

シンビオバクテリウムのゲノム解析による微生物間共生を支える分子基盤の解明

●上田賢志

日本大学生物資源科学部応用生物科学科

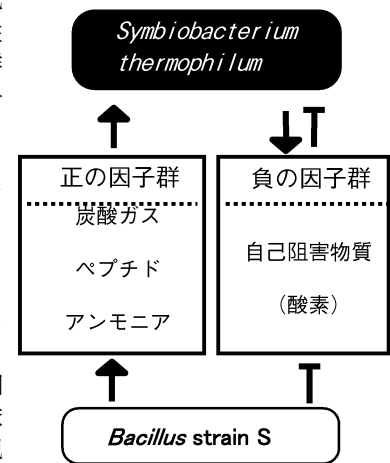
〈研究の目的と進め方〉

共生は生物の自然界における生存戦略の一つの基本形態である。それは微生物の世界においても同様であり、具体的事例に関する生態学的要素を含めた重要な分子生物学的知見が得られつつある。その典型的な例としては、マメ科植物と根粒菌、アリマキと細胞内共生細菌の間における共生関係等があげられ、いずれも代表的な細菌株の全ゲノム解読が完了している。これらは目に見える宿主との間の関係に基づくもので、分子的相互作用の実験的判定が比較的明瞭な研究対象として今後も知見の蓄積が期待できる。それに対して、環境中に分散している微生物細胞どうしの共生関係は、その普遍性が推測される一方、実験的制約のために研究が立ち後れている現状にある。例えば、増殖を別の菌に強く依存するような菌は本質的に寒天平板培地上で独立したコロニーとして得ることができないなど、菌の純粋分離と培養に基礎をおく微生物学の実験手法そのものの限界にあるといえる。

こうした状況において、かつて我々が発見した好熱性共生細菌 *Symbiobacterium thermophilum* とその増殖を支持する好熱性 *Bacillus* S 株 (BS) からなる共生系 (J Gen Microbiol 134:2353, 1988) は、微生物学的に明確に定義された構成員から成り、かつ実験室での培養操作において再構成可能な、極めて稀な単純化されたシステムである。本研究は、この共生系をモデルにしてこれまでに我々が集積した二つの方向からの知見をもとに、微生物間共生系を支える相互作用の本質を分子レベルで解明しようとするものである。すなわち、①本研究を通じて我々が行った詳細な培養条件に関する検討によって、*S. thermophilum* は炭酸ガスとペプチド性物質を含む複数の低分子性因子を要求し、それら全てが揃うことが正常な増殖に必須であること、さらに、*S. thermophilum* は自己の増殖に阻害的な因子を生産し、それを除去することもこの菌の増殖を支える重要な要因となっていることがわかりつつある。②本研究によって *S. thermophilum* の全ゲノム配列の解読が完了し、*S. thermophilum* の遺伝発現情報の解析等を通じてその共生依存性の分子基盤を解明する基盤が整備された。これにより、カルボニックアンヒドラーゼの欠損が *S. thermophilum* の炭酸ガス依存性の原因となっているという革新的発見がなされるに至った。本研究は、こうした背景にもとづいて、特にゲノム情報を基礎として *S. thermophilum* の環境依存的増殖特性を詳細に理解することを目的として行った。特に、*S. thermophilum* において得られた知見を大腸菌や枯草菌などの遺伝的取り扱いのモデルを用いて再現する試みを積極的に行い、ゲノム情報を積極的に活用した共生的相互作用解析を推進した。

本研究は、これまでに殆ど明らかになっていない微生物どうしの共生関係に関する先駆的な基礎知見をあたえることと同時に、いわゆる難培養とされる微生物群の生理に関する遺伝的背景を具体的に明らかにするものである。これまでの微生物学にとって未知の領域を、具体的な事例の特にゲノム解読とその情報に基づいてその新規

な諸性質を明らかにすることができる点で、他に例がない研究であるといえる。特に、我々が環境依存性 (下図) と呼んでいる、複数のしかも正と負両面における要因を総体的に要求するという本菌の特質は、単に一微生物の増殖特性を解明するにとどまらず、環境中における難培養性と呼ばれる微生物群の生理ならびに複合微生物群集における微生物間相互作用を理解する上で重要な鍵を提供するであろう。生物ゲノムはその生物を取り巻く様々な環境に適応して進化したものであり、従ってその詳細な理解には、環境依存性が実験的に再現できるモデル生物を対象とした取り組みが極めて高く貢献していくものと考えられる。



〈研究開始時の研究計画〉

2001年の研究申請における研究計画は以下の通りであった。

S. thermophilum のゲノムシーケンスの準備と具体的なシーケンス作業を開始する。方法はランダム法のプラスミドプロトコールを用いることを予定する。まずこの菌の純粋菌体を前述の大容量透析培養槽を用いて回収し、そこから通常のリゾチーム法などを用いてゲノムDNAを高効率で抽出する方法を確立する。これによって得た *S. thermophilum* 全ゲノムDNAを、次にいくつかの制限酵素ならびに物理的切断法により無作為に断片化し、大腸菌ベクターを用いてクローン化する。得られた形質転換体を各々培養し自動プラスミド抽出機を用いてプラスミドを抽出・精製し、シーケンスの反応に供する。分析はマルチキャピラリーシーケンサーを用いる。申請経費の消耗品費は主としてこのシーケンス用キットの購入費に充当する。取得した配列データは UW phred/phrap/consed プログラムによるアセンブリーによって連結し、蛋白および機能性 RNA コード領域の推定と BLAS. *thermophilum* プログラムによる相同性検索を行う。*S. thermophilum* の DNA は比較的高い G+C 含量 (67%) を示すことを利用し、蛋白コード領域の推定は FRAME-analysis を用いる

次年度には、引き続き *S. thermophilum* のゲノムシーケンス作業を行う。不連続領域については前後の配列をもとにプライマーを合成し、ウォーキング法により決定する。また、解読した配列中に DraI などのパルスフィ

ールド泳動パターンですすでに切断数の判明している希少制限酵素部位を検索し、それを含む DNA 断片をリンキング-プローブに用いたサザンハイブリダイゼーションをパルスフィールドによって分離したゲノム DNA 断片に対して行い、得られた結果をもとに染色体物理地図を完成させる。プライマーウォーキング法で解読の困難な不連続領域が生じた場合はこの地図をもとにしてその領域の特定とクローン化・配列決定を行う。

上記と平行して、引き続きコード領域の同定と蛋白質の機能をホモロジーサーチにより推定し、全ゲノム構造とそこにコードされる全ての遺伝情報の収集を目指す。特に代謝酵素などの構成を、すでにゲノムが明らかになっている種々の細菌のそれと比較することでこの菌の代謝面の性質を遺伝子の配列情報から把握する。特定の代謝系の欠損が認められた場合は、生育支持活性を有する細菌の当該代謝に関与する酵素などを取得し、それが *S. thermophilum* の生育に及ぼす影響を検討する。さらに、生育支持菌の当該代謝能欠損株を分離し、その生育支持活性を調べることでその代謝系と *S. thermophilum* の生育支持機構との関連を調べる。また、二次元電気泳動装置によって種々の条件下で培養した *S. thermophilum* の菌体蛋白質を分離・比較する実験を並行して行い、菌の増殖に深く関わると予想される蛋白スポットのアミノ酸配列を分析する。これから得られる結果とゲノムデータとをリンクさせることで、当該蛋白質の全一次構造を速やかに決定し、本菌の共生に依存する増殖の分子機構を明らかにしていく。

上記の基礎微生物学上の研究展開と同時に、産業上の応用が見込まれる酵素蛋白などの配列の探索にも取り組み、それらをコードする領域の塩基配列が決定し次第、大腸菌などの宿主発現系を用いて精製標品を取得し、その活性の特に熱安定性を中心とした評価を行うことで利用性を追求する研究も併せて行う。

〈研究期間の成果〉

まず、*S. thermophilum* のゲノム解読に供する染色体 DNA の大量回収ならびにポストゲノム解析に必要な転写産物や蛋白質の大量回収を主な目的として、この菌を大量に培養するための発酵槽の設計・製作を行った。外槽と内槽からなるこの発酵槽は、内槽の底に装着した透析膜を介して低分子物質の交換を行うことで *S. thermophilum* を *Bacillus* S 株から独立して培養することを可能にした (成果リスト中の論文 1)。

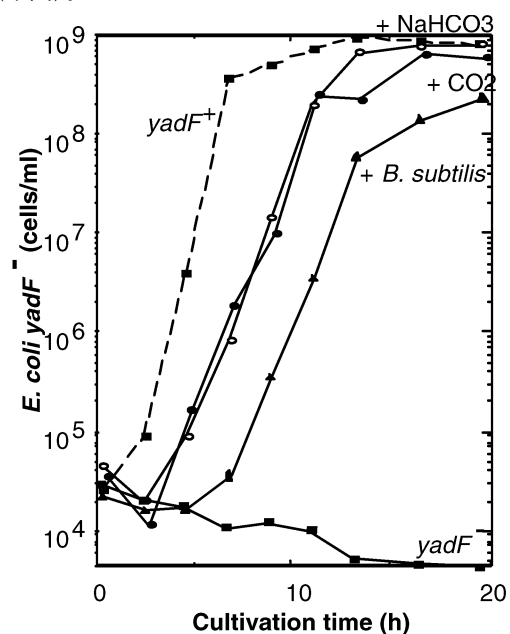
上記で得られたゲノム DNA をもとに、*S. thermophilum* の全ゲノム配列 (3.57 Mb, 68.7%G+C) の解読を行い、データベース構築を含め完了した (論文 3)。一次代謝に関連する遺伝子の殆どが同定され、アリマキ細胞内共生細菌のゲノムに知られる様な特定代謝系の大幅な脱落は認められなかった。このことは、*S. thermophilum* が特定の栄養を要求しているのではなく、複数の環境条件が整うことを必要としているというそれまでの観察と一致した。また、高 G+C 含量生物において初めての内生孢子形成遺伝子群の存在や、原核生物に事例の少ない Group II intron が 25 箇所に見つかるなど、細胞生物学的ならびに遺伝学的に全く新しい知見を得た。

ゲノム解読に関連して、この菌のトリプトファナーゼオペロンには、大腸菌などのそれとは異なり、真核生物型の膜輸送蛋白 TnaT がコードされていることが判明した。TnaT は GABA トランスポーターに代表される Na/Cl 依存型の輸送蛋白であり、原核生物には殆ど分布が知られていなかった。そこで、大腸菌を用いて発現させた組

み替え TnaT 蛋白を用いて、この蛋白質がトリプトファンを輸送する活性があることを生化学的に明らかにした (論文 2)。

ゲノム解読と並行して *S. thermophilum* の生理に関する研究も鋭意進め、本菌の増殖を支持する具体的な生化学的要因 (ペプチド/K⁺イオン/炭酸ガス) を明らかにした。逆に、高倍率の透析培養によって *S. thermophilum* が顕著な単独増殖を示すことを発見し、この菌が自己増殖に阻害的な代謝産物を生成し、それを除去することもこの菌の増殖に重要であることを明確にした。以上から、正負両面における要因が *S. thermophilum* の増殖に関与することが明らかになり、それら要因が *S. thermophilum* の生理に及ぼす影響を遺伝的に検証する基礎が整った。

上記 2 方向からのアプローチにより、一つの重要な知見が得られた。すなわち、*S. thermophilum* の要求因子で最も決定的な因子は炭酸ガスであり、それが *S. thermophilum* ゲノムのカルボニックアンヒドラーゼ (CA) の欠損に帰因することの発見である。CA は炭酸ガスと重炭酸の変換を触媒する普遍酵素であり、大気中の炭酸ガスから重炭酸を獲得し、重炭酸依存性の代謝酵素群に供給する働きを持つと推測されている。我々は、CA の欠損により *S. thermophilum* に見られる共生依存が起こることを、*E. coli* の CA 遺伝子 (*yadF*) 欠損株を用いた再構成実験により実証した。*E. coli yadF* 変異株は通常大気下では増殖せず、炭酸ガスの通気により増殖することが知られるが、枯草菌との共培養によっても増殖を開始した (下図)。



この事実は、高濃度の炭酸ガスが外部から獲得できる共生的環境においては CA は必須ではないこと、逆に CA の欠損が共生依存の一つの原因になることを示しており、微生物の難培養性の問題に重要なヒントを与えるものと考えられた。すなわち、CA を持たない菌は、共生環境など比較的炭酸ガス濃度が高い場所であればそれと自然平衡にある重炭酸を利用することで増殖でき、従って自然界に普遍的に存在できると推測される (次ページ図)。しかし、それらの菌は通常大気下の実験室で純粋分離できず、培養できないものと考えられる。

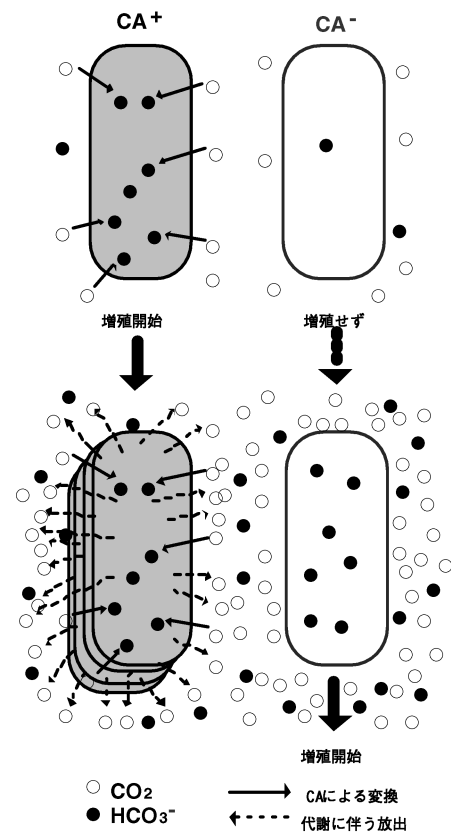
我々はさらに、*S. thermophilum* と類縁菌の環境分布に関する探索研究も展開し、この菌群が土壌や家畜糞便などを中心とした陸性環境中と同時に、海洋環境において

も高い頻度で存在しているという実験的証拠を得た。それらの16S rDNA配列に基づく多様性は、このグループならびに近縁の細菌が多様かつ普遍的に存在することを示しており、上記のような理由により培養できないために見過ごされていることを実証するものであった。これらに関する知見は今後、微生物の環境動態ならびに遺伝進化に関する新しい材料となる可能性がある。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究は、難培養とされる微生物群の生理に関する遺伝的背景を具体的に明らかにするとともに、ゲノム解読を通じて初めて明らかになった微生物学的に新規な諸性質を明らかにした。難培養微生物のゲノム解読は、いわゆるメタゲノムとして直接環境試料から抽出したDNAをもとに再構成する手段で解読する取り組みが知られているが、それらは生物の実体を伴わないために生理面における情報は一切得られない。それに対し、我々が取り扱う *S. thermophilum* は培養できてその実体が明らかである

ことに大きな特色があり、そうした実例に対するゲノム解析は国内外を通じて他に例がない。ゲノム配列から得られる個別の有用な情報に加え、我々が環境依存性と呼んでいる、複数のしかも正と負両面における要因を総体的に要求するという本菌の特質は、今後いわゆる複合微生物群集における異種微生物間相互作用のシステム生物学を開拓していく上で、



重要な鍵を提供すると期待される。また、環境中における難培養性と呼ばれる微生物群の生理に関しても重要な基礎情報を与えたと言える。生物ゲノムはその生物を取り巻く様々な環境に適応してさまざまに進化したものである。その詳細な理解には、本研究に見られるような、環境依存性が実験的に再現できるモデル生物を対象とした取り組みも高く貢献すると考える。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

トランスクリプトームおよびプロテオームの手法により、この菌の共生に伴う遺伝子発現の変動を追跡する研究を推進することを予定していたが、明確な結果を得るには至らなかった。これは主にこの菌の細胞を十分量得ることができないことと適切な分析の設定することに予想以上に時間を要したことに帰因する。また、正の増殖因子の一つとしてこの菌が要求することが示唆さ

れているペプチド性の物質について、その具体的な構造を明らかにすることができなかった。これは、当該物質の増殖支持活性が低いことと、分画により活性が分散してしまう現象のため追跡が困難であったことに原因がある。また同様に、カリウムイオンに正の増殖因子としての活性が認められたが、それが *Bacillus* によって実際に供給されているどの物質の代替活性であるのかを同定することができなかった。負の因子についても、研究期間内にその構造を明らかにすることはできなかったが、現在ではほぼ解明に近い状態にある（次項）。

〈今後の課題〉

上記の2種の正の増殖因子について、その本体を明らかにする。ペプチド・カリウムイオン共に、その活性は *Bacillus* によって実際に供給されている何らかの物質の活性を代替していると推測される。それらを明らかにすることで、炭酸ガスに加えて *S. thermophilum* が必要とする正の因子群の全体像が明らかになる。一方、負の因子については、単離精製と構造解析にごく最近成功し、化合物を同定した。今後、その生理活性や作用に関する生化学的研究を推進することで、微生物の増殖を決定している負の要因とそのメカニズムに関する全く新しい知見を得ることができると考える。また、プロテオーム解析の条件検討が終了したことから、それを利用してこの菌の種々の増殖相における全蛋白質の発現変動とそれらのもつ生理的意義と役割に関する研究を改めて推し進める。

S. thermophilum の炭酸ガス依存性に関して得られた知見と新しい概念は、微生物の難培養性に炭酸ガス依存性があることを想起させるものであった。そこで、炭酸ガスを通気する条件により改めて微生物の分離培養を行い、炭酸ガス通気により初めて増殖する菌を探索する。現在既に炭酸ガス依存性の細菌の分離に成功しており、その分類学的解析によって多様性の評価を行っている。今後さらに探索を推進し、新しい微生物の培養法に関する技術開発を行う。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文/プロシーディング
 1. 0602031315
Ueda, K., Saka, H., Ishikawa, Y., Kato, T., Takeshita, Y., Shiratori, H., Ohno, M., Hosono, K., Wada, M., Ishikawa, Y., Beppu, T., Development of a membrane dialysis bioreactor and its application to a large-scale culture of a symbiotic bacterium, *Symbiobacterium thermophilum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60(3):300-5 (2002).
 2. 0403261334
Androutsellis-Theotokis, A., Goldberg, N. R., Ueda, K., Beppu, T., Beckman, M., L., Das, S., Javitch, J. A., Rudnick, G., Characterization of a functional bacterial homologue of sodium-dependent neurotransmitter transporters, *J. Biol. Chem.*, 278(15):12703-9 (2003).
 3. 0602031327
Ueda, K., Yamashita, A., Ishikawa, J., Shimada, M., Watsuji, T.-O., Morimura, K., Ikeda, H., Hattori, M., Beppu, T., Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism, *Nucleic Acids Res.*, 32(16):4937-44 (2004).
 4. Watsuji, T., Kato, T., Ueda, K., and Beppu, T., CO2 supply induces the growth of *Symbiobacterium*

thermophilum, a syntrophic bacterium, Biosci, Biotechnol, Biochem., in press

2) データベース/ソフトウェア

1. 0602031333

Symbiobacterium thermophilum Genome Project Home
<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~projects/genome/S.thermophilumH/>

3) 特許など なし

4) その他顕著なもの

1. 0602041320

難培養微生物～いかにその遺伝情報にせまるか, ゲノミクス・プロテオミクスの新展開, pp. 283-292, エヌティールエス

2. 0602041324

難培養微生物の具体例、共生細菌Symbiobacterium thermophilum, 難培養微生物研究の最新技術, pp. 10-19, シーエムシー出版

3. 0602041328

難培養微生物ゲノムへの挑戦・共生細菌Symbiobacterium thermophilum, 蛋白質核酸酵素, 50(11), 1473-7 (2005).