

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650166

研究課題名(和文) 寒天培地でシアノバクテリアを増殖させる従属栄養細菌の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism that heterotrophic bacteria induce the growth of the cyanobacterial strain on agar media

研究代表者

林 昌平 (HAYASHI, Shohei)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：20725593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：純粋培養しているシアノバクテリア *Synechococcus leopoliensis* CCAP1405/1株は、液体培地で増殖するが、寒天培地では増殖できない。しかし、*Bacillus subtilis* 168などの従属栄養細菌を共培養すると1405/1株が増殖する。*B. subtilis* 168のシステイン生合成経路における硫化物の供給によって1405/1株が増殖するようになると推察された。さらに*B. subtilis* 168は環境と自身の状態に応じて1405/1株の増殖を誘導するかを決定していることが示された。

研究成果の概要(英文)： *Synechococcus leopoliensis* CCAP1405/1 cannot grow on agar media although the strain can grow in liquid media. However, the strain can grow when co-cultured with heterotrophic bacteria, such as *Bacillus subtilis* 168, on agar media. Supply of sulfide in the cysteine biosynthesis pathway from *B. subtilis* 168 was suggested for the mechanism. Additionally, *B. subtilis* 168 determines whether or not to induce the growth of *S. leopoliensis* CCAP1405/1 depending on its environmental and own conditions.

研究分野：微生物生態学

キーワード：共生 シアノバクテリア 寒天培地 従属栄養細菌

### 1. 研究開始当初の背景

直接顕鏡法で計数されるシアノバクテリア細胞数が希釈平板法で計数される値より大きいことや、球菌タイプのシアノバクテリアが優占している試料を寒天培地に塗付すると繊維状菌タイプが優占することが知られている。このことは自然環境中のシアノバクテリアの中には寒天培地上で増殖できない種がいることを示唆する。カタラーゼ活性を持つ細菌がシアノバクテリアの寒天培地での増殖を促進させる例が報告され、寒天培地中の過酸化水素がシアノバクテリアの増殖を阻害している可能性が示されていた。

本研究室で継代培養しているシアノバクテリア *Synechococcus leopoliensis* CCAP 1405/1 株 (以下 1405/1 株) は、単独で数種類の液体培地中では増殖できるが、同成分に寒天 (1.5%) を加えて固化した寒天培地上または培地中では増殖できない。しかし、細菌 *Aquamonas* sp. T-5 (以下 T-5 株、出雲市赤川の河川生物膜から単離) や *Porphyrobacter* sp. Pink1 (以下 Pink1 株、1405/1 株を菌株保存機関から購入した時からコンタミ) などの特定の従属栄養細菌を同一寒天培地上に共接種すると、形成したそれら従属栄養細菌のコロニー周辺で 1405/1 株が増殖して独立したコロニーを形成することを発見した (図 1)。

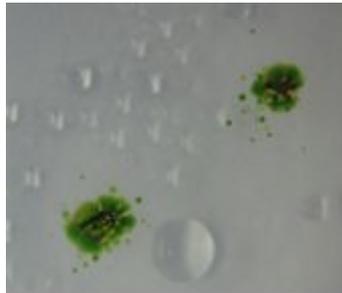


図 1 : 寒天培地上で共培養した Pink1 株 (ピンク色) の周辺で独立したコロニーを形成した 1405/1 株 (緑色)

T-5 株と Pink1 株はカタラーゼ活性を持たず、また、寒天培地にカタラーゼを添加しても 1405/1 株は増殖しなかったことから、過酸化水素による増殖阻害とその除去による増殖誘導とは別のメカニズムが関与していることが示唆された。1405/1 株が寒天培地で増殖できない原因は、寒天中に含まれる不純物による阻害、または、寒天培地にすることによる環境の変化によって 1405/1 株が増殖できない状態になったためと考えた。純度の高い寒天や寒天以外の固化剤を用いても同様の結果になったことから、寒天中に含まれる不純物による阻害の可能性は低いと結論付けた。そこで、寒天培地にすることによる環境の変化によって 1405/1 株が増殖できない状態になっており、従属栄養細菌がそれを相補しているのではないかと予想して研究を開始した。そして本現象を研究することで過酸化水素とカタラーゼの関与とは異なる

従属栄養細菌によるシアノバクテリアの増殖誘導メカニズムが提唱できると考えた。

### 2. 研究の目的

液体培地では増殖できるシアノバクテリア 1405/1 株が、寒天培地では特定の従属栄養細菌が共存する場合でのみ増殖できる本現象のメカニズムの解明を目的とした。特にこのメカニズムを、従属栄養細菌がなぜ 1405/1 株を増殖させることができるのかという観点から明らかにするために研究を行った。さらに、従属栄養細菌が寒天培地で 1405/1 株を増殖させるメカニズムの生態学的意義や、これまで寒天培地では培養が困難だったシアノバクテリアを培養する技術への応用の可能性を調べることも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) T-5 株の 1405/1 株増殖能欠損株の作成とスクリーニング

1405/1 株増殖能を持つ T-5 株にランダムにトランスポゾン挿入してランダム遺伝子破壊株を得た。得られた破壊株について寒天培地上での 1405/1 株増殖誘導能を調査し、関連遺伝子の決定を試みた。

(2) *Bacillus subtilis* 168 の 1405/1 株増殖能に關与する遺伝子の特定

*B. subtilis* 168 にも寒天培地上の 1405/1 株の増殖を誘導する能力がある。*B. subtilis* 168 は遺伝子操作法が確立されており、任意の遺伝子を破壊したり、プラスミドベクターを用いて遺伝子を導入、発現させることができる。*B. subtilis* 168 は遺伝子破壊株ライブラリーが作成、公開されており、このライブラリー (国立遺伝学研究所) の 2515 株の中から得た、寒天培地上の 1405/1 株を増殖させることができない破壊株について、増殖誘導能に關与する遺伝子を特定し、1405/1 株増殖誘導機構の推定を試みた。

従属栄養細菌の 1405/1 株増殖誘導能の調査は、寒天培地を注入した 96 穴ウェルプレートに 1405/1 株と増殖誘導能を調査したい細菌を共接種後、培養して 1405/1 株が増殖しないウェルを判定することで行った (図 2)。研究期間中に同一条件でも 1405/1 株が増殖する場合としない場合があることがわかったため、各条件を 8 連設けて調査した。

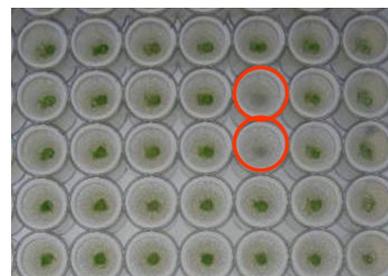


図 2 : 96 穴ウェルプレートを用いた増殖誘導の調査、赤丸は 1405/1 株増殖誘導能欠損株が共接種されたウェル

(3) 硫黄含有物添加が寒天培地上の 1405/1 株増殖および *B. subtilis* 168 の増殖誘導能に及ぼす影響の調査

チオ硫酸ナトリウムを寒天培地へ添加することによって 1405/1 株が単独で増殖することがわかってきた。さらに本研究において、*B. subtilis* 168 の 1405/1 株増殖誘導能欠損株の破壊遺伝子の解析からシステイン生合成経路の関与が示唆されたため、システイン生合成経路に関与すると推定される種々の硫黄含有物(チオ硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、硫化ナトリウム、システイン)を寒天培地に添加し、1405/1 株を単独、または *B. subtilis* 168 野生株、1405/1 株増殖誘導能欠損株である *yvgQ* (システイン生合成経路の亜硫酸還元酵素ヘモタンパク)破壊株、*yvgR* (亜硫酸還元酵素フラボタンパク)破壊株と共培養し、1405/1 株の増殖を調査した。

(4) *B. subtilis* 168 の 1405/1 株増殖誘導能欠損株のシステイン生合成経路の関与の調査

*B. subtilis* 168 のシステイン生合成が 1405/1 株の増殖誘導にどのように関与しているかを調査するために、1405/1 株増殖誘導能欠損株のシステイン生合成に関与すると推定されている別の 5 つの遺伝子を欠損させた株を作成した。*B. subtilis* 168 の *yvgQ* 破壊株の *cysK* (0-アセチルセリンチオールリアーゼと推定)、*yrhA* (別の 0-アセチルセリンチオールリアーゼと推定)、*yusK* (セリントランスアセチラーゼと推定)、*yhfS* (別のセリントランスアセチラーゼと推定)、*ylnF* (亜硫酸還元酵素と推定)を相同組換えを用いてスペクチノマイシン耐性遺伝子に置換した。それらの置換株の 1405/1 株増殖誘導能を調査した。

#### 4. 研究成果

T-5 株についてトランスポゾンを用いて破壊株を作成し 1405/1 株を増殖させる能力を欠損した株をスクリーニングすることで、関与遺伝子の同定を試みた。しかし、得られた 2 株の 1405/1 株増殖誘導能欠損株において破壊されていた遺伝子から 1405/1 株を増殖させる機構を推定するには至らなかった。また、調査ごとに得られた破壊株の 1405/1 株増殖誘導能が異なり、破壊した遺伝子が確かに 1405/1 株の増殖に関与しているのかがはっきりしないという問題が起こった。

*B. subtilis* 168 の遺伝子破壊ライブラリーから得た 1405/1 株増殖誘導能欠損株 9 株の関与遺伝子を調査した。欠損遺伝子の推定機能は、トランスポーター(*yxeQ*, *yufO*)、ヒスチジンキナーゼ(*yxdK*)、反応酵素(*sdhC*, *yvgQ*, *yvgR*, *acoB*, *yusE*)、機能未知(*yrdA*)の 4 グループに分類された。推定機能の関連性が低い遺伝子が 1405/1 株増殖誘導能に関与する遺伝子として同定されたことから、こ

の機構には様々な因子が関与していると考えられた。この中の 2 つの遺伝子 *yvgQ*, *yvgR* はシステイン生合成経路の亜硫酸還元酵素をコードすると推定されている。そこで、寒天培地にシステインを添加すると *yvgQ* 破壊株、*yvgR* 破壊株の 1405/1 株増殖誘導能が相補され、システイン合成経路の関与が示唆された。しかし、システイン添加では 1405/1 株は単独で寒天培地上で増殖するようにはならなかった。

*B. subtilis* 168 との共培養においても同一条件で 1405/1 株の増殖が調査ごとに異なるという問題が起こった。1405/1 株と *B. subtilis* 168 の接種条件や培養条件をできる限り同一にしても調査ごとに 1405/1 株の増殖が異なった。おそらく複数の 1405/1 株増殖誘導経路があり、欠損株と判断した株の 1405/1 株を増殖させる頻度は確かに野生株より低下したが、わずかな違いによって 1405/1 株を増殖させるようになる場合があるのではないかと考えられる。以降は、増殖誘導能欠損が比較的安定していた *B. subtilis* 168 の *yvgQ* 破壊株、*yvgR* 破壊株に着目し、増殖誘導能を調査する際に各条件を 8 連設けて研究を進めた。

寒天培地上での 1405/1 株の増殖誘導に *B. subtilis* 168 のシステイン生合成経路の硫黄含有物が関与していることが示唆されたため、システイン生合成経路に関与すると推定される種々の硫黄含有物(硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、硫化ナトリウム、システイン)を培地に加えたところ、硫化ナトリウムを添加した場合に単独の 1405/1 株が寒天培地上で増殖した。チオ硫酸ナトリウムだけでなく硫化ナトリウムの添加でも 1405/1 株が単独で増殖できるようになることがわかった。しかしシステインの添加では 1405/1 株の単独での増殖が起こらなかったことから *B. subtilis* 168 はシステインを直接 1405/1 株に提供することで増殖を誘導しているわけではないことが示唆された。

チオ硫酸ナトリウムを添加すると 1405/1 株が単独で増殖することから寒天培地上ではチオ硫酸塩を初発基質にしてシステインを生合成して増殖すると推察した(図 3)。*yvgQ* 破壊株と *yvgR* 破壊株が 1405/1 株増殖誘導能を失ったこと、硫化ナトリウム添加によって 1405/1 株が単独で増殖したが硫酸ナトリウム添加によっては増殖しなかったことから、1405/1 株は硫酸塩を初発基質にシステインを生合成する経路中の亜硫酸を硫化物に還元する反応が寒天培地上で起こらないために増殖できず(図 3)、*B. subtilis* 168 は硫化物イオンを 1405/1 株に供給することで寒天培地上での 1405/1 株の増殖を誘導していると予想した(図 4)。

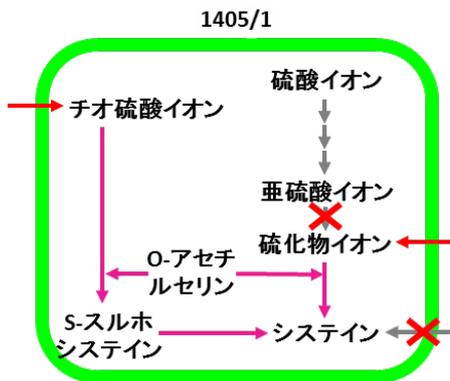


図3：単独の 1405/1 株の増殖（チオ硫酸ナトリウム添加、硫化ナトリウム添加）と未増殖（添加なし、システイン添加）についてのシステイン生合成が関与する推定機構

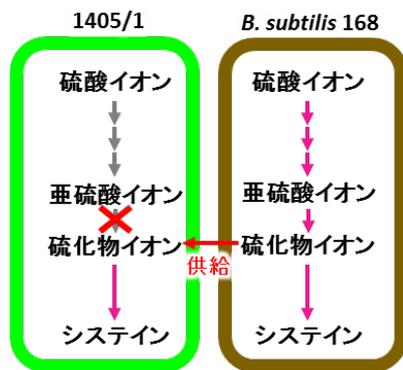


図4：B. subtilis 168 と共存状態の 1405/1 株の増殖についてのシステイン生合成が関与する推定機構

硫黄含有物を添加した培地で 1405/1 株と *B. subtilis* 168 野生株、*yvgQ* 破壊株、*yvgR* 破壊株を共培養すると、チオ硫酸ナトリウムを添加しても *yvgQ* 破壊株が *yvgR* 破壊株が共存すると、また、硫化ナトリウムを添加しても *B. subtilis* 168 野生株、*yvgQ* 破壊株、*yvgR* 破壊株が共存すると 1405/1 株の増殖頻度（1405/1 株が増殖したウェル数/同一条件で調査したウェル数）が低下した。*yvgQ* 破壊株と *yvgR* 破壊株は亜硫酸塩を硫化物に変換できないため硫酸塩からシステイン以降の化合物を合成できず、培地中に存在するチオ硫酸ナトリウムを独占してしまうため、チオ硫酸ナトリウムを培地に添加してもそれらの破壊株が共存すると 1405/1 株が増殖できないと推察した（図5）。また、*B. subtilis* 168 野生株、*yvgQ* 破壊株、*yvgR* 破壊株は培地中に硫化物が十分存在すると優先的に利用し、さらに 1405/1 株の増殖を誘導しないために硫化物添加培地では *B. subtilis* 168 が共存しても 1405/1 株が増殖できないのではないかと予想した（図6）。

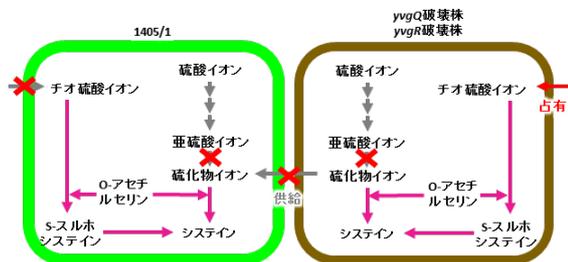


図5：チオ硫酸ナトリウム添加培地における *B. subtilis* 168 *yvgQ* 破壊株、*yvgR* 破壊株と共存状態の 1405/1 株の未増殖についてのシステイン生合成が関与する推定機構

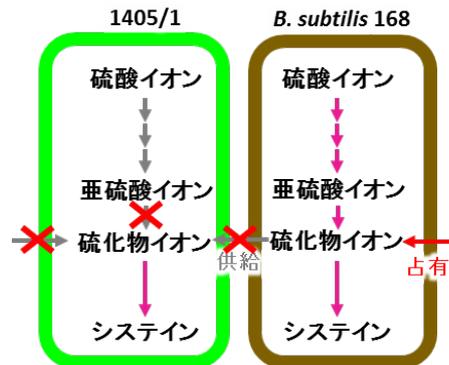


図5：硫化ナトリウム添加培地における *B. subtilis* 168 と共存状態の 1405/1 株の未増殖についてのシステイン生合成が関与する推定機構

*B. subtilis* 168 のシステイン生合成が 1405/1 株の増殖誘導にどのように関与しているかを調査するために、1405/1 株増殖誘導能欠損株である *yvgQ* 破壊株のシステイン生合成に関与する別の5つの遺伝子を欠損させた株を作成して増殖誘導を調査した。システインシンターゼ（0-アセチルセリンチオールリアーゼ）をコードすると推定される *yrhA* 遺伝子を破壊すると、増殖誘導能欠損株の誘導能が復帰した。亜硫酸還元酵素は亜硫酸塩を硫化物に、システインシンターゼはその硫化物と 0-アセチルセリンからシステインを合成することから、*B. subtilis* 168 が生産する硫化物イオンの供給が増殖誘導に関係することが支持された。*yvgQ*、*yvgR* とは別の亜硫酸還元を担う未知酵素があり下流を破壊したために硫化物が蓄積して 1405/1 株に供給されたために *yvgQ* 破壊株の増殖誘導能が *yrhA* 破壊によって復帰したのではないかと考えている（図7）。また、システインで *yvgQ* 破壊株、*yvgR* 破壊株の 1405/1 株増殖誘導能が相補されたのも未知の亜硫酸還元酵素が活性化されたためではないかと考えているが直接的な証拠は得られていない。

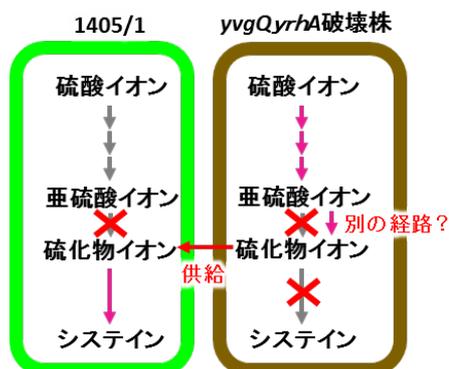


図7 : *B. subtilis* 168 *yvgQyrhA* 破壊株と共存状態の 1405/1 株の増殖についてのシステイン合成が関与する推定機構

これらの研究から 1405/1 株は寒天培地上においてシステイン合成に関連する硫黄含有物の獲得に問題があるために寒天培地上で増殖できないと推察される。*B. subtilis* 168 はあまり硫黄含有物がない培地では 1405/1 株の増殖を誘導するが、硫化物が追加された培地では増殖を誘導しないと考えられる。*B. subtilis* 168 と 1405/1 株は、条件によって硫黄源をめぐる競合関係にあるということが示された。さらに *B. subtilis* 168 が 1405/1 株の増殖を誘導するかどうかは、*B. subtilis* 168 のシステイン合成経路の欠損によって異なるようである。従って、*B. subtilis* 168 は環境と自身の状態に応じて 1405/1 株の増殖を誘導するかを決定していると予想している。*B. subtilis* 168 などの従属栄養生物にとって 1405/1 株の増殖を誘導するかどうかを環境と自身の状態に応じて変化させる機構は環境中で条件に適応して生存率を高めるといった生態学的意義があると考えられる。また、1405/1 株の寒天培地上での増殖にシステイン合成に関連する硫黄含有物が関与するという事実は、これまで寒天培地上では増殖させることができないために見逃していたシアノバクテリアを増殖させる手法に応用できる。

本研究成果のインパクトとして、寒天培地でシアノバクテリアを増殖させる機構として、過酸化水素の除去による機構とは異なる、システイン合成に関連する硫黄含有物の供給による機構があることが示された点が挙げられる。さらに *B. subtilis* 168 の 1405/1 株増殖誘導は環境や自身のシステイン合成経路の状態によって変化することが初めてわかったこともインパクトがあると考えている。

今後、*B. subtilis* 168 や 1405/1 株の細胞内のシステイン合成経路の硫黄含有物の濃度の測定やラベルした硫黄含有物を用いた実際の硫黄含有物の追跡などを行うことでより正確に両者の条件に応じた相互作用の変化を解析できる。それらの結果は、自然環境で普遍的に起こっていると予想される、環境や自身の状態に応じて他者との相互作

用を変化させる細菌の環境応答の研究にも展開できる。

## 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)

〔雑誌論文〕(計1件)

Hayashi Shohei, Itoh Kazuhito and Suyama Kousuke, Genes of *Bacillus subtilis* 168 that support growth of the cyanobacterium, *Synechococcus*

*leopoliensis* CCAP1405/1 on agar media, *Microbial Ecology*, 査読有, 70, 2015, 849-852

DOI:10.1007/s00248-015-0610-y

島根大学学術情報リポジトリ

<http://ir.lib.shimane-u.ac.jp/38137>

〔学会発表〕(計2件)

林 昌平、竹村 萌香、井藤 和人、巢山 弘介、硫黄源が関与する枯草菌の寒天培地上シアノバクテリアの増殖誘導能、日本微生物生態学会第31回大会、2016年10月23~25日、横須賀市文化会館(神奈川県・横須賀市)

林 昌平、井藤 和人、巢山 弘介、寒天培地上でシアノバクテリアを増殖させる *Bacillus subtilis* 168 の関与遺伝子の同定、日本微生物生態学会第29回大会、2014年10月22~24日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

〔その他〕

林 昌平、寒天培地上での微生物間相互作用に関する研究、島根大学お宝研究、2016、41

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

林 昌平 (HAYASHI, Shohei)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：20725593