

共生細菌 *Symbiobacterium thermophilum* をモデルとした難培養性環境微生物の培養特性に関する研究

上田 賢志

(日本大学生物資源科学部 応用生物科学科)

研究の目的

微生物が関与する共生系は、共生宿主が動物や植物の場合についてはその具体的事例に関する詳しい解析が進んでいるが、微生物間における共生は、その取り扱いの難しさゆえに研究が立ち後れている。本研究は、そのような微生物間における共生関係の基礎となる分子メカニズムを理解することを目的として、特にモデルとして *Symbiobacterium thermophilum* を取り上げ、その生理的特性に関する詳細な研究を進めたものである。*S. thermophilum* は単独では増殖しないが、好熱性 *Bacillus* S 株との共培養によって通常の増殖を示す特異な菌であり(1-3)、その増殖を支持する因子を同定することは、微生物間共生の支持基盤を解明することにつながると考えられる。

方法

菌株は *S. thermophilum* IAM14863(3), *Escherichia coli yadF* 欠損株およびその親(4), *Bacillus subtilis* ATCC6633 を用いた。培養法は *E. coli* と *B. subtilis* についてはスタンダードな方法を、*S. thermophilum* についてはかつての記述に準じた方法を用いた(2,5)。また、気相の炭酸ガス濃度を測定する培養に関しては 500 ml 容の枝付きフラスコを密栓して用いた。培地は LB 培地 (1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) を基本に用い、各成分を必要に応じて変動させた。菌数測定は *S. thermophilum* については定量 PCR 法(5)を、それ以外についてはコロニー計数法を用いた。

結果

S. thermophilum の単独増殖をひきおこす培養条件に関する詳細な検討の結果、この菌は炭酸ガスを含む窒素ガスを導入して培養することで顕著な増殖を行うことが明らかになった。炭酸ガスを含まない窒素ガスの導入では増殖が起こらなかったことから、炭酸ガスがこの菌の単独増殖を引き起こす因子であると考えられた。密閉した培養システムによって、*S. thermophilum* の増殖を開始させるために必要な気相中の炭酸ガス濃度の閾値は約 200 ppm であることが判明した。

最近、これに類似の現象が *E. coli* および *Ralstonia eutropha* のカルボニックアンヒドラーゼ欠損株の形質として報告されている(6,7)。カルボニックアンヒドラーゼは炭酸ガスと重炭酸イオンの変換を触媒する普遍酵素であり、*E. coli* や *R. eutropha* の当酵素遺伝子における欠失変異は、通常の培養では致死であるが炭酸ガスを導入した培養では親株と同等の増殖を示すことが知られている。そこで、*E. coli* のカルボニックアンヒドラーゼ遺伝子 (*yadF*) 欠損株を用いて *B. subtilis* との共培養を行った結果、炭酸ガス非通気条件でも

顕著に増殖を行うことが判明した。この *yadF* 欠損株の増殖に対する気相炭酸ガス濃度の閾値は約 7,500 ppm であった。

S. thermophilum のゲノム解読を行った結果、カルボニックアンヒドラーゼに相同性を示す蛋白質をコードする遺伝子は認められないことが明らかになった(8)。この事実から、*E. coli* のカルボニックアンヒドラーゼ遺伝子欠損株に見られたと同様に、*S. thermophilum* はこの酵素の欠損のために炭酸ガス要求性を要求し、それが他の菌との共生によって補われていることが強く示唆された。

S. thermophilum のように炭酸ガスに依存する微生物が他にも存在することを確認する目的で、炭酸ガス通気下のみで増殖する菌株の探索を行った。その結果、これまでに約 60 の細菌株を単離することに成功した。そのうちの一部については 16S rDNA に基づく系統解析を行い、分類学的に極めて新規性の高い菌株が複数含まれていることを見出した。

結論

- 1) *S. thermophilum* の増殖開始に必要な最も重要な因子は炭酸ガスである。
- 2) 共培養条件では他の微生物の増殖に伴って放出される炭酸ガスを利用することで *S. thermophilum* は増殖できる。
- 3) 炭酸ガス要求性の遺伝的背景にはカルボニックアンヒドラーゼの欠損が考えられる。
- 4) 炭酸ガス要求性を示す微生物はおそらく環境中に普遍的に存在する。
- 5) 炭酸ガス要求性の菌は共生培養では増殖するが、通常の培養条件では単離することができないと考えられ、そのために未知の菌株が含まれている可能性がある。

文献

1. Suzuki, S., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1988) *J Gen Microbiol* **134**, 2353-2362
2. Ohno, M., Okano, I., Watsuji, T., Kakinuma, T., Ueda, K., and Beppu, T. (1999) *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1083-1090
3. Ohno, M., Shiratori, H., Park, M. J., Saitoh, Y., Kumon, Y., Yamashita, N., Hirata, A., Nishida, H., Ueda, K., and Beppu, T. (2000) *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1829-1832
4. Hashimoto, M., and Kato, J. (2003) *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 919-922
5. Ueda, K., Saka, H., Ishikawa, Y., Kato, T., Takeshita, Y., Shiratori, H., Ohno, M., Hosono, K., Wada, M., and Beppu, T. (2002) *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 300-305
6. Merlin, C., Masters, M., McAteer, S., and Coulson, A. (2003) *J Bacteriol* **185**, 6415-6424
7. Kusian, B., Sultemeyer, D., and Bowien, B. (2002) *J Bacteriol* **184**, 5018-5026
8. Ueda, K., Yamashita, A., Ishikawa, J., Shimada, M., Watsuji, T., Morimura, K., Ikeda, H., Hattori, M., and Beppu, T. (2004) *Nucl Acids Res* **32**, 4937-4944