

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成12年度博士課程 入学
氏名 丁 林賢
指導教官名 横田 明

論文題目

難培養性細菌の分離および難培養性 *Aquaspirillum* 属細菌の系統分類に関する研究

自然界から伝統的な分離方法で培養可能な微生物は僅か1%程度であり、99%以上が培養困難または培養不能な状態 VNC (viable but non-culturable: 生きているが培養できない) であるものと指摘されている。今日、難分離、難培養微生物の培養技術の確立が極めて重要な課題となっている。

グラム陽性細菌 *Micrococcus luteus* は長期培養により VNC 状態になるが、対数期後期の培養上清にサイトカイン様タンパク質の賦活化因子 Rpf (Resuscitation promoting factor) を生成し、VNC 状態の菌体を賦活化させることができる。この Rpf 因子は他にも *Mycobacterium* 属菌種の VNC も賦活化することが報告されている。そこで本研究ではこの Rpf を利用して、VNC の賦活化による難培養性細菌の分離を試み、また培養困難な淡水性 *Aquaspirillum* 属菌種の培養法を確立して当該細菌群の系統分類学的解析を行った。

1. 難培養性土壌細菌の分離及び系統分類学的解析

M. luteus の培養上清を利用し、MPN (most probable number) 法を用いて、68 土壌サンプルから 40 株の細菌を分離した。16S rDNA の部分塩基配列 (約 500 bp) の比較から、それぞれ、*Rhodococcus* 属 11 株、*Arthrobacter* 属 1 株、*Leifsonia* 属 2 株、*Nocardia* 属 1 株、*Kitasatospora* 属 3 株、*Streptomyces* 属 7 株、*Bacillus* 属 12 株、*Paenibacillus*

属 3 株、計 8 属のグラム陽性細菌と同定した (図 1)。土壌中には通常は分離できない細菌種が数多く存在していることを示唆した。

これらの分離株は 16S rDNA 塩基配列の BLAST 検索結果から、既知菌種との相同性が 97% 以下のものが 3 株、98% が 18 株、99% 以上のものが 19 株であり、既知の菌種と新規の菌種が含まれることが示され、何れも土壌中で VNC 状態で存在している菌体から賦活化されたものと考えられる。

16S rDNA 相同性の低い分離株について、全塩基配列を決定して、系統的位置を確認した。DS59、DS60 両菌株は *Leifsonia* 属で、DS51W 菌株は *Nocardia* 属で、DS471、DS472、DS474 と DS48B の 4 株は *Rhodococcus* 属の新種と推定された。相同性が 97% 以下であった DS471、DS472、DS474 と DS48B の 4 株は表現形質や、化学分類、DNA-DNA hybridization、生理・生化学的性状の解析結果から、それぞれ *Rhodococcus* 属の新菌種と同定された。既知菌種との 16S rDNA 相同性の高い分離株のについて、既知種である可能性があるが、新規の菌種でも、既知の菌種でも、土壌中でどのように VNC 状態になっているかについての解明は今後の課題である。

M. luteus の賦活化因子遺伝子 *rpf* は *Streptomyces* 属菌種にも存在していて、賦活化能に何らかの関連性があるものと指摘されているが、今回、*Streptomyces* 属以外に *Rhodococcus* や、*Arthrobacter*、*Leifsonia*、*Nocardia*、*Kitasatospora*、*Bacillus*、*Paenibacillus* などの属の菌種が土壌から得られたことより、*M. luteus* は高 GC グラム陽性菌や、低 GC グラム陽性菌など、広範囲の細菌に対して適用できる可能性があることが示唆された。

2. 培養困難な *Aquaspirillum* 属菌種と分離株の系統分類学的解析

Aquaspirillum 属細菌は淡水から分離されたグラム陰性細菌であり、現在 15 菌種 4 亜種から構成されている。本属の *A. anulus*, *A. giesbergeri*, *A. itersonii* subsp. *itersonii*, *A. delicatum*, と *A. arcticum* の 5 菌種と井戸水から分離された 7-1^T、7-2^T、AQ9^T、AQ10、AQ11、AQ12、F1 の 7 株合計 12 株は生育およびコロニー形成能の弱い、難培養菌種である。本研究で、賦活化能を持つ *M. luteus* の培養上清を添加することにより、これらの菌種の培養が格段に改善されることを見いだしたので、この培養系を用いて本属の菌種の系統関係の解析が可能となった。全菌種について、16S rDNA 全塩基配列に基づく系統解析を行った結果、基準種 *A. serpens* および *A. dispar*、*A. putridiconchylum*、*A. autotrophicum*、*A. arcticum*、*A. anulus*、*A. giesbergeri*、*A. itersonii* subsp. *nipponicum* と *A. peregrum* subsp. *integrum*、本属の菌種は 4 つの系統的に異なるグループ (group 1、*Neisseriaceae*; group 2、*Oxalobacteriaceae*; group 3、*Comamonadaceae* と group 4 の

α -Proteobacteria) に分けられることがわかった。本属は系統的に不均質であり、分類学的再編が必要であることを明らかにした (図 2)。さらに遺伝、表現の両形質による多相分類学的研究を行って、以下のように各属および新種の提案を行った。

グループ 1: *Aquaspirillum* 属の基準種 *A. serpens* と *A. putridiconchylium* は *Neisseriaceae* 科に属し、*Aquaspirillum* 属として位置する。

グループ 2: 好冷菌 *A. arcticum* は新属 *Butleria* を設立し、*B. arcticum* とした。分離株 7-2^T、*A. autotrophicum* および誤同定の種 [*Pseudomonas*] *huttiensis* は *Herbaspirillum* 属に属し、それぞれ *H. putei*, *H. autotrophicum*, *H. huttiense* とすることを提唱した。

グループ 3: *A. anulus*、*A. sinuosum*、*A. giesbergeri* の 3 菌種は *Comamonadaceae* 科に含まれ、これらの菌種には新属 *Rittenbergia* を設立し、それぞれ *R. anula* (基準種)、*R. sinuosa* と *R. giesbergeri* とすることを提案した。 *A. delicatum*、誤同定の種 [*Pseudomonas*] *lanceolata*、および分離株 7-2^T、AQ9^T、AQ10、AQ11、AQ12、F1 は一つのクラスターを形成することより、新属 *Curvibacter* を設立した。それぞれ分離株 7-2^T を *C. gracilis* (基準種)、*C. delicata*、*C. lanceolata* と新種 *C. fontana* を提案した。

A. metamorphum と *A. psychrophilum* はひとつのクラスターを構成することから、新属 *Terasakia* を設立し、*T. metamorpha* (基準種) と *T. psychrophila* とすることを提案した。

グループ 4: *A. polymorphum* は *Magnetospirillum* 属に属することより *M. polymorphum* とすることを、*A. itersonii* subsp. *itersonii* と *A. itersonii* subsp. *nipponicum* の 2 亜種には新属 *Giesbergiria itersonii* (基準種) と *G. nipponica* とすることを提案した。 *A. peregrinum* subsp. *peregrinum* と *A. peregrinum* subsp. *integrum* の 2 亜種については、新属 *Pretoriusia* を設立し、*P. peregrina* (基準種) と *P. integra* と命名した。

このように、培養困難な淡水性 *Aquaspirillum* 属菌種について、培養法を確立することにより、系統的に不均質な本属の菌種および分離株について新属・新種を設立し、21 菌種 (株) の分類学的位置を明らかにすることができた。

3. まとめ

賦活化因子を持つ *M. luteus* の培養上清を利用することにより、伝統的な分離方法では分離できない土壌中の VNC 細菌が賦活化のできることが示唆された。賦活化されたグラム陽性細菌は既知種と新種の両方とも含まれた。また、グラム陽性細菌は賦活化できるのと同時に、難培養性グラム陰性淡水性細菌の培養に対しても有効であったことから、難培養性細菌の分離や、培養困難な細菌の培養化に対して、微生物の新しい取り扱い方法として有用性があることが示唆され、系統分類学的解析への応用に対しても価値のあるものと思われる。

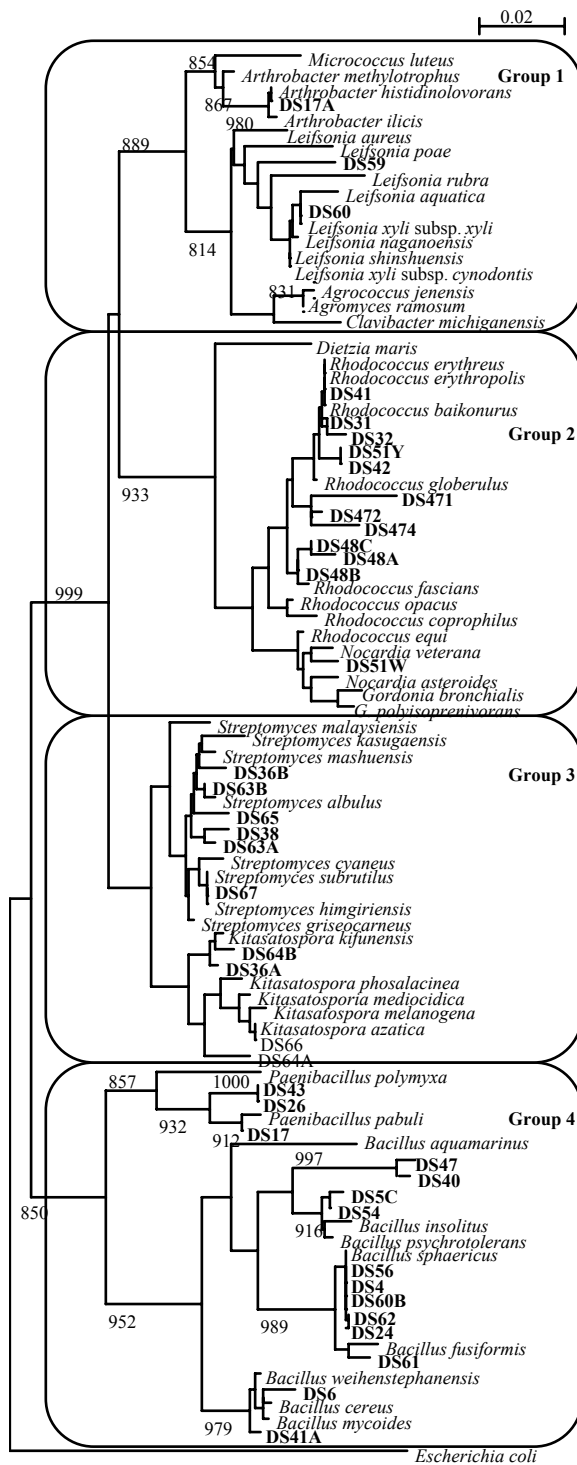


図 1

土壌分離株の16S rRNA 部分塩基配列 (421 bp) に基づく系統樹。数字は1000回抽出によるブーツストラップ値。

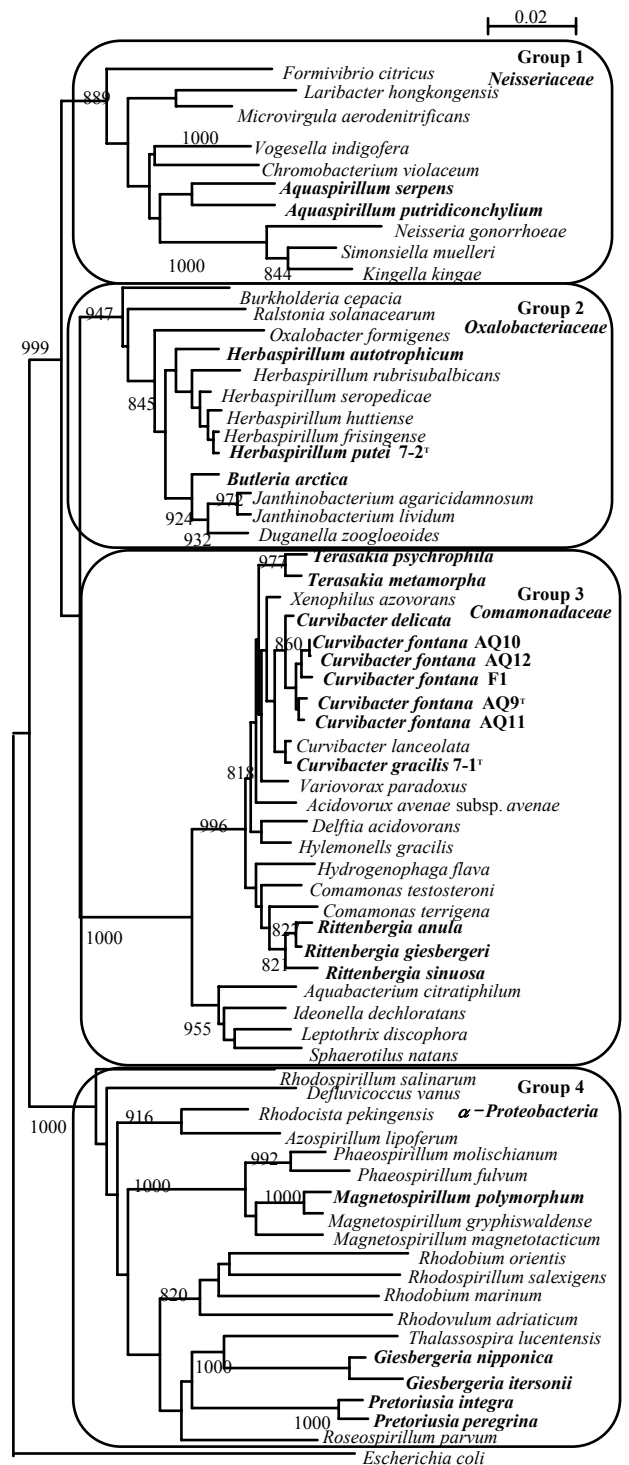


図 2

Aquaspirillum 属細菌の16S rRNA 塩基配列 (1378 bp) に基づく系統樹。数字は1000回抽出によるブーツストラップ値。