

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 田中靖浩

2. 養成カリキュラム名: 複合生物系等生物資源利用技術開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

本養成カリキュラムの目的は難培養性微生物の培養化新技術の開発であるが、この点に関してはほぼ目的が達成されたと考えている。具体的には培養可能な微生物の生産する生育促進化合物を培地中に添加することにより、通常の栄養培地等では生育できない(または極めて生育が遅い)微生物を分離培養することに成功した。また、この手法によって得られた微生物は新属新種細菌、特殊な培養条件を要求する日和見感染菌に近縁な細菌であったことから、今後、新微生物資源の開拓、病原性細菌の検出技術などへの応用が期待される。

4. 成果(A4版3枚程度)

自然界にはいまだに培養方法の確立されていない微生物、いわゆる未培養・難培養性微生物が多く存在することが知られている。本研究ではこのような微生物の分離・培養化を可能とし、産業上利用可能な微生物・遺伝子資源を開拓するための基盤技術を構築することを目的としており、養成期間(3年間)内で以下のような研究成果を得た。

### I. 微生物間相互作用を利用した新規微生物資源の取得

多くの微生物が難培養である理由としては種々あるが、彼らの周囲に存在している微生物間相互作用(微生物間情報伝達物質;生育促進化合物)が培地中に欠落していることがその一つとして考えられる。そこで、微生物の生育に關与する微生物細胞間情報伝達機構を獲得し、難培養性微生物培養化技術開発への利用を目的とし、活性汚泥を分離源として、酵母エキスなどを含む一般的な栄養培地では生育が困難または遅い微生物とその生育を促進する微生物の検索を進めた。

#### 【生育促進因子要求微生物の取得】

まず、生育に微生物由来の生育促進因子を要求する微生物を獲得するために、一般的な栄養培地では生育せず、複合微生物培養液の上清を添加した培地でのみ生育する(または生育が早い)微生物のスクリーニングを進めた。表1に示すNPB培地(pH7.0)に少量の活性汚泥を添加し30で5日間培養し、得られた培養液を遠心分離(15000 rpm, 10 min)し、上清画分を複合微生物培養液上清とした。この複合微生物培養液上清を10%添加したNPB寒天培地(NPBCE)に活性汚泥希釈液を塗抹し、30で4日間培養した。出現したコロニーをNPB寒天培地およびNPBCE寒天培地を用いてレプリカをとり、NPBCE寒天培地でのみ生育する菌株を選択した。以上の方法により、生育に微生物由来の生育促進因子を要求する菌株AST4株を得た。

表1 NPB培地組成

Tryptone peptone	10	g
Yeast extract	3	g
Glucose	5	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	g
Distilled water	1	l

#### 【AST4株の同定】

上述のようにして得られたAST4株の16S rRNA遺伝子の解析を行ったところ、*Rhodobacter*属細菌、*Paracoccus*属細菌、*Rhodovulum*属細菌と近縁であるものの塩基配列の相同性は94.7%以下であり、新属新種菌株である可能性が示唆された。そこで、本菌株の生理的および系統的解析を進めたところ、AST4株は

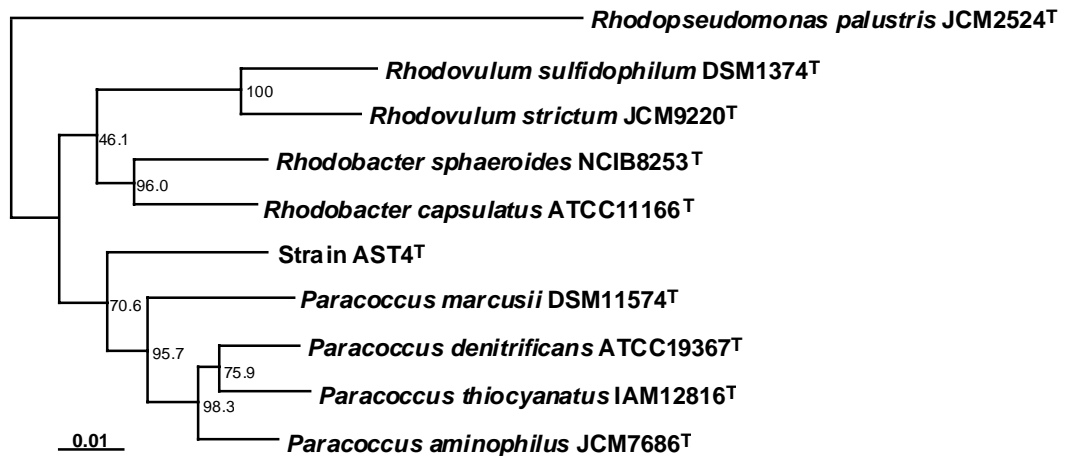
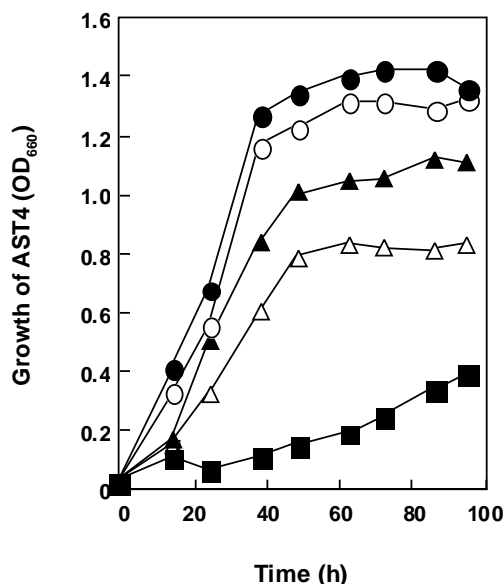


図1 AST4株の分子進化系統樹

*Rhodobacter* 属細菌、*Paracoccus* 属細菌、*Rhodovulum* 属細菌と同様に *Rhodobacteriaceae* family に含まれるが、いくつかの生理的性質（光合成能、硝酸呼吸能、色素形成能など）において、これらの 3 属とは異なる性質を示し、系統的にも別の Lineage を形成することを確認した（図 1）。これらの結果から AST4 株は *Rhodobacteriaceae* family における新属新種菌株であることを明らかとし、*Catellibacterium nectariphilum* として新属新種提案した（Tanaka et al. *Int. J. Syst. Microbiol.* (2004) in press）。

【AST4 株に生育促進因子を供給する微生物のスクリーニング】

AST4 株の生育を促進する微生物のスクリーニングを以下のような方法で行った。NPB 寒天培地に活性汚泥希釈液を塗抹し、30 で 5 日間培養して得られたコロニーを NPB 培地に植菌し、30 で定常期まで振盪培養した。培養液を遠心分離（15000 rpm, 10 min）後、上清を NPB 培地に 10% 添加した。この培地に AST4 株を植菌し、本菌の生育を促進する微生物を検索した。その結果、AST4 株の生育を著しく促進する微生物として GF9 株を得た。16S rRNA 遺伝子の解析により、本菌株は *Sphingomonas* 属細菌であることが明らかとなった。図 2 に GF9 株による AST4 株の生育促進を示した。



【GF9 株が生産する AST4 株生育促進化合物の性質】

GF9 株の培養上清を限外ろ過（分子量 1000 cut）Pronase 処理、酸・アルカリ処理したところ、いずれにおいても生育促進効果への影響は見られなかった。これらの結果より、本生育促進化合物は分子量 1000 以下の非ペプチド性化合物であることが示唆された。また、オートクレーブ処理後も生育促進活性は残存していたことから、熱安定性が極めて高い化合物であることが分かった。さらに、Sep-pakC18、Sep-pakC8、Q-Sepharose XL、限外ろ過膜（Micro-Sep 1K; Pall 社）HPLC（Develosil ODS-UG-3）を用い、GF9 株培養上清からの AST4 株生育促進化合物の精製を試みたが、その過程で本生育促進化合物は UV 領域に吸収を持たない、または微弱な化合物であることが分かった。これまでに報告されている微生物の生育に関与する化合物としてはペプチドの他にはナフトキノロン類、ホモセリンラクトン類、カテコールアミン類、cAMP などが報告されている（Bussmann et al. (2001) *J. Microbiol. Methods* **47**, 41–50; Bruns et al. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3978–3987; Isawa et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 679–681; Kinney et al. (1999) *Microb. Pathogenesis* **26**, 85–91; Belay et al. (2003) *Life Sciences* **73**, 1527–2535）。しかし、これらの化合物には AST4 株生育促進効果が見いだされなかったことから、GF9 株が生産する AST4 株生育促進化合物は新規な微生物間情報伝達物質である可能性が示唆された。

図2 種々の濃度のGF9株培養液上清添加培地におけるAST4株の生育 : 10%, : 5%, : 1%, : 0.5%, : 0%

【GF9 株によって生育が促進される微生物のスクリーニング】

AST4 株と同様に GF9 株によって生育が促進・支持される微生物のスクリーニングを試みた。NPB 培地（表 1）に GF9 株の培養上清を 10% 添加した培地（NPBGF9 培地）に活性汚泥（2 種類：活性汚泥 1、活性汚泥 2）の希釈物を塗抹し、30 にて 5 日間培養した。出現したコロニーを NPB 寒天培地および NPBGF9 寒天培地を用いてレプリカをとり、NPBGF9 寒天培地でのみ生育する菌株を選択した。その結果、活性汚泥 1 からは ASTN45 株が、活性汚泥 2 からは ASN212 株が得られた。Guan らの方法（*Appl. Environ. Microbiol.* (2000) **66**, 2797-2803）に従い、CentriPrep-50（Millipore 社）を用いた GF9 株と ASTN45 株または ASN212 株との共培養を行った結果を図 3 に示した。いずれの菌株も GF9 株非存在下では生育はほとんど

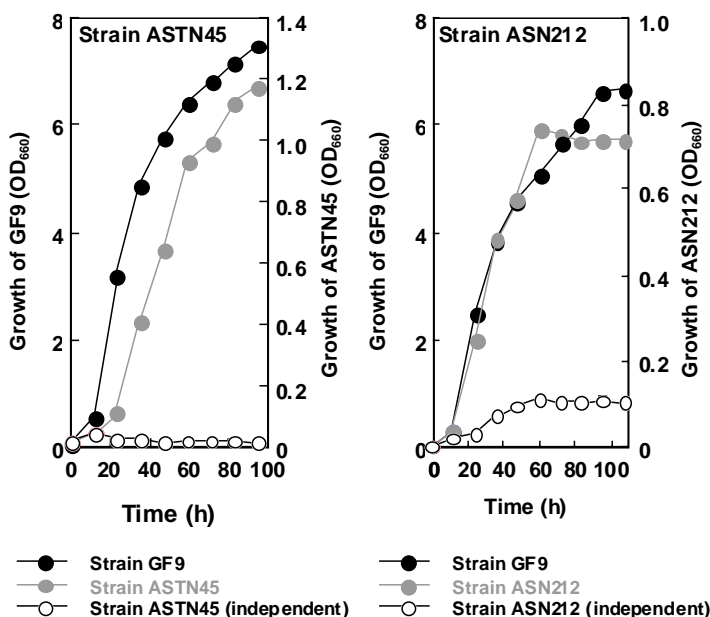


図3 GF9株とASTN45株、ASN212の共培養

確認されなかった。

次に、これら 2 株の 16SrRNA 遺伝子の解析を行ったところ、ASTN45 株は日和見病原菌、猫ひっかき病の原因菌を含み、培養に特殊な方法（アメーバーとの共培養法）を用いる *Afipia* 属細菌と近縁であった。また、ASN212 株に関しては *Leucobacter komagatae* と近縁であったものの、16SrRNA 遺伝子の塩基配列が 95.5% であり、コロニーの形状などが全く異なることから新属新種の可能性が高いことが示唆された。

以上のように、GF9 株を用いることによって、通常の栄養培地では生育できない、または遅い菌株を単離培養することに成功した。また、今回得られた AST4 株、ASTN45 株、ASN212 株は GF9 株によって著しい生育促進を受けたが、他の微生物の一部（大腸菌、*Bacillus* 属細菌等）にもある程度の生育促進効果があることが確認された。したがって、GF9 株を含めた種々の培養可能微生物を用い、これらの微生物によって生育支持・促進される微生物を網羅的に検索すれば、さらに数多くの新規微生物が得られるものと思われる。

## II. 新規遺伝子資源の分離取得技術

難培養性微生物の培養化は微生物スクリーニングにおける対象の多様性を広げ、より多くの有用微生物の取得に貢献できると考えられるが、一方で、微生物として利用するのではなく、新規な有用物質生産酵素遺伝子、環境汚染物質分解酵素遺伝子を獲得するための遺伝子資源としての利用が注目されている。

そこで、本研究では難培養性微生物の遺伝子資源としての利用モデルの構築を目的とし、難培養性微生物群を含む環境サンプルからの新規遺伝子の検索を試みることにした。また、これまでに、フローサイトメーターを用いた複合微生物群からの難培養性微生物の分離が成功しているが（Manome et al. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 29–33）このようにして分画した難培養性微生物はゲルマイクロドロップで包まれている。一方、難培養性微生物を遺伝子資源として利用するには GMD 中の微生物からの DNA 抽出が必要不可欠である。そこで、活性汚泥中の微生物を含むゲルマイクロドロップ（GMD）からの DNA 抽出についても検討した。

### 【新規有用遺伝子の取得】

難培養性微生物の遺伝子資源としての利用モデルの構築を目的とし、難培養性微生物群を含む環境サンプルからの新規遺伝子の検索を試みることにした。

有用遺伝子として今回は、グラム陽性細菌のナフトレンジオキシゲナーゼ（ラージサブユニット）を選定した。これまでに報告されている *Mycobacterium* sp. PYR-1、*Nocardiodies* sp. KP7、*Rhodococcus*

**nidA-F1**

C P Y H G W  
5' TGY-CCI-TAY-CAY-GGI-TGG 3'

**nidA-F2**

A D N F V G D  
5' GCI-CAY-AYY-TTY-GTI-GGI-GA 3'

**nidA-R1**

F I H G T V F  
5' TTY-ATH-CAY-GGI-ACI-GTI-TT 3'

↓ Reverse complementary  
5' AAI-ACI-GTI-CCR-TGD-ATR-AA 3'

**nidA-R2**

F E Q D D A E  
5' TTY-GAR-CAR-GAY-GAY-GCI-GA 3'

↓ Reverse complementary  
5' TCI-GCR-TCR-TCY-TGY-TCR-AA 3'

図4 ナフトレンジオキシゲナーゼ遺伝子増幅用プライマー

sp. NCIMB12038、*Rhodococcus* sp. I24 由来の酵素遺伝子をデータベース（GenBank）より獲得し、これらの遺伝子から推定される一次構造のアライメントを作製した。作製したアライメントにおいて、保存性の高いアミノ酸配列より図 4 に示す PCR 用プライマーをデザインした。難培養性微生物群を含む環境サンプルとしては活性汚泥を用いた。活性汚泥からの DNA 抽出には QIAamp DNA Stool mini kit（QIAGEN 社）を用い、活性汚泥 40 mg から kit 添付のプロトコールに従い、DNA を抽出した。活性汚泥より抽出した DNA を鋳型とし、上述のプライマー、HotStarTaq DNA polymerase（QIAGEN 社）を用い PCR を行った。その結果、nidA-F1、nidA-R2 の組み合わせによってのみ PCR 増幅断片が得られた。この DNA 断片をアガロース電気泳動により精製後、DNA Ligation kit ver.1（TaKaRa 社）を用い、pT7Blue T-vector（Novagen 社）に組み込み、得られた組換えプラスミドの塩基配列を 310 Genetic Analyzer（ABI 社）により解析した。その結果、3 パターンの配列が確認され、これらを *asnida-I*、*asnida-II*、*asnida-III* と命名した。それぞれの配列から推定される一次構造をデータベースにホモロジーサーチしたところ、*Asnida-I* は *Rhodococcus globerulus* のピフェニルジオキシゲナーゼ（ラージサブユニット）と 47%、*Asnida-II* は *Rhodococcus* sp. I24 のナフトレンジオキシゲナーゼ（ラージサブユニット）と 54%、*Asnida-III* は *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 のナフトレンジオキシゲナーゼ（ラージサブユニット）と 56% の相同性を示した。この結果は今回得られたナフトレンジオキシゲナーゼ遺伝子部分断片が新規遺伝子であることを示唆するものである。

### 【GMD からの微生物遺伝子の抽出】

1 ml の GMD 溶液 ( $10^6$ – $10^7$  個/ml) を 4000 rpm、5 分間の遠心分離にかけ、上清を除去後、重量が 200 mg になるように滅菌超純水を加えた。70 °C で 10 分間インキュベートした後、QIAamp DNA Stool mini kit (QIAGEN 社) を用い、Kit 添付のプロトコールに従い DNA の抽出を試みた。

抽出した DNA が細菌由来のものであることを確認するとともに遺伝子資源として利用可能であることを判断するために細菌の 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマー (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3' (bp 515–530 of the *E. coli* 16S rRNA gene), 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (bp 1492–1510 of the *E. coli* 16S rRNA gene, complementary sequence)) を用い、抽出 DNA を鋳型とした PCR を行った。その結果、図 5 に示すように目的の遺伝子断片と思われる増幅が確認された。したがって、本方法がゲルマイクロドロップ中の微生物からの DNA 抽出に適用できることが明らかとなった。今回はフローサイトメーターによる分画前の GMD を用いたため、得られた DNA 中には難培養性微生物、培養可能微生物由来の DNA が混在している。したがって、今後、フローサイトメーターによって分画した難培養性微生物のみを含む GMD からの DNA 抽出に本方法を用いることにより、難培養性微生物由来 DNA を特異的に新規遺伝子資源として利用することが可能であると思われる。また、今後の課題として、物理的破壊方法等の他の DNA 抽出方法についても検討し、抽出効率の高い方法を検索する必要がある。

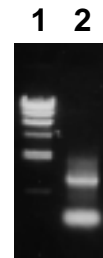


図5 GMD抽出DNAを鋳型とした16SrRNA遺伝子のPCR  
Lane 1: 分子量マーカー, lane 2: PCR product (1 kb)

## 5. 成果の対外的発表等

### (1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象)

Yasuhiro Tanaka, Satoshi Hanada, Akira Manome, Takayasu Tsuchida, Ryuichiro Kurane, Kazunori Nakamura and Yoichi Kamagata (2004) *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth stimulation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* in press (DOI 10.1099/ij.s.0.02750-0).

### (2) 口頭発表 (発表済を対象。)

田中靖浩、馬目章、張輝、金川貴博、倉根隆一郎、土田隆康. 難培養性微生物の生育を促進する微生物の検索. 日本農芸化学会 (仙台, 2002. 3).

田中靖浩、花田智、中村和憲、鎌形洋一. *Sphingopyxis* sp. GF9 による活性汚泥分離細菌 AST4 株および ASTN45 株の生育促進効果. 日本生物工学会 (大阪, 2002. 10).

田中靖浩、花田智、中村和憲、鎌形洋一. 微生物細胞間相互作用を用いた新規微生物の検索. 日本微生物生態学会 (大阪, 2003. 10).

### (3) 特許等 (出願番号を記載)

なし