

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 丁 林賢

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、残りは培養困難または培養不能な状態 VNC (viable but non-culturable:) であることより、今日では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、さらにこの Rpf 因子は他の菌種の 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。

第1章では本研究の背景について述べている。第2章では難培養性土壌細菌の分離及び系統分類学的解析について述べた。*M. luteus* の培養上清を利用し、MPN (most probable number) 法を用いて、土壌試料から細菌 40 株を分離した。16S rDNA の部分塩基配列の比較から、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。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%が以上のものが 37 株であり、既知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。2 菌株が *Leifsonia* 属、1 菌株が *Nocardia* 属、4 菌株が *Rhodococcus* 属の新種と推定された。相同性が 97% 以下であった 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。本実験で広い範囲の属

の菌種が得られたことより、賦活化因子は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。

第3章では培養困難な *Aquaspirillum* 属菌種と分離株の系統分類学的解析の結果について述べた。*Aquaspirillum* 属細菌は淡水性グラム陰性細菌であり、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 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、*M. luteus* の賦活化因子を添加することにより、難培養菌種の培養が格段に改善されたので、この培養系を用いて本属の菌種の系統関係の解析を行った。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. peregrinum* subsp. *integrum* は 4 つのグループ (group 1、*Neisseriaceae*; group 2、*Oxalobacteriaceae*; group 3、*Comamonadaceae*; group 4; α -*Proteobacteria*) に分けられた。系統的に不均質な本属についてさらに遺伝、表現の両形質による多相分類学的研究を行い、以下のような分類学的再編の提案を行った。

グループ 1: *Aquaspirillum* 属の基準種 *A. serpens* と *A. putridiconchylum* は *Aquaspirillum* 属とする。グループ 2: 好冷菌 *A. arcticum* は新属 *Butleria arcticum* とした。分離株 7-2^T, *A. autotrophicum*, [*Pseudomonas*] *huttiensis* は *Herbaspirillum* 属に移行して *H. putei*, *H. autotrophicum*, *H. huttiense* とした。グループ 3: *A. anulus*, *A. sinuosum*, *A. giesbergeri* の 3 菌種は新属 *Rittenbergia anula* (基準種)、*R. sinuosa* と *R. giesbergeri* とした。*A. delicatum*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*、および分離株 7 株には新属 *Curvibacter* を設立し、*C. gracilis* (基準種)、*C. delicata*, *C. lanceolata* と新種 *C. fontana* を提案した。*A. metamorphum* と *A. psychrophilum* には、新属 *Terasakia* を設立し、*T. metamorpha* (基準種) と *T. psychrophila* とした。グループ 4: *A. polymorphum* は *Magnetospirillum* 属であることより *M. polymorphum* とすることを、*A. itersonii* subsp. *itersonii* と *A. itersonii* subsp. *nipponicum* の 2 亜種は新属 *Giesbergiria itersonii* (基準種) と *G. nipponica* とした。また *A. peregrinum* subsp. *peregrinum* と *A. peregrinum* subsp. *integrum* の 2 亜種は、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、系統的に不均質な菌種および分離株について新属・新種を設立し、分類学的位置を明らかにした。

以上、本論文は難培養性細菌の分離および難培養性 *Aquaspirillum* 属細菌の系統関係を明らかにしたもので、学術上、応用上、貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。