

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657068

研究課題名（和文） 南極地域由来新奇微生物の同定とその機能解析

研究課題名（英文） Studies on novel microorganisms isolated from Antarctica

研究代表者

福田 青郎（FUKUDA WAKAO）

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：30421283

研究成果の概要（和文）：

本研究は南極に住む微生物についてその新奇な性質を明らかにすること及び、新分類群の提案を目的とした。結果として新属または新種細菌として、*Rhodoligotrophos appendicifer*（突起をもった赤い貧栄養生物の意味）、*Lysobacter oligotrophicus*（貧栄養性の *Lysobacter* 属細菌）を提案した。また南極微生物の形態変化や生産色素に関して研究を進めた。

研究成果の概要（英文）：

Interesting microorganisms were isolated from the environmental samples from Antarctica. Based on physiological and phylogenetic analyses, a new genus and species with the name, *Rhodoligotrophos appendicifer* gen. nov., sp. nov., and a new species in the genus *Lysobacter* with the name, *L. oligotrophicus* were proposed. In addition, various characteristics of microorganisms from Antarctica were analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：微生物分類・南極微生物・新属・新種・貧栄養

## 1. 研究開始当初の背景

南極大陸は地球上で最も寒冷な地域である。さらに低温だけでなく貧栄養・高塩濃度・強力紫外線照射・乾燥といった多くの極限環境が存在する。また他地域に比べて微生物研究があまり進んでいないこともあり、南極地域の微生物研究には新規微生物の発見が期待される。第 46 次南極地域観測隊の手により、微生物研究があまり進んでいない南極大陸から、土壌、湖沼、岩など、合計 262 種類の試料が採取された。その中には、内部がカラフルな岩石など、ユニークなサンプルが含まれていた。この岩石中では、シアノバクテリアを含む様々な微生物による共生系を構築され、南極の厳しい気候に耐えている

事が予想された。

このような様々な南極環境サンプルを様々な培養条件（有機物濃度・有機物組成・NaCl 濃度・温度・pH・光の有無等を検討）で培養を行うことによって新奇微生物の単離が試みられた。その結果、様々な培養条件で 1,000 種類を超える微生物が生育した。そしてこれら微生物に対して 16S rRNA 配列に基づく系統分類を行った所、約 50 種類の微生物が相同性 97%以下であり、新科、新属、新種の可能性が高いと考えられた。さらにこれら新奇性の高いと考えられる微生物の内の数種類について、その形態、生理学的特徴、遺伝学的比較を行い、分類学的位置づけを明らかにした。その一つが前述のカラフルな岩石より単離された、細胞が枝豆状に連なった新属・新種の

連鎖菌 *Constrictibacter antarcticus* である。この他にも多数の触手状突起をもつ微生物 [120-1 株 (図 1) や 262-7 株 (図 2)], T 字 Y 字型に分裂する菌 (147-1 株)、プロテアーゼ等様々な分解酵素や暗褐色の色素を生産する細菌 [107-E2 株 (図 3)] 等、様々な珍奇な微生物が発見された。

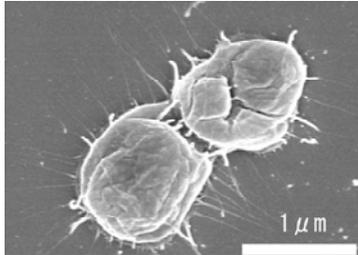


図 1. 突起をもつ微生物 120-1 株

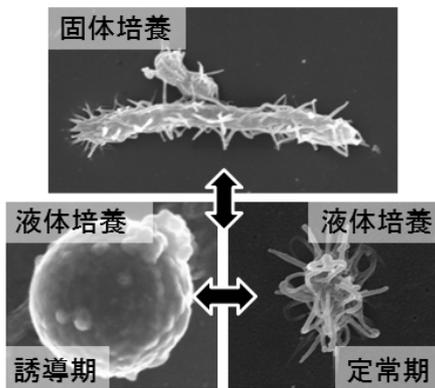


図 2. 多数の触手状突起をもち、かつ形態変化を示す微生物 262-7 株

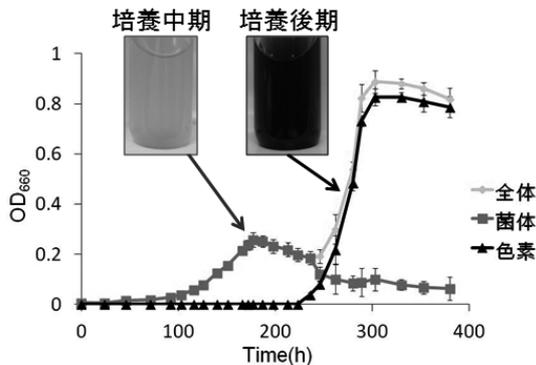


図 3. 107-E2 株の色素生産 (写真は培養液)

## 2. 研究の目的

先行研究により南極大陸より採取された試料より、様々な微生物が得られた。特に興味深い微生物として、多数の触手状突起をもつ微生物 (262-7 株、120-1 株) や、T 字 Y 字型に分裂する菌 (147-1 株)、プロテアーゼ等様々な分解酵素や暗褐色の色素を生産する細菌 (107-E2 株) 等、様々な珍奇な微生物が見つかった。本研究ではこのような奇妙な微生物の特性解析を行い、新分類群の提

案、及びこれら奇妙な特徴を示す理由を解明する。

本研究では新奇性の高いと考えられる南極由来微生物について、新分類群の提案、及び珍しい特徴を持つ微生物の特性解析を行う。本研究により、人類の微生物の広がりに対する理解がより一層深まると考えられる。また本研究は工業的に応用可能な新奇微生物の獲得できる可能性も高く、工学的な側面からも非常に意義のある研究である。

## 3. 研究の方法

### (1) 新分類群の提案

南極由来微生物に関して、生理学的解析 (生育至適・限界条件の決定、資化性試験、膜脂や極性基の質組成分析、抗生物質耐性試験等) や遺伝子配列の解析 (既知微生物との配列比較、系統樹作製、DNA-DNA ハイブリダイゼーション実験による近縁種との比較等)、解体観察 [電子顕微鏡 (SEM) による形態観察、原子間力顕微鏡 (AFM) による鞭毛の観察] を行った。これらの結果を、遺伝子配列から系統的に近いと予想される微生物と比較し、新属または新種の提案を行った。

### (2) 107-E2 株が生産する色素の解析

107-E2 株が生産する暗褐色の色素を HPLC により精製した。この色素がメラニンであることを分光学的手法 (UV-Vis・IR 測定) により解析した。また本色素を塩基で処理し HPLC 解析を行うことで、糖が附着し、本色素の可溶化に寄与していることを確認した。

### (3) 南極微生物のゲノム解析

多数の触手状突起を形成する 262-7 株について次世代シーケンサーにより、ゲノムのドラフト解析を行った。解読できなかった部分に関しては従来の DNA シーケンサーを用いて解読を進めた。さらにこれまでに解読されている 120-1 株のゲノム配列と併せて、各菌株がどのような代謝経路を持つか、推定を行った。これらの結果は、突起を生成するタンパク質の推定や新属・新種の提案のために行った解析の裏付けとして利用した。

### (4) 巨大分子 (ゲノム DNA) の観察

上述のような生物を対象とした研究に加え、120-1 株のゲノム DNA を用いて、巨大な DNA 分子の部分構造を、蛍光顕微鏡や AFM により観察した。この際スペルミジンによる DNA 凝集に着目して観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 120-1 株に関する研究成果

南極露岩地域・スカルプスネスにある淡水湖・長池由来サンプルより単離された、赤色コロニーを形成する、突起状の構造物を発生する微生物 (120-1 株) の生理学的・生化学的特性について詳細な解析を行った。その結果本菌の貧栄養性や、カロテノイド系色素を

生産すること等の特徴が明らかになった。これらの結果をまとめ、*Rhodobiaceae* 科の新属・新種細菌 *Rhodoligotrophos appendicifer* (突起をもった赤い貧栄養生物の意味) として学術雑誌に発表した論文<sup>②</sup>。

本菌は光独立の生育は示さないが、ゲノム解析では炭酸固定回路・カルビン回路や、バクテリオクロフィル a 生合成系等、光合成に必要な遺伝子のほとんどを有していた。

以上の成果に加えて本菌のゲノムを用いて、巨大 DNA の高次構造に関する研究も行った。この結果、巨大な DNA 鎖内では、小さな DNA の観察では見られない、相分離が生じやすい事がわかった論文<sup>③</sup>。

#### (2) 107-E2 株に関する研究成果

スカルスネス地域のたなご池由来サンプルより、低温環境下でプロテアーゼやリゾチーム等様々な分解酵素を生産する *Lysobacter* 属細菌 (107-E2 株) について、生理学的・生化学的特性について詳細な解析を行った。その結果本菌の貧栄養性や、塩ストレスに弱いこと、氷点下 (-5℃) で生育可能であること等の特徴が明らかになった。これらの結果に加えて DNA-DNA ハイブリダイゼーション実験の結果から既知の *Lysobacter* 属細菌とは異なることが明らかとなり、*Lysobacter* 属の新種細菌 *L. oligotrophicus* (貧栄養性の *Lysobacter* 属細菌) として学術雑誌に発表した論文<sup>①</sup>。

本菌は培養後期 (定常期) において可溶性の暗褐色色素を生産する。本菌の色素生産は、メラニン合成に関与する酵素 (チロシナーゼ) の阻害剤を加えることで、その生産が阻害された。また色素そのものに関する分光分析により、その色素がメラニンであることがわかった。さらに本色素はマンノース、グルコース、N-アセチルグルコサミンからなる糖鎖の結合により可溶化していることがわかった。また本色素には UV からの保護能があることや、*L. oligotrophicus* に UV を照射することで本色素の生産が促進することが確認された、これらの結果から、本色素は南極における強度な紫外線からの防御に役立っていると予想された。

#### (3) 262-7 株に関する研究成果

南極で採取された岩石より単離された、培養条件や生育段階依存的に形態が変化する細菌 262-7 株について、細胞膜脂質とその極性基の分析等、種々の解析を進めた。その結果、*Sphingomonadaceae* 科の新属・新種細菌として学術雑誌に投稿した。

次世代シーケンサーを用いて本菌ゲノムのドラフト解析を行なった。その結果ゲノム全長の解読にはいたらなかったが、糖新生系や TCA サイクル等の遺伝子に加え、バクテリオクロフィル a 生合成系遺伝子のほとんどがゲノム上に見出された。しかし RubisCO

等カルビン回路関連の遺伝子は見出されなかった。本菌が運動性を有していることや、ゲノム解析の結果から本菌は鞭毛を持つことが予想された。しかし SEM による形態観察では、鞭毛は確認されなかった。しかし AFM 観察により鞭毛を持つことが明らかとなった。以上のようなゲノム情報に加えて、解読できなかった部分についての解析も進めいくつかの遺伝子について、その存在が明らかになった。また 262-7 株の触手状突起は液体培養の時期が進むほど伸長する。そこで培養初期および培養後期の菌体膜画分について比較したところ、培養後期で増加するタンパク質の存在が示された。

#### (4) 147-1 株に関する研究成果

T 字や Y 字形の細胞構造をとる細菌 (147-1 株) について、AFM により SEM では見られなかった鞭毛の観察を行う等、微生物特性に関する研究を進めた (図 4)。

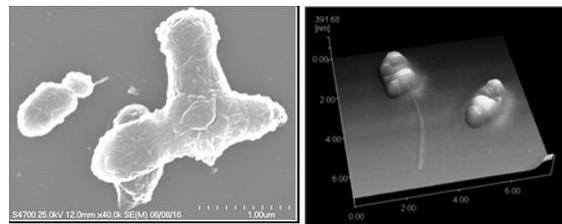


図 4. 147-1 株の顕微鏡観察

左 : SEM、右 : AFM

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 著書名 : W. Fukuda, T. Kimura, S. Araki, Y. Miyoshi, H. Atomi and T. Imanaka、論文標題 : *Lysobacter oligotrophicus* sp. nov., a bacterium isolated from a freshwater lake in Skarvsnes、雑誌名 : International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology、査読 : 有、In press、発行年 : 2013、PMID: 23475347
- ② 著書名 : W. Fukuda, K. Yamada, Y. Miyoshi, H. Okuno, H. Atomi and T. Imanaka、論文標題 : *Rhodoligotrophos appendicifer* gen. nov., sp. nov., an appendaged bacterium isolated from a freshwater Antarctic lake.、雑誌名 : International Journal of Systematic and

Evolutionary Microbiology、査読：有、発行年：2012、巻：62(Pt 8)、ページ：1945-1950、DOI: 10.1099/ijms.0.032953-0

- ③ 著書名：Y. Yosikawa, Y. Suzuki, K. Yamada, W. Fukuda, K. Yoshikawa, K. Takeyasu and T. Imanaka、論文標題：Critical behavior of megabase-size DNA toward the transition into a compact state、雑誌名：Journal of Chemical Physics、査読：有、巻：135/22、発行年：2011、ページ：225101/1-7、DOI: 10.1063/1.3666845

〔学会発表〕（計5件）

- ① 発表者名：木村知見、福田青郎、今中忠行、発表標題：南極湖由来細菌 *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2株が生産する水溶性色素の解析、学会名等：日本農芸化学会2013年度大会、発表年月日：2013年3月25日、発表場所：東北大学・川内北キャンパス（宮城県）
- ② 発表者名：福田青郎、木村知見、荒木成朗、三吉祐輝、跡見晴幸、今中忠行、発表標題：南極湖由来細菌 *Lysobacter oligotrophicus* 107-E2株の特性解析、学会名等：日本農芸化学会2013年度大会、発表年月日：2013年3月25日、発表場所：東北大学・川内北キャンパス（宮城県）
- ③ 発表者名：W. Fukuda, K. Yamada, T. Kimura, S. Araki, Y. Chino, Y. Miyoshi, Y. Kondo, H. Okuno, T. Kanai, H. Atomi and T. Imanaka、発表標題：Microorganisms isolated from Antarctica、学会名等：Extremophiles 2012、発表年月日：2012年9月13日、発表場所：Sevilla（Spain）
- ④ 発表者名：福田青郎、木村知見、荒木成朗、三吉祐輝、跡見晴幸、今中忠行、発表標題：南極由来微生物 *Lysobacter* sp. 107-E2株の解析、学会名等：環境バイオテクノロジー

学会2012年度大会、発表年月日：2012年6月26日、発表場所：京都大学・宇治キャンパス（京都府）

- ⑤ 発表者名：W. Fukuda, K. Yamada, Y. Miyoshi, H. Okuno, H. Atomi and T. Imanaka、発表標題：突起を持った南極由来の新属新種細菌 *Rhodoligotrophos appendicifer*、学会名等：日本農芸化学会2012年度大会、発表年月日：2012年3月24日、発表場所：京都女子大学（京都府）

〔図書〕（計1件）

- ① 著者名：福田青郎、今中忠行、出版社名：シーエムシー出版、書名：極限環境生物の産業展開（監修：今中忠行）、担当標題：南極における微生物の探索と応用、発行年：2012、担当ページ：288-293

〔その他〕

ホームページ等  
立命館大学 生命科学部 生物工学科環境バイオテクノロジー研究室ウェブサイト  
<http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/skbiot/imanaka/HPindex.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 青郎 (FUKUDA WAKAO)  
立命館大学・生命科学部・助教  
研究者番号：30421283