

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：82657

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510207

研究課題名（和文） 南極に生息する細菌の低温環境への適応と進化に関する研究

研究課題名（英文） Study of bacterial adaptation and evolution for low temperature environments in Antarctica

研究代表者

馬場 知哉 (BABA TOMOYA)

大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構・新領域融合研究センター・特任准教授

研究者番号：00338196

研究成果の概要（和文）：南極の低温環境に生息する細菌のゲノム研究は少なく、未開拓の研究分野といえます。本研究は南極に生息する細菌が低温環境に適応して生存を可能としているメカニズムを進化の観点からゲノムレベルでの解明を試みたものです。南極大陸東部の湖沼で日本の南極観測隊により発見され、コケを中心とした多くの微生物との共生構造体である「コケ坊主」から好冷性の *Pseudomonas* 属細菌 MP1 株を分離し、そのゲノム解析を行いました。これまでに他の大陸で分離された近縁の *Pseudomonas* 属細菌のゲノム情報と比較した結果、MP1 株ゲノム上の全遺伝子のレベルで低温環境に適応してきたことが世界で初めて明らかにされました。

研究成果の概要（英文）：The genome studies of the Antarctic bacteria living at low temperature environments are very limited and to be developed further more. I have tried to understand on the genome-level for the mechanisms concerning with low temperature environment adaptation of an Antarctic bacterium. I isolated a psychrophilic bacterium *Pseudomonas* sp. MP1 from a “Moss Pillar”, which Japanese Antarctic Research Expedition had discovered in East Antarctica, and sequenced the complete genome of it. The comparative genome analysis of MP1 with related *Pseudomonas* sp. isolated in other continents revealed that genes of MP1 has adapted lower temperature environments on entire genome-level in its evolution. This study will be the first report for the bacterial entire genome-level adaptation to lower temperature environments in Antarctica.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：細菌、ゲノム、環境適応、低温、南極

## 1. 研究開始当初の背景

南極大陸は約 5000 万年前にオーストラリ

ア大陸から分裂し、約 1400 万年前には現在のような氷の大陸となったと考えられてい

る。その全土の98%が氷(氷床)で覆われており、氷床の厚さは大陸中心部では3000mを越えている。南極に生息する生物は極寒の環境下で独自の進化をとげてきた。南極の低温環境に生息する微生物のゲノム解析例は非常に少なく、わずかに海洋性の細菌である *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 の1例のみであった。南極大陸上の生態系としては、沿岸部の夏季に出現する湖沼環境が挙げられる。本研究では日本の南極観測隊が1995年に初めて発見し(Imura, S. *et al.*, *Polar Biol.*, **22**, 137-140, 1999)、これまでのところ南極大陸東部の Skarvsnes と呼ばれる地域でのみ生息が確認されている南極湖沼の円柱状の共生体「コケ坊主」(図1)に注目した。



図1 南極のコケ坊主

日本の南極観測隊により南極大陸東部の Skarvsnes の一部の湖沼底でナシゴケ(*Leptobryum*)属およびハリガネゴケ(*Bryum*)属と微生物の共生構造体が発見され、「コケ坊主」と命名された。最大のもので直径30cm、高さ80cm程であり、コケ坊主はこれまでにこの地域でしか確認されていない。

「コケ坊主」はこれまでに見つかった最大のもので直径30cm、高さ80cm程であり、群落を構成する植物体としては主にはナシゴケ(*Leptobryum*)属と一部でハリガネゴケ(*Bryum*)属が確認されており、これらが密に絡み合っただけで構造体を維持している。ナシゴケ属もハリガネゴケ属も一般的には陸生のコケ植物であり、南極大陸でのみ水中での群落を観測され、これらも南極環境への適応進化の結果と考えられている。 $C^{14}$ の同位体測定による年代推定の結果、頂上から20cm程の部分は約250年前に形成されたことが示唆され、高さ80cmに達するには約1000年の時間が必要と推定された(Kudoh, S. *et al.*, *Polar Bioeci.*, **16**, 11-22, 2003)。ナシゴケ属のコケ植物はシアノバクテリアなどの光合成細菌と共生することが知られており、我々は「コケ坊主」の1群落を上下および内外に14部位に分け、それぞれの部位で細菌16S rRNAライブラリーを構築し、塩基配列を解析したところ、全体としては Proteobacteria 門を中心とし、好氣的条件の外側では Cyanobacteria 門、嫌氣的条件の内側では Bacteroidetes 門などが優先種となることを明らかにすると共に、細菌16S rRNAライブ

ラリー全体の約90%は新種、約60%が新属あるいは新規な細菌群であることが示唆された(Nakai, R. *et al.*, *Polar Biol.*, **35**, 425-433, 2012)。

## 2. 研究の目的

本研究は、南極の極限環境下に生息する細菌の低温環境への適応と進化の解明を目的として、南極の限られた湖沼に生息する水生のコケを中心とした微生物との共生体「コケ坊主」から分離した微生物(細菌)のゲノム解析を通じて、その生命機能解明への基盤構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)「コケ坊主」からの南極細菌の分離とゲノム解析

コケ坊主試料から各種の寒天培地上にコロニーを形成する微生物を分離し、その分類のために rRNA 配列を決定した。さらに、他の大陸で分離され、ゲノム解析情報も得られている近縁種と比較可能な株についてゲノム解析を行い、これらの近縁種株間での比較ゲノム解析より細菌の低温環境への適応と進化に関する考察を試みた。

(2)南極細菌の生育温度変異株の分離と比較ゲノム解析

コケ坊主試料から分離し、さらにゲノム解析を行った微生物株について、本来の生存環境である南極環境ではない高温の環境で生育可能となる生育温度変異株の分離を試み、得られた生育温度変異株のゲノム解析を行い、元の株との比較ゲノム解析を行うことで低温環境への適応のメカニズムの鍵を握る遺伝子の特定を試みた。

## 4. 研究成果

(1)「コケ坊主」からの南極細菌の分離とゲノム解析

日本の第42次南極観測隊が2000年に Skarvsnes の仏池で採取し、冷凍保存されたコケ坊主試料から4°C、10°C、15°CでLB培地、グルコース最小培地、BG11培地などの寒天培地上に合計1566コロニーを得て、そこから61株の微生物の単離および rRNA 配列を決定した。その結果、Afipia 属、Bosea 属、Brevundimonas 属、Caulobacter 属、Cryobacterium 属、Flavobacterium 属、Mesorhizobium 属、Polaromonas 属、Phenylobacterium 属、Pseudomonas 属、Rhizobium 属、Rhodospirillum 属、Roseomonas 属、Sphingomonas 属、Stella 属などの細菌の近縁種であると推定された。このうち、他の大陸でも分離され、ゲノム解析情報が豊富な細菌種として Pseudomonas 属細菌についてゲノム解析を行うこととし、「コケ坊主」から分離された Pseudomonas 属細菌を

*Pseudomonas sp.* MP1 株とした (図2)。

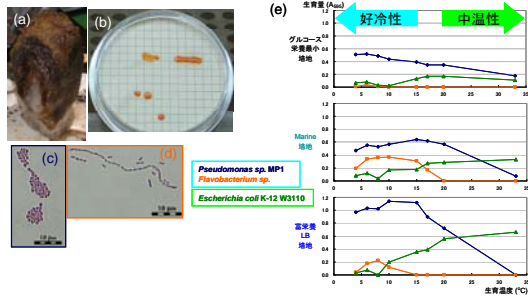


図2 南極コケ坊主からの細菌の分離

(a) 南極大陸東部、Skarvsnesの仏池で採取し冷凍保存されたコケ坊主試料、(b) コケ坊主より分離された微生物コロニーの例 (富栄養LB寒天培地、4°C)、(c) *Pseudomonas sp.* MP1株の顕微鏡写真、(d) *Flavobacterium sp.* 株の顕微鏡写真、(e) 分離された好冷性細菌の培地および温度条件による生育量の比較

*Pseudomonas sp.* MP1 株をはじめとして、分離株の多くでその生育温度の至適が 15°C以下の好冷性の性質を示し、南極の低温環境への適応の結果が示唆された。*Pseudomonas sp.* MP1 株の 16S rRNA 配列を調べたところ、南極の Wright Valley の湖沼で分離された *Pseudomonas antarctica* CMS35 株をはじめとして鉦泉 (冷泉) から分離された低温環境由来の *Pseudomonas* 属細菌と近縁であることが示された (図3)。

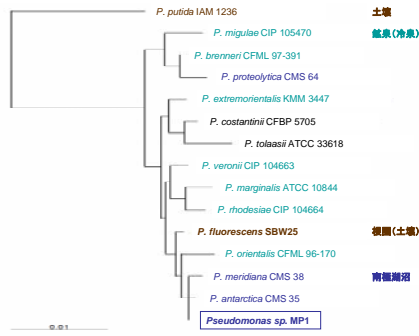


図3 *Pseudomonas sp.* MP1株の16S rRNA配列による系統関係 (NJ法)

南極ではこれまでに Wright Valley の湖沼から *P. antarctica* CMS35 株、*P. meridiana* CMS38 株、*P. proteolytica* CMS64 株が分離され、本研究の *Pseudomonas sp.* MP1 株は Wright Valley とは南極大陸の反対側の Skarvsnes の湖沼環境から分離されたことから、南極大陸に広く分布する *Pseudomonas* 属細菌株であることが示唆された (図4)。



図4 南極で分離された*Pseudomonas*属細菌

パルスフィールド電気泳動による解析から *Pseudomonas sp.* MP1 株のゲノム DNA サイズは約 6.4 Mb と推定された。*Pseudomonas sp.* MP1 株のゲノムの 25 倍の重複度となる Fosmid ライブラリー (4,416 クローン、平均インサート長約 37 kb) を構築し、全クロソンの両末端 DNA シーケンスをサンガー法で決定した。2 種の新型 DNA シーケンサーを用い、ロシュ 454 での約 36 万配列 (22 倍のゲノム重複度) およびイルミナ Genome Analyzer GAII での約 100 万配列 (9 倍のゲノム重複度) による全ゲノム・ショットガン・シーケンスを行い、Fosmid ライブラリーの両末端 DNA シーケンスとあわせることで、6.362 Mb のゲノム塩基配列を決定した。得られたゲノム塩基配列から、情報・システム研究機構のライフサイエンス統合データベースセンターで開発された微生物ゲノム・アノテーション・パイプライン (MiGAP) によるゲノム上の遺伝子のアノテーションを行い、5,762 の遺伝子 (CDS)、6 つの rRNA 遺伝子クラスター (*rrn* オペロン)、61 の tRNA 遺伝子を特定した。5,762 遺伝子 (CDS) の機能予測を STRING データベースへの blastp 検索により 23 の COG (Clusters of Orthologous Groups) 分類を行った。その結果、61% (3,490 遺伝子) の機能予測が可能であったが、39% (2,272 遺伝子) の機能予測は困難であることが判明した (図5)。

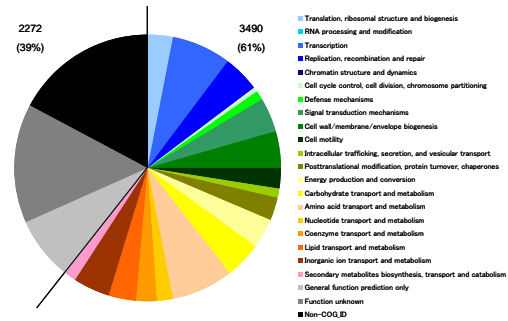


図5 *Pseudomonas sp.* MP1株のゲノムアノテーション

遺伝子構造予測: MiGAP (DBCLS), 5762 CDS, 6 rRNA, 61 tRNA

CDS機能予測: STRING (COG, Clusters of Orthologous Groups), blastp: e値<1e-5

表1に比較ゲノム解析を行った *Pseudomonas sp.* MP1 株を含めた 10 種の *Pseudomonas* 属細菌を示す。それぞれ至適な生育温度域として 30°C 以上の中高温域が 2 種、15°C~30°C の中低温域が 7 種、15°C 以下の低温域は本研究の *Pseudomonas sp.* MP1 株の 1 種であり、*Pseudomonas sp.* MP1 株はこれまでゲノム解析がなされた *Pseudomonas* 属細菌では最も低温環境に適応した株であった。

表1 比較ゲノム解析に用いた*Pseudomonas*属細菌

<i>Pseudomonas</i> 属細菌株	分離源	ゲノム長 (bp)	ゲノムGC組成 (%)	遺伝子数 (CDS)	至適生育温度域 (°C)	温度帯
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Human	6,264,404	66.6	5,727	30-37	中高温 (30°C)
<i>P. stutzeri</i> A1501	Root	4,567,418	63.9	4,080	30-37	
<i>P. fluorescens</i> SBW25	Root	6,722,539	60.5	5,921	25-30	
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	Root	7,074,893	63.3	6,297	25-30	
<i>P. mendocina</i> ymp	Soil	5,072,807	64.7	4,085	25-30	
<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	Plant	6,397,126	58.4	6,818	25-30	中低温 (15-30°C)
<i>P. entomophila</i> L48	Insect	5,888,780	64.2	3,660	25-29	
<i>P. brassicae</i> var. NFM421	Root	6,843,248	60.8	6,095	19-30	
<i>P. putida</i> KT2440	Soil	6,181,863	61.5	5,000	18-28	
<i>Pseudomonas</i> sp. MP1	Lake (Antarctica)	6,362,056	59.0	5,762	10-15	

*Pseudomonas* 属細菌 10 種のゲノム間での遺伝子 (CDS) の相同性をアミノ酸配列に変換した blastp 検索により調べた。*Pseudomonas* sp. MP1 株では *Pseudomonas* 属細菌のゲノム間で保存された Core 遺伝子の割合が最も少なく、他の *Pseudomonas* 属細菌のゲノム上には保存されていない遺伝子が多い傾向が示された (図6)。

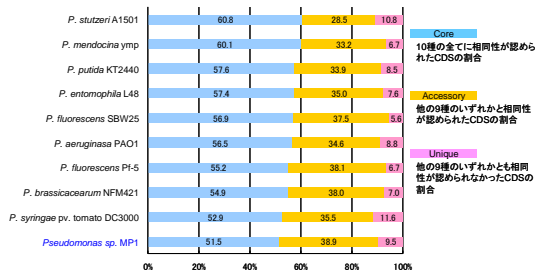


図6 *Pseudomonas*属細菌10種のゲノム間での遺伝子(CDS)の相同性比較

10種の*Pseudomonas*属細菌のゲノム上の遺伝子(CDS)について相同性をアミノ酸配列に変換したblastp検索 (e値<1e-5)により調べた。*Pseudomonas* sp. MP1株では *Pseudomonas*属細菌のゲノム間で保存されたCore遺伝子の割合が最も少ない傾向が示された。

*Pseudomonas* sp. MP1 株のゲノム上の水平伝播遺伝子について、NCBI の nr (non-redundant) データベースへの blastp 検索により調べた。その結果、*Pseudomonas* sp. MP1 株には *Pseudomonas* 属細菌以外の CDS に相同性が高い水平伝播遺伝子が 7.7% (444 CDS) と *Pseudomonas* sp. MP1 株以外に相同性を示す CDS が無い orphan gene (孤児遺伝子) が 6.4% (370 CDS) の存在が示され、これらの遺伝子は *Pseudomonas* sp. MP1 株に特異的な遺伝子であることが示唆された (図7)。

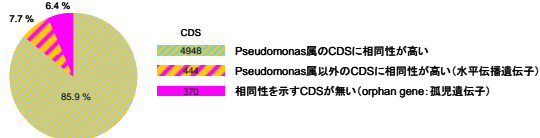


図7 *Pseudomonas* sp. MP1ゲノム上の水平伝播遺伝子の割合

*Pseudomonas* sp. MP1株のゲノム上の遺伝子(CDS)についてNCBIのnr (non-redundant) データベースへのblastp検索 (e値<1e-5)により調べた。*Pseudomonas* sp. MP1株には*Pseudomonas*属細菌以外のCDSに相同性が高い水平伝播遺伝子が7.7%(444 CDS)と*Pseudomonas* sp. MP1株以外に相同性を示すCDSが無いorphan gene(孤児遺伝子)が6.4%(370 CDS)の存在が示唆された。

低温条件でも高い酵素活性を有する低温酵素の研究から、低温酵素に特徴的なアミノ酸組成の傾向として、(1) 非極性アミノ酸のアラニン(Ala)やロイシン(Leu)が少ないこと、(2) 極性アミノ酸のアスパラギン(Asn)

やトレオニン(Thr)が多いこと、(3) アルギニン(Arg)/リジン(Lys)値が低い(アルギニンが少なく、リジンが多い)ことが知られている(Siddiqui, K. et al., Annu. Rev. Biochem., 75, 403-433, 2006)(栗原ら, 生化学, 81, 1072-1079, 2009)。*Pseudomonas* sp. MP1株を含めた10種の*Pseudomonas*属細菌ゲノム上の遺伝子についてアミノ酸組成を調べた。その結果、低温菌の*Pseudomonas* sp. MP1株はゲノム上の遺伝子全体のアミノ酸組成が低温酵素に特徴的なアミノ酸組成の傾向を示すことが明らかにされた。さらに、非極性アミノ酸のイソロイシン(Ile)、極性アミノ酸のグリシン(Gly)やグルタミン酸(Glu)でも特徴的な傾向が示され、これらのアミノ酸組成比の変化も低温における酵素・タンパク質の活性や安定性に関する可能性が示唆された。*P. aeruginosa* PAO1では*Pseudomonas* sp. MP1株と逆のアミノ酸組成の特徴が示され、それぞれ30°C以上の中高温域、15°C以下の低温域の環境にゲノムレベルで適応進化したことが示唆された(図8)。また、*Pseudomonas* sp. MP1株のゲノム上の遺伝子のこれらアミノ酸組成の特徴は、水平伝播遺伝子や孤児遺伝子において特に顕著であることも示唆された。

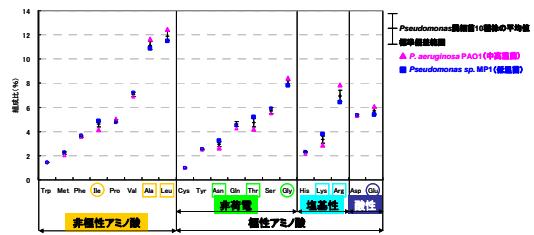


図8 *Pseudomonas*属細菌のゲノムレベルでの遺伝子(CDS)のアミノ酸組成比の比較

*Pseudomonas*属細菌10種のゲノム上の全遺伝子(CDS)領域のアミノ酸組成比を、比較した10種の平均値と標準偏差範囲で示し、中高温菌の*P. aeruginosa* PAO1、低温菌の南極クマカサからの分離株*Pseudomonas* sp. MP1のアミノ酸組成比の値をそれぞれ示した。その結果、比較した10種の中でアミノ酸組成比は*P. aeruginosa* PAO1と*Pseudomonas* sp. MP1で逆の傾向を示すことが明らかとなった。低温酵素(低温に適した酵素)のアミノ酸組成の特徴として、(1)非極性アミノ酸のアラニン(Ala)やロイシン(Leu)が少ないこと、(2)極性アミノ酸のアスパラギン(Asn)やトレオニン(Thr)が多いこと、(3)アルギニン(Arg)/リジン(Lys)値が低い(アルギニンが少なく、リジンが多い)ことが知られているが、これらの傾向がゲノムレベルでの遺伝子(CDS)のアミノ酸組成比の比較でも示唆された。さらに、非極性アミノ酸のイソロイシン(Ile)、極性アミノ酸のグリシン(Gly)やグルタミン酸(Glu)でも特徴的な傾向が見られることから、これらのアミノ酸組成比の変化も低温における酵素・タンパク質の活性や安定性に関する可能性が示唆された。

低温酵素が低温で高いフレキシビリティを獲得するための一つの指標となるアルギニン(Arg)/リジン(Lys)組成比について*Pseudomonas*属細菌10種の至適生育温度との関係を調べた。その結果、3つの至適生育温度域、中高温(30°C以上)、中低温(15~30°C)、低温(15°C以下)とアルギニン/リジン組成比の関係が示された(図9)。

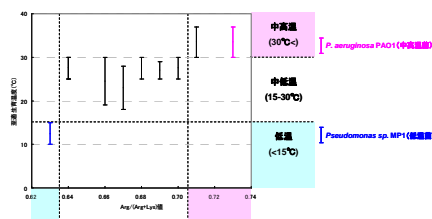


図9 *Pseudomonas*属細菌遺伝子(CDS)のアルギニン/リジン組成比と至適生育温度  
低温酵素が低温で高いフレキシビリティを獲得するための一つの指標として、アルギニン(Arg)/リジン(Lys)組成比(=Arg/(Arg+Lys)値)が小さくなる傾向が知られている。*Pseudomonas*属細菌10種株でのゲノム上の全遺伝子(CDS)領域のArg/(Arg+Lys)値を計算し、各*Pseudomonas*属細菌の至適生育温度との関係を示した。その結果、3つの至適生育温度域、中高温(30°C>)、中低温(15~30°C)、低温(<15°C)とArg/(Arg+Lys)値の関係が示唆された。

*Pseudomonas* 属細菌 10 種でのゲノム上の全遺伝子 (CDS) 領域のアルギニン/リジン組成比と各 *Pseudomonas* 属細菌のゲノム GC 組成 (%) との関係性を調べた。その結果、高い相関関係が示され、3 つの至適生育温度域、中高温 (30°C 以上)、中低温 (15~30°C)、低温 (15°C 以下) のそれぞれの温度域に適応したアルギニン/リジン組成を持つ酵素・タンパク質がゲノムレベルでの全遺伝子 (CDS) 領域に反映され、結果的にゲノム GC 組成 (%) に影響を与えていることが示唆された (図 10)。

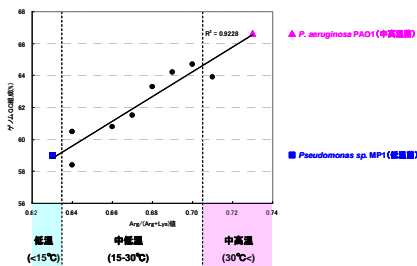


図 10 *Pseudomonas* 属細菌全遺伝子 (CDS) のアルギニン/リジン組成比とゲノム GC 組成  
*Pseudomonas* 属細菌 10 種でのゲノム上の全遺伝子 (CDS) 領域の Arg/(Arg+Lys) 値と各 *Pseudomonas* 属細菌のゲノム GC 組成 (%) との関係性を図示した。その結果、高い相関 (相関係数  $R^2 = 0.9228$ ) が示され、3 つの至適生育温度域、中高温 (30°C)、中低温 (15~30°C)、低温 (<15°C) のそれぞれの温度域に適応した Arg/(Arg+Lys) 値を持つ酵素・タンパク質がゲノムレベルでの全遺伝子 (CDS) 領域に反映され、結果的にゲノム GC 組成 (%) に影響を与えていることが示唆された。

以上の結果から、次のような *Pseudomonas* 属細菌の生育環境の温度域へのゲノムレベルでの適応進化のメカニズムが考察された。30°C 以上の中高温域の生育環境に適応するためにはゲノム上の遺伝子 (CDS) の Arg, Ala, Gly, Leu, Glu の組成比を上げ、Lys, Asn, Ile, Thr の組成比を下げる圧力が掛かった結果、GC-rich なコドンが多用され *P. aeruginosa* PAO1 に代表されるようなゲノム GC 組成が高いゲノム構造となり、逆に 15°C 以下の低温域の生育環境に適応するためには遺伝子 (CDS) の Arg, Ala, Gly, Leu, Glu の組成比を下げ、Lys, Asn, Ile, Thr の組成比を上げる圧力が掛かった結果、AT-rich なコドンが多用され *Pseudomonas* sp. MP1 のゲノム GC 組成は低いゲノム構造となったことが示唆された (表 2)。

表 2 アミノ酸コドン表

1st	2nd	3rd			
		T	C	A	G
T	Phe	TTT	TCT	TAT	TGT
		TTC	TCC	TAC	TGC
		TTA	TCA	TAA	TGA
		TTG	TCG	TAG	TGG
C	Leu	CTT	CCT	CAT	CGT
		CTC	CCC	CAC	CGC
		CTA	CCA	CAA	CGA
		CTG	CCG	CAG	CGG
A	Ile	ATT	ACT	AAT	AGT
		ATC	ACC	AAC	AGC
		ATA	ACA	AAA	AGA
		ATG	ACG	AAG	AGG
G	Val	GTT	GCT	GAT	GGT
		GTG	GCC	GAC	GGC
		GTA	GCA	GAA	GGA
		GTG	GCG	GAG	GGG

*Pseudomonas* 属細菌 10 種でのゲノム上の全遺伝子 (CDS) 領域のアミノ酸組成比を比較した中で

●中高温域の *P. aeruginosa* PAO1 で多くなる傾向を示すアミノ酸: Arg, Ala, Gly, Leu, Glu (GC-rich)

●低温域の *Pseudomonas* sp. MP1 で多くなる傾向を示すアミノ酸: Lys, Asn, Ile, Thr (AT-rich)

ゲノム上にコードされる酵素・タンパク質がそれぞれの *Pseudomonas* 属細菌の生育温度域に適応進化の結果、ゲノムレベルでのアミノ酸組成比の変化とゲノム GC 組成に影響を与えたと考えられる

さらに、*Pseudomonas* sp. MP1 のゲノム上の遺伝子 (CDS) で上記のようなアミノ酸組成比の傾向は、*Pseudomonas* 属細菌以外からの水平伝播遺伝子や *Pseudomonas* sp. MP1 のみに存在が示唆されるユニークな孤児遺伝子で特に顕著であることも明らかになった。

## (2) 南極細菌の生育温度変異株の分離と比較ゲノム解析

*Pseudomonas* sp. MP1 の低温環境への適応のメカニズムを直接的に調べる方法として、変異株の解析は有効な分子遺伝学的手法である。*Pseudomonas* sp. MP1 株の生育が可能な温度域 (コロニーを形成する温度域) は 3~30°C であるが、33°C でコロニーを形成できる変異株 MP1-1 の獲得に成功した。さらに MP1-1 株を 35°C でインキュベーションした後、死滅せずに 33°C でコロニーを形成した 3 株 (MP1-2, MP1-3, MP1-4) を分離し、これらの株から 34°C でコロニーを形成できる変異株 MP1-32, MP1-42, MP1-43 を得た。これらの変異株の生育可能な温度域 (コロニーを形成する温度域) を調べたところ、MP1-1~1-4 は高温側に 33°C まで、MP1-32 は 34°C まで生育可能な温度域が拡大していた。MP1-43 は MP1-32 と同じく高温側に 34°C まで生育可能な温度域が拡大していたが、低温側は 8°C までと生育可能な温度が高温側にシフトしていた。MP1-42 は生育可能な温度域が 10~35°C と、さらに高温側にシフトしていることが明らかになった (図 11)。

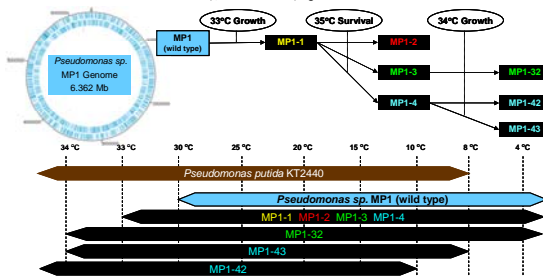


図 11 南極コケ坊主 (仏池) 細菌 *Pseudomonas* sp. MP1 株からの生育温度変異株の分離  
 南極の仏池のコケ坊主試料から分離された細菌 *Pseudomonas* sp. MP1 株の生育温度域 (コロニーを形成する温度域) は 3~30°C であるが、33°C でコロニーを形成できる変異株 MP1-1 を得た。MP1-1 株を 35°C でインキュベーションした後、死滅せずに 33°C でコロニーを形成した株を 3 株 (MP1-2, MP1-3, MP1-4) を得た。これらの株から 34°C でコロニーを形成できる変異株 MP1-32, MP1-42, MP1-43 を得た。これらの変異株の生育温度域 (コロニーを形成する温度域) を調べたところ、MP1-1~1-4 は高温側に 33°C まで、MP1-32 は 34°C まで生育温度域が拡大していた。MP1-43 は MP1-32 と同じく高温側に 34°C まで生育温度域が拡大していたが、低温側は 8°C までと生育温度が高温側にシフトしていた。MP1-42 は生育温度域が 10~35°C と、さらに高温側にシフトしていることが明らかになった。

これらの変異株は、ゲノム上の変異により結果的に好冷性 (耐冷性) を失ったと考えられ、そのゲノム解析比較から変異箇所を同定することで直接的に *Pseudomonas* sp. MP1 の低温環境への適応のメカニズムの鍵を握る遺伝子を特定できる可能性がある。今後は、上記の変異株 7 株について、順次ゲノム解析を行い *Pseudomonas* sp. MP1 との比較ゲノム解析により変異箇所を同定し、南極細菌 *Pseudomonas* sp. MP1 の低温環境への適応機構の解明を進めていく方針である。

## 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1件)

馬場知哉、阿部貴志、豊田敦、藤山秋佐夫、伊村智、神田啓史、本山秀明、仁木宏典、南極大陸 *Pseudomonas* 属細菌のゲノム特性、第6回日本ゲノム微生物学会年会、2012年3月10日、立教大学(池袋キャンパス)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

馬場 知哉 (BABA TOMOYA)

大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構・新領域融合研究センター・特任准教授

研究者番号：00338196