

微生物群集に潜在する CO₂ スティミュロンの実態解明

上田 賢志

日本大学 生物資源科学部

研究成果

高濃度の CO₂ が細菌細胞の状態に及ぼす影響を広く検証するために、網羅的な転写ならびにタンパク質発現解析を実施した。その結果、各菌において 20-50 の遺伝子の発現に顕著な影響が認められ、かつ菌種によって影響を受ける遺伝子のパターンが異なっていた。短時間の高濃度 CO₂ への曝露は、特異的な遺伝子発現調節の存在とともに、細胞に損傷を引き起こす可能性を示唆した。コロニー性状が CO₂ 濃度に依存する新たな自然界分離株が複数取得され、現象の普遍性がさらに明確化された。

研究の目的

生物代謝活性の有効な指標である CO₂ は、環境中で最も普遍的なクオルモン（微生物集団の成熟度を示す特異的な低分子因子）として機能していると考えられる。筆者は、これまでの研究成果に基づき、CO₂ は様々な微生物によって受容されてそれらの挙動に影響を及ぼすことで微生物生態系全体を形作っている基盤になっていると推測している。¹⁻⁵ 本研究では、CO₂ が微生物に多面的に及ぼすと予想される諸影響を網羅的に解析し、一つの普遍的環境因子が微生物コミュニティに対して及ぼす影響の多様性を遺伝制御の観点から理解することを目的とした。特に、CO₂ によって一斉にその発現が変動する遺伝子群（CO₂ スティミュロン）の実態を解明することで、普遍的かつ有効な代謝活性の指標である CO₂ が、最も単純な生物群集の決定要因として作用することを明確にする。微生物を扱う生態学は、今日においてもなお主として特定の菌が示す集団的特性や群集構造の変動に関する限定的な観察に基づいた議論の上に成り立ち、そこに統一的な原理を見いだすまでには至っていない。本研究では、CO₂ が微生物の生理と群集構造に深く関与する一つの鍵要因であることを立証することを通じて、微生物生態学の新しい理解を進める。

方法

CO₂ 濃度変化に対する細菌細胞の応答を網羅的に解析することを目的として、通常大気（Air）と高濃度（5 %）CO₂ 大気下（high-CO₂）でインキュベートした細胞について、転写レベルならびにタンパクレベルでの発現比較解析を行った。転写解析では、培養後 24 h の細胞から抽出した RNA について、RNAseq ならびに RT-PCR を用いた試験を実施した。一方、タンパク質の発現解析には、より短時間の応答を観察する目的で、前培養した細胞を、両条件で 1 h 栄養培地中でインキュベートしたものを細胞内と細胞外に分け、質量分析による網羅的な比較解析に供した。モデ

ル細菌株として、転写解析には *Bacillus* を含む 5 つの細菌属の代表株について、タンパク解析には枯草菌 *Bacillus subtilis* を用いた。

また、CO₂ 濃度変化に対する細菌応答の多様性を検証することを目的として、Air と high-CO₂ で異なる形質を示す細菌株の探索を実施した。高濃度 CO₂ 条件下で主として水圏試料から単離した自然界分離株について、栄養培地にレプリカしたものを両条件で 28°C で培養後、コロニー形態を比較した。

上記の試験に用いた培地は、いずれもバッファーを添加することで高濃度の CO₂ 添加による pH への影響が無い状態で実施した。

結果

(1) 転写解析

CO₂ 濃度に依存して形質の変化を示すことが予備的に観察されているグラム陽性および陰性菌合計 6 株について、通常大気下と 5% CO₂ 大気下の間における転写プロファイルの違いを観察した結果、いずれに株についても Air と high-CO₂ のそれぞれで 20-50 個の遺伝子について有為な転写量の増加が認められた。その構成は多様で、共通した遺伝子を見いだすことはできなかった。また、それらの発現に共通して作動している考えられる調節系についても現在までにその推定には至っていない。一方で、*B. subtilis* において見いだされた CO₂ に正および負の依存性を示した遺伝子のうちいくつかについて、RT-PCR によりその再現を確認することができた。それらの中にはアミノ酸代謝に関するものが含まれていた。上記の RNAseq で見いだされた遺伝子群にも様々な一次代謝遺伝子が含まれていたことから、CO₂ の濃度上昇は代謝調節に連動するシグナルネットワークを形成している可能性が考えられた。

(2) タンパク質解析

(1) の転写解析において、複雑な転写プロファイルへの影響が観察されたことを受けて、短時間での直接の応答を観察する目的でタンパク質レベルの観察を試みた。同一の枯草菌の細胞を Air と high-CO₂ で 1 h インキュベートした細胞について、その細胞外面分に含まれるタンパク質を質量分析で網羅的に比較した。その結果、存在量に有為な差のあるタンパク質が複数検出されたが、特に high-CO₂ で多く認められたタンパク質の中には、リボソームタンパクをはじめとする、細胞内タンパクが複数存在していたことから、本条件にさらすことで一部の細胞に損傷が起これその内容物が漏出した可能性が考えられた。一方、特定の細胞壁結合タンパク質が high-CO₂ で顕著に減少するなど、特異的な発現抑制の結果と捉えられる現象も観察された。

(3) CO₂ 応答株の探索

およそ 500 株の自然界分離株について、主にそのコロニー性状に対する CO₂ の影

響の有無を検定したところ、約 30 株について明確な差が生じていることが観察された。影響を受けた主な形質には、多糖と考えられる粘性物質の生産、色素生産、コロニー形状が認められた。上記の解析で主として用いた *Bacillus* 属の細菌においてもこれらの表現形質に顕著な影響が認められた。

結論

これまでの検証から、様々な細菌が高濃度の CO₂ に多面的な影響を受けることがほぼ明らかである。その影響には、CO₂ 濃度の変化を信号とする特異的な遺伝子発現制御を介したシグナルネットワークを基盤とする適応応答が推測されるが、一方、今回の一連の結果は、CO₂ 濃度の変化は pH の変動のほかにも、細胞構造への物理的な影響や、例えば炭素の付加や脱離の酵素反応効率に対する影響を介した代謝フローの変動など、間接的かつ細胞の恒常性に大きく関わる要因を引き起こし、それに対する応答の信号伝達も誘発する可能性を想起させた。CO₂ スティミュロンは、それらの副次的な応答も全て包含するグローバルな調節体系として捉えられる必要があり、その全貌の解明には個々の介在要因とそれに対する特異的な応答ネットワークを確定する取り組みが必要と考えられる。

文献

1. Ueda, K. Invisible interactions between microorganisms. In *Microbes: The Foundation Stone of the Biosphere*. (Ed. C. Hurst) Springer. in press.
2. Ueda, K. and Beppu, T. Syntrophic growth of *Symbiobacterium thermophilum* in association with free-living bacteria. In *The Mechanistic Benefits of Microbial Symbionts*. (Ed. C. Hurst) (2016) Springer. pp.47-65.
3. Watsuji, T. *et al.* (2014) Analysis of the tryptophanase expression in *Symbiobacterium thermophilum* in a coculture with *Geobacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**:1020-1031.
4. Ueda, K., Nishida, H., and Beppu, T. (2012) Dispensabilities of carbonic anhydrase in proteobacteria. *Int. J. Evol. Biol.* **2012**;2012:324549.
5. Nishida, H., Beppu, T., Ueda, K. (2009) *Symbiobacterium* lost carbonic anhydrase in the course of evolution. *J. Mol. Evol.* **68**:90-96.