

論 文 内 容 の 要 旨

論文題目 新規好熱菌の分離と系統分類及びゲノム解析

氏名 矢 部 修 平

本研究ではコンポスト及び地熱地帯から分離した新規好熱菌のうち、高度好熱菌 *Thermaerobacter* 属の新種、*Nocardiodaceae* 科の新属・新種、*Ktedonobacteria* 綱の新科・新属・新種、同じく *Ktedonobacteria* 綱の新目・新科・新属・2新種の計5株をそれぞれ提唱した。また珍しい系統である *Ktedonobacteria* 綱 (SK20-1^T株) のライフサイクルを詳細に観察して、既報の原核生物では例の無い1つの細胞から複数の胞子を出芽によって形成する事を見出した。さらにそのゲノム解析を行い、特にセルラーゼ系遺伝子の特徴を明らかとした。以下にその要約を記述する。

コンポストから好熱菌を分離する際に、生育が早くプレート上を覆ってしまう *Bacillaceae* 科を避けて分離する事により、効率的に未知好熱菌を分離できるのではないかと考え、分離培地にカナマイシン、トリメトプリ

ムとナリジクス酸を単独または併せて添加する事によって *Bacillaceae* 科の生育を抑えて未知好熱菌 8 株の取得に成功した。カナマイシン添加培地から単離した 27 株中、20 株 (7 種) は既報の株との 16S rRNA 遺伝子の相同性が 95% 以下の高次レベルで新規好熱菌であった。これら 7 種の分子系統樹解析をした結果、*Firmicutes*、*Actinobacteria*、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 及び *Chloroflexi* に属する株が存在し、カナマイシンを添加する事で幅広い系統から分離する事ができた。この 8 株の中で *Thermaerobacter* 属に属する高度好熱菌 Ni80^T 株、既報の放線菌の中で最も生育限界温度が高い高温性放線菌 I3^T 株、分類学的知見が少ない *Ktedonobacteria* 綱に属し、放線菌様の形態学的、生理学的特徴を示す SK20-1^T 株の 3 株については系統分類学的試験を行い、新種提案した。

新規高度好熱性 Ni80^T 株はグラム陽性、孢子形成性、絶対好気性で、周毛を形成する桿菌であった。生育温度範囲は 52-79°C で最適生育温度は 70°C であった。GC 含量は 72mol % と放線菌並に高かった。分子系統解析の結果、Ni80^T 株は *Thermaerobacter* 属に属し、他の *Thermaerobacter* 属菌種の基準株との DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果、値はすべて 10% 以下であった。よって Ni80^T 株を *Thermaerobacter* 属の新種 *Thermaerobacter composti* sp. nov. として提案した。

高温性放線菌 I3^T 株はグラム陽性、栄養菌糸を形成し、生育温度範囲は 35-62°C で最適温度が 50-55°C であり既報の放線菌の中で最も生育限界温度が高かった。GC 含量は 69-70.2mol% であった。主要脂肪酸は C15:0 iso (14.2 %)、C15:0 anteiso (12.1 %)、C17:0 iso (16.3 %)、C17:0 anteiso (21.7 %) であり、主要メナキノン は MK-9 (H₄)、MK-10 (H₄)、MK-11 (H₄) であった。細胞壁は glutamic acid、glycine、alanine 及び LL-diaminopimelic acid で構成されており、細胞壁糖は rhamnose と arabinose であった。分子系統解析の結果 *Nocardiodaceae* 科に属し、化学分類学的、培養生理学的特徴が近縁の属とは明らかに異なっていたため、*Nocardiodaceae* 科の新属・新種 *Thermasporomyces composti* gen. nov., sp. nov.

として提案した。

SK20-1^T株は放線菌とは系統的に大きく離れているにも拘わらず分岐した気菌糸に胞子を着生する典型的な放線菌様の形態を示した。本株はグラム陽性、好気性であり、生育温度範囲は 31-58℃で最適温度は 50℃であった。GC 含量は 54.0 mol%であり、主要メナキノンは MK-9(H₂)であった。細胞壁は glutamic acid、serine、alanine 及び ornithine で構成されており、細胞壁の構成糖は rhamnose と mannose であった。分子系統解析の結果、*Ktedonobacteria* 綱に属する新科である事が明らかとなり、新科 *Thermosporotrichaceae* fam. nov.、新属・新種 *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov.として提案した。更に門の帰属が不明とであった *Ktedonobacteria* 綱を *Chloroflexi* 門に帰属させる事も提案した。この *Thermosporothrix hazakensis* は *Ktedonobacteria* 綱で 2 種目の提唱株であり、本系統は分類学的知見が少ない。このためこの系統の分離株の提唱は分類学的に非常に重要である。*Chloroflexi* 門に属するが形態が放線菌に類似しているなど、形態学、進化学的にも興味深い。さらに結晶性セルロースやキシラン、キチンなどに対して強い分解性を示し、グラム陽性菌に対して抗菌活性を示すなど生理学的性質も放線菌と類似しており応用面でも利用できる可能性ある。そこで、この *Ktedonobacteria* 綱に属する培養株を更に分離するために他の自然界からも分離を試みた。

宮城県鬼首温泉の地熱地帯から 2 種の *Ktedonobacteria* 綱に属する好熱菌の分離に成功した (ONI-1^T株、ONI-5^T株)。これらの株も分岐した気菌糸に胞子を着生する SK20-1^T株と同様の放線菌様の形態を示した。これらの株は 74℃まで生育でき、最適温度は 60-65℃であった。GC 含量は、ONI-1^T株は 60.2 mol%、ONI-5^T株は 58.1 mol%であり、主要脂肪酸は C17:0 iso で主要メナキノンは MK-9 (H₂)であった。細胞壁の glutamic acid、serine、glycine、histidine、alanine 及び ornithine で構成されていた。分子系統解析及び化学分類、培養生理学的試験の結果、ONI^T株は *Ktedonobacteria* 綱に属する新目であり、ONI-1^T株と ONI-5^T株は同属で別種である事が明ら

かとなった。よって ONI-1^T株を新目 *Thermogemmatisporales* ord. nov.、新科 *Thermogemmatisporaceae* fam. nov.に属する新属・新種

Thermogemmatispora onikobensis、及び ONI-5^T株を新種 *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov. として提案した。この 2 種の提案により *Ktedonobacteria* 綱に属する種は SK20-1^T株も含め 2 目、2 科、3 属、4 種となった。これらの株は目レベルで異なるが、形態が分岐した気菌糸に胞子を着生する共通の特徴を有した。従ってこの系統は放線菌様の特徴を有している事が示唆された。

放線菌様細菌 *Ktedonobacteria* 綱のライフサイクルを解析するために、SK20-1^T株をモデルとして電子顕微鏡を用いて経時観察した。その結果、胞子から栄養菌糸を伸長させ、その後、気菌糸を発展させ、胞子を着生させ、胞子が成熟し、遊離する事が示唆された。これらのサイクルは典型的な放線菌と同様であった。胞子の形成様式は気菌糸内の 1 つの隔壁で囲まれた母細胞から複数の胞子を出芽によって形成する事が明らかとなった。このような胞子形成様式は原核生物では初めての報告であり、真核生物である担子菌の胞子形成様式に類似している事から *Blastospore* と名付けた。

Ktedonoabacteria 綱の SK20-1^T株と ONI株は繊維質分解能に優れ、SK20-1^T株はグラム陽性細菌に対して抗菌性を示すなど産業微生物である放線菌と同様、応用面で期待できる事が考えられた。そこで、応用の可能性を網羅的に把握するため、SK20-1^T株のゲノムをドラフト解読した。その結果、ゲノムサイズは 7.3 Mb、ORF 数が 6391 個であった。またその ORF は未知機能遺伝子の割合が 5 割近くあり、2 次代謝産物関連遺伝子の割合が 4.75% と高く、*Actinobacteria* の 4.54% と同様であった。糖質加水分解酵素ファミリー (GHs) を検索した結果、SK20-1^T株の GHs は 26 種類、59 個存在した。ゲノム中に多種、多数の GHs が検出された事は多様な高分子糖類を分解できる能力がある事を示唆している。その中でセルラーゼ系の糖質加水分解酵素ファミリーとして GH5、6、9、12、48 が検出された。GH6、9、48 の共存はほぼ放線菌特有の組み合わせであり、放線菌のセルロース分

解機構を特徴付けている重要な組み合わせであると考えられるが、SK20-1^T株は GHs の種類パターンが放線菌と類似している事が明らかとなった。以上の事から、SK20-1^T株は分子系統分類学的に放線菌とは大きく離れているにも拘わらず形態、繊維質分解酵素生産、抗菌物質生産など生理学的に類似しているだけでなく、セルラーゼ系糖質分解酵素ファミリーの種類も類似している事が明らかとなった。*Ktedonobacteria* 綱に属する細菌は工業微生物である放線菌に次ぐ抗生物質や繊維質分解酵素のスクリーニングソースとなる事が示唆された。