

論文の内容の要旨

論文題目 *Micrococcineae* 亜目に属する放線菌の系統分類と
リン脂質に関する分類学的研究

氏 名 植 晴美

はじめに

放線菌は生理活性物質やアミノ酸の生産、環境汚染物質や難分解化合物の分解菌として注目される。有用な生産物や酵素を見出すには新規な菌株の探索は有効であり、同時に正確な分類・同定がなされ、その知見を探索にフィードバックすることはメリットがある。分類・同定の基準は、当初、形態や生理的性状などの表現形質によるものであった。1970年頃からは、生物間に普遍的に存在し分類群を反映した菌体成分に基づく化学分類が導入された。化学分類における指標には、細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸、菌体中の還元糖、脂肪酸、キノン、リン脂質が用いられ、主に属及び科レベルの分類に重要視された。1990年代に入り DNA 塩基配列の解析技術の発展に伴って 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析など遺伝子レベルの手法が導入された。本研究では、海洋環境などから分離された *Micrococcineae* 亜目に属する新規な放線菌について分類学的解析を行ない、不明瞭領域の分類体系の構築を試みた。さらに、近年技術発展が著しい質量分析を微生物の化学分類におけるリン脂質、キノン及び細胞壁のアミノ酸の分析に応用した。

Micrococcineae 亜目に属する放線菌の系統分類

生態学的研究のみならず新規有用代謝産物や酵素の探索研究においても新規な放線菌を自然界から分離することが必要不可欠である。*Micrococcineae* 亜目は *Actinobacteria* 綱 *Actinobacteridae* 亜綱 *Actinomycetales* 目内の亜目の一つであり、形態的にも化学分類的にも多様である。本研究では、海洋環境などから分離された *Micrococcineae* 亜目に属する分離株 5 菌株について分類学的に解析し、新規提案及び分類体系の構築を行なった。

Leucobacter 属は *Micrococcineae* 亜目 *Microbacteriaceae* 科に属する。現在報告されている菌種のうちペプチドグリカンにおいて γ -aminobutyric acid (GABA) を有する点で他属にはない特徴を有するが、その分類学的知見はまだ得られていない。本研究では家畜の肥料由来 mixed culture から単離された K-540B 株について分類学的性状を調べ、新種 *Leucobacter exalbidus* sp. nov. を提案した。K-540B 株は GABA を含むがスレオニンやリジンを含まず、ペプチドグリカンのアミノ酸組成は近縁既知種 5 株とは異なった。近隣結合法及び最大制約法による系統樹において GABA の有無による分離は生じなかったため、GABA の分類学的意義を追求するには更に詳細な研究が必要である。GABA については、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)により、他の成分と完全に分離し、保持時間と分子量による正確な同定を行なうことができた。微生物分類学の分野において、CE-MS を用いた分析の報告はこれまでにないが、誘導体化の必要性もなく、CE-MS 法はペプチドグリカン加水分解物のアミノ酸分析において有効であることが示された。

海洋環境は新しい有用物質や酵素生産菌の探索源として大いに開拓の余地があり、生息する放線菌の分類や研究もまだあまりなされていないため分類体系も不明瞭な領域が多い。海砂から分離された YM24-125 株、*Zostera marina* Linnaeus (アマモ科) 由来の YM05-1041 株、及び海藻由来の YM12-102 株について分類学的解析を行い、それぞれ *Demequina* 属の新種 *Demequina globuliformis* sp. nov.、*Demequina oxidasica* sp. nov. 及び *Demequina aurantiaca* sp. nov. として提案した。これらの分離株は高い塩耐性を有し、嫌気性下でも生育できるなど、海洋性の特徴を示した。*Demequina* 属は Zhi, et al. (2009) によって *Cellulomonadaceae* 科として提案されているが、*Demequina* 属の既知種 3 菌株及び分離株 3 菌株は他の *Cellulomonadaceae* 科の属菌とはデメチルメナキノン を有する点で異なった。また、系統樹において *Demequina* 属 6 菌株が明確に単一の群を形成し、16S rRNA 遺伝子配列のシグネチャー配列のパターンが *Micrococcineae* 亜目内の他科とは異なったことから、*Demequina* 属 6 菌株からなる新科 *Demequinaceae* fam. nov. を設立した。

海砂から分離された YM18-15 株は非運動性の球菌-桿菌であり、通性嫌気性である。*Beutenbergiaceae* 科は 3 属 (*Salana* 属、*Beutenbergia* 属及び *Serinibacter* 属) 各 1 菌種ずつのみしか報告されていない。YM18-15 株は *Beutenbergiaceae* 科の 3 属と化学分類学的性状及び 16S rRNA 遺伝子シグネチャー配列のパターンが異なることから、YM18-15 株を新属新種 *Miniimonas arenae* gen. nov., sp. nov. として提唱した。

LC-ESI-MS を利用したリン脂質の解析

リン脂質は、その豊富なバリエーションに基づき微生物の分類指標として有効的に用いられている。リン脂質の分析は薄層クロマトグラフィー(TLC)が広く用いられているが、この手法は標準物質と同時に分析できないなどの難点がある。そこで、本研究においては液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化マスペクトロメトリー(LC-ESI-MS) をリン脂質分析に用いた。LC-ESI-MSはTLC法より高感度であり、LCの保持時間とMS分析の分子量の測定によりリン脂質のタイプとTLC法では推定できない側鎖の長さが決定でき、また、精密分子量からはリン脂質の側鎖とヘッドグループの間の結合様式を推定することができる。本研究ではLC-ESI-MSを用いて分離株5菌株のリン脂質の解析を行ない分類指標に利用し、さらに、その結合様式を解析した。その結果、K-540B株において細菌では稀なジエーテル結合を有する2つのリン脂質dialkyl (33:0) phosphatidylglycerol 及びdialkyl (32:0)phosphatidylglycerolが検出された。*Propionibacterium propionicum*においてモノアルキルエーテル型リン脂質が見出されているが、*Actinobacteria*門においてこれまでジアルキルエーテル型リン脂質の報告はない。ジアルキルエーテル型のリン脂質が*Actinobacteria*門から本研究において初めて見出されたことになる。

一般的に、細菌のリン脂質は、側鎖とヘッドグループがエステル結合で結合しており、古細菌の結合様式はエーテル結合である。しかし、これまで細菌からプラズマローゲン以外にもエーテル結合を有するリン脂質がいくつか報告されている。ジエーテル結合は深く分岐した好熱性細菌の*Aquifex pyrophilus*や*Ammonifex degensii*、好熱性硫酸還元細菌の*Thermodesulfotobacterium commune*、及びmyxobacteriumの*Stigmatella aurantiaca*から報告されている。エーテル/エステル結合混合リン脂質は好熱性細菌の*A. pyrophilus*や*Thermotoga martima*、中温菌の硫酸還元細菌*Desulfosarcina variabilis*及び*Desulforhabdus amnigenus*、*S. aurantiaca*及び放線菌の*Propionibacterium propionicum*から見出された。エーテル結合はエステル結合より耐熱性が高いといわれておりエーテル型脂質をもつ真正細菌の報告の殆んどは好熱菌であるが、好熱菌以外の古細菌がエーテル型脂質を有する生理学的意味合いはまだ明らかにされていない。強度の酸性やアルカリ状態下ではエーテル結合の方がエステル結合より化学的または酵素的攻撃に対して有効であるが、*Leucobacter exalbidus* K-540B^T株は極限環境で分離されたわけでもなく生育もしない。エーテル型リン脂質が、*D. variabilis*及び*D. amnigenus*、*S. aurantiaca*、*Propionibacterium propionicum*に加えて、本研究において*Leucobacter exalbidus* K-540B^T株から見出されたことは、細菌において以前考えられたより初期の分岐や極限環境に関係なく膜脂質に存在することが示唆されたことになる。ジアルキルエーテル型リン脂質は*Leucobacter exalbidus* K-540B^T株の分類学的特徴であるか、あるいは進化によりエーテル型リン脂質が退化した菌と残存している菌が存在するのかもしれない。分析技術の発展と普及により細菌からのエーテル型リン脂質の報告が増えれば、エーテル結合の存在の意義も明確になるであろう。

まとめ

Micrococcineae 亜目に属する分離株 5 菌株について分類学的解析を行い、4 新種、1 新属新種の創立、及びデメチルメナキノンの特徴とする *Demequina* 属のみからなる新科 *Demequinaceae* 科の創立を提案した(図 1)。LC-ESI-MS を用いてリン脂質の詳細な解析を行い、*Leucobacter exalbidus* K-540B^T 株において 2 つのジアルキルエーテル型 phosphatidylglycerol が見出された。本研究により、ジアルキルエーテル型リン脂質が *Actinobacteria* 門から初めて見出されたことになり、リン脂質におけるエーテル結合の存在意義について知見を示した。

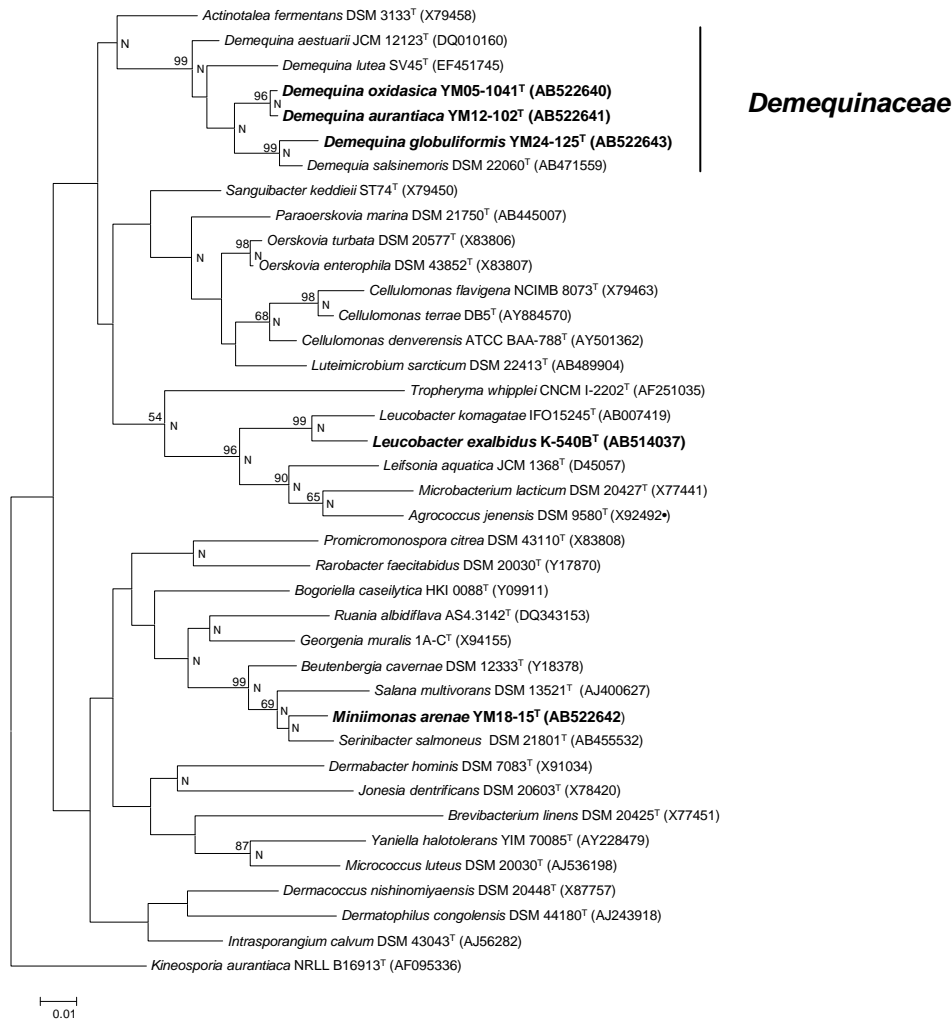


図 1. 提案した新規 5 菌株と *Micrococcineae* 亜目のすべての科の関連既知種のタイプ株との系統関係を示す 16S rRNA 遺伝子配列に基づく ML 法により作製した系統樹

各分岐の数値は 1000 回繰り返し bootstrap 解析で評価した信頼値(50%以上)を示す。Outgroup として *Kineosporia aurantiaca* NRRL B-16913^T 株の配列を用いた。‘N’は NJ 法においても形成された分岐を表す。括弧内の数は GeneBank のアクセッション番号を示す。本研究で決定された配列は太字で示されている。バーは 0.01(K_{nuc})。