

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007 ~ 2008  
 課題番号： 19780055  
 研究課題名 (和文) 高濃度二酸化炭素存在環境における微生物生態

研究課題名 (英文) Screening for high CO<sub>2</sub> requiring bacteria

## 研究代表者

橋本 昌征 (Hashimoto Masayuki)

信州大学・信州大学 ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点 助教

研究者番号：80402139

研究成果の概要： 細菌の培養をする際には一般的に酸素濃度を調整するが、CO<sub>2</sub> 濃度に着目した研究はこれまであまりなされていない。近年、CO<sub>2</sub> を要求する細菌の存在が知られ始め、本研究でも環境中から CO<sub>2</sub> 要求性細菌の単離に成功した。大腸菌の炭酸脱水酵素欠損株が CO<sub>2</sub> 要求性を示すことから、おろらく高濃度 CO<sub>2</sub> 存在環境から単離された CO<sub>2</sub> 要求性細菌も炭酸脱水酵素を持たないがために低濃度 CO<sub>2</sub> 環境では増殖できないことが予想される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	180,000	3,180,000

研究分野：環境微生物

科研費の分科・細目：農学・農芸化学・応用微生物

キーワード：環境微生物，微生物生態，難培養細菌，二酸化炭素

## 1. 研究開始当初の背景

環境中に存在する微生物のほとんどが培養できないことが知られており、近年、培養を経ない微生物生態学研究が注目を集めている。しかし、その様な微生物が培養可能になることによる恩恵は計り知れず、様々な新しい培養法の検討もまた盛んに行われている。我々は、以前に大腸菌の YadF (炭酸脱水酵素) が細胞増殖に必須であることを報告した<sup>1)</sup>。YadF は細胞内で生じ

た二酸化炭素を炭酸に変換し、脂肪酸合成経路に供給していると考えられる。とはいえ、YadF は大気下 (二酸化炭素濃度 0.03%) での培養時には必須であったが、高濃度の二酸化炭素 (5%) 存在下においては必須ではなかった。このことから、炭酸脱水酵素は低濃度の二酸化炭素環境下で増殖する際の炭酸濃縮装置であると考えられる。さらに、*Bacillus* 属細菌と共生している *Symbiobacterium thermophilum* が、炭酸脱水酵素を持たないがために *Bacillus* 属細

菌から炭酸の供給を受けていることが報告されている<sup>2,3)</sup>。

## 2. 研究の目的

土壌中や海水中の二酸化炭素（炭酸）濃度は大気中と比べると遥かに高く、地中 1m ほどの深さでも 10% 近くにまで上るところもある。こういった環境下に生存している細菌では炭酸脱水酵素が増殖に必須にならないことから、炭酸脱水酵素遺伝子を持たない細菌が存在することが予想できる。その様な細菌は二酸化炭素を高濃度に要求するため、大気下における一般的な好気性細菌の培養条件では増殖することができず、これまでは難培養性細菌として扱われてきた可能性が高い。なお、ここでいう二酸化炭素要求性細菌とは従属栄養性にも関わらず、二酸化炭素を要求するものを指す。そこで、高濃度の二酸化炭素存在環境から二酸化炭素要求性細菌を探索し、さらに、その様な環境下における微生物の生態を明らかにしたいと考えて実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養条件

本研究では環境中の細菌を大気条件下と高濃度 CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、高濃度 CO<sub>2</sub> 条件下でのみ増殖する細菌の単離を試みる。そこで、大気条件下での培養には通常の好気培養で用いるインキュベーターを用い、高濃度 CO<sub>2</sub> 条件下での培養には CO<sub>2</sub> インキュベーターを用いて 10% の CO<sub>2</sub> を供給しながら培養を行った。なお、全ての培養は 30°C で行った。培地は細菌の培養や保存によく用いられる Antibiotic Medium 3 (P 培地)、Nutrient 培地 (N 培地)、YG 培地を基本とし、ただし栄養を豊富に含む培地を用いると、増殖の速い細菌によって他の細菌の増殖が妨げられる可能性が考えられるため、より多くの細菌を単離するために各培地を通常用いられる 1/10 の濃度で使用した。また CO<sub>2</sub> インキュベーターを用いて微生物を培養する際の大きな問題として培地への CO<sub>2</sub> の溶込みによる pH の変動があげられる。そこで、大気条件下で培養する際には 10 mM MOPS-NaOH (pH7.5) を、10%CO<sub>2</sub> 条件下で培養する際には 10 mM MOPS-NaOH (pH7.0) を培地に添加した。

### (2) CO<sub>2</sub> 要求性細菌の探索

サンプルを適宜希釈し、上述の培地にプレーティングし、まず 10%CO<sub>2</sub> 条件下での培養を行った。培養期間中、出現したコロニーを 2 枚の同じ寒天培地に線画し、1 枚

を大気条件下で 1 枚を CO<sub>2</sub>10% 条件下で培養した。この 2 枚のプレートに生育したコロニーを比較し、CO<sub>2</sub> インキュベーターでは生育するが、Air インキュベーターでは生育しない、若しくは CO<sub>2</sub> インキュベーターに比べて著しく生育が悪い形質を示す菌を選抜した。選抜した菌株で同様の線画培養をさらに 2 回繰り返す、一貫して CO<sub>2</sub> インキュベーターでのみ良好に増殖するものを CO<sub>2</sub> 要求性細菌(HCR)とした。

### (3) 菌の同定

CO<sub>2</sub> インキュベーターにて増殖したコロニーを鋳型とし、細菌 16SrDNA 用のユニバーサルプライマー 16S-27Fw (agagtttgatcctggctag) と 16S-1525Rv (aaaggagtgatccagcc) を用いて PCR 反応によって 16SrDNA を増幅後、その DNA 配列を決定し、NCBI non-redundant nucleotide データベースに対する BLAST 検索によって菌種を推定した。

## 4. 研究成果

### (1) 培地の pH 調整

本実験において、CO<sub>2</sub> インキュベーターを用いて微生物を培養する際の大きな問題として培地への CO<sub>2</sub> の溶込みによる pH の変動が予想された。実際、緩衝液を加えずに調製した培地を大気条件下と 10%CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベートした場合、いずれの培地においても大気条件下では 4 日後に pH7.2 付近に、10%CO<sub>2</sub> 条件下では 4 日後に pH6.5 付近に収束した (図 1A)。一方、大気条件下で培養する際には 10 mM MOPS-NaOH (pH7.5) を、10%CO<sub>2</sub> 条件下で培養する際には 10 mM MOPS-NaOH (pH7.0) を培地に添加した場合、1 日以上インキュベートした培地ではいずれも pH7.2 付近となったことから、培地にはこれらの緩衝液を加え、1 日プレインキュベートしたものを使用することとした (図 1B)。

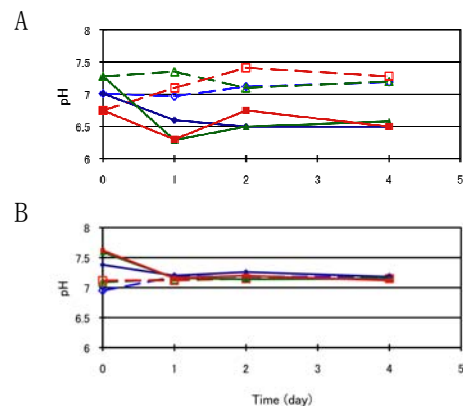


図 1 : ダイヤは P(1/10) 培地、三角は N(1/10) 培地、四角は YG(1/10) 培地。点線は大気条件下

で、実線は 10%CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベートした。A は緩衝液無添加、B は大気条件下の場合は 10 mM MOPS-NaOH (pH7.5) を、10%CO<sub>2</sub> 条件下の場合は 10 mM MOPS-NaOH (pH7.0) を添加した。

## (2) CO<sub>2</sub> 要求性細菌の探索と同定

本研究では生育に高濃度の CO<sub>2</sub> を要求する細菌を探索するため、CO<sub>2</sub> 濃度が高い場所、また生物活性が高いと思われる場所からの微生物スクリーニングを試みた。土壌中は十分な生物活性があると考えられる上、地中は空気の流れが少ないため CO<sub>2</sub> が溜まりやすい。また植物が多く生育している場所の方が CO<sub>2</sub> の発生が多いと考えられる事から、まず植物の生えている土壌環境からのサンプリングを試みた。また人為的な環境で生物活性が高いと思われる場所として、排水槽、コンポスト、下水処理場からのサンプリングを試みた。さらに水系環境には好気的な環境とは異なった細菌フローラが存在すると考えられる事から、水田や湖底からのサンプリングも試みた。その結果、3 株の CO<sub>2</sub> 要求性細菌 (HCR) を単離することに成功した。

①HCR-1。信州大学上田キャンパス内の雑木林の地中 1m から P(1/10) 培地を用いて単離された (図 2, HCR-1)。サンプリング地点の CO<sub>2</sub> 濃度は 2% と大気条件よりも高かった。本菌の 16SrDNA の塩基配列は放線菌である *Nocardioides* 属の 16SrDNA に対して広い相同性を示したものの、最も相同性の高かった *Nocardioides* sp. JS884 の 16SrDNA 配列に対しても 97% の相同性しか示さなかったことから、*Nocardioides* 属に属する新種の細菌である可能性が高い。

②HCR-2。信州大学上田キャンパス内の雑木林 (HCR-1 とは異なる地点) の地中 1m から P(1/10) 培地を用いて単離された (図 2, HCR-2)。サンプリング地点の CO<sub>2</sub> 濃度は 5.8% と大気条件よりもかなり高かった。本菌の 16SrDNA の塩基配列は β プロテオバクテリアに属する *Pelomonas saccharophila* の 16SrDNA 配列に対して 99% 以上の高い相同性を示したことから、これと同一種の細菌だと考えられる。

③HCR-3。上田市下水処理場の爆気槽から YG(1/10) 培地を用いて単離された (図 2, HCR-3)。爆気槽では大気がバブリングされているが、汚水に溶込んでいる CO<sub>2</sub> 濃度は未測定である。本菌の 16SrDNA の塩基配列は *Lactococcus raffinolactis* の 16SrDNA に対して 99% 以上の高い相同性を示したことから、これと同一種の細菌であると考えられる。

上記の HCR-1, HCR-2, HCR-3 は 3 回の CO<sub>2</sub> 要求性選抜において一貫して CO<sub>2</sub> 要求性を示し、さらに CO<sub>2</sub> 要求性選抜を繰り返しても安定して CO<sub>2</sub> 要求性を示した。HCR-3 が単

離された爆気槽の CO<sub>2</sub> 濃度は分からないものの、HCR-1 と HCR-2 はいずれも大気よりも高い CO<sub>2</sub> 濃度環境から単離されたことから、その様な環境には周囲の CO<sub>2</sub> に依存した細菌が存在していることが明らかになった。

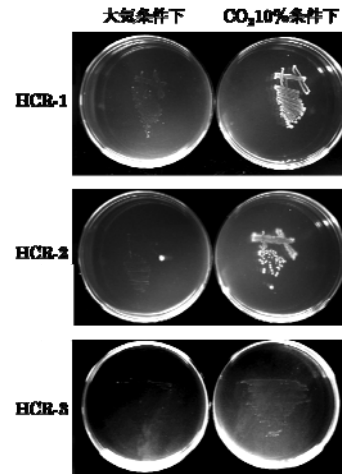


図 2 : HCR-1, HCR-2, HCR-3 を大気条件下と 10% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した際の寒天培地。

④HCR 以外の CO<sub>2</sub> 要求性細菌。上記 3 菌株は CO<sub>2</sub> 要求性選抜を繰り返しても安定して CO<sub>2</sub> 要求性を示し続けた。しかし探索の際に、初めは CO<sub>2</sub> 要求性を示したものの選抜を繰り返すうちに CO<sub>2</sub> 要求性を失ってしまう菌株がかなり多く観られた。その理由は定かではない。例えば、線画培養を繰り返すうちに共存している細菌の影響が変化することが考えられる。また環境中から採取した細菌の中には、富栄養培地への播種やインキュベーターによる培養等の人為的な操作によって、生育具合等に予期せぬ影響を受けやすい細菌も多いのではないかと考えられる。さらに、環境中に多数存在すると言われている、生きてはいるが培養できない菌 (VBNC ; Viable but nonculturable) が、高濃度の CO<sub>2</sub> によって VBNC 状態から復帰する事も考えられる。真核生物に感染するような細菌が、環境中では VBNC として存在するが、真核生物の体内に入ると培養可能となる事例がいくつか知られている。これらの細菌が真核生物の体内に入った事を認識する因子として、CO<sub>2</sub> が関与する可能性も考えられる。これは今後の検討課題としたい。

## (3) 総合考察

細菌の培養をする際には一般的に酸素濃度を調整するが、CO<sub>2</sub> 濃度に着目した研究はこれまであまりなされていない。近年、CO<sub>2</sub> を要求する細菌の存在が知られ始め、本研究でも環境中から CO<sub>2</sub> 要求性細菌の単離に成功した。これらの細菌が CO<sub>2</sub> を要求する理由は明らかになってはいないが、大腸菌の炭酸脱水酵素欠損株が CO<sub>2</sub> 要求性を示す

ことから、高濃度 CO<sub>2</sub> 存在環境から単離された CO<sub>2</sub> 要求性細菌も炭酸脱水酵素を持たないがために低濃度 CO<sub>2</sub> 環境では増殖できないことが予想される。

16SrDNA の配列が HCR-1 のものと比較的似ている (相同性 96%) *Nocardioides* sp. JS614 ではゲノム配列が決定されている (未発表)。JS614 株のゲノム中には大腸菌の炭酸脱水酵素に対して約 25% と比較的低い相同性を持つ遺伝子が存在している。しかし、ゲノム解析が報告されている放線菌全般に保存している  $\beta$ -class 炭酸脱水酵素遺伝子は *Nocardioides* sp. JS614 のゲノム上には見出されず、本菌が炭酸脱水酵素を持たない可能性もある。一方、既知のいくつかの *Nocardioides* 属細菌はアルカリ環境から分離されており、その際に炭酸ナトリウムを用いてアルカリ側に pH を調整した培地が使用されている。つまり、培地中に炭酸イオンが多量に存在する状況となっていることから、そのようにして単離された菌株の中にも二酸化炭素を要求するものが含まれている可能性は高い。一方、HCR-3 の 16SrDNA は多くの未培養 *Lactococcus* 属細菌と高い相同性を示した。これらの *Lactococcus* 属細菌は低温貯蔵中のミルクから培養を経ずに検出されたもので、通常の乳酸菌培地からは検出されなかったことから、HCR-3 と同様に CO<sub>2</sub> 要求性である可能性が考えられる。

細菌が誕生した約 37 億年前の原始大気には CO<sub>2</sub> が 20% ほど含まれ酸素がほとんど存在しなかったことから、細菌は嫌気性生物として誕生したと言われている。その後、光合成生物の誕生に伴って大気中の酸素濃度が上昇したことで、嫌気性細菌が酸素への耐性を獲得し好気性へと進化してきた。しかし、大気中の酸素濃度の上昇に伴って CO<sub>2</sub> 濃度が低下したことを考えると、現在の大気下で増殖可能な細菌は酸素耐性に加えて低二酸化炭素濃度への耐性機構として炭酸脱水酵素を獲得してきたと推測できる。その裏付けとして、ゲノム配列が決定された大気下で培養可能な細菌からは、いずれも炭酸脱水酵素をコードすると予想される遺伝子が見いだされ、その分子系統樹からは、これらの炭酸脱水酵素が種分化に伴って進化したのではなく水平伝搬によって獲得されたものであることが示された (図 3)。

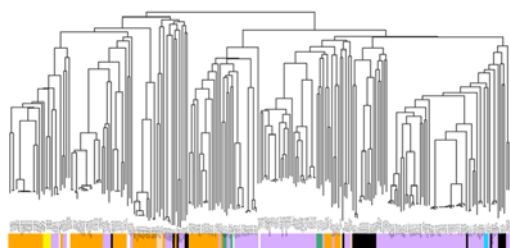


図 3 : 大腸菌の炭酸脱水酵素 YadF と相同性を持つタンパク質の進化系統樹。系統樹下部に示した色は、各生物の属するグループごとに色分けしてある。紫；グラム陰性、オレンジ；グラム陽性、黄；フラボバクテリア、緑；シアノバクテリア、シアン；スピロヘータ、黒；真核生物。

本研究で得た成果は、環境中から実際に高濃度 CO<sub>2</sub> 要求性細菌を単離できたという過程にあると考える。今回サンプリングした環境において、高濃度 CO<sub>2</sub> 要求性細菌はマイナーな存在であったと考えられるが、その存在自体を明らかにしたことにより、展望が大きく広がった。今後、高濃度 CO<sub>2</sub> 要求性細菌がより主要な存在として生息する環境を見つける事ができれば、新規微生物を探索する際の新しい培養法として本研究で用いた方法の価値が高まるうえ、難培養微生物へのアプローチに大いに役立つと考えられる。

1) Indispensability of the *Escherichia coli* carbonic anhydrases YadF and CynI in cell proliferation at a low CO<sub>2</sub> partial pressure. Hashimoto, M. and Kato, J. Biosci. Biotech. Biochem. 67: 919-922. (2003)

2) Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism. Ueda K, Yamashita A, Ishikawa J, Shimada M, Watsuji TO, Morimura K, Ikeda H, Hattori M, Beppu T. Nucleic Acids Res. 32: 4937-44. (2004)

3) CO<sub>2</sub> supply induces the growth of *Symbiobacterium thermophilum*, a syntrophic bacterium. Watsuji TO, Kato T, Ueda K, Beppu T. Biosci Biotechnol Biochem. 70: 753-6. (2006)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

橋本 昌征 「二酸化炭素要求性細菌の探索」日本微生物生態学会 第 24 回大会、2008 年 11 月、札幌

原田 宏之、林田信明、関口順一、橋本昌征 「高濃度 CO<sub>2</sub> 要求性細菌の探索」日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月、名古屋

原田宏之、林田信明、関口順一、橋本昌征  
「高濃度 CO<sub>2</sub> 要求性細菌の探索」日本分子  
生物学会 BMB2007、2007 年 12 月、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 昌征 (Hashimoto Masayuki)

信州大学・ファイバーナノテク国際若手  
研究者育成拠点・助教

研究者番号：80402139

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者