**様式 C-19**

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 28 日現在


**研究種目：基盤研究（A）**
**研究期間：2007 ～ 2009**
**課題番号：19205022**

**研究課題名（和文）南極地域由来新規微生物の探索と機能解析**

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


**研究代表者**
**今中　忠行（IMANAKA TADAYUKI）**
**立命館大学・生命科学部・教授**
**研究者番号：30029219**



研究成果の概要（和文）：

南極大陸は地球上で最も寒冷な地域であり､他地域に比べて微生物研究があまり進んでいない。ことため南極大陸から新規微生物の発見が期待される。本研究では、南極大陸より得られた試料より新規微生物の単離を目指した。この結果、1,000株を超える新規微生物の候補株を分離し、このうち特に新科、新属、新種の可能性が高い約50種類の微生物について、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。

研究成果の概要（英文）：

The studies on bacterial distributions in the Antarctic has been limited due to the extreme climate of the Antarctic. The purpose of this study is to find the phylogenetically novel bacteria from the samples collected in the Antarctic. In this study, more than 1,000 bacterial strains were isolated from the samples collected in Antarctica, and about 50 bacterial strains were considered as phylogenetically novel bacteria. The detailed analyses were performed to clarify the phylogenetic situation, physiological characteristics and morphological characteristics of these bacteria.


交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 2007 年度 | 20,700,000 | 6,210,000 | 26,910,000 |
| 2008 年度 | 15,000,000 | 4,500,000 | 19,500,000 |
| 2009 年度 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総　計 | 39,500,000 | 11,850,000 | 51,350,000 |


研究分野：生体関連化学
科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学
キーワード： (1)南極地域 (2)極限環境微生物 (3)微生物分離 (4)貧栄養性微生物 (5)好冷菌 (6)好塩菌 (7)ゲノム解析

## 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り、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により、南極大陸から新規微生物の発見が期待される。

## ２．研究の目的

本研究では、微生物研究があまり進んでいない南極大陸の土壌、湖沼、岩などから得られた262種類の試料より、新規微生物の単離を目指す。本研究は、新規微生物の発見を目的としているため、生命の広がりに関して知見を得るという学術的な意義に加え、工業的に応用可能な微生物を獲得できる可能性も高く、非常に意義のある研究である。

## ３．研究の方法

（1）南極大陸の土壌、湖沼、岩などから得られた 262 種類の試料から、様々な培養条件で培養を行うことにより、様々な微生物を分離した。微生物分離の培地として LB 培地・M9 培地・肉汁培地などを用いた。低温菌分離を行う場合は 4℃で培養し、好塩菌分離には、NaCl 濃度を１M～5M に調整した培地を使用した。また、貧栄養環境を再現するために培地中の有機物濃度を 10 倍から 1000 倍まで希釈した培地で培養を行い、pH もアルカリ性・酸性条件ともに検討を行った。

（2）得られた微生物の遺伝子を解読し、16S rRNA 配列に基づく系統分類を行うことで、微生物の新規性を確認した。一般に既知の微生物との相同性が 97%以下であれば新種に分類される可能性が高いと考えられる。

（3）新規ある可能性が高い微生物については、「より詳細な遺伝学的比較」､「詳細な電子顕微鏡観察」、「生育特性解析」、「ゲノム解析」を試みた。またこれらの実験を通して微生物の共生関係の検証を目指した。

## ４．研究成果

（1）本研究では、南極大陸の土壌、湖沼、岩などから得られた262種類の試料から、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り、微生物分離を試みた。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。

（2）次に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。今回の研究では約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。

（3）上述（2）の結果を受け、これら約 50 種類の微生物について、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。そのうち特に、新規性の高いと考えられる微生物（後述①-④）について詳細な解析を行った

①120-1 株は既知の微生物との 16S rRNA 配列相同性が 93%程度と極めて低い値を示した細菌である。120-1 株は直径 0.5～1.0μm 程度の球菌であり、SEM 観察を行ったところ菌体の周囲に突起状構造が観察された。進化系統樹からも新属新種であるだけでなく、新しい科を代表する微生物となる可能性が期待される。120-1 株は既知の微生物には見られないような有用物質生産能や代謝活性を示す可能性があるので全ゲノム塩基配列解析を行った。総塩基数 5,663,506bp、遺伝子数は 5,000-6,000 個程度と予想された。

②107-E-2 株は *Lysobacter* 属の微生物と近縁な微生物である。コロニーの色は黄色であるが、培養後期には黒色色素を分泌するという特徴がある。また SEM を用いた観察から長桿菌であることが分かった。この株はプロテアーゼ、アミラーゼ、エステラーゼ、リゾチームなど様々な分解酵素を生産しており、これらは *Lysobacter* 属の既知の微生物にも見られる特徴である。現在報告されている *Lysobacter* 属の微生物は全て 30℃で生育可能だが 107-E-2 株は 30℃では生育できず、この株は南極大陸から単離されていることからも低温で高活性を示す有用酵素の発見が期待される。

南極大陸より採取された岩石サンプル中から、シアノバクテリアや窒素固定菌を含む微生物群が発見された。これらは岩石中で互いに必要な物質を供給しあう「共生関係」にあると考えられた。またこれら微生物群の遺伝子解析より、特に新規性の高いと考えられる 262-7 株（③）及び 262－8 株（④）については、より詳細な電子顕微鏡（SEM）による形態観察、及び生育特性解析を行なった。

③16S rRNA の塩基配列に基づいて、262-7 株の系統解析を行なった。その結果、262-7 株は *Sandarakinorhabdus limnophila* と 95%の相同性を示し、*Sphingomonadaceae* 科の新属を代表する可能性があることが示唆された。

SEM による形態観察を行なったところ、262-7 株は固体培地上に存在する菌の多くが触手状の突起物をもつ球菌であったが、一部に突起物のある桿状形態の菌体も観察された。また、本菌は液体培地では誘導期に球菌であり、定常期にかけて徐々に突起物が形成されることがわかった。一方様々な濃度の LB 液体培地により菌を生育させたところ、低栄養の培地において生育が確認されたが、高栄養培地における生育は確認されなかった。この結果から 262-7 株は貧栄養微生物であることが確認された。
④16S rRNA の塩基配列に基づいて、262-8 株の系統解析を行なった。その結果 262-8 株は *Stella vacuolata* と 90%の相同性を示し、*Rhodospirillales* 目の新科を代表する可能性があることが示唆された。SEM による形態観察を行なったところ、262-8 株は細胞が枝豆状の連鎖菌であった。さらに原子間力顕微鏡により、本菌が鞭毛を有することが明らかになった。本菌も 262-7 株同様貧栄養微生物であり、生育温度範囲は 5～30°C（至適生育温度 25°C)、生育 pH 範囲は 6.0～8.0（至適 pH7.0)、生育塩濃度範囲は 0.10～2.0%（至適塩濃度 0.50%)であった。

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 9 件）
①著者名:Yokooji Y.、Tomita H.、Atomi H.、Imanaka T.、論文標題：Pantoate kinase and phosphopantothenate synthetase, two novel enzymes necessary for CoA biosynthesis in the Archaea、雑誌名：Journal of Biological Chemistry、査読：有、巻：284、発行年 2009、ページ：28137-28145

②著者名:Y. Shimada、W. Fukuda、Y. Akada、M. Ishida、J. Nakayama、T. Imanaka、S. Fujiwara、論文標題：Property of cold inducible DEAD-box RNA helicase in hyperthermophilic archaea、雑誌名：Biochemical and Biophysical Research Communications、査読：有、巻：389、発行年 2009、ページ：622-627

③著者名:Yamada Y.、Fukuda W.、Hirooka K.、Hiromoto T.、Nakayama J.、Imanaka T.、Fukusaki E.、Fujiwara S.、論文標題：Efficient in vitro synthesis of *cis*-polyisoprenes using a thermostable *cis*-prenyltransferase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*、雑誌名：Journal of Biotechnology、査読：有、巻：143、発行年 2009、ページ：151-156

④著者名：T. Toyooka、T. Awai、T. Kanai、T. Imanaka、H. Hori、論文標題：Stabilization of tRNA ($m^1G37$) methyltransferase [TrmD] from *Aquifex aeolicus* by an intersubunit disulfide bond formation、雑誌名：Genes Cells、査読：有、巻：13、発行年 2008、ページ：807-816

⑤著者名：A. Yamanaka、Y. Yamada、K. Hirooka、H. Higashibata、W. Fukuda、J. Nakayama、T. Imanaka、E. Fukusaki、S. Fujiwara、論文標題：、Efficient synthesis of trans-polyisoprene compounds using two thermostable enzymes in an organic-aqueous dual-liquid phase system、雑誌名:Biochemical and Biophysical Research Communications、査読：有、巻：365、発行年 2008、ページ：118-123

⑥著者名：T. Imanaka、論文標題：Adaptation strategy of thermophiles towards hyperthermophily and their molecular bases、雑誌名：Bull. Chem. Soc. Japan、査読：有、巻：81、発行年2008、ページ：171-182

⑦著者名：Watanabe S.、Matsumi R.、Arai T.、Atomi H.、Imanaka T.、Miki K.、論文標題：Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: insights into cyanation reaction by thiol redox signaling、雑誌名：Molecular Cell、査読：有、巻：27、発行年 2007、ページ：29-40

⑧著者名：Yoshida S.、Atomi H.、Imanaka T.、論文標題：Engineering of a type III rubisco from a hyperthermophilic archaeon in order to enhance catalytic performance in mesophilic host cells、雑誌名：Applied and Environmental Microbiology、査読：有、巻：73、発行年 2007、ページ：6254-6261

⑨著者名：Shikata K.、Fukui T.、Atomi H.、Imanaka T.、論文標題：A novel ADP-forming succinyl-CoA synthetase in Thermococcus kodakaraensis structurally related to the archaeal nucleoside diphosphate-forming acetyl-CoA synthetases、雑誌名：Journal of Biological Chemistry、査読：有、巻：282、発行年 2007、ページ：26963-26970

〔学会発表〕（計 3 件）
①発表者名：千野 陽三、福田 青郎、跡見 晴幸、今中 忠行、発表表題：触手状突起物をもつ南極地域由来貧栄養細菌 262-7 株の分離と同定、発表学会名等：日本農芸化学会、発表年月日：2010 年 3 月 28 日、発表場所：東大駒場キャンパス（東京都）

②発表者名：山田耕造、近藤由佳、三吉祐輝、

福田青郎、跡見晴幸、今中忠行、発表表題：南極岩石の隙間から分離された微生物群、発表学会名等:日本農芸化学会、発表年月日：2009年3月28日、発表場所：福岡国際会議場（福岡県）

③発表者名:三吉 祐輝、近藤 由佳、横山 祐一郎、島原由利江、跡見 晴幸、今中 忠行、発表表題：南極地域由来新規微生物の分離と同定、発表学会名等:第８回極限環境微生物学会年会、発表年月日:2007年11月29日、発表場所：九州大学西新プラザ（福岡県）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.ritsumei.ac.jp/lifescience/skbiot/imanaka/HPtop.html

６．研究組織
(1)研究代表者
今中 忠行（IMANAKA TADAYUKI）
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：**30029219**

(2)研究分担者
跡見　晴幸（ATOMI HARUYUKI）
京都大学・工学研究科・准教授
研究者番号：90243047