第2回極域科学シンポジウム（東京）.
6) 中鉢淳，大島健志朗，上岡麗子，Mangoni, A., Gurgui, M., Oldham, N., Echten-Deckert, G.，井上広光，大熊盛也，本郷裕一，宮城島進也，Piel, J.，服部正平，深津武馬（2012），ミカンキジラミ共生細菌2種のゲノム構造と機能的役割．第6回日本ゲノム微生物学会年会（東京）.
7) 中鉢淳，大島健志朗，上岡麗子，Mangoni, A., Gurgui, M., Oldham, N., Echten-Deckert, G.，大熊盛也，本郷裕一，宮城島進也，服部正平，Piel, J.，深津武馬（2012)）．ミカンキジラミの防衛共生．第56回日本応用動物昆虫学会（奈良）.

シンポジウム等招待講演

1) 本郷裕一（2010）．難培養性細菌種のゲノム完全長配列取得による機能解明．日本土壌微生物学会2010年度大会シンポジウム“土壌の環境・DNA・個別菌情報の融合をめざして：『メタ解析』時代の土壌生態学”（東京）.
2) 本郷裕一（2010）．難培養性細菌のゲノム完全長配列取得による機能解明．農業環境技術研究所セミナー（つくば）.
3) 本郷裕一（2010）．ゲノムから見るシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌の機能と進化．日本進化学会第12回東京大会ワークショップ“ゲノムから見る微生物進化”（東京）.
4) 本郷裕一（2010）．シロアリの不思議～腸内細菌のゲノム解析と機能解明．東工大バイオフェスタ2010（東京）.
5) 本郷裕一（2010）．培養できない微生物の機能を探る～シロアリ腸内微生物のはたらき～．有機農業研究者会議2010（つくば）.
6) 本郷裕一（2010）．シロアリ腸内共生鞭毛虫と細胞共生する細菌の多様性と機能．第43回原生動物学会公開シンポジウム“生物の共生機構を考える”（水戸）.
7) 本郷裕一（2010）．難培養性細菌のゲノム解析によるシロアリ腸内共生機構の解明．酵素工学研究会第64回講演会（東京）.
8) Hongoh, Y. (2010). Termites, protists, and bacteria: a multi-layered symbiosis for thriving on lignocellulose. 国際生物学賞記念シンポジウム: Biology of Symbiosis (Tsukuba, Japan).
9) 本郷裕一（2010）．シロアリ腸内複合共生系をベースにした微生物新機能開発に向けて．日本分子生物学会・日本生化学会合同大会（BMB2010）ワークショップ“微生物新機能開発の最前線”（神戸）.
10) 本郷裕一（2011）．ゲノムから明らかにする シロアリ腸内複合共生機構．京都大学生態学研究センター・セミナー（京都）.
11) 本郷裕一（2011）．シロアリ腸内微生物群集の多様性とゲノム情報に基づく機能解明．日本進化学会2011年度大会シンポジウム“未知の多様性探索とゲノム情報”（京都）.
12) 本郷裕一（2011）．シロアリ腸内共生系 - メタゲノムとシングルゲノムからのアプローチ．日本ゲノム微生物学会ワークショップ2011（仙台）.
13) Hongoh, Y. (2011). Genome analysis of unculturable microbial symbionts in the termite gut. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress session: Single-cell Genomics: An Innovative Tool for Analyzing Uncultivable Microorganisms. (Sapporo, Japan).
14) Hongoh, Y. (2011). Genome analysis of symbiotic microorganisms in termite guts. International Symposium on Digestive systems in Termites -from Fundamentals to Applications to Biomass Utilization-. (Okinawa, Japan).

原著論文

1) Hongoh, Y. & Toyoda, A. (2011). Whole genome sequencing of unculturable bacterium using whole genome amplification. Methods Mol. Biol. **733**: 25-33.
2) Kawafune, K., Hongoh, Y., Hamaji, T. & Nozaki, H. (2012), Molecular identification of rickettsial endosymbionts in the non-phagotrophic volvovalean green algae. PLoS One **7**: e31749.

その他（総説など）

1) 本郷裕一，大熊盛也（2010）．第13章 Single Cell のゲノム解析 in「難培養微生物研究の 最新技術 II—ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望—」(大熊 盛也，工藤俊章監修）シーエムシー出版．pp. 136-146. 東京.
2) 本郷裕一，大熊盛也（2010）．第5章 統計学的微生物群集構造の解析 in「難培養微生物研究の最新技術 II—ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望—」(大熊 盛也，工藤俊章監修）シーエムシー出版．pp. 51-60. 東京.
3) 本郷裕一（2010）．第3章 難培養性微生物のゲノム解析技術とシロアリ腸内微生物の共生機構 in 「メタゲノム解析技術の最前線」(服部正平監修）シーエムシー出版．pp. 118-126，東京.
4) Hongoh, Y. (2010). Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in termite gut. Biosci. Biotech. Biochem. **74**: 1145-1151.
5) 本郷裕一（2010）．難培養性細菌種のゲノム完全長配列取得による機能解明．土と微生物 **64**: 77-80.
6) 本郷裕一（2011）．シロアリ腸内原生生物と原核生物の細胞共生．原生動物学雑誌 **44**: 115-129.
7) Hongoh, Y. & Ohkuma, M. (2011). Termite gut

flagellates and their methanogenic and eubacterial symbionts. Microbiology Monographs **19**: 55-79.
8) Hongoh, Y. (2011). Chapter "Complete genome of an uncultured endosymbiont coupling nitrogen fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut" in "Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats" (Ed. Frans J. de Bruijn) Wiley-Blackwell. pp. 221-228. New Jersey.
9) Hongoh, Y. (2011). Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. Cell. Mol. Life Sci. **68**:1311-25.

謝　辞

本研究に対し助成をいただいた公益財団法人発酵研究所と関係者の皆様に厚く御礼申し上げます．またシロアリ採集にご協力いただいた，マサチューセッツ大学のMichael Dolan教授，琉球大学の徳田岳准教授に御礼申し上げます．ゲノム配列解析には，国立遺伝学研究所の豊田淳准教授にご協力いただき，感謝しております．

文　献

Blainey, P.C., Mosier, A.C., Potanina, A., Francis, C.A. & Quake, S.R. (2011). Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. PLoS One **6**: e16626.

Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J., Driscoll, M., Song, W., Kingsmore, S.F., Egholm, M. & Lasken, R.S. (2002). Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**: 5261-5266.

Heywood, J.L., Sieracki, M.E., Bellows, W., Poulton, N.J. & Stepanauskas, R. (2011). Capturing diversity of marine heterotrophic protists: one cell at a time. ISME J. **5**: 674-684.

Hongoh, Y. (2011a). Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. Cell. Mol. Life Sci. **68**: 1311-1325.

Hongoh, Y. (2011b). Cellular symbiosis between protists and prokaryotes in termite guts. Jpn. J. Protozool. **44**: 115-129.

Hongoh, Y. & Ohkuma, M. (2011) Termite gut flagellates and their methanogenic and eubacterial symbionts. In Microbiology Monographs: (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea. Hackstein, J.H.P. (ed). Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, pp. 55-79.

本郷裕一& 大熊盛也 (2010). Single Cell のゲノム解析. *In* 大熊盛也，工藤俊章 (編) 難培養微生物研究の最新技術 II，pp. 136-146，株式会社シーエムシー出版，東京.

Hongoh, Y. & Toyoda, A. (2011). Whole-genome sequencing of unculturable bacterium using whole-genome amplification. Methods Mol. Biol. **733**: 25-33.

Hongoh, Y., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T. & Ohkuma, M. (2007a). *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae: bristle-like *Bacteroidales* ectosymbionts of termite gut protists. Environ. Microbiol. **9**: 2631-2635.

Hongoh, Y., Sato, T., Dolan, M.F., Noda, S., Ui, S., Kudo, T. & Ohkuma, M. (2007b). The motility symbiont of the termite gut flagellate *Caduceia versatilis* is a member of the "*Synergistes*" group. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 6270-6276.

Hongoh, Y., Deevong, P., Hattori, S., Inoue, T., Noda, S., Noparatnaraporn, N., Kudo, T. & Ohkuma, M. (2006). Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum *Fibrobacteres*, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 6780-6788.

Hongoh, Y., Sharma, V.K., Prakash, T., Noda, S., Taylor, T.D., Kudo, T., Sakaki, Y., Toyoda, A., Hattori, M. & Ohkuma, M. (2008a). Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **105**: 5555-5560.

Hongoh, Y., Sharma, V.K., Prakash, T., Noda, S., Toh, H., Taylor, T.D., Kudo, T., Sakaki, Y., Toyoda, A., Hattori, M. & Ohkuma, M. (2008b). Genome of an endosymbiont coupling N_2 fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. Science **322**: 1108-1109.

Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O., Pfannkoch, C.& Venter, J.C. (2005). Cell-free cloning using phi29 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **102**: 17332-17336.

鎌形洋一 (2010). 難培養微生物の培養技術. *In* 大熊盛也，工藤俊章 (編) 難培養微生物研究の最新技術 II，pp. 251-262，株式会社シーエムシー出版，東京.

Komaki, K. & Ishikawa, H. (1999). Intracellular bacterial symbionts of aphids possess many genomic copies per bacterium. J. Mol. Evol. **48**: 717-722.

Leung, K., Zahn, H., Leaver, T., Konwar, K.M., Hanson, N.W., Page, A.P., Lo, C.C., Chain, P.S., Hallam, S.J. & Hansen, C.L. (2012). A programmable droplet-based microfluidic device applied to multiparameter analysis of single microbes and microbial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **109**: 7665-7670.

Marcy, Y., Ishoey, T., Lasken, R.S., Stockwell, T.B., Walenz, B.P., Halpern, A.L., Beeson, K.Y., Goldberg, S.M. & Quake, S.R. (2007). Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. PLoS Genet. **3**: 1702-1708.

Martinez-Garcia, M., Swan, B.K., Poulton, N.J., Gomez, M.L., Masland, D., Sieracki, M.E. & Stepanauskas, R. (2012). High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. ISME J. **6**: 113-123.

Moran, N.A. (2006). Symbiosis. Curr. Biol. **16**: R866-871.

Noda, S., Iida, T., Kitade, O., Nakajima, H., Kudo, T. & Ohkuma, M. (2005). Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotrichonympha grassii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 8811-8817.

Ohkuma, M., Ohtoko, K., Grunau, C., Moriya, S. & Kudo, T. (1998). Phylogenetic identification of the symbiotic hypermastigote *Trichonympha agilis* in the hindgut of the

termite *Reticulitermes speratus* based on small-subunit rRNA sequence. J. Euk. Microbiol. **45**: 439-444.

Ohkuma, M., Sato, T., Noda, S., Ui, S., Kudo, T. & Hongoh, Y. (2007). The candidate phylum 'Termite Group 1' of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. FEMS Microbiol. Ecol. **60**: 467-476.

Rappe, M.S. & Giovannoni, S.J. (2003). The uncultured microbial majority. Annu. Rev. Microbiol. **57**: 369-394.

Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J. & Goodman, R.M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 2541-2547.

Siegl, A., Kamke, J., Hochmuth, T., Piel, J., Richter, M., Liang, C., Dandekar, T. & Hentschel, U. (2011). Single-cell genomics reveals the lifestyle of *Poribacteria*, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. ISME J. **5**: 61-70.

Stepanauskas, R. & Sieracki, M.E. (2007). Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**: 9052-9057.

Thongaram, T., Hongoh, Y., Kosono, S., Ohkuma, M., Trakulnaleamsai, S., Noparatnaraporn, N. & Kudo, T. (2005). Comparison of bacterial communities in the alkaline gut segment among various species of higher termites. Extremophiles **9**: 229-238.

Trager, W. (1934). The cultivation of a cellulose-digesting flagellate, *Trichomonas termopsidis*, and of certain other termite protozoa. Biol. Bull. **66**: 182-190.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H. & Smith, H.O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science **304**: 66-74.

Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S.G., Podar, M., Martin, H.G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., Szeto, E., Salamov, A., Barry, K., Mikhailova, N., Kyrpides, N.C., Matson, E.G., Ottesen, E.A., Zhang, X., Hernandez, M., Murillo, C., Acosta, L.G., Rigoutsos, I., Tamayo, G., Green, B.D., Chang, C., Rubin, E.M., Mathur, E.J., Robertson, D.E., Hugenholtz, P. & Leadbetter, J.R. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature **450**: 560-565.

Woyke, T., Tighe, D., Mavromatis, K., Clum, A., Copeland, A., Schackwitz, W., Lapidus, A., Wu, D., McCutcheon, J.P., McDonald, B.R., Moran, N.A., Bristow, J. & Cheng, J.F. (2010). One bacterial cell, one complete genome. PLoS One **5**: e10314.

Woyke, T., Xie, G., Copeland, A., Gonzalez, J.M., Han, C., Kiss, H., Saw, J.H., Senin, P., Yang, C., Chatterji, S., Cheng, J.F., Eisen, J.A., Sieracki, M.E. & Stepanauskas, R. (2009). Assembling the marine metagenome, one cell at a time. PLoS One **4**: e5299.

Yilmaz, S., Haroon, M.F., Rabkin, B.A., Tyson, G.W. & Hugenholtz, P. (2010). Fixation-free fluorescence *in situ* hybridization for targeted enrichment of microbial populations. ISME J. **4**: 1352-1356.

Yoon, H.S., Price, D.C., Stepanauskas, R., Rajah, V.D., Sieracki, M.E., Wilson, W.H., Yang, E.C., Duffy, S. & Bhattacharya, D. (2011). Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. Science **332**: 714-717.

平成22年度一般研究助成の研究報告

助成期間：平成22年４月～平成24年３月

植物病原性菌類の新たな寄生性系統への進化メカニズムに関する研究

飯　田　祐一郎

農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所
〒514-2392　三重県津市安濃町草生360

目的：トマト葉かび病菌（*Passalora fulva*）は，世界中で重要病害とされている植物病原糸状菌である．葉かび病抵抗性遺伝子が導入された市販品種がこれまで効力を発揮してきたが，近年新たに病原性が分化した系統が多数出現したため，これら抵抗性品種が無力化しつつあり，大きな問題となっている．植物病理学では特に，品種ごとに分化した病原性を「寄生性」，またそれぞれの寄生性系統を「レース（Race）」と呼ぶ．トマト葉かび病菌の寄生性を決定するのは*AVR*遺伝子である．宿主植物は抵抗性遺伝子産物によって，病原菌から分泌される*AVR*遺伝子産物を認識することで病原菌の侵入を感知し，一連の抵抗性反応を誘導する．一方，トマト葉かび病菌は*AVR*遺伝子を変異または欠失することで寄生性を分化させ，宿主の抵抗性遺伝子産物による認識機構を回避することで，感染を成立させる．本研究では，*AVR*遺伝子群の変異部位とその変異様式を解析し，寄生性進化の遺伝的背景の解明を目指した．

方法：本菌からは4つの*AVR*遺伝子（*AVR2*, *AVR4*, *AVR4E*, *AVR9*）が単離されている．国内で近年分離されレースが決定している209菌株について，*AVR*遺伝子群の塩基配列を解析し，既に解析済みの海外で分離された89菌株の配列情報と比較した．

結果・考察：日本分離菌株と海外分離菌株の配列情報を比較した結果，日本分離菌株の*AVR*遺伝子は，これまでに海外分離菌株には認められなかった新たな変異部位が多数見いだされ，日本分離株の変異様式が海外分離株とは全く異なることが明らかになった．その結果，国内における多様なレースは海外から持ち込まれたものではなく，国内で独自の寄生性進化を遂げ，日本特有のレースが生じたものと考えられた．また同じレースでも菌株によって変異様式が全く異なることが明らかになり，新レースは国内の各地域においてそれぞれに発生したと推察された．*AVR*遺伝子の変異はゲノム中において中立的に起こるが，抵抗性品種の画一的な栽培による選択圧が局地的な新レースの増殖を招き，定着するものと考えられる．

日本分離菌株において新たな変異部位が多数見いだされたにも関わらず，海外分離菌株と同様に，変異様式が①*AVR2*のフレームシフト変異，②*AVR2*へのトランスポゾンの挿入，③*AVR4*と*AVR4E*の点突然変異，④*AVR4E*と*AVR9*の遺伝子欠失，の4パターンのみであることが明らかになった．本菌の変異様式がなぜたった4パターンに集約されるのか定かではないが，現在のところゲノム上の位置が関わる可能性と*AVR*遺伝子本来の機能が生存に関与する可能性を推察している．本病害では種子汚染を想定して輸入種子の消毒が奨励されていたが，本研究の結果からは海外から持ちこまれたとは考えにくく，輸入種子の消毒は効果が薄いことが明らかになった．

実験室内進化させた耐熱大腸菌に対するゲノムワイド解析

應　　蓓　文

大阪大学大学院情報科学研究科
〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-5

目的：微生物は様々な環境変化に応じて適応進化すると考えられるが，その適応進化の過程において細胞全体がどのように変化して適応状態に辿り着くのかが解明されていない．特に，ある祖先からどのように現在の状態まで進化してきたのかは現存の生物種間の比較だけでは明らかにすることが難しい．そこで，実験室内進化により得られた各段階の細胞をゲノムワイドに解析することにより，実の祖先から子孫への細胞全体の変化のスナップショットをリアルタイムで捉え，進化プロセスの解明を目指す．先行研究では，二年間植え継ぎ培養実験により最適生育温度が37℃である大腸菌を45℃まで適応進化させた．進化前後の大腸菌の“ゲノムワイド

な写像”を比較することにより，塩基変異や遺伝子発現の変化の特徴を明らかにする．

方法：高温適応進化した大腸菌のゲノム配列を同定するためには，次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンシングとサンガー法による変異確定を行った．大腸菌を定常期まで培養し，そのゲノムを抽出して，次世代シーケンサー（SOLiD, AB）用のサンプル調整を行った．マッピング及び変異解析はBIOSCOPEで実行した．また，適応進化前後の大腸菌の遺伝子発現パターンを比較するためには，本研究室で開発された高密度一塩基タイリングアレイEcFS-1を用いて，細胞内全遺伝子の転写レベルを定量した．

結果・考察：まず，ゲノム配列解析の結果，先行研究では確定できなかったゲノム変異を同定し，集団内遺伝子型の多様性を発見した．変異確定によって，進化過程における突然変異率の上昇および進化過程が正の選択から中立へ切り替わったことを明らかにした．これは，分子進化の研究分野における重要な発見であり，個体レベルのDarwin適応進化と分子レベルの木村中立進化を結ぶ初めての実験結果である．そして，45℃適応大腸菌株のなかでは，大まかに3種類異なるゲノム配列を示す集団が確認され，各遺伝子型をもつ集団間の相互作用による高温適応や分子進化のヒッチハイク効果が予想される．次に，適応進化がどのような転写レベルの変化をもたらすのかを明らかにした．高温適応進化した大腸菌が従来のヒートショック応答を保持しながら，遺伝子発現パターンの乱れから定常への緩和が加速されることが観測され，転写ネットワークの頑丈性を示唆する．まとめると，大腸菌の高温適応進化過程をゲノムワイドレベルで解析して，自然突然変異率の上昇，変異固定の正の選択から中立への遷移，集団内遺伝子型の多様性，ゲノム変異の蓄積順序，転写ネットワーク全体の緩和など，集団適応度の持続的な向上が観察された．これらの実験事実及び解析結果から，ゲノム変異と遺伝子発現プロフィールの相関を見だすことが可能となり，表現型レベルの適応進化と遺伝子型レベルの分子進化を繋ぐことが期待できる．

アメーバ動物類の系統分類
—粘菌類を中心として—

川　上　新　一

山形県立博物館
〒990-0826　山形県山形市霞城町1-8

目的：細胞性粘菌の中でも，*Polysphondylium pallidum*を含む系統的にまとまりのある種群（*P. pallidum–P. album*群と呼ぶ）の分類はまだ混乱したままである．本研究では，未同定株を含めて，再分類をおこなう．また，細胞性粘菌の中で*Polysphondylium*属は輪生枝を有する最も複雑な子実体を形成する．その形態の複雑化にいたる進化を理解する上で非常に有意義であると考える．未同定株を含めて，形態進化について議論する．

一方，真正粘菌（変形菌）類は，日本では500種程度知られているが，まだ分類学上の問題が多い．本研究では，山形県内のフロラを中心にして日本のフロラを明らかにすることを進め，分類学上問題のある種類の収集をおこなう．

方法：*P. pallidum–P. album*群の14既知種および未同定株の形態比較および分子系統学的解析（LSU rDNA D1/D2領域）をおこなった．また，*P. pallidum–P. album*群の既知種および新分類群（形態種）と思われる株についてSSUおよびLSU rDNA全塩基配列の系統解析（両rDNAを連結し，Separate modelで解析）をおこなうことによって形態進化について議論した．

真正粘菌については，県内を中心に採集し，かつ，国立科学博物館にある標本の調査もおこなった．それらの形態的特徴により分類学的処置をおこなった．

結果・考察：*P. pallidum–P. album*群の形態比較の結果，形態的に明らかに異なる少なくとも8つの新分類群を見出した．次に，この種群のLSU rDNA D1/D2領域の部分塩基配列の系統解析から，新タクサが各々単系統群を形成することが明らかとなった．その中には，再検討を要する株も認められた．以上の結果から，少なくとも8つの新分類群は各々独立種であると判断した．

次に，SSUおよびLSU rDNA全塩基配列の系統解析

をおこなった．両 rDNA を連結し，Separate model で解析した結果と上記の LSU rDNA D1/D2 領域の系統解析の結果を踏まえて，以下のように考察した．1）パターンの限られた形態進化の過程で，原則的に形態の複雑化が生じている（一部において，二次的に単純化も起こっている）．2）いくつかの形態的特徴が本種群内の別々のクレードで認められたことから，これらの現象は本種群内で平行進化によってもたらされたものと考えられる．

真正粘菌においては，県内の採集調査や国立科学博物館の標本調査により，山形県内に 77 種産することが認められた．そのうち，今回採集された 10 種が県内新産であることが明らかになり，それらの新しい分布域が判明した．また，分類学上問題のある種類の存在も認められ，今後，さらなる解析をおこなう予定である．

海洋性アナモックス細菌の系統分類とその集積培養系に共存する未培養古細菌の機能解析

金田一　智　規

広島大学大学院工学研究科
〒739-8527　広島県東広島市鏡山1-4-1

目的：アナモックス細菌は新規窒素代謝経路を持つ微生物として 15 年ほど前に発見され，海洋にも広く存在することが明らかとなっている．本研究室ではこの海洋性アナモックス細菌の集積培養に成功しており，集積された海洋性アナモックス細菌は，数種類存在している可能性がある．近年の報告では海洋性アナモックス細菌は種の多様性が大きいことが示唆されているが，詳細な系統分類については明らかにはなっていない．また，本集積培養系には機能が不明な未培養細菌・古細菌も共存している．そこで本研究では広島湾底泥から集積された海洋性アナモックス細菌および共存する未培養細菌・古細菌の種多様性を評価し，FISH 法による可視化を行った．
方法：連続式カラムリアクターで集積されたバイオマスを対象としてアナモックス細菌・古細菌に特異的なプライマーセットを用いて 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行い，微生物群集構造を把握した．得られた塩基配列に基づき，FISH 法によるプローブの選定・設計を行い，優占種を可視化した．古細菌に関しては，可視化が困難な場合は FISH 法のための細胞壁の前処理条件を最適化するとともに，CARD-FISH 法を適用した．
結果・考察：アナモックス細菌に特異的なプライマーセットを用いて系統解析を行った結果，主に二種類の *"Candidatus* Scalindua*"* に属する海洋性アナモックス細菌が検出された．これらの塩基配列に基づき，FISH プローブ（Sca1129a, Sca1129b）の設計を行った．プローブ使用条件の最適化後，二種類の海洋性アナモックス細菌を個別に検出することができた．これらのプローブを用いて，二種類のアナモックス細菌の変遷を蛍光面積比に基づいて調べたところ，それぞれのアナモックス細菌の構成比は変化するものの，長期間に渡って二種類が共存していることが明らかになった．そこで塩分濃度，温度条件などを変化させて種ごとの変遷を調査したところ，温度による優占種の変化が観察された．

全細菌を対象とした系統解析では，アナモックス細菌が 17 クローン，*Gammaproteobacteria* が 32 クローン，*Bacteroidetes* が 25 クローン，その他の細菌が 15 クローンに分類された．また，古細菌を対象とした系統解析では，10 グループに分けることができた．このうち 9 グループが，機能が未知の *Euryarchaeota* 門，1 つが *Crenarchaeota* 門に分類された．*Crenarchaeota* に分類されたものは，アンモニア酸化古細菌に近縁な種であった．リアクターからバイオマスを採取し，古細菌に特異的なプローブを用いて FISH 法を試みたが，蛍光シグナルを得ることができなかったので，細胞壁処理を行った後でハイブリダイゼーションを試みたが，同様に蛍光シグナルは得られなかった．そこで CARD-FISH 法を試みたところ，古細菌と考えられる蛍光シグナルは得られたが，優占化しているアナモックス細菌の内在性ペルオキシダーゼ活性が強く，古細菌の蛍光シグナルと区別することは困難であった．今後は CARD-FISH 法以外の方法を適用する予定である．

古細菌から学ぶ酸素呼吸系獲得への機能進化の研究

鴻 巣 麻 子

日本医科大学医学部
〒113-8602 東京都文京区千駄木1-1-5

目的：超好熱菌の酸素呼吸系は進化的に最古な諸性質をとどめている可能性がある．一般に生物の酸素呼吸系複合体は，電子流入口を担う複合体と末端酸化酵素より構成される．超好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来の呼吸鎖複合体 II(SdhABCD) は，常温菌酵素とは性質が異なり，生物が嫌気的環境から好気的環境へと適応進化した蛋白質機能変遷の過程を分子レベルで探るのに適している．本酵素の詳細な構造機能解析を通じ，原始地球で環境適応した初期好気性生物の分子進化基盤の理解を目的とする．

方法：一般にタンパク質の構造機能解析には多量の精製酵素が不可欠だが，超好熱性古細菌は発育速度が遅く，菌体収量も低い．そこで本研究では，*S. tokodaii* 由来 SdhABCD の異種発現系開発にも取り組んだ．SdhABCD 個々の 4 サブユニットをコードする遺伝子を pET 系ベクターにクローニングし，レアコドン対応の大腸菌 BL21(DE3) CodonPlus-RIL 株にて高発現させた．複数の補欠分子族を含む大変複雑な酵素複合体であるため，培養条件等を詳細に検討し，得られた組換酵素につき，結晶化，各種分光解析（電子スピン共鳴，共鳴ラマン，X 線吸収スペクトル）等を行った．

結果・考察：これまでの研究で，SdhA, C, D サブニットについては，大腸菌異種発現により水溶性蛋白質として得られていた．本研究では培養条件等を改善することで，SdhABCD 複合体として異種発現させ，全サブユニットを SDS-PAGE 上で確認した．この組換え複合体を用い，現在 6-8Å 分解能程度の立方晶（空間群 $P2_13$ or $P23$, 格子定数: a = 230.45Å）を得ている．補欠分子族に関しては，本組換え複合体には少なくとも [2Fe-2S] クラスター 1 つ，[4Fe-4S] クラスター 3 つ，Zn 中心，非共有結合性の FAD（天然型では共有結合）を含むことがわかった．組換え複合体の結晶性改善を目的とし，結晶化において強い界面活性剤を用いたところ，これまでとは異なる形状の結晶を見いだし，X 線実験により 2.3Å 分解能程度の回折を得た（空間群 $C222_1$, a=110.07, b=234.34, c=163.94Å）．この $C222_1$ 結晶の SDS-PAGE から，複合体より乖離した SdhA サブユニット単独結晶と推定し，現在解析をすすめている．本研究は，分子生物学と構造生物学を用いた超好熱性古細菌の好気的呼吸鎖の分子構造進化基盤解明のための最初の重要な一歩と位置づけられる．とくに，ヒトや大腸菌などの好気性生物の呼吸鎖複合体 II と異なり，本酵素複合体では膜結合性ヘム蛋白質のかわりに [4Fe-4S] クラスターと亜鉛中心をもつ SdhC が電子受容部位を構築していると推察される．原始地球での好気的環境に適応するため，祖先型酸化還元モジュールが，連結，置換，欠失などを繰り返し（酸素に弱い Fe-S タンパク質を切り捨てながら），分子進化してきた足跡を将来可視化できる展望が開けた．

菌類と植物の寄生関係における進化の特性

高 松 進

三重大学大学院生物資源学研究科
〒514-8507 三重県津市栗真町屋町1577

目的：広義の共生関係である寄生関係を対象とし，人工培養が不可能な絶対寄生菌類，人工培養可能な寄生菌類について，植物に対してどのように適応しながら進化してきたのかを，共進化，生物地理学，形態の進化などの視点から解析する．これにより，異種生物が密接に関わり合いながら進化が起こった場合の多様性と進化の様相をより鮮明に理解することを目的とする．

方法：絶対寄生菌類としてうどんこカビ類，人工培養可能な寄生菌類として *Cercospora* 関連属菌を選定した．これらの標本を国内外から広く採集し，さく葉標本を作成するとともに，人工培養可能な菌類については培養菌株を確立した．採集した菌類について，形態観察によって菌種を同定した．さらに，DNA 塩基配列を決定し系統

解析を行うことにより，それらの進化経路や多様性獲得機構について検討した．

結果・考察：植物の絶対寄生菌で，人工培養できないうどんこ病菌は，植物の進化や生態に密接に関係しながら進化したと考えられる．これまでの研究からうどんこ病菌の地理的起源は北半球の温帯と考えられ，熱帯地域に分布するうどんこ病菌は温帯から分布を拡大したものと推察される．(亜)熱帯地域に限定的に分布するうどんこ病菌である *Brasiliomyces* 属菌は形態的および生態的特性とも温帯では見られない特異なうどんこ病菌である．本研究において，*Brasiliomyces* 属菌が多系統群であることを明らかにし，これが熱帯地域への適応による収斂進化の結果である可能性を指摘した．この結果は，うどんこ病菌が熱帯地域の環境条件や植物の生態的特性に巧妙に適応しながら進化した一例であると考えられる．

一方で培養が可能な植物寄生菌類の場合，腐生生活が可能であるため宿主の進化，分散によりどのような影響を受けるのか評価が困難であった．そこで *Cercospora* 関連属菌で，ビロウと小笠原諸島固有植物種のオガサワラビロウに寄生し，我が国では南西諸島および海洋島である小笠原諸島に分布する *Distocercospora livistonae* を用い，分子系統解析による種内多様性の評価と，得られた系統樹から分散過程の推定を行った．結果，*D. livistonae* は台湾周辺が起源地と推定される宿主植物の海流分散の過程と密接な関係を示し，それぞれの島で宿主を獲得したのではなく宿主と共に分散したことが示唆され，さらに群島効果と思われる多様性を示した．このことから，絶対寄生性を有する菌類と同様に腐生生活が可能な植物寄生菌についても，植物の進化，分散により，寄生菌の進化・適応において大きな影響を受けていることを示すことが出来た．

また，我が国に分布する *Cercospora* 関連属菌の保有菌株の複数遺伝子領域を解析し，これまでに保有している塩基配列データと比較検討することにより，種として認識されるべき株を多数確立し，1種の neotype を含む *Pseudocercospora* 属菌4種，*Passalora* 属菌1種を日本新産種として報告した．

アカントアメーバに共生する難培養性細菌が宿主細胞内で持続的に生存するために必須な分子基盤の解明

山　口　博　之

北海道大学大学院保健科学研究院
〒060-0812　札幌市北区北12条西5丁目

目的：土壌や河川水などの自然環境に普遍的に見られるアカントアメーバ（以下アメーバ）の約20%程度に難培養性の偏性細胞内寄生性細菌が共生していることがここ十年程の研究にて明らかになってきた．アメーバは微小生態系食物連鎖の頂点に位置する細菌の捕食者であり，その殺菌機構は強力である．それ故に，ユニークな未知の分子基盤が共生関係を規定する要因として存在するものと考えられるが，未だにその機構は良くわかっていない．我々は，これまで自然環境より41株のアメーバを株化し，その5株に持続的に感染する共生細菌を見いだしている（Matsuo *et al.*, Environ Microbiol Rep, 2010）．本研究では，株化アメーバ内に見いだされた難培養性共生細菌の生物学的特徴について検討した．

方法：共生細菌は我々が株化したアメーバ内に見いだされた細菌を用いた．シストへの移行は *Protochlamydia* 共生アメーバをマグネシウム溶液にてシストに移行させ，精製シストに内在する共生細菌の生存性をモニターした．アポトーシスの検出はヒト株化細胞として HEp-2 を用いた．*Protochlamydia* を HEp-2 細胞に添加し，細胞死誘導能を TUNEL, DAPI, 電顕にて精査した．またカスパーゼ阻害剤の影響についても検討した．ゲノム解読は新学術領域「マトリョーシカ進化原理」代表野崎，分担永井，ゲノム支援黒田らとの共同研究により進めている．

結果・考察：アメーバは劣悪な環境をやり過ごすためにセルロール二重層よりなるシストを形成し休眠する．そこでシストに内在する共生細菌の生存性をモニターした．その結果，アメーバシスト内でも *Protochlamydia* は感染性を保持し生存していることが明らかになった（Nakamura *et al.*, Environ Microbiol Rep, 2010）．アメーバシストが共生細菌の環境ストレスをエスケープす

るためのシェルターとして機能している可能性が示唆された.

株化したアメーバ内に見いだされた難培養性細菌は,ヒトとの接点はない.それ故にこれら共生細菌のヒト細胞への刺激は新規の細胞機能を見いだす可能性がある.そこでアメーバ共生細菌 *Protochlamydia* をヒト細胞株 HEp-2 や THP-1 に添加し観察した.その結果,添加した *Protochlamydia* は細胞内で増殖できなかったが,接着・侵入を介して,カスパーゼ 3 と 9 依存的にアポトーシスを誘導した.興味深いことに *Yersinia* の III 型分泌装置に対する阻害剤によりこのアポトーシスは抑制された.その一方で,ヒト末梢血液細胞には細胞死を誘導しなかった.これらの結果は,アメーバ共生細菌が癌化細胞に選択的に作用する新規生物活性物質を宿主細胞内に分泌している可能性を示唆している(Ito *et al.*, PLoS ONE, 2012).

現在,二つのアメーバ共生細菌 *Protochlamydia* と *Neochlamydia* のドラフトゲノムは既に得られており,ゲノムサイズはそれぞれ約 2.7Mbp と 3.2Mbp であった.これら共生細菌は,ゲノムのスリム化により 1.0Mbp のゲノムサイズを持つトラコーマやオウム病の原因である病原性クラミジアの直系祖先と考えられ,ヒトに病原性を持つクラミジアが既に失った機能分子(エフェクター)を温存している可能性があり,その機能分子の釣り上げ作業を現在進めている.

多様な時系列標本から分離されるヒト結核菌のゲノム情報抽出と分子進化学的検討

和 田 崇 之

大阪市立環境科学研究所
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

目的:ヒト結核の起因菌・結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)は,世界各地においてヒトへの適応進化と定着を起こしていると考えられている.本課題では,現代において分離される結核菌株の遺伝子型別およびゲノム配列情報を基に,残存する過去の結核病理標本や海外分離株などを比較検討することにより,今の日本で起こっている結核状況に至った経緯と時系列を結核菌側から再構築することを目的とした.

方法:日本において特異的に定着している種内系統群「北京型結核菌(北京株)」に着目し,以下の項目を実施して現代株との比較ならびに検討を行った.①1966-1980 年に結核診断され,病理標本が残存した 100 検体を対象とした結核菌 DNA の抽出・同定ならびに亜系統分類.②日本からの移民先(19 世紀末〜20 世紀初頭)であったペルーにおいて分離培養された北京株の亜系統分類および遺伝子型別調査.加えて,③現代日本の北京株を対象とした比較ゲノム情報に基づいて,系統・型別マーカーとして利用することにより,標本由来 DNA およびペルー株双方について詳細な菌株相同性を推定した.

結果・考察:DNA 抽出を試みたパラフィン包埋標本のうち,54 サンプルについて結核菌 DNA の存在が認められた.これらについて結核菌系統マーカーとなる突然変異を標的としたリアルタイム PCR 分析を行い,29 サンプルについて詳細な系統情報を得ることに成功した.①現代において流行傾向を示す modern 型株が既に同程度の割合で存在していたこと,②G5/6 群の分離頻度が高率であり,現代において全国規模で広範的に分離される「大規模拡散型結核菌」と近縁関係にある菌株が高頻度で見出されたこと,③現代日本における代表的亜系統群である G4 群に属する菌株が少なかったこと,④高齢者の再発例が多い G3 群が必ずしも当時における蔓延株ではなかったことが推察された.とりわけ②の結果は,当該の大規模拡散型株が,過去における蔓延を歴史背景として現代における再発例として見出されている可能性を意味しており,現代社会で発生した集団事例とは公衆衛生上区別して解釈される必要性を示している.20 世紀初頭に日本からの結核菌流入が起こったと想定される南米・ペルーでは,現代日本で定着している結核菌とは異なる系統群(modern 型)が著しく優先しており,現代においては同群の蔓延が発生していることが明らかとなった.一方で,海外では報告例が少ない G4 群株が 192 株のうち 3 株見出され,G5/6 群につい

ても8株がそれに該当した．これらの菌株については，上述したパラフィン標本由来DNAと同様に，現代国内株のフルゲノム分析から得られた株固有変異の有無を検証することにより，分岐（伝搬）年代の推定に結び付けたいと考えている．

植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼが大腸菌で可溶性に発現される変異機構の解明

浅　野　泰　久

富山県立大学工学部生物工学研究センター
〒939-0398　富山県射水市黒河5180

目的：分子生物学の発展により，各種起源のタンパク質の異種発現実験が行われて来たが，多数のタンパク質は封入体として不溶性画分にしか発現しないことが多い．また，一般にタンパク質のフォールディングについて理解が深まっているとは言い難い．

植物由来のヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）について探索を行い，最も重要な産業用微生物の一つである大腸菌における発現を検討してきた．キャッサバ（*Manihot esculenta*）由来の（*S*）-HNL(MeHNL)等の大腸菌内での活性型発現は，封入体を形成し困難であった．MeHNLのLys176Pro, Lys199Pro, Lys224Proや，His103Met，His103Leu等の変異型HNLが可溶性の活性型酵素として大腸菌で大量に発現される現象を発見した．本研究では，（1）活性タンパク質の可溶性発現の機構，（2）大腸菌以外の発現系と可溶性となる変異の一般性の検討を行い，さらに（3）可溶性HNLを光学活性なβ-ニトロアルコールなどの有機合成に利用した．

方法：*in vitro*の条件で，LysをProに置換した変異型酵素や，His103Met, His103Leu等の変異型酵素について温度やpHに対する安定性，動力学的定数の算出などの生化学，および生物物理学的性格付けを行い，野生型酵素と比較した．また，*Manihot esculenta*由来HNL変異株His103Leuについて，大腸菌，酵母*Pichia pastoris*，動物細胞*Leishmania tarentolae*，および2種類の無細胞発現システム（大腸菌由来のWakoPUREシステム，および小麦胚芽システム）での発現について検討した．

結果・考察：

（1）野生型，変異型酵素では，円偏光二色性（CD），FT-IR，蛍光スペクトルは，ほとんど違いが認められなかった．熱による失活では，His103Metが野生型酵素に対して熱安定性を5°C程度失っていた．また，グアニジン塩酸による酵素の失活とアルギニン中での再フォールディング実験では，野生型酵素が全く再活性化しないのに対して，His103MetやHis103Leuの変異型酵素が，それぞれ33および47%再活性化した．これらの結果から，変異型酵素は*in vitro*で変性状態から，活性型へと自力で再フォールディングする能力を獲得したことが認められた．

（2）*Pichia pastoris*および*Leishmania tarentolae*では，野生型および変異型酵素の両者とも同様に高い活性で発現された．一方，大腸菌の形質転換株および大腸菌由来のWakoPUREシステムでは，いずれも，変異型酵素のみが総活性，比活性とも高く発現された．つまり，実験した範囲では，変異型酵素His103LeuやHis103Metが可溶性に発現され，かつ野生型の発現が認められなかったのは大腸菌の系のみであった．

（3）シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来のHNL(*AtHNL*)を用いHenry反応の条件を種々検討した．ベンズアルデヒド1 mmol当たり10,000 Uもの各種のHNLを加え，水–有機溶媒（ジイソプロピルエーテルや酢酸ブチル）の二相系で反応を行うと，非酵素的な反応の影響を抑え，高い立体選択性で目的の(*R*)-β-ニトロアルコールを合成できた．

新規な高速・高効率シキミ酸製造法の完成とタミフル増産への寄与

足　立　収　生

山口大学農学部
〒753-8515　山口市吉田1677-1

目的：インフルエンザの世界的蔓延への対策として，タミフル備蓄が奨励されている昨今，シキミ酸（SKA）は

タミフル合成原料として重要な物質である．現行の発酵法によるSKAの製造は，複雑な細胞内代謝経路に依っているために，克服不能な代謝調節もあってタミフルの世界需要は満されていない．著者は酢酸菌にキナ酸からデヒドロシキミ酸（DSA）への酸化発酵系を見出し，DSAからSKAへの変換など新規な製造法の確立の可能性を指摘した．キナ酸源はコーヒー粕中のクロロゲン酸を利用し，糸状菌のクロロゲン酸水解酵素（CHase）によるキナ酸の製造（酵素反応1）．酢酸菌によるキナ酸からDSAの製造（酵素反応2）．細胞質内のNADPH-シキミ酸脱水素酵素（SKDH）によるDSAからSKAへの変換（酵素反応3）から構成される新規なSKA製造法を完成させることを目的とした．

方法：上記の酵素反応の固定化系を構築のための検討を加えた．酵素反応1では熱処理によって，CHase活性を損なわず生育能を喪失させた糸状菌（*Aspergillus sojae* AKU 3312など）をCHaseとした．本法は研究助成を受けた時点でほぼ完成していたのでこれを踏襲した（Appl. Microbiol. Biotechnol., 81, 143-151 (2008)）．酵素反応2では酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* IFO 3244の細胞または細胞膜を固定化して使用した．酵素反応3ではNADP-依存性酵素の共役酵素系の固定化調製法を検討した．

結果・考察：酵素反応2に必要な酢酸菌や細胞膜の固定化に，種々なアルギン酸を試験した結果，300-400cPのNa-アルギン酸を使用すると，ビーズの機械的破断を低減できる弾力性のある固定化触媒が得られた．通気撹拌下に卓上ファーメンター中で固定化酢酸菌触媒を使って，反応pHを中性に保ってキナ酸を酸化させると，収率100%近い成績でDSAが得られた．酵素反応3の固定化触媒の調製には，SKDHとNADP-グルコース脱水素酵素の精製にDEAE-セルロースやDEAE-セファデックスが有効であったので，両酵素をこれらのイオン交換体に結合させても良好な触媒能を示した．また両酵素はブルーデキストランセファロース（BDS）に強い親和性を示したので，両酵素をBDSや直接ブルーデキストラン（BD）に固定化したものも良好な触媒能を示した．両酵素とBDを混合したものは巨大な分子量をもつ液状触媒となって，酵素反応3は即座に進行した．反応液を濾別すると固定化触媒とSKAを含む反応液を容易に分離できた．水溶性の酵素を溶液状に固定化して良好な触媒活性が得られた例は極めて稀で，本研究成果はNAD(P)依存性水溶性酵素の固定化の好例として，関係者の批判を仰ぎたい．上記の結果をBiosci. Biotechnol. Biochem., 74, 2438-2444 (2010) に発表した．酵素反応1でのキナ酸源として，コーヒー粕よりも南米産マテ茶の方が，その後の研究で良好なことが判明したので，現在引き続き検討を加えている．

超好熱菌に存在する新規分子シャペロンの同定

金　井　　保

京都大学大学院工学研究科
〒615-8510　京都市西京区京都大学桂

目的：*Thermococcus kodakarensis* は生育温度60～100°C，至適生育温度85°Cの超好熱性アーキアである．これまでに転写制御因子Phrが，本菌の熱ショック応答遺伝子群の転写制御に関わることを見出している．これらPhr制御下にある遺伝子の多くは機能未知遺伝子であり，これらの遺伝子産物が本菌の熱ショック耐性獲得に必要な生理学的プロセスに関わる可能性が考えられた．そこで本研究ではPhr制御下にある機能未知遺伝子の機能解明を目指した．

方法：Phr破壊株で転写量が増加する上位8種の遺伝子（*TK1121*, *TK1155*, *TK1590*, *TK1157*, *TK1097*, *TK0750*, *TK0131*, *TK1591*）に対する遺伝子破壊株を作製した．なお *TK1121*, *TK1155* はprefoldinとsmall heat shock proteinをそれぞれコードするが，残りの遺伝子は明確な機能が不明である．*T. kodakarensis* の遺伝子破壊株作製には，*pyrF* マーカーを用いたpop in-pop out法を利用した．

結果・考察：作製した8種の遺伝子破壊株について，高温での生育（93°C）や熱ショックに対する影響（100°C，

1時間）を検討した．その結果，Δ*TK0131*株を除く全ての遺伝子破壊株は，ホスト株と比較して，生育の遅延や細胞収量の低下が認められた．このことから，Phr制御下にある遺伝子は，実際に本菌の熱ショック耐性の獲得に関係していることが示唆された．

明確な機能が不明である5個の遺伝子（*TK1590*, *TK1097*, *TK0750*, *TK0131*, *TK1591*）について，組換えタンパク質を調製した．まずTK1097, TK0750, TK0131, TK1591の各精製タンパク質について，主要な熱ショック応答因子である，分子シャペロンやプロテアーゼとしての活性の有無を検討した．クエン酸シンターゼに対する凝集抑制活性や酸変性GFPを用いた変性タンパク質結合活性を測定したが，いずれのタンパク質においてもこれらの活性を検出することはできなかった．また，カゼインを基質としたプロテアーゼ活性も認められなかった．

TK1590タンパク質は，ATP結合配列であるWalker A/Bモチーフを持ち，DNAの修復・組換えに関わるRecA superfamily ATPaseタンパク質と相同性を示す．そこでTK1590タンパク質のATPase活性を検討したところ，種々の核酸の添加条件において，ATPase活性の上昇が観察された．この活性上昇は，single strand DNAを添加した際に顕著であったことから，TK1590タンパク質が熱ショック条件下で発生すると予想されるDNAの変性や損傷の修復に関与する可能性が考えられた．

キノリン酸の利用ならびに合成に着目した出芽酵母の新規NAD合成経路

河　井　重　幸

京都大学大学院農学研究科
〒611-0011　京都府宇治市五ヶ庄

目的：NADは膨大な酸化還元反応に関わる補酵素であるが，基質としても様々な反応により活発に消費される．したがってNAD合成経路の正確な理解は重要である．*Saccharomyces cerevisiae*（出芽酵母）を含む真菌類ならびに動物におけるNADは，トリプトファンを出発材料としてキノリン酸（QA）を中間代謝物とするキヌレニン（Kyn）経路，および細胞内外のニコチン酸（NA）などを利用するサルベージ経路によって合成される．本研究ではキノリン酸の利用ならびに合成に着目した出芽酵母の新規NAD合成経路に検討を加えた．

方法：出芽酵母野生株，サルベージ経路各欠損株（*tna1*, *npt1*），およびKyn経路各欠損株（*bna4*, *bna6*）の各々をNA非含有完全合成（SC）液体培地，およびNA（3.3または33 μM）やQA（3.3または33 μM）のみをNAD前駆体として含むSC液体培地などで培養し，対数期および定常期における各遺伝子（*TNA1*, *BNA4*, *BNA6*ならびに*NPT1*）の生育性および転写量を調べた．なお，転写量はqPCRで測定した．さらに，各株の分泌するQA量ならびに各株の定常期における生存数（定常期における寿命）も測定した．上記濃度のNAやQAを添加したSC固体培地における各株の生育性も観察した．

結果・考察：新規QA利用経路の解明のため，Kyn経路およびサルベージ経路の両経路を欠失した出芽酵母株（*npt1bna4*および*npt1bna6*）作成を試みたが，その過程で本来致死性を示すはずの*npt1bna4*株が，固体培地上において正常なKyn経路を有する出芽酵母株の近隣においてのみ致死性を示さないという新規な現象を見出した．本現象を基に出芽酵母がQAを培地中に分泌することを明らかにした．また，高感度なQAのバイオアッセイ法を確立した．さらに，細胞外QAは高親和性NAトランスポーター（Tna1）により細胞内に取り込まれることが示された．また，細胞内NADを低下させるような細胞内外の環境に，NAD濃度の恒常性を維持するためにKyn経路構成遺伝子や*TNA1*が柔軟に応答することも明らかにした．一方，QAが出芽酵母*bna6*（QA利用に関わる*BNA6*の欠損株）やKyn経路を持たない分裂酵母によっても，NAD前駆体として利用されることを見出した．本結果から，QAを利用する新規NAD合成経路が分裂酵母にも存在すること，QAが広く真菌（QA取り込みに関わると予想されるTna1ホモログを有する）に利用され得るNAD前駆体であると考えられた．以上の結果から，出芽酵母さらには真菌類に

おいて，Kyn 経路の代謝中間体 QA の分泌と再利用も NAD 濃度の恒常性維持において重要な役割を果たすと考えられた．

極地由来好冷性微生物を宿主とした新しいタンパク質低温生産システムの開発

栗 原 達 夫

京都大学化学研究所
〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

目的：0℃付近の低温で生育する好冷性微生物を異種タンパク質生産の宿主として利用することにより，熱安定性の低いタンパク質，封入体を形成しやすいタンパク質，毒性のあるタンパク質などの生産に適した新しいタンパク質低温生産システムの構築が可能になると期待される．本研究では，好冷性微生物を宿主としたタンパク質低温生産システムの開発を目的とし，特に，膜タンパク質高生産系開発の基盤となる研究を実施した．

方法：4℃と 18℃で培養した *Shewanella livingstonensis* Ac10 の内外膜をショ糖密度勾配遠心法で分離し，それぞれの画分に含まれるタンパク質を二次元電気泳動で解析した．18℃に比べて 4℃において生産量が 2 倍以上増加したタンパク質をペプチドマスフィンガープリンティング法で同定した．Omp74 のフォールディング実験はエイコサペンタエン酸（EPA）含有リン脂質を含むリポソームを用いて行った．

結果・考察：南極海水から単離した低温菌 *S. livingstonensis* Ac10 は 4℃から 25℃で生育するグラム陰性細菌である．本菌をタンパク質低温生産システムの宿主として利用する上で，本菌の低温適応機構を理解し，低温での増殖能やタンパク質生産能の増強を図ることは重要である．すでに，本菌の低温適応に関与すると考えられる低温誘導性の可溶性タンパク質と外膜タンパク質の網羅的解析は行っていたが，内膜タンパク質については，内外膜が混在した状態での解析が困難であるため，解析が進んでいなかった．本研究では，種々の条件検討から，ショ糖密度勾配遠心分離によって本菌の内膜と外膜を分離することに成功し，内外膜を構成する様々なタンパク質の分析を可能にした．内膜画分を用いてプロテオーム解析を行い，低温環境適応に関与する内膜タンパク質の同定を試みた．その結果，低温で生産量が 2 倍以上増加した 8 種（Ald, AtoS, DegP, FtsY, MreB, PspA, SdhA, SurA）のタンパク質が見いだされた．ペリプラズム局在性シャペロンと推定される DegP および SurA や，シグナル認識粒子受容体と推定される FtsY は，低温での膜タンパク質の生合成に関与すると考えられ，これらのタンパク質の増強は，本菌を宿主とした膜タンパク質の生産性向上に寄与するものと期待される．一方，本菌が膜リン脂質のアシル鎖として低温で誘導生産する長鎖多価不飽和脂肪酸の一種である EPA の機能解析を行い，EPA 含有リン脂質が本菌の低温誘導性主要外膜タンパク質 Omp74 の膜への組み込み，および立体構造形成を促進する分子シャペロン様の機能を有することを見いだした．このシャペロン様機能を利用することで膜タンパク質の生産性向上が可能になることが期待される．

微生物変換による新規な不飽和脂肪族アルコールの製造法の開発

永 尾 寿 浩

大阪市立工業研究所
〒536-8553 大阪市城東区森之宮1-6-50

目的：界面活性剤などの原料である脂肪族アルコールは，植物油などから化学法で工業的に製造されているが，製造条件が過酷なため，飽和脂肪族アルコールと，二重結合が 1 個の脂肪族アルコールに限定されている．そこで，工業的化学法では合成が困難な二重結合 2 個以上の不飽和脂肪族アルコールを，微生物変換により効率よく製造する方法を開発する．さらに，微生物変換により希少不飽和脂肪酸を調製し，その機能性を評価する．

方法：微生物の培養は，培地容量に対して 5 wt%の油脂を含む培地（1%肉エキス，2%ペプトン，0.1%塩化ナトリウム，pH7.0）中，28℃，3〜6 日間，振盪しながら行っ

た．培養液の溶媒抽出とケン化分解により不飽和脂肪酸画分と不飽和脂肪族アルコール画分に分画し，HPLC分取により，脂肪酸と脂肪族アルコールを精製した．

結果・考察：土壌から単離した *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* N-6 は，種々の植物油から，天然油脂中には希少な脂肪族アルコール(7-*cis*-C16:1, 5-*cis*-C14:1, 7-*cis*, 10-*cis*-C16:2, 5-*cis*, 8-*cis*-C14:2, 7-*cis*, 10-*cis*, 13-*cis*-C16:3 脂肪族アルコールなど)をワックス(脂肪酸と脂肪族アルコールのモノエステル体)として生産していた．これらの脂肪族アルコールの *Staphylococcus aureus* NBRC13276 に対する抗菌活性を調べたが，最小発育阻止濃度(MIC)は検出限界以下(>1,000 ppm)であった．

Acinetobacter sp. N-476-2 は，*Mortierella alpina* 由来のアラキドン酸(5-*cis*, 8-*cis*, 11-*cis*, 14-*cis*-arachidonic acid, C20:4-FA)含有油を原料とした時，C20:4-FA を還元してアラキドニルアルコール(5-*cis*, 8-*cis*, 11-*cis*, 14-*cis*-arachidonyl alcohol, C20:4-Alc)に変換した．この還元反応は，化学法とは異なり，スケールアップ可能である．また，C20:4-Alc を原料として合成したエーテル結合型脂質（*sn*2-アラキドニルグリセロールエーテル）は，カンナビノイドレセプターに結合し，兎の眼圧を低下させることから，医薬品として期待される．

A. hydrophila N-6 を用いた微生物変換により，天然油脂中には希少な不飽和脂肪酸（7-*cis*-C16:1, 5-*cis*-C14:1, 7-*cis*, 10-*cis*-C16:2, 5-*cis*, 8-*cis*-C14:2 脂肪酸)を調製し，*S. aureus* NBRC13276 に対する抗菌活性を調べた．その結果，種々の植物油中に豊富に存在するオレイン酸（*cis*9-C18:1 脂肪酸）の MIC は 630 ppm であったのに対して，微生物変換で調製した 7-*cis*-C16:1 脂肪酸の MIC は，評価した脂肪酸の中で最も低い 8.8 ppm であった．この脂肪酸の抗菌活性は，マカデミアナッツなどに含まれる 9-*cis*-C16:1 脂肪酸の MIC(16 ppm)よりも優れていた．したがって，脂肪酸の鎖長数と二重結合の位置が *S. aureus* NBRC13276 に対する抗菌活性に重要であると推定され，微生物変換により調製した希少な 7-*cis*-C16:1 脂肪酸は，優れた抗菌剤の原料として期待される．

放線菌の分泌シグナル非依存型タンパク質分泌機構の解明

畑　中　唯　史

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所
〒716-1241　岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1

目的：申請者は，*Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株が，大量に金属プロテアーゼ（SCMP）を分泌することを見出した．SCMP は，培地中のリン酸塩の濃度，炭素源の種類・濃度によって，発現量が異なり，それら成分を至適化した培地を PG 培地と名付けた．また，SCMP プロモーターによる放線菌用発現ベクター(pTONA5a)も，構築した．PG 培地を用いると，分泌シグナルをもたず，その局在性が菌体内であるとされている，全く異なる数種のタンパク質が，大量に菌体外に分泌されることを見出した．そこで本申請では，この非定常型分泌機構を解明し，「放線菌 *Streptomyces* 属を宿主とした有用タンパク質生産」に資することを目的として研究を行うものである．

方法：PG 培地を用いて，恒常発現型プロモーター(PLD)と SCMP プロモーターの発現パターンを比較する目的で，分泌シグナルをもたない放線菌由来プロリンアミノペプチダーゼ活性を指標に，検討を行った．さらに，1 次配列の比較から SCMP は，*Streptomyces griseus* の金属プロテアーゼ SgmA のホモログである．SgmA の発現は，A-ファクターのシグナルを伝える転写因子 AdpA の支配下にあることが既に明らかにされている．また SCMP プロモーターの塩基配列を SgmA プロモーター配列と比較した結果，AdpA 結合様配列が，SCMP プロモーターには複数存在した．そこで，恒常発現型 AdpA を，pTONA5a にタンデムに組み込み，プロリンアミノペプチダーゼおよび X-プロリルアミノペプチダーゼについて，培養上清における発現時期・発現量に及ぼす影響を検討した．

結果・考察：

① 恒常発現型プロモーター（PLD）と SCMP プロモーターの発現を，PG 培地・*Streptomyces lividaus* 1326

株の組み合わせで発現させたところ，いずれのプロモーターでも，プロリンアミノペプチダーゼ活性は，培養上清に見出された．これらの結果から，培地成分によって，分泌または，溶菌が誘導されることが示唆された．

② 上記の検討で，発現時期については，PLD プロモーターが培養初期から，プロリンアミノペプチダーゼ活性は分泌されるのが，SCMP プロモーターの場合は，培養後期になって同活性が分泌された．これらの結果から，SCMP の発現は，2 次代謝のオン・オフとかかわっていることが示唆された．

③ AdpA を，組み込んだベクターに挿入した，プロリンアミノペプチダーゼおよび，X-プロリルアミノペプチダーゼは，いずれも培養上清に分泌されたが，AdpA を組み込まないものと比較して，発現時期を早める，あるいは発現量を向上させることはできなかった．今後，SCMP プロモーターによる発現時期の制御・発現量の向上についてのさらなる検討が必要である．

キラル合成原料としての4-ヒドロキシイソロイシン立体異性体個別生産へ向けた(2S,3R,4S)-HIL変換酵素類の微生物スクリーニング

日　比　　慎

京都大学大学院農学研究科
〒606-8502　京都市左京区北白川追分町

目的：4-ヒドロキシイソロイシン（以下 HIL）は骨格中に 3 つの異なる置換基が結合した不斉炭素原子を持っており，8 種類の立体異性体構造を取り得る．各 HIL 立体異性体は高度な立体構造を持つ医薬品などのキラル原料として有用であるが，その立体構造の複雑さゆえ有機合成法での効率的な生産は困難である．一方既に我々は (2*S*,3*R*,4*S*)-HIL 立体異性体に関して酵素的大量生産法を確立している．そこで本研究では(2*S*,3*R*,4*S*)-HIL を出発原料として多様な微生物由来の酵素と反応させる事で，HIL の立体異性を変換できる技術開発を目指した．

方法：HIL の 4 位の水酸基および 3 位のメチル基の立体構造の変換法として，それぞれカルボニル還元反応および 3 位–4 位間における脱水水和反応の利用を目論んだ．約 3,000 種類におよぶ研究室保存菌より目的とした酵素活性を保持する微生物のスクリーニングを実施した．還元反応に関しては基質として 2-アミノ-3-メチル-4-ケトペンタン酸（以下 AMKP）を含んだ微生物反応液中の HIL の生成量と立体異性を解析した．脱水水和反応に関しては基質として 3-メチル-2-ケトペント-3-エン酸（以下 MKP）を含んだ微生物反応液中の水和物の生成を解析した．

結果：AMKP 還元活性菌として 15 種類の多様な微生物が AMKP 還元活性菌として選抜された．選抜菌は主に (2*S*,3*R*,4*S*)-HIL と (2*S*,3*S*,4*S*)-HIL を選択的に生成していたが，*Rhodotorula marina* NBRC 0879, *Rhodotorula pallida* NBRC 0715, *Flammulina velutipes* NBRC 30603, *Pithomyces maydicus* NBRC 30015 では(2*R*,3*R*,4*R*)-HIL の生成も見られ，また *Cephalosporium acremonium* AHU 9518 では(2*R*,3*R*,4*S*)-HIL が生成していた．一方 MKP 水和活性菌としては *Cellulomonas fimi* NBRC 15513, *Mycobacterium avium* NBRC 3153, *Fusarium oxysporum* NBRC 7706, *Aspergillus ostianus* NBRC 4080, *Rhodotorula texensis* NBRC 0920, *Nocardia asteroides* AKU 2103 が得られた．以上，高い基質認識性や立体選択性を持ったカルボニル還元活性や，新規性の高い炭素二重結合水和活性を保持する微生物を多数取得することができた．各種酵素活性を利用し組み合わせることで，(2*S*,3*R*,4*S*)-HIL の 4 位水酸基と 3 位メチル基の立体配向が変換でき，別種の HIL 立体異性体の高光学純度での生産が可能となるであろう．

微生物とヨウ素の相互作用に関する総合的研究

天　知　誠　吾

千葉大学大学院園芸学研究科
〒271-8510　千葉県松戸市松戸648

目的：ヨウ素は甲状腺ホルモンを構成し，ヒトに必須の元素である．地球環境中でヨウ素はヨウ化物イオン

(I^-)，ヨウ素酸イオン（IO_3^-），有機ヨウ素などの形態で存在し，ダイナミックに循環している．多くの地球化学的証拠より，ヨウ素循環には微生物の働きが不可欠と考えられるが，詳細は不明である．ヨウ素と微生物の相互作用を理解することは，原子力の再処理過程で発生する^{129}I（半減期 1600 万年）の挙動や安全性を評価する上でも重要である．本研究では，申請者がこれまでに分離したヨウ素と相互作用を行う細菌の生化学的特質を解明すると共に，ヨウ素循環に関連した新規な微生物群の集積・分離も目指す．

方法：1．ヨウ素酸呼吸細菌の呼吸鎖コンポーネントの同定，2．ヨウ素酸化細菌からのヨウ素酸化酵素の精製と構造遺伝子の同定，3．有機ヨウ素化合物を還元的に脱ヨード化する微生物集積培養系の取得，を行った．

結果・考察：

1．*Pseudomonas* sp. SCT 株はヨウ素酸を唯一の電子受容体として生育するヨウ素酸呼吸細菌である．ここではヨウ素酸呼吸時の化学量論的解析，呼吸阻害剤の影響について検討した．0〜5 mM のヨウ素酸存在下で，SCT 株はヨウ素酸濃度に比例した生育を示した．また SCT 株の代謝は，ヨウ素酸呼吸の推定される熱力学的反応式 $3C_2H_3O_2^-+4IO_3^-+3H^+=4I^-+6CO_2+6H_2O$（$\Delta G=-741$ kJ/反応）と完全に一致していた．本菌のヨウ素酸呼吸は HQNO，ロテノン，アンチマイシン A，KCN によって阻害されたため，複合体 I，$CoQH_2$，複合体 II，シトクローム *c*，複合体 IV から成る電子伝達系を有すると考えられた．

2．ヨウ素酸化細菌はヨウ化物イオンを分子状ヨウ素（I_2）へ酸化する細菌である．ここでは本菌のヨウ素酸化酵素を精製すると共にドラフトゲノム配列を決定し，内部アミノ酸配列情報などから本酵素の構造遺伝子を決定した．ヨウ素酸化酵素はマルチ銅オキシダーゼ（MCO）の 1 種と考えられ，ヨウ化物イオン以外に各種フェノール性化合物にも活性を示した．また既知の MCO の中で最もヨウ素酸化能に優れていた．LC-MS/MS 解析の結果，ヨウ素酸化酵素は MCO と考えられる IoxA と機能未知の IoxC から成る複合体であることも示唆された．その他，ヨウ素酸化細菌のニッチ獲得に関する生態学的な解析も行った．

3．X 線造影剤廃液からの微生物的なヨウ素の回収を最終目標として，モデル物質であるトリヨードフェノール（2,4,6-TIP）を電子受容体とした嫌気集積系を調製した．本集積系により 2,4,6-TIP が化学量論的に 4-ヨードフェノールにまで脱ヨード化されることを確認した．PCR-DGGE 解析により脱ヨード化反応に寄与するのは *Chloroflexi* 門の *Anaerolineae* 綱に属する新規細菌であることが示唆された．

酵母を利用した糖尿病の分子病態モデルの構築

井　上　善　晴

京都大学大学院農学研究科
〒611-0011　京都府宇治市五ケ庄

目的：本研究では，解糖系から派生するメチルグリオキサール（MG）によるグルコーストランスポーターの機能阻害，ならびにエンドサイトーシス機構を，酵母を用いて明らかにすることで，MG 存在下におけるグルコースの動態と，MG と糖尿病病態の関係について新たな知見を得ることを目的とした．

方法：酵母のグルコーストランスポーター（Hxt）の細胞内局在の観察には，GFP 融合タンパク質を用いた．MG が哺乳類のグルコーストランスポーター（GLUT）活性に及ぼす影響は，酵母の全ての Hxt（17 種類）を欠失させた変異株に，ヒト GLUT1 あるいはラット GLUT4 を機能的に発現させ，[^{14}C]グルコースの取り込み速度を測定することで評価した．

結果・考察 [1)]

（1）MG によるグルコーストランスポーターの機能阻害

MG は Hxt 活性を可逆的に阻害した．さらに，MG は哺乳類の GLUT1 ならびに GLUT4 活性も阻害することを明らかにした．MG はインスリン応答性のグルコーストランスポーターである GLUT4 を阻害した．糖尿病患者では血中や血清中の MG レベルが上昇しているこ

とから，MG は糖尿病患者における GLUT4 の機能阻害を介して，高血糖状態の増悪に関与している可能性が強く示唆された．

(2) MG による酵母 Hxt のエンドサイトーシス

MG 処理により Hxt はユビキチンリガーゼである Rsp5 依存的にユビキチン化され，エンドサイトーシスされた後，MVB (multivesicular body) 経路を経て液胞で分解されることを明らかにした．Hxt の MG 依存的エンドサイトーシスにおけるシグナル伝達機構について解析した結果，プロテインキナーゼ C (Pkc1) と TORC2 (target of rapamycin complex 2) が関与することを明らかにした．また，ホスホリパーゼ C (Plc1) 欠損株では Rsp5 依存的な Hxt の液胞への異常蓄積が観察されたが，MG 存在下での Hxt のエンドサイトーシスに Plc1 は関与しないことを明らかにした．

これらの知見を基にして，哺乳類細胞における GLUT の機能と細胞内局在に及ぼす MG の影響を解析することで，MG と糖尿病病態の関係の理解が進むことが期待される．

1) Yoshida, A., Wei, D., Nomura, W., Izawa, S., and Inoue. Y. (2012) J. Biol. Chem. **287**: 701-711

カイコ幼虫を用いた新規自然免疫活性化多糖生産菌の探索

浦　井　　誠

東京大学大学院薬学系研究科
〒113-0033　東京都文京区本郷7-3-1

目的：近年，ガンに対する医薬品開発の重要性が高まっているなかで，多糖類のもつ抗腫瘍活性をはじめとした自然免疫活性化能が注目されている．しかし，これまではキノコや植物の細胞壁に由来するホモ-β-グルカンなど，ごく限られた構造の多糖に関する報告が多かった．一方，細菌の分泌する細胞外多糖の構造は，細菌種によって多様であり，構成単糖の種類や結合様式に起因する多様性だけでなく，アシル化やピルビン酸の付加といった修飾を受けているものも多く存在する．したがって，細菌細胞外多糖には，自然免疫活性化能をもつ新しい多糖が存在する可能性がある．しかし，細菌細胞外多糖について自然免疫活性化能を指標に探索した例はない．われわれはこれまで，カイコ幼虫の筋標本に自然免疫活性化物質を注射し，筋肉の収縮により体長が変化することを指標にした，簡便な自然免疫活性化物質の探索系を確立しており，緑茶抽出物などからヒト免疫担当細胞の活性化を引き起こす自然免疫活性化多糖を単離している．そこで本研究では，このカイコ筋収縮活性測定法を用いて，自然免疫活性化能をもつ細胞外多糖を分泌する細菌を探索し，その多糖についてカイコ筋収縮活性を指標に精製して，構造解析を試みた．

方法：カイコ筋収縮活性測定法を用いて，自然免疫活性化能をもつ細胞外多糖を分泌する細菌の探索を行い，16S rDNA 配列による分類を行った．この多糖について各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し，単糖組成分析，メチル化分析，NMR 分析等による構造解析を行った．

結果・考察：カイコ筋収縮活性測定法を用いて，自然免疫活性化多糖生産菌 M2 株を取得した．16S rDNA 配列による分類を行った結果，*Rhizobium pusense* と 98% の相同性を示した．M2 株の生産する細胞外多糖について精製を試み，DEAE カラムクロマトグラフィーにおける糖の溶出とカイコ筋収縮活性の溶出とが単一に一致したところで活性物質を単離できたとみなした．構造解析の結果，この多糖はグルコースとガラクトースを 7：1 のモル比で含む 8 糖の繰り返し単位をもち，さらにピルビン酸アセタールを繰り返し単位の 85%，コハク酸エステルを繰り返し単位の 40%含む高分子酸性ヘテロ多糖であった．この糖鎖は分岐構造をもち，→3)-β-D-Glc*p*-(1→, →4)-β-D-Glc*p*-(1→, →6)-β-D-Glc*p*-(1→, →4,6)-β-D-Glc*p*-(1→, →3)-β-D-Gal*p*-(1→を，2：2：1：2：1 のモル比で含んでいた．ピルビン酸は側鎖の非還元末端グルコースの 4,6 位にアセタール結合し，その絶対配置は *S* 型であった．この多糖に含まれるピルビン酸，コハク酸を化学的に除去した結果，カイコ筋収縮活性は失われなかった．以上の結果は，*Rhizobium* sp. M2

株の生産する高分子酸性ヘテロ多糖が自然免疫活性化能をもち，その活性には糖鎖構造が関与することを示唆する．

微生物に見出されたメナキノン新規生合成経路の全容解明と抗ピロリ菌薬開発への応用

大　利　　徹

北海道大学大学院工学研究科
〒060-8628　北海道札幌市北区北13条西8丁目

目的：メナキノン（以下MKと略す）は，微生物では呼吸の際の電子伝達系成分として生育に必要である．MKの生合成研究は1970-80年代に大腸菌を用いて解明された．しかし筆者は約8年前，当時ゲノム解析が終了していた放線菌やピロリ菌では，大腸菌のMK生合成遺伝子オーソログを全く持たないことに気づき，その概略を明らかにした．しかし，本新規経路の詳細，特に初発反応の詳細は不明であることから今回，更なる解析を行った．また，MKの生合成は微生物に必須であることから，新規経路の阻害剤はピロリ菌に対する特異的抗生剤になると期待される．そこで候補化合物の探索も行った．

方法：ゲノム解析株の中からMK生合成遺伝子がクラスターを成している株を探索し，クラスター内に存在する機能未知遺伝子を組換え酵素を用いて解析した．阻害剤探索は以下のように行った．*Bacillus*属細菌は呼吸の際メナキノンを利用する．またゲノム解析結果から，*B. halodurans*は新規経路を有し，類縁菌の*B. subtilis*は既知経路を利用すると推定される．そこで両菌株を被検菌に用い，*B. halodurans*にのみバイオアッセイで生育阻止円を示すサンプルを探索した．

結果・考察：新規経路の遺伝子群をゲノム解析が終了した微生物に探索すると，多くの場合，個々の遺伝子は染色体上に分散しているが，好熱放線菌である*Acidothermus cellulolyticus*は遺伝子群が2箇所にクラスターを成しており，その一方にアデノシンデアミナーゼ(ADase)が含まれていた．微生物では関連遺伝子がクラスターを成す場合が多いことから，本酵素の新規経路への関与を検討した．化学合成したアミノ体のフタロシン（アミノデオキシフタロシン，AFLと略す）と組換えADaseを反応させた結果，予想通りフタロシン(FL)が生成した．したがって，放線菌ではコリスミ酸→AFL→FL→DHFL(デヒポキサンチニルフタロシン)の順番で生合成されると推定された．他方，新規経路を持つ高度好熱菌である*Thermus thermophilus*はFLのみを基質とした．したがって，本株では，コリスミ酸→FL→DHFLの順番で生合成されると推定された．またピロリ菌ではMqnBのオルソログは他の菌株のMqnBと相同性が低い．実際，組換えMqnBとFLを反応させてもDHFLの生成は認められなかった．そこで，AFLと反応させた結果，DHFLが生成したことから，ピロリ菌ではコリスミ酸→AFL→DHFLの順番で生合成されると推定された．以上，新規経路の初発反応には多様性があることを示した．

新規経路を有する微生物の生育のみを特異的に阻害する化合物を放線菌とカビが生産する天然物に探索した．その結果，放線菌の代謝産物に候補化合物を見出し構造解析した結果，分岐脂肪酸である12-methyltetradecanoic acidと13-methyltetradecanoic acidであった．

植物病原菌の病原性発現に必要なオルガネラ機能の分子解析と創薬開発に向けての応用展開

高　野　義　孝

京都大学大学院農学研究科
〒606-8502　京都市左京区北白川追分町

目的：病原糸状菌が農作物生産に与える被害は甚大であり，現在，環境への負荷を軽減し，同時に安定的に病原菌を制御する新技術の開発が強く望まれている．この技術開発を実現するためには，病原菌の感染戦略を分子レベルで理解することが必須である．我々は，ペルオキシソーム機能が*Colletotrichum orbiculare*(ウリ類炭疽病菌）の植物侵入プロセスの初期段階に必要である一方，液胞内において進行するペルオキシソーム自体の選択的オートファジー分解（ペキソファジー）が，後期の段

階に必要であることを初めて明らかにしている(Kimura *et al.*, Plant Cell 2001; Asakura *et al.*, Plant Cell 2009). 本研究では, この病原性発現に必須の両オルガネラ機能(ペルオキシソーム, 液胞)について解析した.

方法：ペルオキシソーム内の Multifunctional Enzyme をコードする遺伝子 *MFE1* およびペルオキシン PEX14 をコードする遺伝子 *PEX14* をウリ類炭疽病菌より同定し, 相同性組換えによる標的遺伝子破壊を実施した. 作出した破壊株について, 詳細な表現型解析(生育度, 病原性, 侵入器官分化, ペルオキシソーム分解など)を実施した. また, ペルオキシソーム, 液胞機能への阻害化合物スクリーニング系構築のため, ペルオキシソーム動態およびオートファジー機能をモニターできる新たなレポーターラインを作出した.

結果・考察：*MFE1* の標的破壊株は脂肪酸を唯一の炭素源とする培地で全く生育できず, *MFE1* が脂肪酸 β 酸化経路に必須であることが示唆された. また, *MFE1* 破壊株は, 宿主植物への病原性を失っており, ペルオキシン遺伝子 *PEX6* を破壊した株と同様に, 侵入器官細胞である付着器のメラニン化に欠損を示すことが明らかとなった. この結果より, ペルオキシソーム内の MFE1 依存的な脂肪酸 β 酸化経路が, 侵入器官のメラニン化に必要であることが明らかとなった(論文準備中). *PEX14* 破壊株は, *PEX6* 破壊株とは異なり, メラニン化した付着器を形成し, さらに GFP-PTS1 のペルオキシソームへの輸送能を保持していることが見出された. しかし, ラベルされたペルオキシソームは, 野生株の付着器細胞内では, 急速に分解されていくのに対して, *PEX14* 破壊株ではその分解は顕著に抑制されていた. この結果より, *PEX14* が本菌のペキソファジーに必要であることが示唆された. さらに, 現在, GFP-PTS1 を用いて本病原菌のペルオキシソームを可視化・モニターしているが, PTS1 輸送阻害とペルオキシソーム分解を区別するために, PEX14-mCherry 発現株を新たに作出した. さらに非選択的オートファジーとペキソファジーを同時にモニターするために, 新たなレポーター株を作出した. これらの株を用いることで, 病原性発現に必要な両オルガネラ機能(ペルオキシソーム, 液胞)に対しての阻害化合物スクリーニングが可能となると期待される.

原油汚染環境の浄化に有効な嫌気的炭化水素分解遺伝子検出ツールの開発

福井　学

北海道大学低温科学研究所
〒060-0819　札幌市北区北19条西8丁目

目的：海底油田の掘削過程やタンカー座礁等により流出した原油で汚染された海洋底は貧酸素環境であり, 原油炭化水素の微生物による嫌気的分解は著しく遅い. 汚染物質の運命予測は生態系保全の観点から重要であり, また, 微生物による環境修復が期待されている. しかし, 原油炭化水素の嫌気的分解に関する知見は断片的であり, 汚染環境における嫌気的分解過程や分解菌のモニタリング技法は確立されていない. そこで, 本研究では嫌気的原油炭化水素分解菌株を用いたプロテオーム解析により, 新たな嫌気的分解菌検出ツールを開発することを目的とした.

方法：検出ツール開発には, これまでに *p*-キシレン分解–硫酸還元集積培養系(接種源として東京湾三番瀬干潟堆積物)から分離した, トルエン分解硫酸還元菌 28bB2T 株を用いた. 28bB2T 株を, 単環芳香族炭化水素の一つであるトルエン, 芳香族化合物である安息香酸塩, あるいは低分子有機化合物であるエタノールを唯一の炭素源として培養した. 菌体の増殖は, 硫酸還元の生成物である硫化物濃度の測定によって確認した. また, 培養によるトルエンの消費を調べるために, 培養系中のトルエン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した. それぞれの基質を用いた培養系から, 菌体細胞の対数増殖初期, 対数増殖後期, 定常期にそれぞれタンパク質を抽出した. 発現タンパク質をさらに詳しく解析するために, 炭化水素関連タンパク質が活発に合成されていると考えられる対数増殖初期に抽出したタンパク質を用いて, 二次元電気泳動を行った.

結果：抽出した全タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって比較した結果，バンドパターンに各培養系間および培養時間における有意な差異は認められなかった．発現タンパク質を解析した結果，トルエン培養系，安息香酸塩培養系，エタノール培養系ではそれぞれタンパク質の発現パターンが異なった．さらに，トルエン培養系でのみ発現したタンパク質のスポットが見られた．今後，発現量が異なるスポットの更なる解析を行い，硫酸還元菌の単環芳香族炭化水素分解に関与するタンパク質を同定する．さらに，同株のゲノム解析を行った（解析リード数230701，解析総塩基数7703570）．その結果，7,714個のContigおよび276個のScafold（最大Scafold長：117,973）を得た．今後，遺伝子の機能予測を行い，硫酸還元菌の単環芳香族炭化水素分解に関与する遺伝子とタンパク質の解析結果から，新たな嫌気的分解菌検出ツールの開発に資する予定である．

腸内共生細菌群の制御による疾患の改善・予防に関する研究

福　田　真　嗣

理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター
〒230-0045　神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22

目的：腸内細菌叢は宿主の健康維持・増進に寄与したり，あるいは逆に腸管関連疾患の発症にも関与することが知られている．そのため，腸内細菌叢を含む腸内環境全体の代謝動態を理解し，それらを制御することは，われわれのQuality of Lifeを向上させる意味でも重要である．腸内細菌叢の制御方法の一つとして，ビフィズス菌などのいわゆる善玉菌の増殖促進効果を有し，腸内環境の改善効果をもたらすプレバイオティクスの一種であるフラクトオリゴ糖（FOS）摂食があげられる．動物試験ではFOSを摂食すると腸管免疫系が賦活化され，アレルギー抑制効果や病原菌の感染防御に重要な免疫グロブリン（Ig）の一種であるIgAの産生が誘導されることが報告されている．しかしその詳細な分子メカニズムは不明な点が多い．そこで本研究では，網羅的菌叢解析技術とメタボローム解析技術を組み合わせたマルチオミクス解析手法を用いてそのメカニズムに迫った．

方法：20代から30代の健康なボランティア7名（男性4名，女性3名）に10 gのFOSを1日2回，一週間摂食してもらった．腸内細菌叢が大きく変動すると考えられる酒，薬，発酵食品などの摂取は試験期間の1週間前から試験終了まで制限した．FOS摂食前後には2回以上，FOS摂食中には可能な限り糞便を採取した．採取した糞便は凍結乾燥し，オートミルを用いて物理的に破砕した．凍結乾燥した糞便10 mgから腸内細菌叢のDNA，代謝物，およびIgAを常法に従って抽出し，それぞれ変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE法），核磁気共鳴（NMR）を用いたメタボローム解析およびELISA法にて行った．得られた各々の網羅的情報は数値化し，多変量解析手法を用いてメタ解析を行った．

結果および考察：腸内細菌叢の構成は個体間での違いが大きく，FOS摂食前後における個体内での変動はそれよりも小さいことが明らかとなった．同様に腸管内代謝物の変動もFOS摂食前後の個体内変動は個体間での違いよりも小さいことが明らかとなった．そこで，FOS摂食前後における個体内の微弱な腸内環境の変動を見出すために，腸内細菌叢の変動と腸管内代謝物変動の相関解析を行った．その結果，短鎖脂肪酸を含むいくつかの代謝物の変動が，DGGE解析により得られた腸内細菌叢の変動と相関しており，それらの菌群は個体ごとに異なることが明らかとなった．加えて，腸管内代謝物変動と宿主IgA量の変動の相関解析から，FOS摂食により糞便中のIgA量が増加傾向にあった複数の個体で共通して変動する代謝物が存在することが明らかとなった．このことから，FOS摂食による宿主免疫系を介した腸内環境の改善効果の一端は，腸内細菌叢–代謝物–宿主免疫系を介した効果であることが示唆された．すなわち，FOS摂食により腸内細菌叢が変化し，そこで産生された代謝物が宿主免疫系に作用することで，IgA産生量が変化し，腸内環境を改善すると考えられた．

IFO Res.Commun. 26
2012

微生物代謝を活用した親環境地盤改良技術（バイオグラウト）の開発

安　原　英　明

愛媛大学大学院理工学研究科
〒790-8577　愛媛県松山市文京町3番

目的：近い将来に発生する確率の高い南海地震により，我が四国でも，太平洋沿岸域の堤防・護岸の破壊等，甚大な物的・人的被害が発生すると予測されている．過去の大地震では，これら既存インフラ被害のほとんどは地盤の液状化に起因しており，有効な液状化対策を実施できれば一次的・二次的な地震被害を大幅に軽減することが可能である．そこで本研究では，低コストかつ環境に優しい地盤改良工法の開発を目的にして，研究を実施した．

方法：本研究で提案する工法は，微生物（*Saccharomyces cerevisiae*, *Sporosarcina pasteurii*）および酵素（なた豆製ウレアーゼ）の代謝活動を利用して地盤の空隙内に炭酸カルシウムを析出させ，土粒子の縫い付け効果により地盤の強度を増加させ，液状化に堪えうる地盤を構築させるものである．本工法では，微生物（*Saccharomyces cerevisiae*, *Sporosarcina pasteurii*）あるいは酵素（ウレアーゼ），微生物代謝に必要な栄養源（菌体を注入する場合），尿素，カルシウム源の4種類の物質（以下，グラウト材と称す）を砂供試体に注入し，注入後の砂供試体の強度特性を評価した．特に，微生物・酵素の量，尿素・カルシウム源の溶液濃度をパラメータとして設定し，改良砂供試体の強度特性の変化を詳細に評価した．

結果：*Saccharomyces cerevisiae*, *Sporosarcina pasteurii*, ウレアーゼを使用した注入材を砂供試体に注入した結果，X線回折により炭酸カルシウムの析出を確認することができた．*Saccharomyces cerevisiae* を用いて作製したグラウト材の場合，菌体 0.5 g/ℓ，スクロース 0.05 mol/ℓ，酢酸カルシウム 0.05 mol/ℓ の配合で，砂供試体が自立し，一軸圧縮強さ 25 kPa の強度改善効果が確認できたが，*Sporosarcina pasteurii* やウレアーゼを用いたグラウト材よりもその改善効果が小さいことがわかった．一方，*Sporosarcina pasteurii* の尿素加水分解作用を利用したグラウト材の場合，OD 値 1.6 の菌体 11 g/ℓ，尿素・塩化カルシウム溶液 1.0 mol/ℓ の配合で，最大 0.73 MPa の一軸圧縮強さを有する改良体を作製することができた．ウレアーゼをグラウト材に使用した場合，尿素・塩化カルシウム溶液の濃度を 0.50～2.0 mol/ℓ と変化させ，砂供試体の強度改善効果を検討した．その結果，ウレアーゼ 5.0 g/ℓ，尿素・塩化カルシウム溶液 2.0 mol/ℓ の配合で，最も大きな一軸圧縮強さを得ることができ，その値は 2.0 MPa 程度であった．この値は，軟岩程度の強度を表しており，本工法の有用性を確認することができた．

発酵研究所助成研究報告　第26号【非売品】
平成24年12月20日　印刷
平成24年12月25日　発行

編集責任者　中瀬　崇
編集委員　伊藤忠義, 桑原正章, 駒形和男, 木村　光
左子芳彦, 杉山純多, 永井和夫, 坂野　勲
古川謙介, 本田武司, 山里一英
発行人　中濱一雄
発行所　公益財団法人 発酵研究所
大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
TEL. 06－6300－6555
FAX. 06－6300－6814
印刷所　日本印刷出版株式会社
大阪市福島区吉野1丁目2番7号