IS3-PM1 微生物の生育を考え直す—微生物共生系における生育因子と生育阻害因子の役割

○別府 輝彦, 加藤 平, 和辻 智郎, 上田 賢志
(日大生資科・生命セ)

シロアリ腸管やメタン発酵槽などの中の複合微生物系の構成員の多くは、いわゆる難培養性かまたは相互に依存しあう共生的関係にあり、コロニー分離を基本とする手法でそれらを純粋培養することは困難である。16S rDNA など特定配列を対象とする PCR 法は構成員の多様性の解析を可能にしたが、それぞれの生物単位としての機能に関する情報を得るためには、依然として純粋培養がもっとも望ましい手段だといわざるを得ない。

我々がかつて耐熱性トリプトファナーゼ生産菌のスクリーニングで見出した、好熱性共生細菌 *Symbiobacterium thermophilum* とその生育を支持する好熱性 *Bacillus* 属細菌 S 株とからなる互利共生系は、微生物学的に明確に定義された構成員から成り、かつ再構成可能な単純化されたシステムとして、複合微生物系における生育をめぐる相互作用を考える上で参考になる知見を与えてくれる。

1. 共生系における物質交換の証明: *S. thermophilum* はコロニーを殆ど形成せず、懸濁液の濁度も通常細菌の 1/10 程度であるために、特異的配列を標的とする定量 PCR による生育測定法をまず開発した。また生育支持菌との間の物質交換を実証する目的で、透析膜を介して二つの菌を別々に培養する簡単な透析培養装置を製作した。これらを用いることにより、透析膜を隔てて支持菌を培養した時にのみ *S. thermophilum* の単独生育が起こることが確認された。

2. 生育支持因子の同定: さらに高精度の PCR を用いる生育測定で、上記の結果とは一見矛盾するが、酵母エキス (Y) およびトリプトンペプトン (T) を含む培地中で *S. thermophilum* が 10^7 cells/ml 程度の極めて限定的な単独生育をすることが見出された。この限定的生育を支える Y および T の活性を置き換える必須因子として、カリウム、リチウム、アンモニア等の一価カチオン、炭酸ガス、重炭酸塩、オキサロ酢酸等の炭酸固定反応に関与する基質、蛋白質のプロテアーゼ分解物等の生態系で普遍的な環境物質が同定された。

3. 自己生育阻害の解除による生育支持: 上記の因子を組み合わせた補給によって起こる生育が極めて限定的であるのに対して、*S. thermophilum* は支持菌との混合培養では 10^9 cells/ml を超えて生育する。そこで、*S. thermophilum* の単独培養を 100 倍量の新鮮培地に対して透析したところ同程度の高密度培養が達成されたことから、この菌が自己の代謝産物による生育阻害に極めて敏感であり、支持菌はそれを分解または取り込むことによって生育を助けていることが明らかになった。

4. 今後の展望: 我々は *S. thermophilum* の全ゲノム配列を決定済みなので、それを基盤として生育支持および自己阻害機構の網羅的解析を進める基礎は整った。一方ここで明らかになった事実—

(1) 通常の方法では観察できないような限定的生育、(2) 普遍的な環境物質が多数組み合わせられた生育要求性、および (3) 自己生育阻害の別の菌による解除—は、一般的な複合微生物系の解析に利用可能な示唆を含んでいるものと考えられる。

Role of growth promoting and inhibiting factors in microbial symbiosis

○ Teruhiko Beppu, Taira Kato, Tomoo Watsuji, Kenji Ueda
(LSRC, College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

Key words 微生物間共生

IS3-PM2 有機性廃棄物を分解する微生物集団の解析

○ 春田 伸, 中村 浩平, 石井 正治, 五十嵐 泰夫
(東大院農生科)

微生物機能の利用技術は、純粋培養した 1 種の微生物によるもの (抗生物質生産、アミノ酸発酵など) と多種微生物を集団として利用しているもの (醸造、堆肥化、メタン発酵など) に大別される。微生物集団の特徴として、多種多様な機能を総合的に発揮できること、さらに単一微生物では達成できない機能も期待できることなどが挙げられる。また我々は生ゴミ分解過程を解析する中で外来微生物の侵入を拒む現象を見出し、これも組織化された微生物集団の特徴のひとつと考えられる。このような微生物集団の制御法が確立できれば、微生物利用技術の適用範囲は広がりまた効率化も期待できる。

我々は高温でアルカリ性条件での生ゴミ分解に関わる微生物集団の解析を行ってきた。PCR-DGGE 解析の結果、安定に分解が進んでいる時期にはその菌叢はほとんど変化せず、再現的に同一のバンドが主要バンドとして検出された。その塩基配列は他の有機物処理システムからも検出されており、高温・アルカリ性条件での有機物分解過程に普遍的に存在する微生物であることが示唆された。しかし培養法での検出は困難で、寒天平板培養した数百コロニーの中からわずか 2 コロニー得られたのみであった。本菌について各種同定試験を行ったところ、*Bacillaceae* に属する新属新種であった (*Cerasibacillus quisquiliarum* strain BLx[†] として提唱)。BLx[†] 株の変遷をリアルタイム PCR 法で解析したところ、生ゴミ分解が活発化し pH 上昇が見られる時期に急激に増加していることが分かった。また FISH 法で定量を行うと、全細菌の約 40% を占めることが明らかとなった。単離した BLx[†] 株の性質を純粋培養系で調べると、その増殖最適 pH や温度はそれぞれ pH8-9、50℃ であり生ゴミ処理過程と良く一致していた。しかし BLx[†] 株が利用できる炭水化物はごく限られており、セルロース、脂質、デンプンといった高分子基質の分解性も見出されなかった。ただしその培養上清からゼラチナーゼ活性が確認された。生ゴミ処理過程のゼラチナーゼ活性を測定すると、やはり BLx[†] 株の増加とほぼ同時期に上昇しており、さらに処理過程で発現しているゼラチナーゼと BLx[†] 株の産出するゼラチナーゼは N 末端アミノ酸配列レベルで一致していた。優占化している微生物 BLx[†] 株は微生物集団内においてもゼラチナーゼを産生しており、生ゴミ分解過程においてタンパク質分解に関与していると考えられる。それでは他の残りの微生物にはどのような種が存在するのだろうか。DGGE 解析では BLx[†] 株以外のバンドは確認されていない。そこで 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを解析したところ、BLx[†] 株が大多数を占めるが (300 clone 中、193 clone)、その他に uncultured compost bacterium, *Bacillus* sp., *Gracilibacillus halotolerans*, *B. permians*, *B. themroclaoae*, *Amphibacillus* sp. などが検出された。また高分子基質 (タンパク質、セルロース、脂質、デンプン) の分解を指標にスクリーニングを行った結果、クローン解析で検出されていない *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Chryseobacterium* sp., *Acinetobacter* sp. などが単離された。このように DGGE 法では検出されない少数ポピュレーションの微生物叢は非常に多様であった。生ゴミ分解や他菌の侵入排除といった集団としての機能には、これら少数微生物の寄与も重要であると考えられる。微生物集団を理解・制御するためには、少数ポピュレーションを含めた集団全体の多様性、変遷およびその機能解析が必要であり、今後の課題である。

Studies on microbial community degrading organic wastes

○ Shin Haruta, Kohei Nakamura, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi
(Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo)

Key words microbial community, molecular ecology, organic solid waste, kitchen refuse