

博士論文

細菌の寒天培地でのコロニー形成への脂肪酸の関与とその応用

納庄 一樹

-目次-

第 1 章 序論

1. 1. 研究の背景	1
1. 2. 当研究室のこれまでの研究	12
1. 3. 本研究の目的	18

第 2 章 *E. coli fabB* 変異株の解析

2. 1. 緒言	19
2. 2. 材料と方法	24
2. 3. 結果	30
2. 4. 考察	45

第 3 章 様々な細菌における脂肪酸合成阻害時のコロニー形成能

3. 1. 緒言	47
3. 2. 材料と方法	48
3. 3. 結果	49
3. 4. 考察	58

第 4 章 飢餓状態の細菌のコロニー形成における脂肪酸の重要性

4. 1. 緒言	60
4. 2. 材料と方法	61
4. 3. 結果	66
4. 4. 考察	78

第 5 章 総括、総合討論と今後の展望

5. 1. 本研究の総括	80
5. 2. 総合討論	83
5. 3. 今後の展望	87

補章 脂肪酸の不足がコロニー形成を阻害する要因

6. 1. 緒言	90
6. 2. 材料と方法	92
6. 3. 結果	94
6. 4. 考察	111

論文の内容の要旨	113
----------	-----

引用文献	118
------	-----

謝辞	133
----	-----

第1章 序論

1.1. 研究の背景

1.1.1. 小さな巨人、微生物をめぐる大航海時代の幕開け

地球上に存在する原核生物の総数は 10^{30} 細胞以上にのぼり、その細胞の炭素の総量は数千億トンに達すると推定されている。この量は、地球上の植物全体が持つ炭素量に匹敵する (Whitman et al., 1998)。このように地球上に大量に存在する原核生物、とりわけバクテリアは、Carl von Linné 以来の高等動物・植物中心の生命観で想定される遺伝的多様性よりもはるかに莫大な多様性を示し、生命の系統樹の大部分を占めることが、近年の研究により明らかになっている (Hug et al., 2016; Woese et al., 1990)。

莫大な遺伝的多様性を有する微生物は、今でこそ我々の生活に欠かせない存在として脚光を浴びているが、その存在を人類が知るところになったのは、微生物の生きてきた地質学的時間から考えれば極めて最近の 17 世紀であり、それは Antonie van Leeuwenhoek が高性能な顕微鏡を開発したことによる (Porter, 1976; Smit and Heniger, 1975)。Leeuwenhoek は、その洗練された微細加工の技術をもって数百倍にも達する倍率のレンズを研磨・作製し、たった一滴の水の中にさえ大都市の人口を凌駕するほどの、目では見えなかった生物たちがうごめいていることを知った。彼はそれら目には見えない大きさの生物を「Animalcule」と名付け、微生物の存在を立証した。なお、今では彼が見たものの多くがバクテリアであることがわかっている。以来、科学界は Animalcule、すなわち微生物の存在を認知することになったものの、長らく人類はこれら微生物を取り扱うことはできず、それらが時に深刻な疫病を引き起こすこともあれば、食品の発酵や共生といった形で人類に陰ながら貢献していたことにすら気づいていなかった。彼ら「小さな巨人」が脚光を浴びるようになるのは、さらに 200 年後、ドイツ人医師 Heinrich Hermann Robert Koch の登場を待たねばならなかった。

微生物が固体の表面で 1 細胞から分裂して肉眼で見えるほどの密度で遺伝的に同一な細胞集団、すなわちコロニーを形成することは当時も知られていたが、確実にコロニー形成させる方法はまだ知られていなかった。Koch は、栄養素をゼラチン等で固めた固体培地を利用することで、今で言う single colony isolation、すなわち雑多な微生物の入り混じった

試料の中から目的の微生物を単離し、純粋培養することに成功した。さらなる試行錯誤の結果、固化剤としては寒天がとりわけ有用であることを見出し、寒天培地を用いた純粋培養法を基に様々な病原菌の単離に成功した (Blevins and Bronze, 2010; Hitchens and Leikind, 1939; Koch, 1882)。これを受けて、多くの微生物学者が Koch に倣い、寒天培地を用いた微生物の単離に乗り出した。莫大な数の微生物資源をめぐる大航海時代の幕開けである。以来、100 年以上にわたって微生物学者達は、寒天培地を利用することで、人体を含むありとあらゆる環境から様々な微生物をコロニーとして単離してきた。人類は、ようやく地球上に横たわるこの膨大な生物資源の末端に手が届くようになり、今や微生物の利用は、医薬品産業、食品産業、排水処理産業をはじめとする様々な分野に浸透し、我々の生活に欠かせないものとなっている。

1. 1. 2. 膨大な微生物資源に手が届かない…伝統的コロニー分離法の限界

寒天培地を用いた純粋培養法によって数々の微生物が単離・培養されるようになった一方で、当初から、Sergei Winogradsky をはじめとする環境微生物学者らは、自然環境中の大半の微生物が実験室環境では培養できないことに気づいていた。19 世紀半ばには、自然環境から得られる試料では、顕微鏡下で直接観察した細胞数に比べて、寒天培地上で生じるコロニー数が著しく低いことが正式に報告された (Razumov, 1932; Skinner et al., 1952)。

自然環境中の微生物のほとんどがコロニーを形成しないという事実に対して、当初は、顕微鏡で見える微生物の大半は死菌ではないかという疑いも強かった。これについて、Kogure らは、次に述べるような画期的な生菌数の計数法を提唱し、生きているバクテリアのほとんどがコロニー形成しないことを定量的に実証した (Kogure et al., 1979)。Kogure らは、DNA gyrase の阻害剤である nalidixic acid を利用することで、分裂能を有するバクテリアを顕微鏡下で直接計数することを試みた。海水試料に微量の Yeast extract と nalidixic acid を添加して培養すると、生きた細胞（特に桿菌）は、ゲノム DNA の複製が阻害されるため分裂ができないもののタンパク質合成は行うため、その結果として伸長してフィラメント様の細胞形態を示すはずである。彼らは、このようなフィラメント様の形態を示した細胞を、nalidixic acid がなければ増殖していた細胞、すなわち生きた細胞であ

るとみなして生菌数の指標（Direct count of viable bacterial cells, DVC）とした。彼らの調査した海水試料では、寒天培地上でのコロニー形成数は、DVC の値よりも 2~3 桁程度低かった。こうして、自然界の生きたバクテリアのほとんどがコロニー形成しないという経験則は疑いのない事実となった。これは、Koch 以来の伝統的な寒天培地による微生物の分離法に限界があることを示していた。

以来、様々な自然環境で得られた試料において、顕微鏡下で観察される細胞数に比べてコロニー形成数が 1~5 桁程度にわたって低いことが次々と報告され、このような細胞数とコロニー形成数との大きな乖離を指して The Great Plate Count Anomaly と呼ぶようになった (Amann et al., 1995; Staley and Konopka, 1985)。この問題に対し、次項で述べる様々な工夫によって培養効率を向上させ、扱える微生物種を拡大せんとする試みがなされてきたものの、コロニー形成できない根本的な原因はほとんどわかっていない。我々は、現行のコロニー形成に依存する固体培養法では遺伝子や生体分子の多様性に富む膨大な微生物資源の大部分に手が届かないという問題に直面しているのである。

これ以降の議論では、一般的な環境に棲息し、かつ従来の固体培養法ではコロニーを形成しない微生物についての議論を進める。それらの大部分は、バクテリアドメインに属する微生物であることから、本論文においてはバクテリアドメインの微生物のことを「細菌」と表記する。

1. 1. 3. 未培養微生物を培養する試み

前項で述べたように、自然界の微生物の大半は生きていても培養できない（あるいは培養しにくい）状態にある。その原因は人工的な培養条件の不完全さにあるとの考えから、以下のような培養条件の改善によって培養効率を向上させ、未培養微生物を培養しようとする様々な試みがこれまでに実施されてきた。

自然環境を模倣した培養系

第一のアプローチは、自然環境に近い培養条件を用意することである。

自然界の多くの環境は栄養分をほとんど含まない貧栄養条件であるのに対して、実験室で使用する培地の多くは C 源や N 源などが豊富な培地である。このような培地では、栄養素が高濃度過ぎるがゆえに、貧栄養な環境に適応した微生物は生育できない可能性がある。この考えを反映して、貧栄養培地を用いることで自然環境からの微生物の培養効率の増大に成功した例が知られている (Button et al., 1993; Ingeborg et al., 2001; Ohta and Hattori, 1980; Schut et al., 1993)。特に、Giovannoni らのグループは、海水そのものをベースにごく微量の栄養素を加えただけの貧栄養液体培地を用い、なおかつ Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) によって検出感度を上げた培養系を組むことで、従来の平板培養法の 10~1000 倍にも達する高い培養効率を実現した (Connon and Giovannoni, 2002)。彼らはまた、メタゲノム解析では海洋表層で圧倒的に優占していることが示されているにもかかわらず、培養例のなかった α -Proteobacteria 綱の SAR11 clade に属する細菌の純粋培養にも成功し、*Pelagibacter ubique* という学名を提唱している (Rappé et al., 2002)。さらに、同様のアプローチで、それまで培養例のなかった候補門 VadinBE47 に属する細菌の培養に成功し、正式な学名 *Lentisphaera* 門を提唱し、認定されている (Cho et al., 2004)。

一方、Epstein らのグループは、環境中に存在する何らかの物質が、土着の微生物の増殖には必要なのではないかと考え、もとの生育環境で (*in situ*) 培養するというアプローチを取った (Kaeberlein et al., 2002)。すなわち、海底堆積物からの微生物試料を 0.03 μm 径のポアサイズのメンブレンフィルターで囲ったチャンバーに接種し、これをもとの海底堆積物上に静置して培養することで、自然界に存在する増殖に必要な何かしらの物質が行き来できるような系 (diffusion chamber) を用意した。一週間後に回収してチャンバー内の微生物の増殖を確認すると、実験開始時に顕微鏡下で計数した細胞の 40% 近くが増殖しており、いくつかの未培養微生物の分離にも成功した。

共培養

実験室での培養法は、複数種の微生物が混じり合った天然の環境とは異なり、単一細胞に由来する純粋培養を主としている。したがって他の微生物種と共生状態にある微生物は、それらの共生相手のいない純粋培養系では生育できない可能性が高い。例えば、Beppu ら

が *Symbiobacterium thermophilum* と名付けた細菌は、*Bacillus* 属細菌との共培養時にしか寒天培地上で生育しない (Suzuki et al., 1988)。後に、*S. thermophilum* は、他の細菌からの炭酸イオンの供給を生育に要していたこと (Watsuji et al., 2006)、さらに *S. thermophilum* が生産する indole 誘導体が自身の生育を抑制しており、*Bacillus* 属の細菌はその無毒化に寄与していたことが明らかとなった (Watsuji et al., 2007)。

Zinser らのグループは、それまでほとんど培養例の知られていなかった *Prochlorococcus* 属シアノバクテリアが、共培養によって培養できることを示した (Morris et al., 2008)。*Prochlorococcus* 属は、北緯 40°から南緯 40°にわたる世界中の海水圏で検出されているにもかかわらず、当初、そのうち純粋培養に成功したものは 2 株しかなかった。Zinser らが調べた *Prochlorococcus* 属の一種、*Prochlorococcus marinus* MIT9215 は、 10^5 cell/mL 以上の植菌密度なら液体培地で純粋培養できるが、通常の寒天培地ではほとんどコロニー形成しない。しかし、同細菌は、海洋中の別種の従属栄養細菌との共培養時には、ほぼ 100%のコロニー形成頻度を示していた。のちに、同グループによって、この効果は従属栄養細菌によって産生されるカタラーゼによる活性酸素種の除去が要因であったことが明らかにされた (Morris et al., 2011)。

Lewis らのグループは、共培養することで生育が大きく増大するような細菌二株のペアのスクリーニングを行い、それらの相互作用を解析したところ、別種の細菌が放出する siderophore がもう一方の細菌の生育を支えていることを明らかにした (D'Onofrio et al., 2010)。

以上は原因物質が同定された共培養の例であるが、他にも、原因物質は明らかになっていないものの共培養によって初めて培養に成功した例が知られている。例えば、*Actinomyces* 属の細菌との共培養によって候補門 TM7 に属する新規細菌が (He et al., 2015)、*Sphingopyxis* 属の細菌 (GF9) の培養上清を添加することで新属細菌 *Catellibacterium nectarophilum* (Tanaka et al., 2004; Tanaka et al., 2005) がそれぞれ分離培養された。なお、後者の GF9 の培養上清は、*Leucobacter* 属の未培養細菌の生育も促進することが知られており、これについては、GF9 によって生産される zincmethylpyrin や coproporphyrin 誘導体が生育促進物質であることが同定されている (Bhuiyan et al., 2016)。

固化剤の検討

Koch 以来、培地の固化剤としては寒天が最も広汎に用いられてきたが、近年、異なる組成の固化剤を用いるアプローチが試みられている。特に gellan gum は自然界からの微生物の分離において有用性が高く、コロニー形成数および取得できる微生物叢が増大することが報告されている (Janssen et al., 2002; Tamaki et al., 2009; Tamaki et al., 2005)。

上記について、寒天プレート上でのコロニー形成数が gellan gum プレート上でのコロニー形成数よりも低くなる原因については不明であったが、近年、寒天とリン酸成分を共にオートクレーブすることによって過酸化水素が生じることが原因の一つであることが明らかになった (Tanaka et al., 2014)。また寒天には、特定の細菌の培地表層での遊走を阻害する物質が含まれていることが報告されている (Hara et al., 2012)。

Microdevice の活用

近年の微細加工技術の発達によって、細菌のサイズに適合した microdevice の作製が可能となり、これらを微生物の分離培養に応用しようとするアプローチがある。その先駆けとして、Zengler らは、雑多な細胞の入り混じった環境試料から細胞ひとつひとつをゲル状の microdroplet に閉じ込めて分離した上で、貧栄養培地で培養する方法を開発した (Zengler et al., 2002)。彼らの手法で実際にどれほどの未培養微生物が取得できるかについては未だ議論の余地があるが、一細胞を分離した上で培養するというアイデアは、以下に記す研究成果のような「培養系の小型化」という形で発展し、自然界からの微生物の high-throughput な培養を可能にしている。

Ingham らは、百万もの well からなる micro-petri dish を作製し、その well 内で微生物を純粋培養することで high-throughput な培養を実現した (Ingham et al., 2007)。Ma らは、同様に数千個の微小な well からなる microfluidic chip を作製し、培養とともに DNA sequencing を組み合わせることで、特定の微生物種を狙った high-throughput な培養系を開発した (Ma et al., 2014)。彼らは、実際にこの方法で、Human Microbiome Project において最も分離培養の求められている細菌の一種の培養に成功した。さらに、既に述べた Epstein らのグループは、自身の開発した diffusion chamber を小型化し、high-throughput

化することに成功した (Nichols et al., 2010)。それは diffusion chamber 型の数百の well からなる chip (iChip と命名された) で、そこに一細胞を閉じ込めてもとの自然環境中に静置して培養することで多数の未培養微生物の培養に成功している。さらに、iChip を利用した抗生物質生産菌の大規模なスクリーニングを実施し、実際に新規の抗生物質を発見した (Ling et al., 2015)。Teixobactin と名付けられたその抗生物質は、細胞壁合成に関わる peptidoglycan 生合成経路および teichoic acid 生合成経路の二つを同時に標的として阻害する。この特性から、彼らの調べた範囲では Teixobactin 耐性菌の出現は確認されず、医療現場での安全な使用が期待されている。

その他の特筆すべき未培養細菌の培養例

ここまで述べてきた方法以外にも、柔軟な発想に基づいた創意工夫によって未培養微生物の培養に成功した例がいくつもある。

中でも、門レベルの新規細菌の分離例としては、例えば、Zhang らによる「重い細菌種」に狙いを絞った画期的な分離培養方法がある (Zhang et al., 2003)。彼らは、低速遠心処理によって試料から「重い細菌種」のみを分離し、貧栄養培地での培養を試みた結果、これまで培養例のなかった候補門 BD (あるいは KS-B) に属し、ポリリン酸を蓄積する新規細菌 *Gemmatimonas aurantiaca* の分離培養に成功した。彼らは、この *G. aurantiaca* を基準株に、候補門 BD に対して学名 *Gemmatimonadetes* 門を提唱し、認定されている。これとは別に、Geissinger らは、0.2 μm 径のポアサイズのメンブレンフィルターを通る大きさであることが鍵となって、シロアリ腸内から候補門 TG1 に属する極小細菌、*Elusimicrobium minutum* の分離培養に成功し、同門に対し学名 *Elusimicrobia* 門を提唱、認定されている (Geissinger et al., 2009)。他にも、候補門 OP5 に属する新規細菌 *Caldisericum exile* (Mori et al., 2009) や候補門 OP10 に属する *Armatimonas rosea* (Tamaki et al., 2011) の培養例など、培養成功の要因 (あるいはなぜこれまで培養できなかったか) が正確には解明されていないものの、研究者の不断の努力によって、候補門に属する新規性の非常に高い細菌の培養に成功した例が知られている。

その他、新門レベルの新規細菌の分離培養にまでは至っていないものの、cyclic AMP の添加や N-acyl homoserine lactones の添加によっても培養効率が增大することが知られている (Bruns et al., 2002; Bruns et al., 2003; Busmann et al., 2001)。

以上のように、画期的なアイデアによる培養に関する多くの革新と知見が蓄積している。しかし、次項に述べる培養に依らず環境中の微生物種の多様性を知る技術の発展の結果、これまでに人類が培養に成功した微生物は、どんなに多く見積もっても全体の 1%未満で、大多数の微生物は未だ培養に成功していないことが明らかになっている (Achtman and Wagner, 2008; Gans et al., 2005; Hug et al., 2016; Rappé and Giovannoni, 2003; Rinke et al., 2013; Torsvik et al., 1990)。なぜほとんどの微生物が培養できないのか、その根本的な原因の解明が望まれている。

1. 1. 4. 培養に依存しないアプローチ

近年の sequencing 技術の発展に伴い、培養を経ずに自然環境中の微生物叢の遺伝情報を直接取得するメタゲノム解析が台頭している。メタゲノム解析は、1998 年に提唱され (Handelsman et al., 1998)、その後すぐに DeLong らの研究グループによって、海水圏の微生物叢の生態系を対象とした解析手法として確立された (Béjà et al., 2000b)。さらに DeLong らは、同技術を応用することで、SAR86 系統の未培養細菌のゲノムから、bacteriorhodopsin に類似した新規の rhodopsin の遺伝子を同定し、proteorhodopsin と名付けた (Béjà et al., 2000a)。続いて、Venter らのグループが、Sargasso 海域の微生物叢を対象に、shotgun sequencing を利用した大規模なメタゲノム解析に乗り出した (Venter et al., 2004)。彼らは、同海域では proteorhodopsin を有する細菌が優占していることを示し、proteorhodopsin によって ATP 合成を行う細菌が生態系での物質循環、特に炭素循環に大きな役割を果たすことを示唆した。こうした一連の研究成果によって、培養非依存的なメタゲノム解析が、生態系の理解に有用であることが実証され、メタゲノム解析は一躍脚光を浴びるようになった。

以来、様々な自然環境で、培養非依存的に微生物叢の遺伝的多様性を知ろうとする試みがなされ、その結果、未だ培養に成功していない膨大な微生物資源の姿が明らかになりつつある (Achtman and Wagner, 2008; Gans et al., 2005; Hug et al., 2016; Rappé and Giovannoni, 2003; Rinke et al., 2013; Torsvik et al., 1990)。しかしメタゲノム解析は決して万能ではなく、メタゲノム解析で得られる配列情報のみでは、既知遺伝子との相同性が低い未知遺伝子の機能推定は難しい。事実、Venter らの報告では、得られた配列情報から推定される ORF の 69%が既知遺伝子との相同性を持たない未知の機能を有するものであった (Venter et al., 2004)。また、たとえ環境中に存在する遺伝子を全て把握できたとしても、それらが実際にどのように影響しあって生態系を構成するのか、その全容を知ることは到底不可能であり、今もなお、微生物を分離培養するという伝統的なアプローチの重要性は微塵も損なわれていない。近年、メタゲノム解析で得た代謝情報などをもとに新規微生物の培養に成功した例が報告されており (Bomar et al., 2011; Pope et al., 2011)、今後、配列情報を活用した分離培養技術の発展が期待されている。

1. 1. 5. Viable but non-culturable (VBNC) な細菌

VBNC の概念

1. 1. 2 項で述べたように、Kogure らによって自然界の細菌は、DVC をはじめとする各種の生理活性を持つにもかかわらず、そのほとんどがコロニー形成しないことが明らかになった。しかしこれはあくまで自然界に存在する培養できない細菌、すなわち未知の細菌の生理状態であって、我々に馴染みの深い *Escherichia coli* といった培養の容易な細菌とは明確に異なる状態であると思われていた。ところが、Kogure らの報告を受けてすぐに、Colwell らのグループは、実験室での培養が容易なはずの *E. coli* や *Vibrio cholerae* の実験室株でも、見かけ上同様の表現型、すなわち生菌数とコロニー形成数とに大きなギャップを生む状態があることを報告した (Xu et al., 1982)。すなわち、*E. coli* および *V. cholerae* の実験室株を長期間飢餓条件におくと、それらの細胞は、Kogure らが示した DVC をはじめとする各種の生理活性は保っているにもかかわらず、栄養条件の整った寒天培地に接種してもそのほとんどがコロニー形成しなくなるのである。彼らは、このように生理活性を持つ

にもかかわらず培養できない細菌の生理状態を「Viable but non-culturable (VBNC) 状態」と呼ぶことを提唱した (Colwell et al., 1985; Roszak et al., 1984)。

Colwell らの報告以降、様々な細菌において VBNC 状態の報告が相次ぎ、飢餓以外にも、低温条件 (Pawlowski et al., 2011; Wolf and Oliver, 1992) や pH 変化 (Cunningham et al., 2009)、浸透圧ストレス (Wong and Liu, 2008)、酸化ストレス (Arana et al., 1992; Cuny et al., 2005) などの様々な環境要因が VBNC 状態を誘導することがわかった。また VBNC 状態にある細胞が、呼吸活性 (Lleò et al., 2000; Oliver and Bockian, 1995) や転写活性 (Lleò et al., 2000) を有すること、さらにはタンパク質合成も行っている証拠 (Lleò et al., 1998; Rahman et al., 1994) が見つかり、VBNC 状態にある細胞は確かに生きているとの証拠が DVC 以外にも数多く蓄積した。こうして、VBNC の概念は広く浸透し、今では 80 種以上の細菌が特定の条件によって VBNC 状態に陥ることがわかっている (Li et al., 2014)。

VBNC 状態の重要性

VBNC 状態にある細菌は、生理活性を保ちながらも通常の寒天培地上ではコロニーをつくらないという知識が広く普及した現在でも、食品衛生や医療の現場での病原細菌の検出 (公定法等) には、コロニー形成に依存した平板培養法を用いる場面が多い。しかし、Colwell らが示した *E. coli* や *V. cholerae* の病原性株以外にも、*Aeromonas hydrophila* (Mary et al., 2002; Rahman et al., 2001) や *Listeria monocytogenes* (Besnard et al., 2000; Besnard et al., 2002)、*Vibrio vulnificus* (Linder and Oliver, 1989) をはじめとする数々の病原細菌が VBNC 状態に陥ることが知られており (Li et al., 2014)、これらは平板培養による検出・監視を逃れて人体内に侵入した後、増殖を再開して病原性を発揮する可能性がある。実際に、いくつかの病原菌では、特定の条件下で VBNC 状態から復帰して増殖を再開することが知られている (Maalej et al., 2004; Nilsson et al., 1991; Oliver and Bockian, 1995; Oliver et al., 1995)。したがって食品衛生や医療の現場では、VBNC 状態に陥った病原細菌の検出とその原因解明は極めて重要な課題となっている。

上記とは別に、VBNC 状態は自然界に存在する細菌の生理状態に大きな示唆を与えるといった意味で非常に重要である。すなわち、VBNC 状態にある細菌と自然界の培養できな

い細菌には、背景に共通した分子メカニズムが存在するのではないかと考えられる。もしそうであるならば、実験室株における VBNC 状態を引き起こす分子メカニズムの解明は、自然界の細菌が培養できない原因の一部を明らかにするはずである。

以上のような背景から、以下に記すような VBNC 状態を引き起こす分子メカニズムに迫ろうとする研究が知られている。

VBNC 状態を引き起こすメカニズム

本項の最初で述べた通り、細菌の VBNC 化を引き起こす外的要因としては、飢餓をはじめとする様々な環境要因やストレス条件が知られている。一方で、VBNC を誘導する内的要因、すなわち分子メカニズムはほとんど知られていない。

そもそも VBNC 状態とは、細菌にとってどのような意義があるのだろうか。種々のストレス因子に対し、様々な細菌が VBNC 状態という見かけ上は同じような生理状態を一貫して示すことから、「VBNC 状態は多くの細菌で保存された一種の生存戦略である」という意見があるものの、「VBNC 状態は細菌が死に向かう途中過程でしかない」という主張もある。後者については直接的な証拠がほとんど報告されていないが、前者を支持する報告はいくつかある。例えば、VBNC 化する際には転写系やタンパク合成系に明確な変化が見られることが知られており、これらは VBNC 化が特異な細胞状態の変化を伴うことを示唆している (Asakura et al., 2007; Heim et al., 2002; Lai et al., 2009)。また、様々なストレス応答反応の制御因子 σ^s をコードする *rpoS* (Hengge-Aronis, 1993; Lange and Hengge-Aronis, 1991; Paolo et al., 2014) の欠失が VBNC 化を促進すること (Boaretti et al., 2003; Kusumoto et al., 2012)、および polyphosphate kinase 1 (Gangaiah et al., 2009) や glutathione S-transferase (Abe et al., 2007) が VBNC 化に関わることが知られている。これらは、VBNC 化が遺伝的に制御された生物学的応答であることを示唆しているが、いずれも背景にどのような分子メカニズムがあるのか、その解明にまでは至っていない。

1. 2. 当研究室のこれまでの研究

1. 2. 1. 固体培養と液体培養での生育に差を生む遺伝的要因

大半の微生物が寒天培地上ではコロニー形成しない問題について、当研究室では、*E. coli* ですら VBNC 状態に陥ってコロニー形成能を失うという事実注目し、「細菌がコロニーを形成しない」ことには普遍的な原因があると仮定した。そして、*E. coli* において DVC とコロニー形成数との間に大きなギャップを生む原因を解明すれば、自然界の細菌がコロニー形成できない原因の一端が明らかになると期待した。

DVC は、定義上、海水中つまり液体条件での分裂能を示したものである。そこで、当研究室では、液体培養ならば固体培養に比べて大きな培養効率を得られるのではないかと素直な考えのもとに研究を開始した。そのしばらく後、当研究室と同様の考えに基づいた研究から、特に海洋細菌では、一般的に液体培養の方が固体培養よりも多数の細菌を分離培養できるとの報告があり、これを利用した未培養微生物の分離例が続出した (Button et al., 1993; Connon and Giovannoni, 2002; Rappé et al., 2002; Schut et al., 1993; Shigematsu et al., 2009; Shigematsu et al., 2007)。

これらの報告を吟味すると、固体培地での増殖時と液体培地での増殖時とでは細菌の生理状態が大きく異なっており、固体培地でのコロニー形成には、液体培養時には現れない何らかの障壁が存在することが示唆される。ここから、そのような障壁を乗り越えてコロニー形成に至るためには、液体培地での増殖には必要の無い (あるいは重要性の低い) 何らかの生物学的な機能が必要なのではないかと予想した。当研究室では、その機能が特定の遺伝子に支配されるのではないかと考えた。これらの仮説が正しければ、「固体培地でコロニー形成しないが、液体培地でなら生育できる *E. coli* 変異株」が取得できるはずである。その変異株の原因遺伝子を同定・解析することで、なぜ大多数の細菌が固体培地上ではコロニー形成しないのか、その根本的な原因を解明することができる。

以上の考えのもと、当研究室では次のようなスクリーニングを行ってきた。

1.2.2. 温度感受性変異株ライブラリーからのスクリーニング

まず、スクリーニングの目標を、「大きく低下するコロニー形成頻度と比較して、液体培地での増殖頻度が高く保たれている」という表現型の変異株と定め、温度感受性 (temperature-sensitive, ts) 変異株ライブラリーの中から、この表現型の変異株を求めた。使用したライブラリーは、*E. coli* PA3092 株に対する *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) による処理の結果、必須遺伝子に点変異が入ることで、常温 (25-30°C) では親株と同様に生育できるものの、高温 (39-42°C) では生育できなくなった変異株のライブラリー (Hirota collection) である (Isono et al., 1976)。ただし、ここでいう生育とは固体培地におけるコロニー形成能のことであり、ライブラリー株の高温域における液体培地での生育は網羅的には調べられていない。

当研究室の安原および池端は、Fig. 1-1 に示す実験系、すなわち各変異株の複数段階の希釈液を固体培地と液体培地とに植菌して制限温度 (39°C or 41°C) で培養することによって、固体培養と液体培養とで増殖頻度に大きな差を生じる変異株を探した (安原幸司, 2007; 池端佑仁, 2010)。

安原によるスクリーニング

安原は、合計 1432 株について、41°C における固体培養と液体培養での増殖頻度を比較し、大きな差が生じる変異株を 2 株分離した。これらに対し、*E. coli* の全 ORF を載せた mobile plasmid ライブラリーを利用した相補試験 (Saka et al., 2005) を行ったところ、それぞれ *fabB* あるいは *polA* 遺伝子が相補された場合にのみ、固体培養と液体培養での増殖頻度の差が解消した。*fabB* (ORF は 1221 bp) は β -ketoacyl-ACP synthase I (KAS I) をコードし、長鎖の不飽和脂肪酸の合成に必須の遺伝子である (Cronan et al., 1969; Garwin et al., 1980a, b; Zhang and Rock, 2016)。一方、*polA* (ORF は 2787 bp) は DNA 修復に関わる DNA polymerase I をコードする (Bessman et al., 1958; Fijalkowska et al., 2012; Lehman et al., 1958)。分離した変異株の各遺伝子を sequencing したところ、*fabB*^{ts} 株は *fabB* ORF の 653 番目の C が T に置換したミスセンス変異 (GCC→GTC、Ala→Val) を持ち、*polA*^{ts} 株は *polA* ORF の 651 番目の G が A に置換したサイレント変異 (GAG→GAA) と 1631 番目

の G が A に置換したミスセンス変異 (GGT→GAT、Gly→Asp) を持っていた (Table 1-1)。

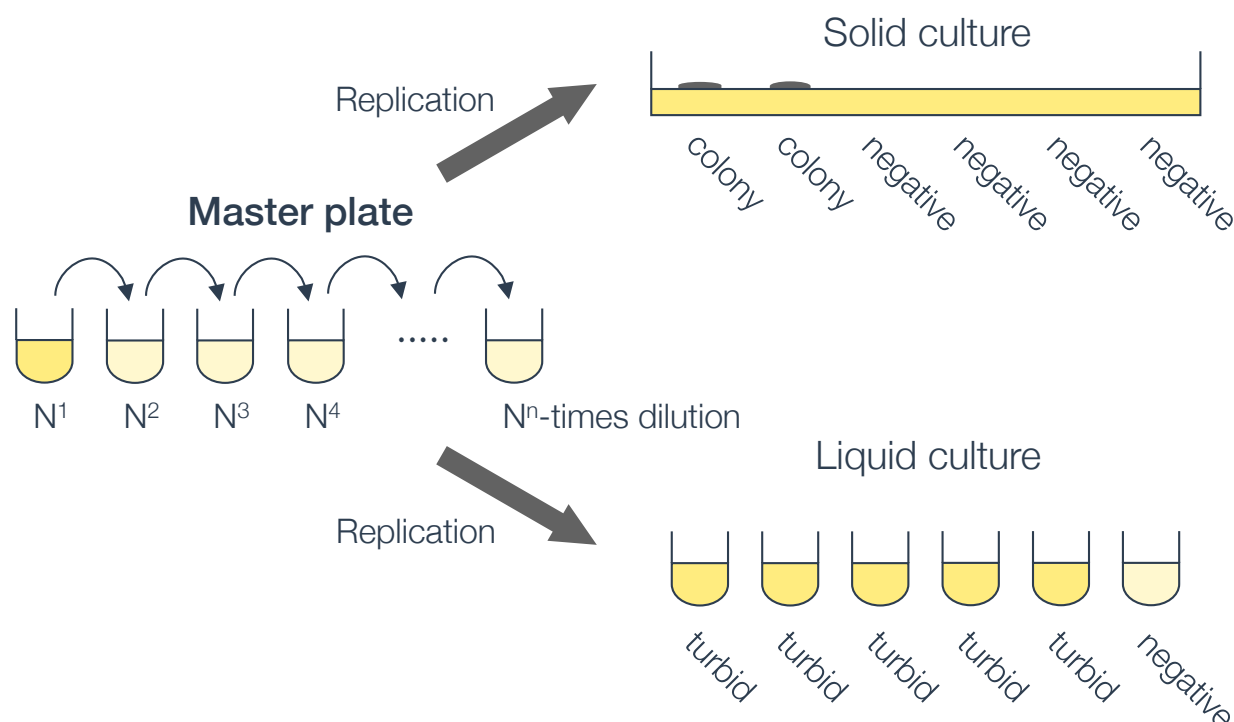


Figure 1-1. 温度感受性変異株ライブラリーからのスクリーニング方法

Hirota collection の各株を 30℃ で終夜培養した培養液を段階希釈 (N 倍ずつ n 回希釈) した。作業は 96-well microtiter plate で行い、調製後の希釈液は 96-multiwell pipetter を用いて、等量ずつ固体培地および液体培地に植菌し、制限温度 (安原は 41℃, 池端は 39℃) で静置培養した。2-3 日間の培養後、固体培地ではコロニーが、液体培地では濁りが確認できる最大の希釈段階 (n) を比較し、両者に 2 段階以上の差があった株を、固体培養と液体培養で生育差のある候補株として採用した。例えば、図に示すように、固体培地では N² 倍希釈液までしかコロニーが確認できないのに対し、液体培地では N⁵ 倍希釈液まで濁りが確認できるという場合である。なお、安原は N=29, n=5 で、池端は N=31, n=6 で希釈系列を調製した。

Hirota collection は MNNG で変異処理した変異株ライブラリーなので、一つの変異株のゲノムには多数の変異が入っていると考えるをえない。それゆえ、分離した株の表現型は、*fabB* あるいは *polA* 以外の遺伝子に入った変異との協働によってもたらされた可能性が残る。そこで、分離した株の *fabB^{ts}* および *polA^{ts}* の変異を pRed/ET Recombination system (Gene Bridges GmbH) を利用して *E. coli* MG1655 株に導入して、*fabB^{ts}* または *polA^{ts}* のみの効果を調べようとしたが、取得できたのは *E. coli* MG1655 株ベースの *fabB^{ts}* 株のみであ

った。この株では、固体培養と液体培養での増殖頻度に差が出たため、スクリーニング結果の正しさが確認できた。

Table 1-1. 安原および池端の分離した ts 変異株とその原因遺伝子における変異点

Responsible gene	Mutation	Origin
<i>fabB</i>	C653 to T, Ala218 to Val	安原幸司, 2007
<i>polA</i>	G651 to A; G1631 to A, Gly544 to Asp	安原幸司, 2007
<i>fabB</i>	G95 to A, Gly32 to Glu	池端佑仁, 2010
<i>folD</i>	G281 to A, Gly94 to Asp	池端佑仁, 2010
<i>folE</i>	G359 to A, Gly120 to Asp	池端佑仁, 2010

池端によるスクリーニング

続く池端は、41°C よりも緩やかな制限温度でなら、より多くの ts 変異株が固体培養と液体培養での増殖頻度に差を示すと予想して、39°C という制限温度でスクリーニングを行った。池端は、1167 株から、固体培養と液体培養での増殖頻度に顕著な差を示す変異株を新たに複数分離した。それら分離株の原因遺伝子の特定と表現型の確認を安原と同様の方法で行ったところ、再現性よく固体培養と液体培養での増殖頻度に差が出た株は、*fabB*、*folD* および *folE* 遺伝子における点変異が原因の株であると同定された。ここで分離された *fabB*^{ts} 株は、*fabB* ORF の 95 番目の G が A に置換したミスセンス変異 (GGG→GAG、Gly→Glu) を持ち、安原の分離した *fabB*^{ts} 株とは異なる変異であった (Table 1-1)。一方、新たに分離された *folD*^{ts} 株および *folE*^{ts} 株は、それぞれ、867 塩基対の *folD* ORF のうちの 281 番目の G が A に置換したミスセンス変異 (GGC→GAC、Gly→Asp)、および 669 塩基対の *folE* ORF のうちの 359 番目の G が A に置換したミスセンス変異 (GGC→GAC、Gly→Asp) を含むもので (Table 1-1)、それぞれ bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase (D'Ari and Rabinowitz, 1991) および GTP cyclohydrolase I (Burg and Brown, 1968; Katzenmeier et al., 1991; Yamamoto et al., 2003) をコードし、いずれも tetrahydrofolate およびその誘導体の合成・代謝に関わる。

次に池端は、*fabB*、*folD*、*folE* の単独での機能を探るために、*E. coli* BW25113 株をベースにして各遺伝子を破壊した株を作製しようとした。ただし、各遺伝子は必須遺伝子とされるものなので、単純には完全欠失株は得られない。そこで、まず各遺伝子の ORF を、mini-F plasmid pKLJ12 (Jones and Keasling, 1998) の Arabinose promotor P_{BAD} の下流に挿入した plasmid を作製した。これらの plasmid を *E. coli* BW25113 株に導入して、Arabinose で各タンパク質の生産を誘導した上で、ゲノム上の各遺伝子を Kanamycin resistance gene と置換することで完全欠失株 (BW25113- $\Delta fabB$ + pKLJ12-*fabB*, BW25113- $\Delta folD$ + pKLJ12-*folD* および BW25113- $\Delta folE$ + pKLJ12-*folE*) を作製した。これらの株のうち、BW25113- $\Delta fabB$ + pKLJ12-*fabB* は、Arabinose 無添加、すなわち FabB を生産しない状態で、固体培養と液体培養での増殖頻度に顕著な差を示した。また、Arabinose の添加による FabB の生産時には、固体培養と液体培養での増殖頻度の差はなくなった。ただし、親株と比べると全体的に生育は悪かった。一方、BW25113- $\Delta folD$ + pKLJ12-*folD* および BW25113- $\Delta folE$ + pKLJ12-*folE* は、Arabinose 無添加条件でも添加時と変わらぬ生育、かつ親株と同等の生育を示した。

三井による *fabB* 完全欠失株の作製とその解析

E. coli の *fabB*^{ts} 株は、脂肪酸合成経路の同定と解明が盛んであった 1960~1980 年代に多数分離されており、それらは制限温度でも oleic acid を添加すると生育することが知られていた (Cronan et al., 1969; Garwin et al., 1980b)。そこで当研究室の三井は、必須遺伝子である *fabB* の欠失株も oleic acid の供給下であれば作製可能であると考え、実際に MG1655 野生株をベースにして作製に成功した (三井智玄, 2013)。三井の作製した MG1655- $\Delta fabB$ 株は、200 μ g/mL の oleic acid を供給すると LB 固体培地でも LB 液体培地でも野生株と同様の生育を示した。しかし、oleic acid のない LB 固体培地ではコロニーを全く作らないのに対し、LB 液体培地では肉眼でも濁りが確認できる程度 (約 10^6 - 10^7 cells/mL) の増殖を示した。

さらに三井は、長鎖不飽和脂肪酸 (palmitoleic acid と *cis*-vaccenic acid) の合成に必須な *fabA* の欠失株も同様の方法で作製した。FabA の機能については、第 2 章第 1 節で述べ

る。MG1655- $\Delta fabA$ 株は、MG1655- $\Delta fabB$ 株よりも到達濁度は小さかったものの、液体培地でのみ増殖した。

また三井は、寒天 (agar) に MG1655- $\Delta fabB$ 株の生育を阻害する成分が含まれる可能性を疑った。agar から水抽出した成分を加えると、液体培地でも MG1655- $\Delta fabB$ 株が増殖しなくなることを示した。また一方で、agarose にはそのような成分は含まれないことを示した。しかし、agarose を固化剤に用いた固体培地でも MG1655- $\Delta fabB$ 株は増殖せず、液体培養との生育差は埋まらなかった。以上から三井は、固体培養と液体培養における MG1655- $\Delta fabB$ 株の生育差は、agar に含まれる生育阻害成分以外に、培養条件の違いによる生理状態の違いに起因すると結論した。

以上の三名の研究結果から、当研究室では、 $\Delta fabB$ 株および $\Delta fabA$ 株こそ長年探索してきた「固体培養でコロニー形成しないが、液体培養で増殖できる変異株」の一つであり、脂肪酸の合成が固体培養と液体培養での生育差に強く関わっていると結論した。

1. 3. 本研究の目的

前節で述べた *fabB* 変異株を用いた一連の実験は、改めて考えると、固体培養と液体培養の生育差に関して定量性に乏しい。またいずれも *E. coli* の変異株における結果であり、未だ細菌一般における現象を説明していない。そこで本研究では、これらの変異株のより定量的な解析からはじめて、*E. coli* 野生株を含む細菌一般においても、脂肪酸の不足時に固体培養と液体培養での生育差が見られるかを検証し、自然界の細菌がコロニー形成しにくい普遍的な要因の解明とその応用を目指した。

本論文の第 2 章では、安原および池端の分離した *ts* 変異株のさらに定量的な解析を進めるとともに、三井の作製した $\Delta fabB$ 株の詳細な解析を行った。その結果、*E. coli* が固体培地で増殖してコロニー形成に至るためには、液体培養での増殖時に比べて多量の脂肪酸を必要とすることがわかった。第 3 章では、脂肪酸合成阻害剤を用いることで、*E. coli* だけではなく、系統的に離れた *Bacillus subtilis* や *Corynebacterium glutamicum* でも、脂肪酸不足時には固体培養と液体培養での生育に大きな差が生じることを示し、細菌一般のコロニー形成にとっての脂肪酸合成の普遍的な重要性を示した。さらに第 4 章では、飢餓状態に陥った *E. coli* や土壌細菌がコロニー形成しない主要な要因の一つが、脂肪酸の関わる生理機能の不足にある可能性を示した。また、効率的な脂肪酸供給方法の開発とともに、その応用展望を示した。

最後に、第 5 章で本研究の総括と総合討論、そして今後の展望を述べる。また補章として、*E. coli* において脂肪酸合成が不足すると、なぜ固体培養と液体培養での生育差が生じるのか、その背景にある要因の解明に迫った一連の実験結果を付記した。

第2章 *E. coli fabB* 変異株の解析

2.1. 緒言

本章では、当研究室の前任者らによって分離・取得されていた *fabB*^{ts} 変異株と *fabB* 欠失株の表現型に関してさらなる解析を進めるとともに、特に固体培養と液体培養での増殖と脂肪酸との関係を定量的に調べることで、脂肪酸合成が *E. coli* のコロニー形成にとってどのような重要性を持つのかを検証する。

本節では、*E. coli* の脂肪酸の利用、ならびに脂肪酸の生合成経路について述べる。

E. coli の利用する脂肪酸

E. coli は、長鎖脂肪酸としては主に Fig.2-1 に示す三種の脂肪酸、すなわち飽和脂肪酸である palmitic acid と、不飽和脂肪酸である palmitoleic acid および *cis*-vaccenic acid を合成・利用する (Mansilla et al., 2004; Marr and Ingraham, 1962)。

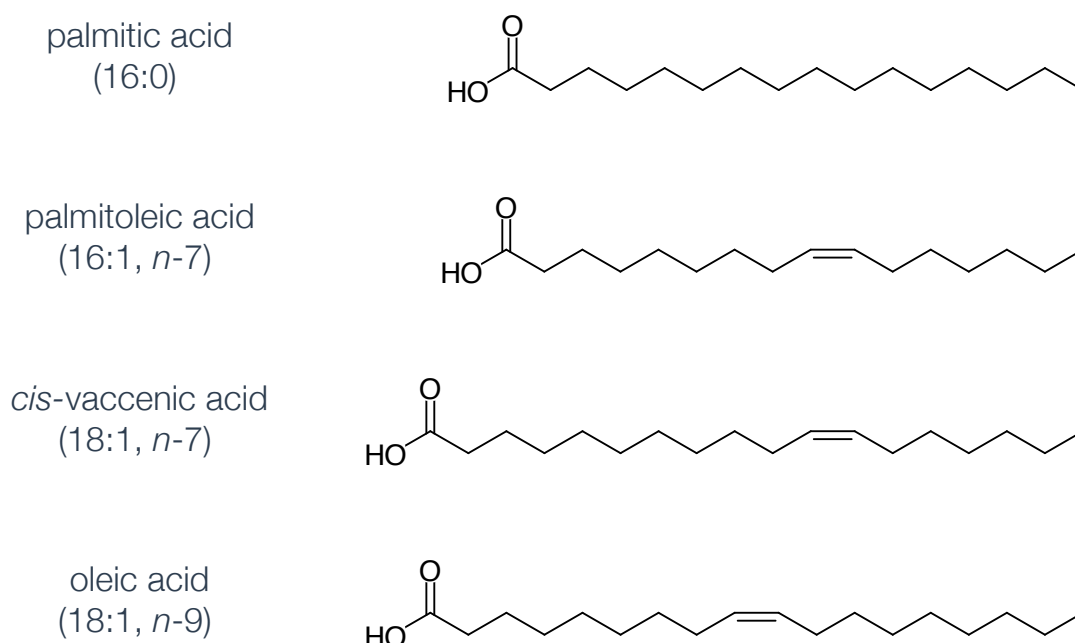


Figure 2-1. *E. coli* の利用する主な脂肪酸と oleic acid

E. coli は、図に示した palmitic acid、palmitoleic acid および *cis*-vaccenic acid を長鎖脂肪酸として主に利用する。本研究の実験では、*cis*-vaccenic acid の代わりに、不飽和結合の位置が2つ隣の oleic acid を主に代用した。

細胞膜リン脂質中の飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸の比率は温度の低下によって増大するが、そのほとんどは *cis*-vaccenic acid の生合成量の増大に由来する (Cronan, 1975; de Mendoza et al., 1983; Marr and Ingraham, 1962)。リン脂質の生合成の初発反応を担うのが細胞膜に結合している glycerol-3-phosphate 1-O-acyltransferase (PlsB) であり (Lightner et al., 1980)、PlsB の活性は ppGpp により阻害される (Heath et al., 1994)。また近年、SpoT と Acyl carrier protein (ACP) との相互作用が SpoT に依存した ppGpp 合成をもたらし、脂肪酸合成を抑制することが示された (Battesti and Bouveret, 2006, 2009)。このように、脂肪酸合成とリン脂質合成は協調的に機能している。

fabB 変異株の生育は、*cis*-vaccenic acid とは不飽和結合の位置が二つ隣である oleic acid の添加で回復する (Cronan et al., 1969; Garwin et al., 1980b)。これは、oleic acid が外膜に存在する long-chain fatty acid outer membrane porin (FadL) によって細胞内に取り込まれるためである (Nunn and Simons, 1978)。FadL は炭素数 12 から 18 の長鎖脂肪酸を取り込み、取り込まれた長鎖脂肪酸は CoA あるいは ACP と結合した後に各種の代謝系で利用される。

長鎖飽和脂肪酸の合成経路

E. coli における脂肪酸の合成の鍵反応は、acetyl-CoA carboxylase によって acetyl-CoA が carboxyl 化されて malonyl-CoA となり、さらに malonyl-CoA:ACP transacylase (FabD) によって malonyl-ACP に変換される反応である。malonyl-ACP は、Fig. 2-2 に示す脂肪酸の鎖長伸長反応サイクルにおいて、 β -ketoacyl-ACP synthase (KAS) が 2C 単位の伸長の基質として使い続ける物質である。*E. coli* は 3 種類の KAS を有し、それらは KAS I (FabB)、KAS II (FabF)、KAS III (FabH) である。

脂肪酸合成の最初は、malonyl-ACP が KAS III (FabH) による acetyl-CoA との縮合で acetoacetyl-ACP となる反応である。その後、 β -ketoacyl-ACP reductase (FabG)、 β -hydroxyacyl-ACP dehydratase (FabZ)、enoyl-ACP reductase (FabI) が順に作用して butanoyl-ACP を生じる。長鎖飽和脂肪酸は、この butanoyl-ACP が Fig. 2-2 の反応サイクルによって 2C 単位の付加を繰り返し受けて伸長されることで合成される。FabB (KAS I)

は、この反応サイクルの第一ステップである 2C 単位の付加を触媒する酵素であり、*E. coli* の生育には必須の酵素とされている (Cronan et al., 1969; Garwin et al., 1980a, b; Zhang and Rock, 2016)。

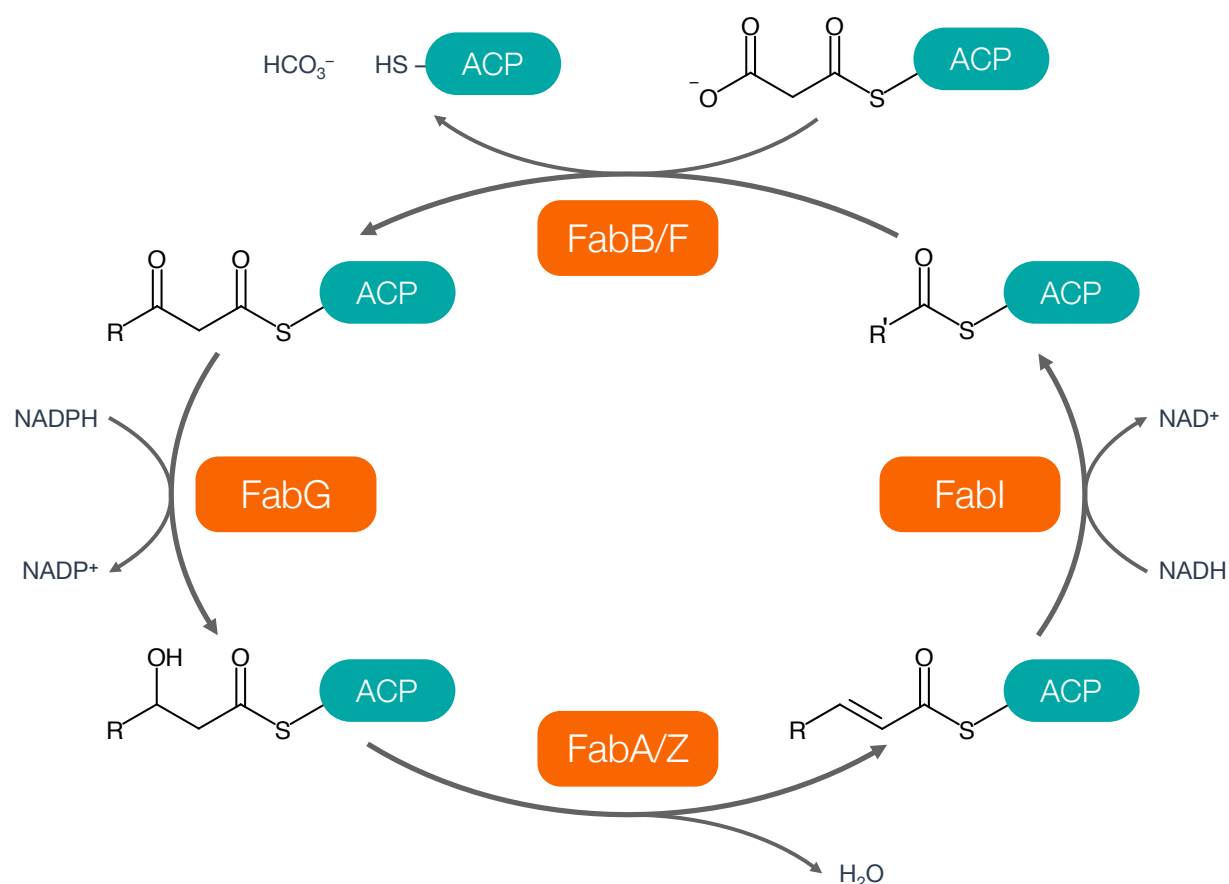


Figure 2-2. *E. coli* における脂肪酸合成の伸長サイクル

E. coli における脂肪酸の伸長サイクルの反応と各ステップに関わる酵素を示す。図のように、malonyl-ACP から 2C 単位が供給され、酸化還元反応を経て 2C 単位ずつ脂肪酸が伸長する。図は Zhang らによる Review (Zhang and Rock, 2016) を基に作図。

近年、Lin らによって、Fig.2-2 の反応サイクル、すなわち FabB は、*E. coli* における biotin 生合成にも関与することが明らかになった (Lin and Cronan, 2011; Lin et al., 2010)。Lin らは、biotin 合成に必須であるものの機能未知であった BioC が、malonyl-CoA と S-adenosyl-L-methionine から malonyl-CoA methyl ester を生成することを示した。malonyl-CoA methyl ester は、その後 KAS III (FabH) による malonyl-ACP からの 2C の付加を受ける

ことで Fig. 2-2 の反応サイクルに入り、FabB によって伸長されて pimeloyl-ACP methyl ester となる。この pimeloyl-ACP methyl ester を基に biotin が生合成される。biotin は、上記の acetyl-CoA carboxylase を含む様々な carboxylase の活性に必須の補酵素として機能し、脂肪酸合成のほか、アミノ酸代謝や炭酸固定などに関わる (Streit and Entcheva, 2003)。

長鎖不飽和脂肪酸の合成経路

長鎖不飽和脂肪酸の合成には FabA が関わる。FabA は、FabZ と同じく β -hydroxyacyl-ACP dehydratase として機能し (Heath and Rock, 1996; Silbert and Vagelos, 1967)、3-hydroxydecanoyl-ACP を *trans*-2-decanoyl-ACP へ変換する (Fig. 2-2, 2-3)。この *trans*-2-decanoyl-ACP に対して次にどの酵素が作用するかで、飽和脂肪酸合成と不飽和脂肪酸合成が分岐する。*trans*-2-decanoyl-ACP が FabI により還元されると長鎖飽和脂肪酸生合成が進むことになる。その一方で、FabA はある頻度で *trans*-2-decanoyl-ACP に対して *trans*-2-decenoyl-ACP isomerase 活性を示して *cis*-3-decanoyl-ACP を生じる (Fig. 2-3)。*cis*-3-decanoyl-ACP は、2 位と 3 位の炭素間が一重結合であるため FabB の基質となり、Fig. 2-2 の反応サイクルで伸長反応を受けて長鎖不飽和脂肪酸の生合成が進むことになる。つまり、炭素数 10 の段階で FabI が作用するか、あるいは FabA が isomerase としての作用を示すかによって飽和脂肪酸合成と不飽和脂肪酸合成の経路が分かれる。したがって、FabA は飽和脂肪酸合成と不飽和脂肪酸合成を振り分ける鍵酵素となっている。

不飽和脂肪酸の鎖長伸長反応サイクルでは、炭素鎖 16 までの伸長反応は FabB のみが触媒し、FabF (KAS II) は関与しないことが明らかにされている (Heath and Rock, 1996)。FabB による伸長反応によって palmitoleoyl-ACP が生成された後、これにさらに FabF による伸長反応が加わることで *cis*-vaccenoyl-ACP が生成される。

以上のように、FabB は FabA とともに不飽和脂肪酸の合成に必須の酵素である。そして、*fabB* 遺伝子と *fabA* 遺伝子は、共に FabR による転写抑制 (Zhang et al., 2002) と FadR による転写促進を受け (Campbell and Cronan, 2001; Henry and Cronan, 1991)、その発現量は協調して制御されている。FabR は unsaturated acyl-ACP と結合することで *fabB* と *fabA* に対してリプレッサーとして機能する。

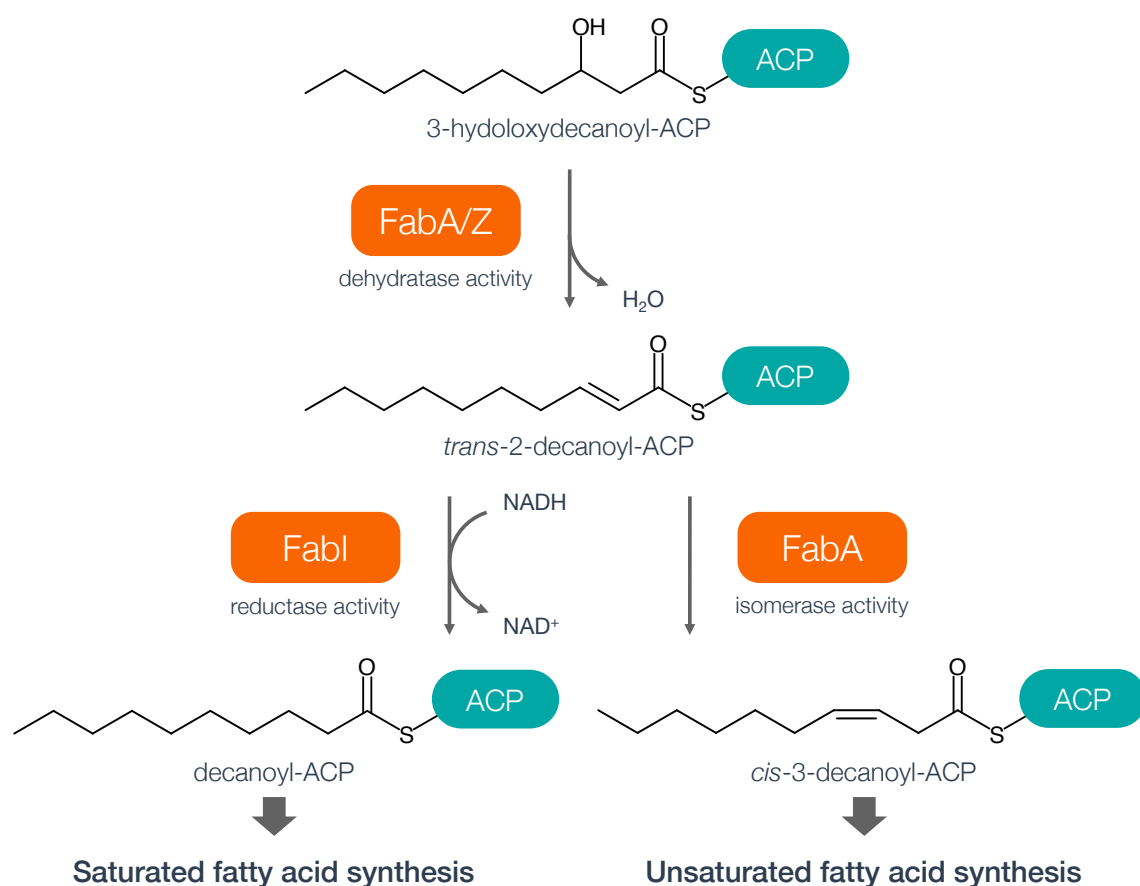


Figure 2-3. *E. coli* における飽和脂肪酸合成と不飽和脂肪酸合成の分岐点

E. coli における飽和脂肪酸合成と不飽和脂肪酸合成の分岐点となる FabA の作用点を示す。FabA が *trans*-2-decanoyl-ACP に対して isomerase 活性を示して *cis*-3-decanoyl-ACP を生じた場合は、右の経路で不飽和脂肪酸が合成される。図は Zhang らによる Review (Zhang and Rock, 2016) を基に作図。

以上の生合成反応から考えると、制限温度における *fabB*^{ts} 変異株では三種の脂肪酸の合成量が大きく減少し、*fabB* 欠失株では三種の脂肪酸のいずれもが合成されなくなると思われる。このことがどのような要因で固体培養と液体培養との生育差を生むのかに迫り、コロニー形成にとって重要な生理機能の解明を目指す。

2. 2. 材料と方法

2. 2. 1. 使用した菌株と培地

本研究では、過去に当研究室で分離されていた *E. coli* PA3092 株由来の *fabB^{ts}* 株および MG1655 株ベースの $\Delta fabB$ 株を使用した。また、本研究では MG1655 株を wildtype として使用する。なお、Hirota collection は *E. coli* PA3092 を *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) で処理して得た *ts* 変異株ライブラリーである (Isono et al., 1976)。

MG1655 : wildtype

PA3092 : *thr leu thi argH thy his trp str lacY mtl xyl malA mel tonA* 変異を有する K-12 株

PA3092-*fabB^{ts}*-1 : Hirota collection から分離した FabB-A218V 変異を持つ株

PA3092-*fabB^{ts}*-2 : Hirota collection から分離した FabB-G32E 変異を持つ株

MG1655- $\Delta fabB$: MG1655 の *fabB* を Red/ET recombination system による Kanamycin resistance gene との置換処理で破壊した株

培地として、以下のものを用いた。

LB (Lennox) 培地

10 g/L Bacto Tryptone (BD), 5 g/L Bacto Yeast Extract (BD), 5 g/L NaCl

M9CA 培地

6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 1 g/L NaCl, 1.0 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 5 g/L Vitamin Assay Casamino Acids (BD)

M9CAGlc 培地

M9CA 培地に 4 g/L D-Glucose を添加

M9CAGal 培地

M9CA 培地に 4 g/L D-Galactose を添加

SOC 培地

2% Bacto Tryptone (BD), 0.5% Bacto Yeast Extract (BD), 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM D-Glucose

なお、固体培地では、Bacto agar (BD) および agarose L03 (TAKARA) を終濃度 1.5% で添加した。

2.2.2. 使用した試薬

oleic acid は、10 mg/mL の Triton X-100 水溶液に 1、7.5、100、2000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で溶かし、それぞれの 1/100 量を培地に添加して用いた。palmitoleic acid および *cis-vaccenic acid* は、10 mg/mL の Triton X-100 水溶液に 2000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で溶かし、それぞれの 1/100 量を培地に添加して用いた。L-Arabinose は、5、25、50、100、200、400 mg/mL の水溶液とし、それぞれの 1/100 量を培地に添加して用いた。Kanamycin および Ampicillin は、それぞれ 20 および 100 mg/mL の水溶液を調製し、1/1000 量を培地に添加して用いた。また、PA3092 株および PA3092 株由来の *fabB^{ts}* 株の培養時には、終濃度 40 $\mu\text{g/mL}$ のチミンを培地に添加した。

2.2.3. MG1655- $\Delta fabB$ 株ベースの *fabB* 遺伝子発現調節株の作製

当研究室で作製されていた pKLJ12 (Jones and Keasling, 1998) の Arabinose promotor P_{BAD} の下流に *fabB* 遺伝子を挿入した plasmid である pKLJ12-*fabB* を用い、これを MG1655- $\Delta fabB$ 株に導入して *fabB* の発現を制御できる株を作製した。

まず plasmid の調製を次のように行った。pKLJ12-*fabB* を持つ BW25113- $\Delta fabB$ 株 (池端 佑仁, 2010) を 150 mL の LB 液体培地 (Arabinose 2 mg/mL, Kanamycin 20 $\mu\text{g/mL}$, Ampicillin 100 $\mu\text{g/mL}$) において 37°C で終夜振盪培養した。培養液 150 mL 全量を遠心して得た菌体ペレットから、HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) を用いて pKLJ12-*fabB* を抽出し、Milli-Q 水 20 μL に回収した。抽出方法は kit に記載の方法に従った。

次に、調製した pKLJ12-*fabB* 溶液を用いて、MG1655- $\Delta fabB$ 株を electroporation によって形質転換した。まず MG1655- $\Delta fabB$ 株を、10 mL の LB 液体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$, Triton X-100 100 $\mu\text{g/mL}$) において optical density (OD_{660}) が 0.4 に達するまで 37°C で振盪培養した。培養液全量を遠心 (9000 rpm, 4°C, 5 min) し、上清を捨てた。ペレットを氷冷した Milli-Q 水 1.5 mL に再懸濁して遠心 (9,000 rpm, 4°C, 5 min)、上清を捨てることでペレットを洗浄した。この洗浄操作を続けて 3 回行った。洗浄後、ペレットを Milli-Q 水 49 μL に懸濁し、調製した plasmid 溶液 1 μL を加えた。この菌液 50 μL を氷冷したキューベットに注ぎ、200 Ω 、1.8 kV、25 μF の電圧をかけて electroporation を行った。electroporation

には Gene Pulser 2 (Bio-Rad) を用いた。electroporation 後、ただちにキュベットに SOC 培地 900 μ L を加えて菌液を回収し、37°C で 90 min 静置することで plasmid 遺伝子の Ampicillin 耐性酵素の発現を誘導した。誘導後、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 μ g/mL, Triton X-100 100 μ g/mL, Arabinose 2 mg/mL, Kanamycin 20 μ g/mL, Ampicillin 100 μ g/mL) に菌液を散布、37°C で静置培養した。培養後、生じたコロニーを形質転換体として選択し、実験に用いた。

2.2.4. CFU と MPN の計測

固体培養における増殖可能菌数と液体培養における増殖可能菌数を、それぞれ colony-forming unit (CFU) および most probable number (MPN) として、以下の要領で算出して比較した (操作の概要を Fig. 2-4 に示す)。

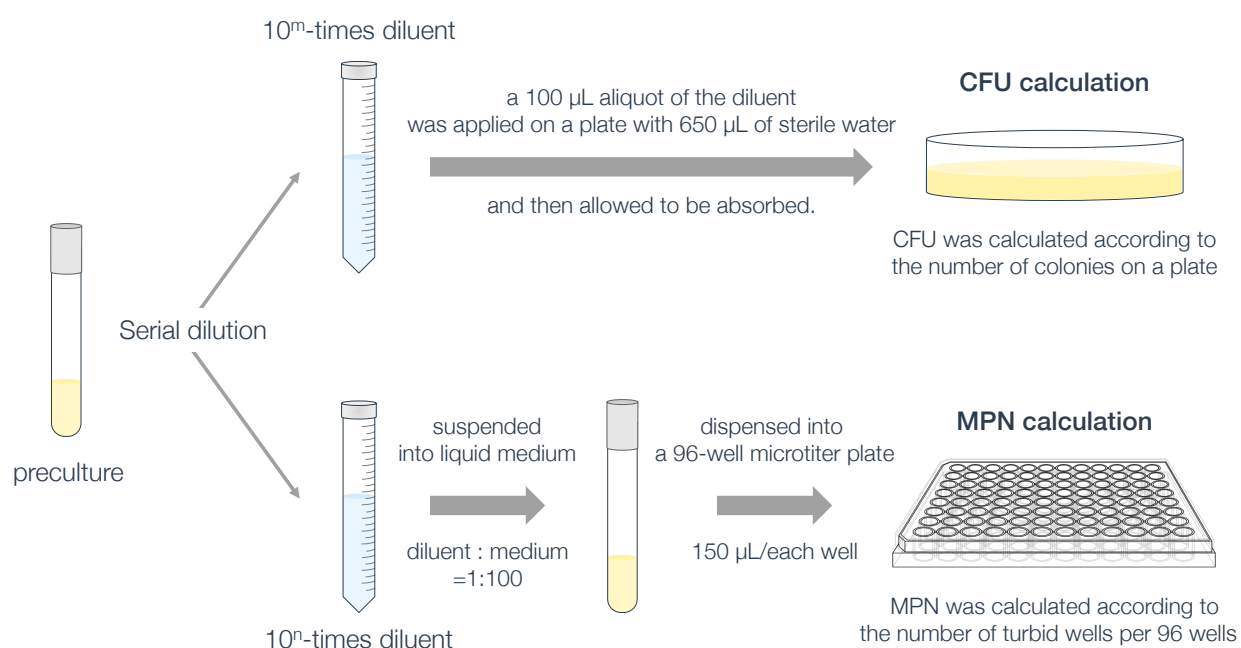


Figure 2-4. 固体培養における CFU と液体培養における MPN の算出方法

対数増殖後期の培養液を適宜希釈し、固体培地および液体培地にそれぞれ図のように植菌し、37°C で静置培養した。培養後、生じたコロニー数から CFU を、濁った well の数から MPN をそれぞれ算出し、もとの培養液 1 mL あたりの CFU と MPN に換算して比較を行った。

CFU の算出

OD₆₆₀ = 1.1-1.2 程度の対数増殖後期の培養液を、生理食塩水（0.9%）で適宜希釈し、この希釈菌液 100 μL を、固体培地 1 plate あたり 100 μL 散布する。ただし散布の際は、菌液の損失を無くして精度の高いデータを得るために、コンラージ棒は使用せず、代わりに菌液 100 μL とともに 650 μL の滅菌水を plate 上に散布し、plate を傾けることで表面に均一に菌液を散布した。クリーンベンチ内での風乾後、plate をパラフィルムでシールして 37°C で静置培養した。培養後、肉眼で観察できるコロニーを計数し、もとの培養液 1 mL あたりの CFU を算出した。

MPN の算出

OD₆₆₀ = 1.1-1.2 程度の対数増殖後期の培養液を、生理食塩水（0.9%）で適宜希釈し、この希釈菌液をその 100 倍量の液体培地に混和し、それらを 150 μL ずつ 96-well microtiter plate の各 well に分注した。分注後、96-well microtiter plate に蓋をしてパラフィルムでシールし、37°C で静置培養した。培養後、1 plate すなわち 96 well あたり肉眼で観察できる濁りが生じた well の数を計数し、以下の Poisson distribution に基づく計算式から、もとの培養液 1 mL あたりの MPN を算出した（別府輝彦, 1989）。

$$\lambda = \log_e 10 \times \log_{10} \frac{96}{96 - x}$$

λ: 1 well すなわち 150 μL の液体培地あたりの増殖可能菌数の平均値 (=MPN)

x: 96-well microtiter plate のうち、濁りの観察された well の数

2. 2. 5. 固体培養と液体培養におけるΔ*fabB* 株の増殖の比較

10 mL の LB 液体培地（oleic acid 20 μg/mL, Triton X-100 100 μg/mL）あるいは M9CAGlc 液体培地（oleic acid 20 μg/mL, Triton X-100 100 μg/mL）で終夜培養した MG1655 野生株およびΔ*fabB* 株の菌液を、生理食塩水（0.9%）を用いて適宜希釈した。希釈液 100 μL を、約 10 plates の固体培地および 10 mL の液体培地に散布・植菌し（散布方法は 2. 2. 4.項と同様）、37°C で静置培養（固体培地）および振盪培養（液体培地）した。この固体培地お

よび液体培地における MG1655 野生株と $\Delta fabB$ 株の細胞数の経時的な変化を、それぞれの次の要領で定量・比較した（操作の概要を Fig. 2-5 に示す）。

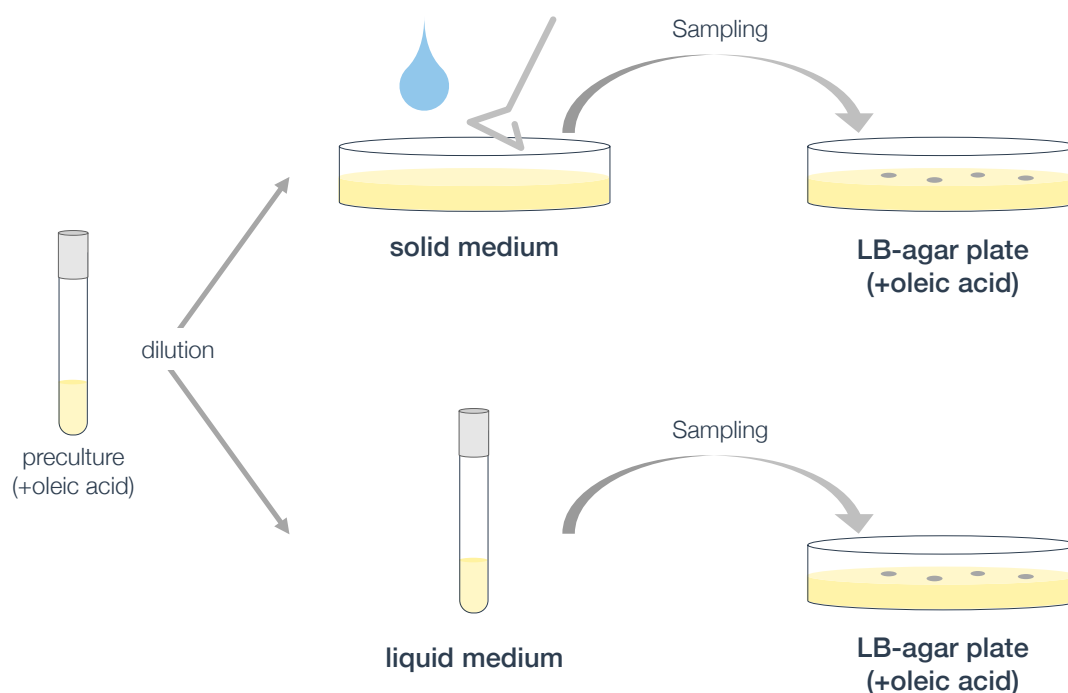


Figure 2-5. 固体培養と液体培養における細胞の増殖の比較方法

E. coli の前培養液を適宜希釈し、固体培地と液体培地に散布・植菌して培養。経時的に固体培地上および液体培地中の細胞を回収し、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の oleic acid を含む LB-agar 固体培地に散布して静置培養し、生じたコロニー数から、もとの固体培地上および液体培地中の細胞数の経時的な変化を推定する。

固体培養した細胞の計数

plate 表面上の菌を滅菌水とコンラージ棒を用いて洗い出して回収し、その菌液を適宜希釈して LB-agar 固体培地（oleic acid 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Triton X-100 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 固化剤: 1.5% Bacto agar）に散布し、37°C で静置培養した。なお、散布時には 2.2.4.項と同様、コンラージ棒は使わず、滅菌水 650 μL とともに菌液を散布して plate を傾けることで菌液を表面全体に均一に散布する方法をとった。終夜培養後、生じたコロニー数からもとの固体培地 1 plate あたりの菌数を算出した。これを一定時間ごとに 1 plate ずつ消費しながら繰り返すことで、固体培地上の細胞数の経時的な変化を追跡した。

液体培養した細胞の計数

培養液を回収して適宜希釈し、LB-agar 固体培地（oleic acid 20 µg/mL, Triton X-100 100 µg/mL, 固化剤: 1.5% Bacto agar）に散布し、37°C で静置培養した（散布方法は上記と同様）。終夜培養後、生じたコロニー数からもとの液体培地 1 mL あたりの菌数を算出した。これを一定時間ごとに繰り返すことで、液体培地中の細胞数の経時的な変化を追跡した。

2. 2. 6. 液体培養における $\Delta fabB$ 株の細胞数、生菌数、CFU の比較

10 mL の LB 液体培地（oleic acid 20 µg/mL, Triton X-100 100 µg/mL）あるいは M9CAGlc 液体培地（oleic acid 20 µg/mL, Triton X-100 100 µg/mL）で終夜培養した MG1655- $\Delta fabB$ 株を、生理食塩水（0.9%）を用いて適宜希釈した。希釈液 100 µL を、10 mL の液体培地に植菌し、37°C で振盪培養した。培養液を回収して適宜希釈し、培養液 1 mL あたりの細胞数、生菌数、CFU を次のように算出した。細胞数は、Multisizer3 Coulter Counter（Beckman Coulter）を用いて測定した。生菌数は、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit（Invitrogen）を用いた染色によって算出した生菌比率と細胞数との積により算出した。CFU は、菌液を LB-agar 固体培地（oleic acid 20 µg/mL, Triton X-100 100 µg/mL, 固化剤: 1.5% Bacto agar）に散布し、37°C で終夜静置培養した後（散布方法は 2. 2. 4.項と同様）、生じたコロニー数から算出した。これを一定時間ごとに繰り返すことで、培養液 1 mL あたりの細胞数、生菌数、CFU の経時的な変化を追跡した。

2. 3. 結果

2. 3. 1. *fabB^{ts}* 変異株の固体培養と液体培養における増殖頻度の比較

PA3092-*fabB^{ts}*-1 株と PA3092-*fabB^{ts}*-2 株について、非制限温度 (30°C) と制限温度 (39°C) における固体培養での増殖頻度と液体培養での増殖頻度を定量的に比較した (Fig. 2-6)。なお、固体培養における増殖頻度の指標としては colony-forming unit (CFU) を、液体培養における増殖頻度の指標としては most probable number (MPN) を用いた。

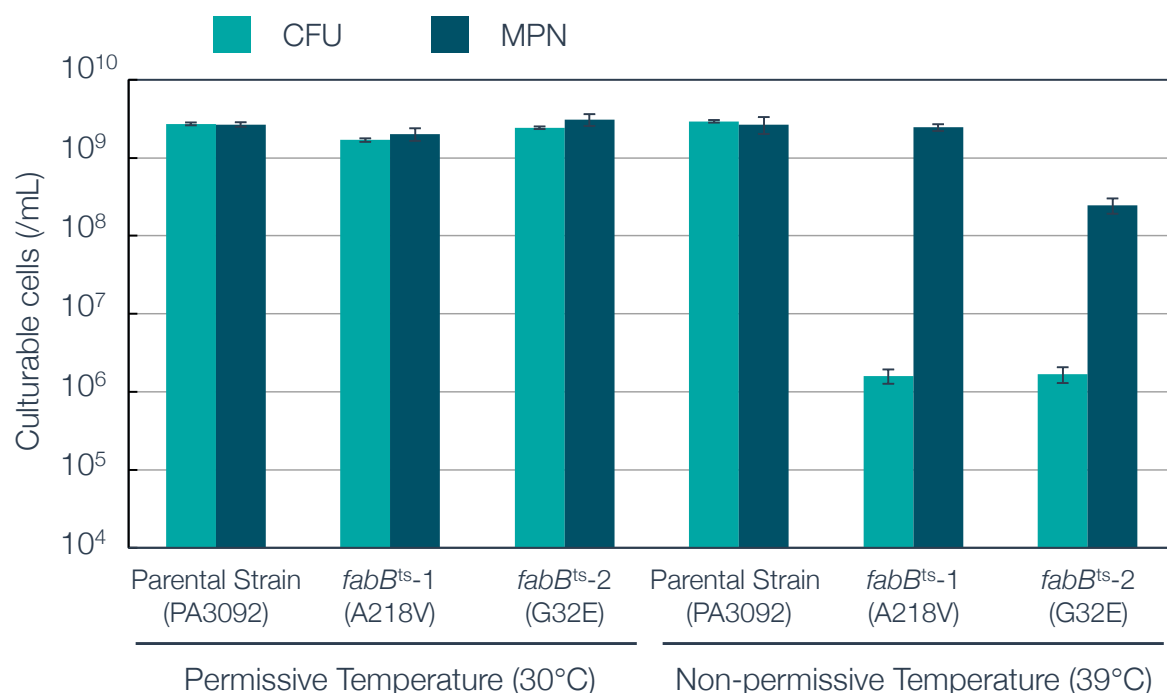


Figure 2-6. *fabB^{ts}*-1 株および *fabB^{ts}*-2 株の CFU と MPN

fabB^{ts}-1 株、*fabB^{ts}*-2 株およびその親株である PA3092 株を、10 mL の LB 液体培地において非制限温度である 30°C で対数増殖後期まで振盪培養した。これらの菌液を適宜希釈して LB-agar 固体培地および LB 液体培地に散布・植菌し、非制限温度 (30°C) および制限温度 (39°C) で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。各データは 4 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

まず、親株である PA3092 株は、CFU と MPN のいずれも 30°C でも 39°C でもすべて一定の値を示し、培養温度の違いも、固体培養と液体培養との違いも増殖頻度に変化をもたらさなかった。一方、*fabB^{ts}*-1 および *fabB^{ts}*-2 株は、非制限温度 (30°C) では CFU も MPN も親株である PA3092 株の値と同等の値を示し、固体培養と液体培養における増殖頻度に

差は見られなかった。一方、制限温度 (39°C) では、*fabB^{ts}*-1 株の MPN は非制限時と変わらなかったのに対し、CFU は 1/1000 程度に低下した。また、*fabB^{ts}*-2 株の制限温度における CFU の低下は *fabB^{ts}*-1 の示した低下と同程度であったが、この株では MPN も 1/10 程度に低下した。

以上より、FabB の担う脂肪酸合成機能が低下すると固体培養での増殖が液体培養時よりも大きく阻害されることが示された。*fabB^{ts}*-2 株のデータから、液体培養においても FabB の担う脂肪酸合成が重要であることは間違いないが、その要求量が固体培養と液体培養では異なると考えられる。この要求量の違いという点を理論化するにあたり、筆者は、通常の *E. coli* 野生株の培養時には観察されない増殖を阻む障壁が、脂肪酸の不足時には固体培養で特に顕在化するために、固体培養で増殖を開始できる細胞の割合が液体培養時に比べて大きく低下したのではないかと考えた。

2.3.2. $\Delta fabB$ 株の固体培養と液体培養における増殖頻度の比較

fabB^{ts} 株では、制限温度において FabB の機能がどこまで損なわれるのかが明確ではない。そこで、MG1655- $\Delta fabB$ 株を用いて、FabB 機能の完全欠損がもたらす CFU と MPN の変化量を調べることにした。MG1655- $\Delta fabB$ 株および MG1655 野生株を、oleic acid を添加した LB 液体培地で前培養し、その菌液を oleic acid を添加した LB 培地と添加しない LB 培地に植菌して培養した際の CFU と MPN を比較した (Fig. 2-7)。

$\Delta fabB$ 株は、20 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid を添加した培地では、CFU と MPN はいずれも野生株と同等の値を示し、固体培養と液体培養での増殖頻度に差は見られなかった。しかし、oleic acid を添加しない場合、固体培養ではコロニーを全く形成しなかったのに対し、液体培養では、野生株に大きく劣る値ではあるものの検出可能な MPN を示した。なお、液体培地における濁りはかなり薄かったが、これは三井の観察結果、すなわち「 $\Delta fabB$ 株は LB 液体培地では 10^6 cells/mL 程度の菌密度まで増殖する (三井智玄, 2013)」との報告と一致する。

では、脂肪酸を全く合成できないはずの $\Delta fabB$ 株がなぜ一定の菌密度まで増殖可能なのだろうか。おそらく、LB 培地の成分である Yeast extract に微量の脂肪酸が含まれており、

この微量の脂肪酸が $\Delta fabB$ 株の液体培養における増殖を支えたのであろう。つまり *E. coli* は、液体培養ではこの微量の脂肪酸を基に比較的多数の細胞が増殖を開始できる一方で、固体培養ではより強い増殖の障壁が存在するために、同量の脂肪酸だけではこの障壁を乗り越えることができず、ほぼ全ての細胞が増殖を開始できないと考えられる。

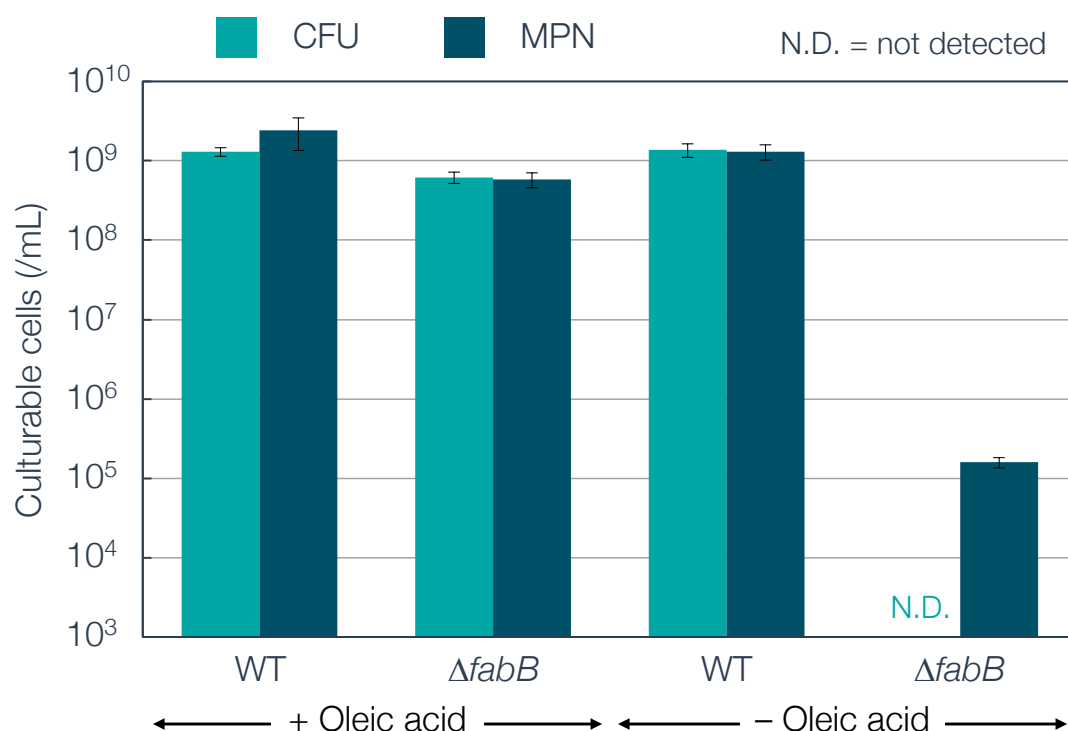


Figure 2-7. $\Delta fabB$ 株の CFU と MPN

MG1655- $\Delta fabB$ 株および MG1655 野生株を、10 mL の LB 液体培地 (oleic acid 20 μ g/mL) において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。これらの菌液を適宜希釈して LB-agar 固体培地 (+/- oleic acid 20 μ g/mL) および LB 液体培地 (+/- oleic acid 20 μ g/mL) に散布・植菌し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。各データは 4 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

2. 3. 3. $\Delta fabB$ 株が増殖に要求する不飽和脂肪酸

前項では oleic acid が FabB の欠損を補完できることが確認できたが、この脂肪酸は *E. coli* が生理的に用いているものではない (Fig. 2-1 参照)。そこで、細胞内で生合成される不飽和脂肪酸、すなわち palmitoleic acid および *cis*-vaccenic acid は、FabB の欠損に対して、oleic acid を上回る補完能を有するかを調べた (Fig. 2-8)。なお、本章第 1 節で述べた

が、palmitoleic acid は FadL によって細胞内に取り込まれた後に、その一部は FabF による鎖長伸長反応を受けて *cis*-vaccenic acid となると思われる。

その結果、palmitoleic acid および *cis*-vaccenic acid 添加時の CFU と MPN は、すべて oleic acid 添加時の値と同等であった。つまり、oleic acid が示す FabB 欠損の補完能は本来の脂肪酸が示す補完能と同等である。よって、これ以降の実験でも、最も安価な oleic acid を用いることとした。

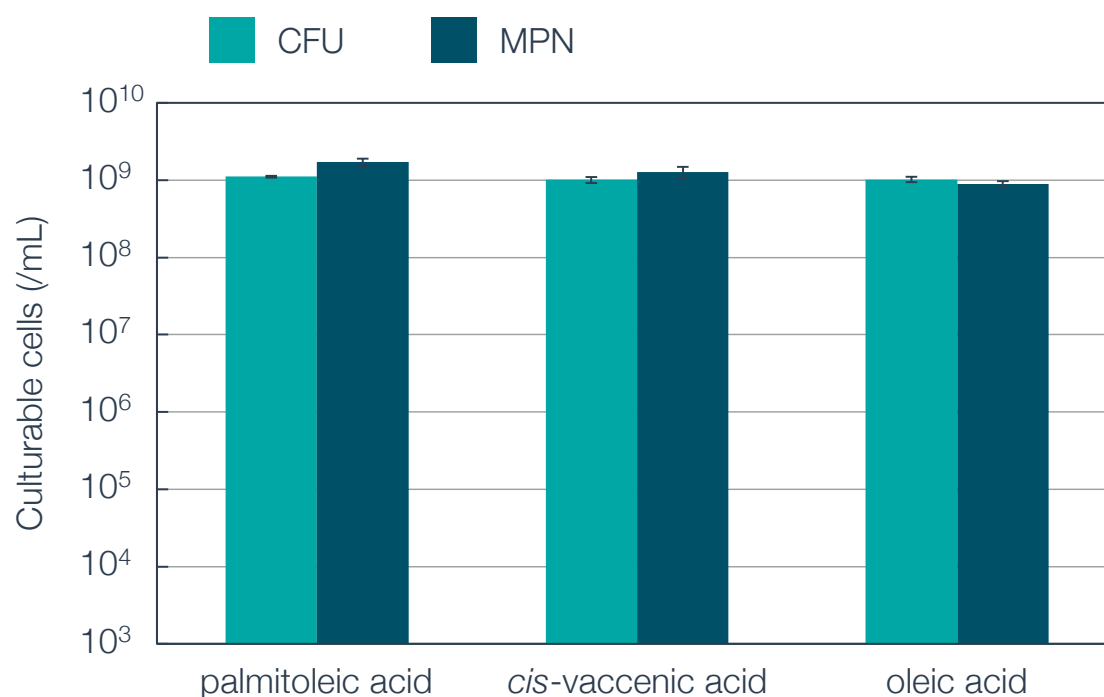


Figure 2-8. 生理的に用いられる不飽和脂肪酸を添加した培地における $\Delta fabB$ 株の CFU と MPN

MG1655- $\Delta fabB$ 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地（oleic acid 20 μ g/mL）において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。これらの菌液を適宜希釈して、20 μ g/mL の palmitoleic acid、*cis*-vaccenic acid および oleic acid を含む LB-agar 固体培地と LB 液体培地にそれぞれ散布・植菌し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）と液体培地での増殖可能菌数（MPN）を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

2.3.4. $\Delta fabB$ 株の固体培養と液体培養での増殖における脂肪酸要求量の違い

LB 培地ベースの固体培養と液体培養における $\Delta fabB$ 株の増殖の比較

ここまで、 $\Delta fabB$ 株の固体培養と液体培養における生育を CFU と MPN という指標を用いて比較してきた。しかし、CFU も MPN も肉眼で観察できる程度まで増殖した菌集団とならなければ検出できない数値である。したがって、Fig. 2-7 で oleic acid を添加しない条件でコロニーを検出できなかった事象が、本当に細胞が全く増殖していないことに由来するのか、あるいはある程度増殖してはいるものの目に見えない micro colony にしかっていないことに由来するのかは区別できない。目に見えない増殖の程度を知るために、固体培養における細胞数の変化を経時的に追跡する必要がある。そこで、 $\Delta fabB$ 株は、LB-agarose 固体培地上および LB 液体培地で、植菌後どの程度の細胞数まで増殖するのかを、2.2.5.項に示した方法で追跡した (Fig. 2-9)。なお、agar による $\Delta fabB$ 株に対する生育阻害効果 (三井智玄, 2013) を避けるため、ここでは agarose を固化剤とした固体培地を使用した。

その結果、 $\Delta fabB$ 株は、液体培養では植菌後速やかに増殖し、植菌数の約 10^4 倍以上、すなわち 10^5 cells/mL 以上の菌数まで増殖した。一方、固体培養では植菌数の 10 倍程度にしか細胞数は増大しておらず、培養開始時から数回程度の細胞分裂しかしなかったと考えられる。なお、コントロールとした MG1655 野生株は、固体培養と液体培養で同様の増殖速度および到達菌数を示していることから、実験系の定量性に問題はないと言える。

以上の結果から、*E. coli* は、固体培養における増殖には、液体培養よりも多量の脂肪酸を必要とすることが示唆された。これについて筆者は次のような要因を想定している。すなわち、LB 培地において $\Delta fabB$ 株は、液体培養では培地に含まれる微量の脂肪酸を基に増殖を開始し、脂肪酸を使い切るまで増殖できるが、固体培養では、同量の脂肪酸を利用して最初の数回の分裂は行うものの、少し脂肪酸を使った時点で増殖の障壁を乗り越えられなくなり、脂肪酸を使い切る前に分裂が停止してしまうのではなかろうか。

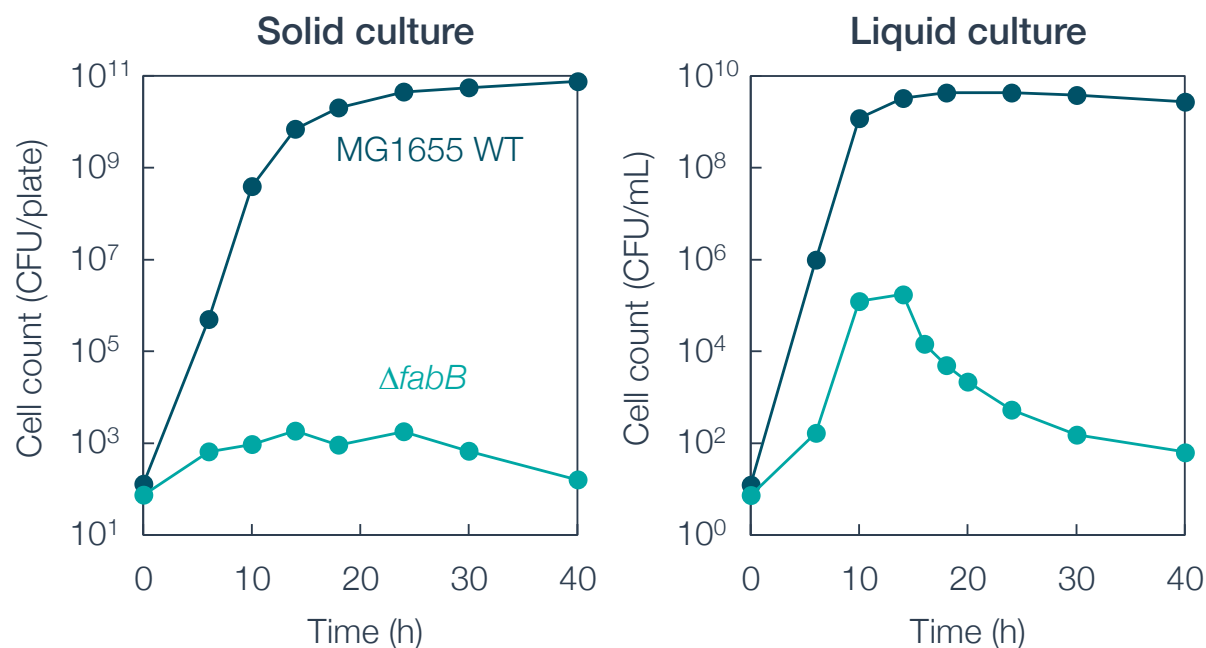


Figure 2-9. LB 固体培地および液体培地における MG1655 野生株と $\Delta fabB$ 株の増殖

10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) において 37°C で終夜振盪培養した MG1655 野生株および $\Delta fabB$ 株の菌液を、適宜希釈して 100 μL ずつ LB-agarose 固体培地および LB 液体培地に散布・植菌して 37°C で静置培養 (固体培地) および振盪培養 (液体培地) した。経時的に固体培地上および液体培地中の細胞を回収し、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) に散布して 37°C で終夜静置培養し、生じたコロニー数から、もとの固体培地 1 plate あたり、および液体培地 1 mL あたりの細胞数を推定した。

さて、筆者は上記のように「 $\Delta fabB$ 株は液体培養では脂肪酸を使い切るまで増殖する」と考えるのだが、増殖しきった細胞はその後に興味深い現象を見せる。すなわち、 $\Delta fabB$ 株の LB 液体培地における増殖では、CFU として 10⁵ cells/mL 以上まで細胞数が増大した後、急速にコロニー形成能が低下しているのである。先行研究でも同様の現象が報告されており、*fabA* および *fabB* の変異株は液体培地で一過的に増殖した後、濁度あるいはコロニー形成能の低下を示す (Broekman and Steenbakkens, 1974; Cronan and Gelmann, 1973)。ではこの CFU の低下は、 $\Delta fabB$ 株のほとんどが脂肪酸を使い切って死んだことに起因するのであろうか。これを検証するため、CFU が低下する際の細胞数と生菌数を、Multisizer3 での計測と LIVE/DEAD 染色によって算出し、CFU と比較した (Fig. 2-10)。

その結果、oleic acid を添加した LB 液体培地で培養した $\Delta fabB$ 株では、細胞数、生菌数、CFU の値が一致し、いわゆる順当な生育をしている (Fig. 2-10 左)。これに対して、oleic

acid を添加しない LB 液体培養では、CFU が最大値となる時点における細胞数と生菌数はともに CFU よりも 100 倍程度高い値を示し、CFU が急速に低下する際にも生菌数は一定に保たれていることが明らかとなった。すなわち、LB 液体培養において $\Delta fabB$ 株は微量の脂肪酸を基に細胞数として 10^7 cells/mL にまで達するが、そのほとんどが、oleic acid を十分供給した固体培地に散布しても増殖できない状態に陥っていることがわかった。また、CFU が最大値となった後に、生菌数と CFU との乖離が経時的に大きくなっていく現象は、見かけ上は、*E. coli* が VBNC 化する際に見せる現象と類似している。

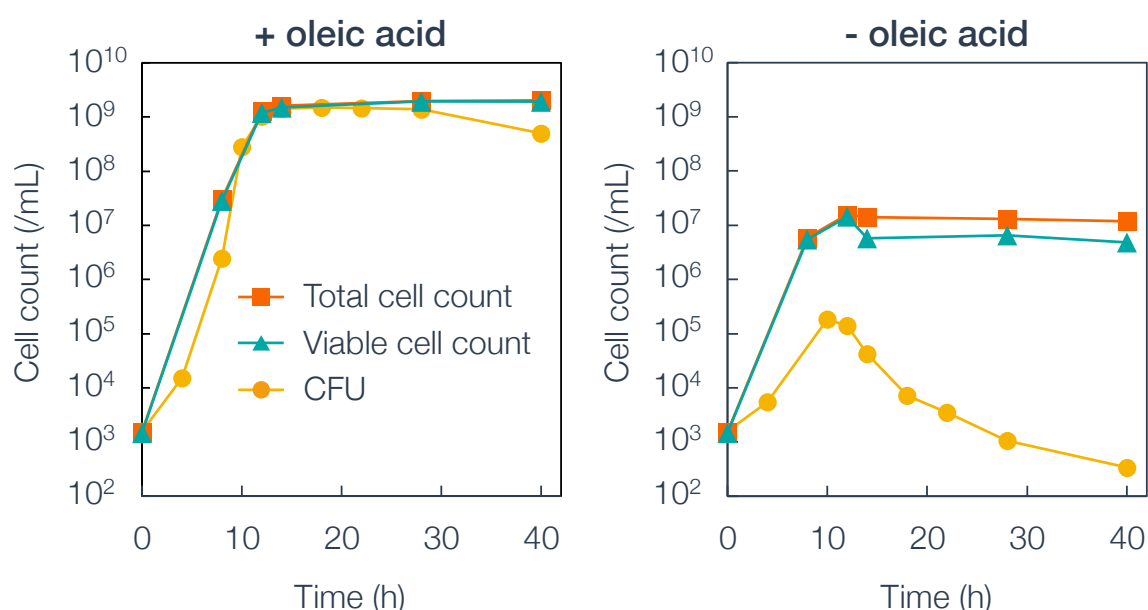


Figure 2-10. LB 液体培地における $\Delta fabB$ 株の細胞数、生菌数、CFU の推移

10 mL の LB 液体培地 (oleic acid 20 μ g/mL) において 37°C で終夜振盪培養した MG1655- $\Delta fabB$ 株の菌液を、適宜希釈して 100 μ L ずつ、20 μ g/mL の oleic acid を添加した (左図) あるいは添加しない (右図) LB 液体培地に植菌して 37°C で振盪培養した。経時的に液体培地中の細胞を回収し、液体培地 1 mL あたりの細胞数、生菌数、CFU を算出した。細胞数および生菌数は、それぞれ Multisize3 および LIVE/DEAD 染色によって算出した。CFU は、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 μ g/mL) に散布して 37°C で終夜静置培養し、生じたコロニー数から算出した。

M9CAGlc 培地ベースの固体培養と液体培養における $\Delta fabB$ 株の増殖の比較

すでに述べてきたように、LB 培地中の Yeast extract に微量に含まれる脂肪酸が、液体培養での $\Delta fabB$ 株の増殖を支えており、固体培養と液体培養では増殖に要する脂肪酸量が異なると考えられる。ここでは、これをより定量的に実証するため、LB 培地に代えて、脂肪

酸を全く含まない最少培地である M9CAGlc 培地を用いた。各種濃度の oleic acid を添加した M9CAGlc 固体培地と液体培地における $\Delta fabB$ 株の増殖を、Fig. 2-9 と同様の方法で比較することで、正確な脂肪酸量と増殖との関係を調べた (Fig. 2-11)。

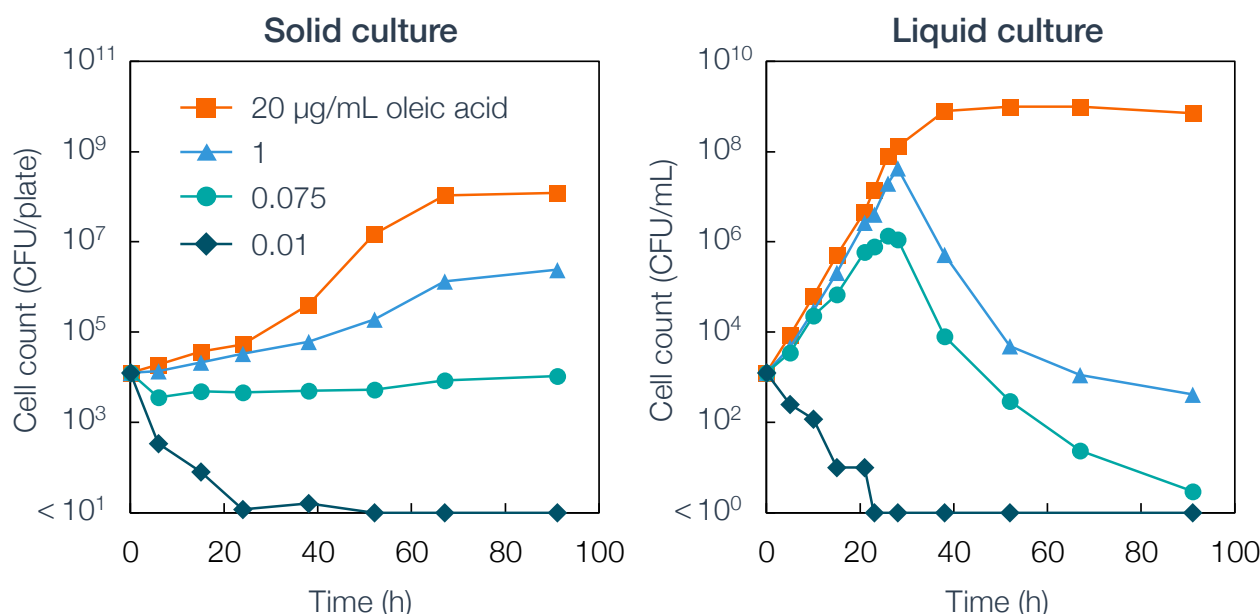


Figure 2-11. M9CAGlc 固体培地および液体培地における $\Delta fabB$ 株の増殖

10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) において 37°C で終夜振盪培養した MG1655- $\Delta fabB$ 株の菌液を、適宜希釈して 100 μL ずつ、各種濃度の oleic acid を含む M9CAGlc-agarose 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌して 37°C で静置培養 (固体培地) および振盪培養 (液体培地) した。経時的に固体培地上および液体培地中の細胞を回収し、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) に散布して 37°C で終夜静置培養し、生じたコロニー数から、もとの固体培地 1 plate あたり、および液体培地 1 mL あたりの細胞数を推定した。なお、実験データは、筆者の修士論文より引用している (納庄一樹, 2015)。

0.01 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid 添加時では、固体培養と液体培養のいずれでも増殖しなかった。0.075 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid 添加時には、固体培養での細胞数は植菌時から全く増加しないのに対し、液体培養では増加して植菌数の 10³ 倍以上に達した。1 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid 添加では、固体培養でも増加して植菌数の 10² 倍になったが、液体培養ではさらに大きく増加して植菌数の 10⁵ 倍以上に達した。さらに、20 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid 添加時には、固体培養でも植菌数の 10⁴ 倍以上に達して肉眼で見える程度の大きさのコロニーを形成していたが、液体培養ではさらに増大して 10⁹ cells/mL の菌密度に到達していた。

また、増殖速度に着目すると、固体培養では、全体的に増殖速度は oleic acid の濃度に強く依存しており、かつ液体培養に比べて大きく低下していた。一方、液体培養では、 $\Delta fabB$ 株の増殖速度は、最も低濃度の oleic acid 添加条件 (0.01 $\mu\text{g/mL}$) を除き、約 300 倍の濃度範囲で大きな差は見られず、到達菌密度は異なるものの一様に増殖していた。

以上の結果から、*E. coli* が固体培養で増殖するためには、液体培養での増殖時よりも多量の脂肪酸を必要とすることが示された。これについて、特に 0.075 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid 添加時のデータから、前項の実験結果 (Fig. 2-9) を受けて述べた仮説が支持される。すなわち、液体培養では増殖の障壁がほとんどないために少ない脂肪酸量でも、それらを使い切るまで増殖できるが、固体培養では液体培養に比べて大きな障壁が存在するために、同量の脂肪酸では増殖を開始できないのではないかと、またたとえ増殖しても、脂肪酸を使い切る前に増殖の障壁を乗り越えられなくなって細胞分裂が止まってしまうのではなかろうか。

一方、同様の実験を MG1655 野生株で行ったところ (Fig. 2-12)、固体培養と液体培養のいずれでも oleic acid の添加は増殖速度に影響を与えず、到達菌数にも違いがなかった。野生株では、 $\Delta fabB$ 株で見られた固体培養と液体培養での増殖差は顕在化しないことが明らかになった。本培養条件における野生株では、脂肪酸合成量が十分なため、外部から供給される脂肪酸は増殖に必要なではないのであろう。ただし、固体培養での増殖速度は、全体として液体培養よりも低下していた。野生株の LB 培地における増殖速度は、固体培養と液体培養とであまり差がなかった (Fig. 2-9) ことから、脂肪酸以外に、Yeast extract をはじめとする LB 培地にあつて M9CAGlc 培地にはない成分、あるいは培地に依存した生理状態の違いがこのような増殖速度の差に寄与しているのかもしれない。

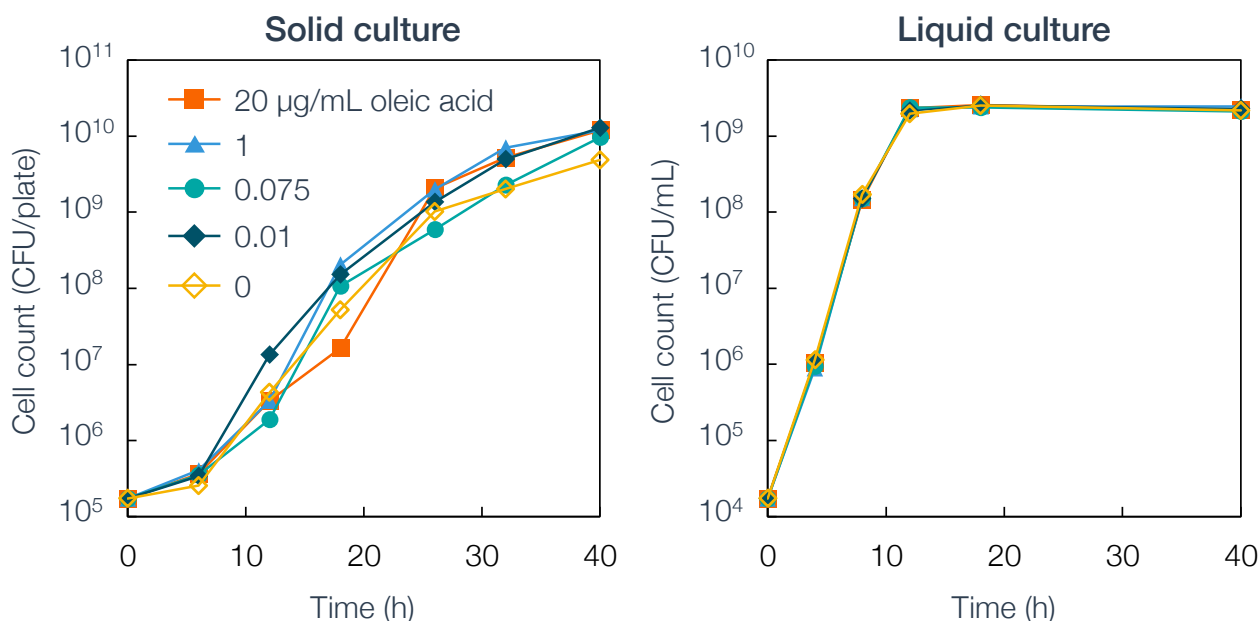


Figure 2-12. M9CAGlc 固体培地および液体培地における MG1655 野生株の増殖

10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 µg/mL) において 37°C で終夜振盪培養した MG1655 野生株の菌液を、適宜希釈して 100 µL ずつ、各種濃度の oleic acid を含む M9CAGlc-agarose 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌して 37°C で静置培養 (固体培地) および振盪培養 (液体培地) した。経時的に固体培地上および液体培地中の細胞を回収し、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 µg/mL) に散布して 37°C で終夜静置培養し、生じたコロニー数から、もとの固体培地 1 plate あたり、および液体培地 1 mL あたりの細胞数を推定した。なお、実験データは、筆者の修士論文のより引用している (納庄一樹, 2015)。

続いて $\Delta fabB$ 株は、M9CAGlc 液体培地でも、LB 液体培地で見られたようなコロニー形成能の急速な低下を示したため、Fig. 2-10 と同様に、M9CAGlc 液体培地で急速に CFU が低下する際の細胞数と生菌数を測定した (Fig. 2-13)。その結果、1 µg/mL の oleic acid を添加した M9CAGlc 液体培地においても、LB 液体培地での培養時と同様の現象が確認された。すなわち、脂肪酸を使い切ったと思われる時点から CFU が急速に低下するが、細胞数・生菌数は高く保たれており、VBNC 様の生理状態を示すことがわかった。一方、20 µg/mL の oleic acid 添加によって一旦 10^9 cells/mL 以上にまで菌数が到達すると、CFU の低下は見られず、細胞数・生菌数との差も生じなかった。

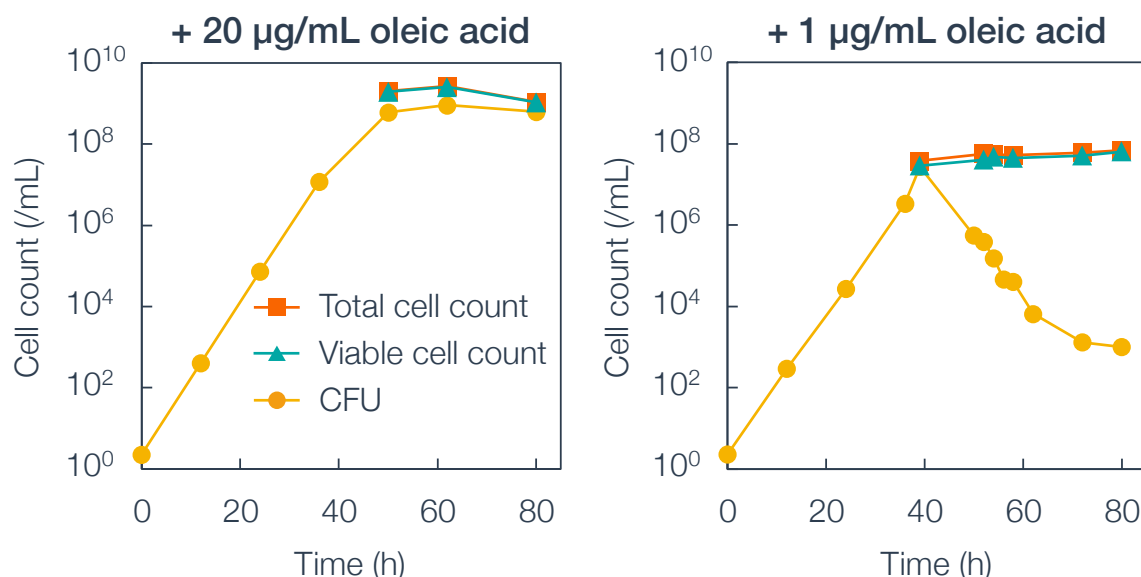


Figure 2-13. 各種濃度の oleic acid を添加した M9CAGlc 液体培地における $\Delta fabB$ 株の細胞数、生菌数、CFU の推移

10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) において 37°C で終夜振盪培養した MG1655 $\Delta fabB$ 株の菌液を、適宜希釈して 100 μL ずつ、20 (左図) あるいは 1 $\mu\text{g/mL}$ (右図) の oleic acid を添加した M9CAGlc 液体培地に植菌して 37°C で振盪培養した。経時的に液体培地中の細胞を回収し、液体培地 1 mL あたりの細胞数、生菌数、CFU を算出した。細胞数および生菌数は、それぞれ Multisize3 および LIVE/DEAD 染色によって算出した。CFU は、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) に散布して 37°C で終夜静置培養し、生じたコロニー数から算出した。

次に、このコロニー形成能の低下が脂肪酸を使い切ったために生じるのかを検証するため、上記の VBNC 様の菌集団に oleic acid を添加すると CFU が再び回復するのかを調べた (Fig. 2-14)。その結果、20 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid の追添加で、菌集団のコロニー形成能が向上し、CFU として 10^9 cells/mL まで増大したことから、CFU の急速な低下は、やはり oleic acid の枯渇が原因であったことが強く示唆された。ただし、この CFU の増大は、コロニー形成能を保っていた集団が oleic acid によって再増殖した結果なのか、あるいはコロニー形成能を失った VBNC 様の集団がコロニー形成能を回復した結果なのか (あるいはその両方か)、その区別はできない。

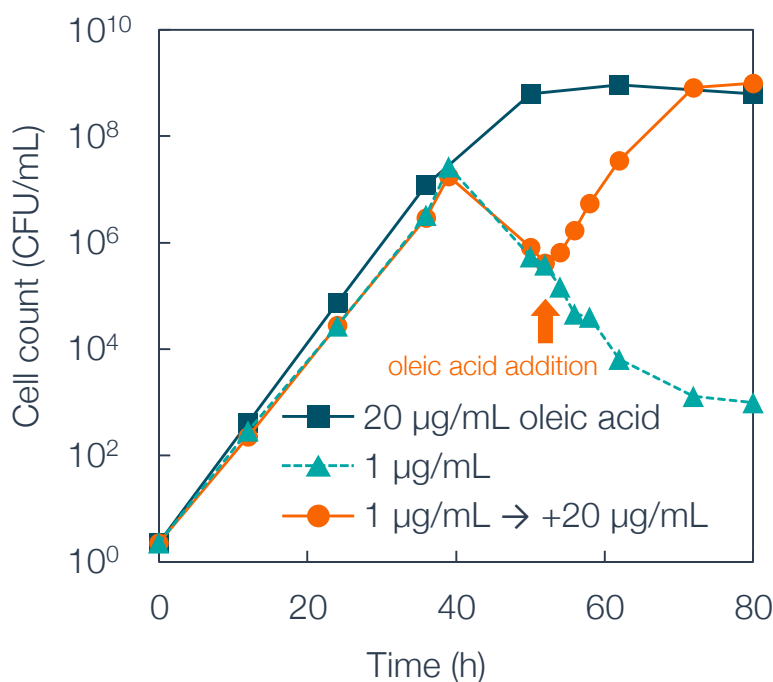


Figure 2-14. M9CAGlc 液体培地で oleic acid を追添加した場合の $\Delta fabB$ 株の CFU 推移

10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) において 37°C で終夜振盪培養した MG1655- $\Delta fabB$ 株の菌液を、適宜希釈して 100 μL ずつ、M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 1 $\mu\text{g/mL}$) $\times 2$ 本および M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) に植菌して 37°C で振盪培養した。2 本の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 1 $\mu\text{g/mL}$) のうち一方には、培養 52 時間後に oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$ を追添加した。経時的に液体培地中の細胞を回収し、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$) に散布して 37°C で終夜静置培養し、生じたコロニー数から、もとの液体培地 1 mL あたりの細胞数を推定した。なお、実験データは、筆者の修士論文から引用した (納庄一樹, 2015)。

以上の一連の実験によって、 $\Delta fabB$ 株では、LB 培地と M9CAGlc 培地のいずれでも、液体培養で増殖を続けて脂肪酸を使い切ってしまうと、その細胞集団のほとんどがコロニー形成能を失い、VBNC 様の細胞状態となることが示唆された。

このような現象について筆者は、脂肪酸が不足した際に固体培養で強く顕在化する増殖の障壁の効果と合わせて、次のように考えた。すなわち液体培養では増殖の障壁がない（あるいは少ない）ために、脂肪酸が少ないにもかかわらず、脂肪酸を使い切るまで増殖した結果、ほとんどの細胞が脂肪酸飢餓状態に陥ってしまい、その結果何らかの生理機能が低下したために、次に十分量の脂肪酸が供給されても増殖を再開することができなくなってしまうのではなかろうか。また、20 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid 添加時には、脂肪酸を使い切る

前に増殖が止まる静止期に至り、脂肪酸飢餓状態には陥らないためにコロニー形成能が高く保たれていたのではないか。一方で、固体培地では、増殖の障壁があるために液体培養に比べて増殖速度も小さく、到達菌数も少ないまま分裂が停止するが、そのおかげで細胞のほとんどが、十分量の脂肪酸が供給されれば増殖を再開できる能力を維持していたのではなかろうか。事実、Fig. 2-11 では、0.01 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid 添加条件を除き、固体培養での到達菌数は液体培養よりも少ないものの、それらの細胞集団はコロニー形成能を維持している。

以上を考え合わせ、筆者は、脂肪酸不足時に見られた固体培養での増殖の障壁は、何らかの意義を持つ「積極的な増殖抑制機構」として存在するのではないかと考えている。例えば、この増殖抑制機構は、脂肪酸が十分でない環境では、環境が整うまで増殖するのをやめて「次の増殖」に備え、必要な生理機能を温存する一種の休眠戦略として機能するのではないだろうか。

2.3.5. *fabB* の発現を制限した際の固体培養と液体培養における増殖頻度の比較

fabB 変異株の実験結果から、固体培養時には増殖を阻む障壁が存在するために、固体培養での増殖には液体培養時よりも多量の脂肪酸を要するのではないかと予想した。しかし、通常の実験室条件における MG1655 野生株の培養では、固体培養と液体培養での生育差はほとんど見られなかった。これは、*E. coli* が通常の実験室条件では十分量の FabB を有し、固体培養での増殖を阻む障壁を乗り越えてコロニー形成に至るのに十分な脂肪酸を合成しているために、生育差が顕在化しないからだと考えられる。もし、自然界の細菌の大半は、脂肪酸合成酵素が少ない、あるいは活性が低いためにこの障壁を乗り越えてコロニー形成に至ることができないのだとすると、*fabB* の発現量を制限することでも、*fabB* 変異株で見られたような固体培養と液体培養での生育差が生じるかもしれない。

同様のアプローチの実験は、第 1 章で述べたように、すでに池端によって行われていた(池端佑仁, 2010)。池端は、mini-F plasmid pKLJ12 (Jones and Keasling, 1998) の Arabinose promotor P_{BAD} の下流に *fabB* ORF を挿入した plasmid である pKLJ12-*fabB* を作製し、これを *E. coli* BW25113 株に持たせた上でゲノム上の *fabB* 遺伝子を破壊することで、*fabB* の発

現量を Arabinose 添加量によって制御できる株、BW25113- $\Delta fabB$ + pKLJ12-*fabB* を作製した。しかし、この株を用いた *fabB* の発現制御実験では、*fabB* を十分量発現させた条件と全く誘導しない条件の極端な 2 条件でしか生育を調べておらず、かつ十分に *fabB* 遺伝子を発現させた条件でも、生育頻度はたいして回復せず、野生株に比べて固体培養、液体培養ともに大きく低下していた。これについては、BW25113 株が、 P_{BAD} 制御下の遺伝子の恒常的な発現により何らかの生育阻害を受ける株であったことによる可能性がある。

そこで、2.2.3.項に記載した方法に従い、MG1655- $\Delta fabB$ 株に pKLJ12-*fabB* を導入することで、MG1655 野生株ベースの *fabB* 発現制御株を作製した。この発現制御株が、Arabinose による *fabB* の発現誘導が十分量の際には野生株と同程度まで生育が回復することを確認するとともに、そこから徐々に *fabB* の発現量を減少させた際に固体培養と液体培養での生育差が見られるかを検証する。 P_{BAD} からの発現は、Glucose によって抑制されるため (Guzman et al., 1995)、本実験では Glucose に代えて Galactose を用いた M9CAGal 培地をベースに、各種濃度の Arabinose を添加した固体培地と液体培地における MG1655- $\Delta fabB$ + pKLJ12-*fabB* 株の増殖頻度、すなわち CFU と MPN を比較した (Fig. 2-15)。

その結果、4000 $\mu\text{g/mL}$ の Arabinose 添加時には、MG1655- $\Delta fabB$ + pKLJ12-*fabB* 株の CFU と MPN は野生株並の値を示しており、両者にほとんど差もなかったことから、*fabB* の発現が十分に誘導されていることが確認できた。一方で、Arabinose 濃度の低下に従って CFU と MPN に差が生じ、特に 250 $\mu\text{g/mL}$ の Arabinose 添加時には、CFU は MPN の 1/100 以下にまで低下していた。以上より、*fabB* の発現量を制限することで脂肪酸合成機能を低下させた場合にも、固体培養と液体培養での生育差が生じることが示された。

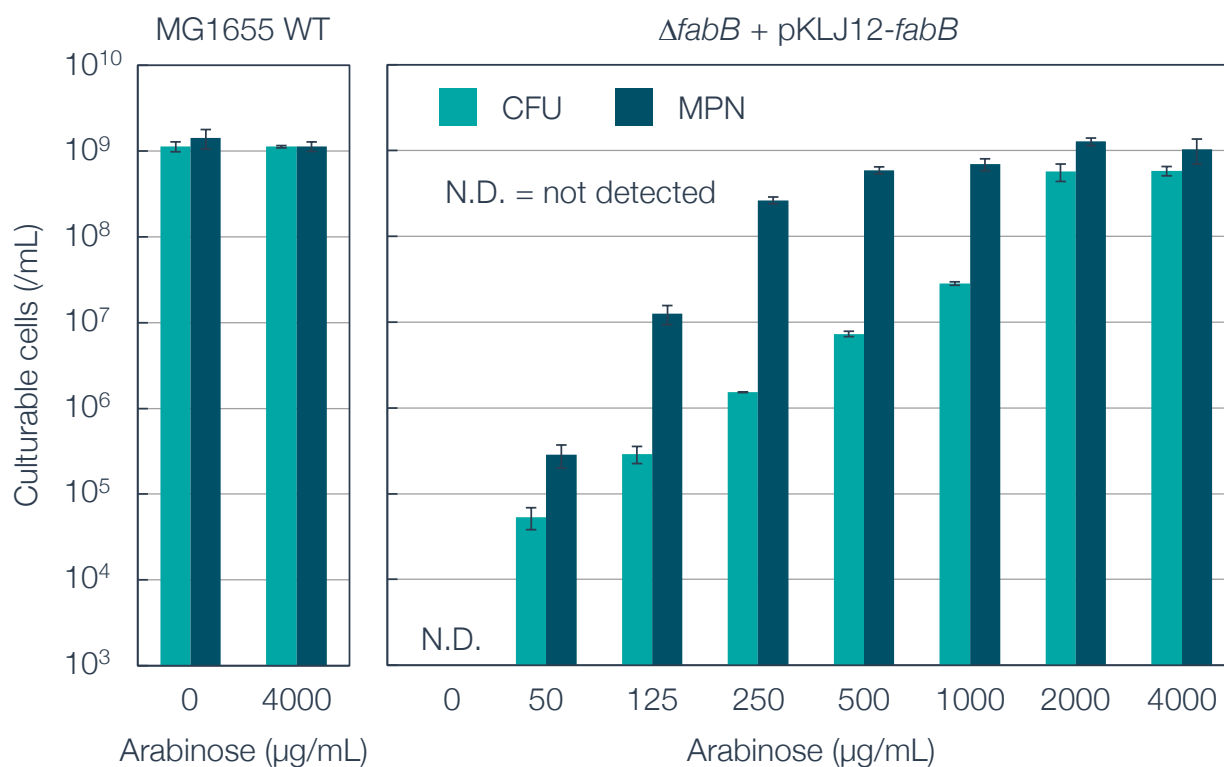


Figure 2-15. *fabB* の発現量を制御した際の CFU と MPN

MG1655 野生株および MG1655- $\Delta fabB$ + pKLJ12-*fabB* 株を、10 mL の M9CAGal 液体培地 (Arabinose 2 mg/mL, Ampicillin 100 μg/mL) において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。これらの菌液を適宜希釈して、各種濃度の Arabinose を含む M9CAGal-agar 固体培地と M9CAGal 液体培地にそれぞれ散布・植菌し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

2. 4. 考察

本章では、当研究室で保有する *fabB^{ts}* 株と $\Delta fabB$ 株を用いて、脂肪酸合成が不足すると、固体培養での増殖頻度が、液体培養に比べて大きく低下することを示した (Fig. 2-6, 2-7)。本章第 1 節で述べた通り、FabB は biotin の生合成にも関わることから、biotin が関与する脂肪酸代謝以外の経路が上記の表現型に寄与する可能性もあるが、 $\Delta fabB$ 株の示す生育差は、oleic acid の添加のみで回復したことから、上記の表現型は脂肪酸の不足が直接の要因であったと考えられる。ところで、oleic acid は *E. coli* が生理的に利用する脂肪酸ではない。そこで、生理的に利用する palmitoleic acid と *cis*-vaccenic acid が示す $\Delta fabB$ 株のコロニー形成能の回復程度と oleic acid が示す回復程度を比較したが、これらに差はなかった (Fig. 2-8)。また、当研究室の三井は、 $\Delta fabB$ 株に oleic acid を添加して培養した場合、細胞膜リン脂質の脂肪酸のほとんどが oleic acid で占められるようになることを示した (三井智玄, 2013)。これらのことより、oleic acid を取り込むことでもたらされるコロニー形成能の回復は、生理的に正常な現象を観察していると言ってよいであろう。

ここで少し先走るが、palmitic acid および stearic acid の添加が $\Delta fabB$ 株にどのような効果をもたらすかを議論しておく。第 4 章に述べる methyl- β -cyclodextrin を利用した供給方法によって、飽和脂肪酸である palmitic acid および stearic acid の添加効果（それぞれ 20 $\mu\text{g/mL}$ ずつ添加）も調べたものの、いずれも $\Delta fabB$ 株の生育を支持できなかった。おそらく、飽和脂肪酸のみで構成されるリン脂質では融点が高すぎて正常な生体膜として機能できないのであろう。このことを支持する観察が、三井が MG1655- $\Delta fabA$ 株を作製した際になされている。MG1655- $\Delta fabA$ 株は oleic acid を添加した培地では正常に増殖するものの、oleic acid を添加しない LB 培地では固体培養でも液体培養でも肉眼的では増殖が確認できなかった。Fig. 2-9 に示したのと同様の解析を行うことで、液体培養でのみわずかな増殖が確認できるだけだった (三井智玄, 2013)。FabA の機能が欠損して長鎖不飽和脂肪酸が合成されなくなり、飽和脂肪酸のみで生体膜が構成される細胞は、外部から長鎖不飽和脂肪酸を取り込んで生体膜の流動性を確保することができない限り増殖しえないのであろう。

続いて、固体培養・液体培養時の $\Delta fabB$ 株の増殖と脂肪酸の利用量との関係を正確に比較するため、Fig. 2-9、2-11 および 2-12 に示す実験を行った結果、脂肪酸が不足すると固体培

養で特に強い増殖の障壁（抑制）が見られ、継続的な増殖には、液体培養時よりも多量の脂肪酸が必要であることが明らかになった。また、液体培養ではそのような増殖の障壁（抑制）は見られず、 $\Delta fabB$ 株は脂肪酸を使い切るまで増殖を続けるが、その結果、それらの細胞が何らかの機能不全を起こし、脂肪酸を供給することで栄養条件を整えた培地でも再度増殖することができない、すなわち VBNC 様の生理状態に陥ることがわかった (Fig. 2-10, 2-13, 2-14)。

以上の結果を総括し、*E. coli* の生育に関して筆者は次のような結論に至った。すなわち、固体培養での増殖時には、液体培養時には現れない（あるいは現れにくい）障壁が潜在的に存在し、それを乗り越えてコロニー形成に至るためには FabB が担う脂肪酸合成が関わる生理機能が必要なのではなかろうか。一方でその障壁は、積極的な増殖抑制機構として機能し、脂肪酸が不足した際に細胞が不用意に増殖を開始して飢餓状態・機能不全に陥るのを抑止しており、「次の増殖」に備える一種の生存戦略として存在するのではないかと筆者は考えている。このような増殖抑制の際には、FabR をはじめとする脂肪酸合成を抑制する制御因子などが関わっているかもしれない。ただし、筆者が想定するこのような増殖の障壁の正体、分子機構については未だ直接的な証拠を得ておらず、さらなる解析が必要である。本論文の補章では、この障壁の解明に迫るために行った一連の実験の結果を付記する。

次章では、以上の結論が *E. coli* 以外の細菌にも適用されるかを検証する。

第3章 様々な細菌における脂肪酸合成阻害時のコロニー形成能

3.1. 緒言

第2章では、*fabB* 変異株の解析を通じて、*E. coli* においては、脂肪酸が不足すると固体培養で特に大きな増殖の障壁、すなわち増殖抑制が現れるために、固体培養で増殖できる細胞の割合が液体培養に比べて大きく低下することを明らかにした。本章では、この結論が *E. coli* 以外の細菌でも成立するかを検証し、細菌一般のコロニー形成における脂肪酸合成の普遍的な重要性を示すことを目指す。

脂肪酸合成はほぼ全ての生物が行う基本的な代謝反応であるため、*E. coli* 以外の細菌でも遺伝学的なアプローチ、すなわち変異株を用いた解析が原理的には可能だが、変異株の作製には多大な労力を要するため現実的ではない。第2章の最後に行った *fabB* 発現制御株の実験では、FabB の合成量を制限した場合にも固体培養と液体培養での生育差が生じたことから、筆者は、薬剤によって FabB の活性を阻害することでも、同様の生育差が観察できるのではないかと予想した。その場合、該当の薬剤が *E. coli* 以外の細菌に対しても同様の活性を示すものであれば、様々な細菌で、脂肪酸不足時の固体培養と液体培養での生育を容易に比較することができる。

FabB、すなわち β -ketoacyl-ACP synthase I (KAS I) の阻害剤としては、Cerulenin が知られている (D'Agnolo et al., 1973)。Cerulenin は、KAS I に対して最も強い阻害活性を示すが、KAS II (FabF) および KAS III (FabH) に対しても阻害活性を示し (Price et al., 2001)、また *E. coli* 以外の様々な細菌の KAS に対しても幅広い阻害活性を有する (Omura, 1976)。本章の前半では、Cerulenin によって脂肪酸合成を阻害することでも *fabB* 変異株の表現型が再現されるかを検証し、さらに *E. coli* 以外の細菌でも同様の現象が見られるかを調べた。

さらに本章の後半では、FabB 同様、脂肪酸合成に必須の酵素である enoyl-ACP reductase I (FabI) の阻害剤、Triclosan を用いた実験を行い、FabB に限らない脂肪酸合成経路全般のコロニー形成における重要性を検証した。

3. 2. 材料と方法

3. 2. 1. 使用した菌株と培地

E. coli MG1655 株、*B. subtilis* 168 株および *C. glutamicum* ATCC13032 株を使用した。これらはすべて野生株である。*B. subtilis* と *C. glutamicum* は、それぞれ東京農業大学の吉川博文教授および東京大学の古園さおり特任准教授より分譲していただいた。

E. coli の培養には LB 培地および M9CAGlc 培地を用いた（組成は 2. 2. 1.項に示した）。*B. subtilis* および *C. glutamicum* の培養には、それぞれ以下に示す組成の SPMMCAGlc 培地および CM2B 培地を用いた。なお、固体培地では、Bacto agar (BD) を終濃度 1.5% で添加した。

SPMMCAGlc 培地

14 g/L K_2HPO_4 , 6 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L Trisodium citrate $\cdot 2H_2O$, 0.2 g/L $MgSO_4$, 5 g/L D-Glucose, 50 mg/L D-Tryptophan (Peptide Institute), 5 g/L Vitamin Assay Casamino Acids (BD)

CM2B 培地

10 g/L HIPOLYPEPTON (Nihon Pharmaceutical), 10 g/L Bacto Yeast Extract (BD), 5 g/L NaCl

3. 2. 2. 使用した試薬

oleic acid は、10 mg/mL の Triton X-100 水溶液に 2000 μ g/mL の濃度で溶かしたもの、あるいは 200 mg/mL の methyl- β -cyclodextrin (Junsei Chemical) 水溶液に 6000 μ g/mL の濃度で溶かしたものを、それぞれ 1/100 量を培地に添加して用いた。Cerulenin、Triclosan および Ampicillin は、50% の EtOH 水溶液に適切な濃度で溶かし、それぞれ 1/100 量を培地に添加して用いた。なお、methyl- β -cyclodextrin 抱合脂肪酸の調製は、東京医科歯科大学の大隅一興研究員が行った。

3. 2. 3. CFU と MPN の計測

2. 2. 4.項と同様の方法で行った。

3. 3. 結果

3. 3. 1. Cerulenin 添加時の固体培養と液体培養における増殖頻度の比較

亜致死量の Cerulenin を添加した M9CAGlc 培地での *E. coli* の、固体培養における増殖頻度（CFU）と液体培養における増殖頻度（MPN）を比較した（Fig. 3-1）。

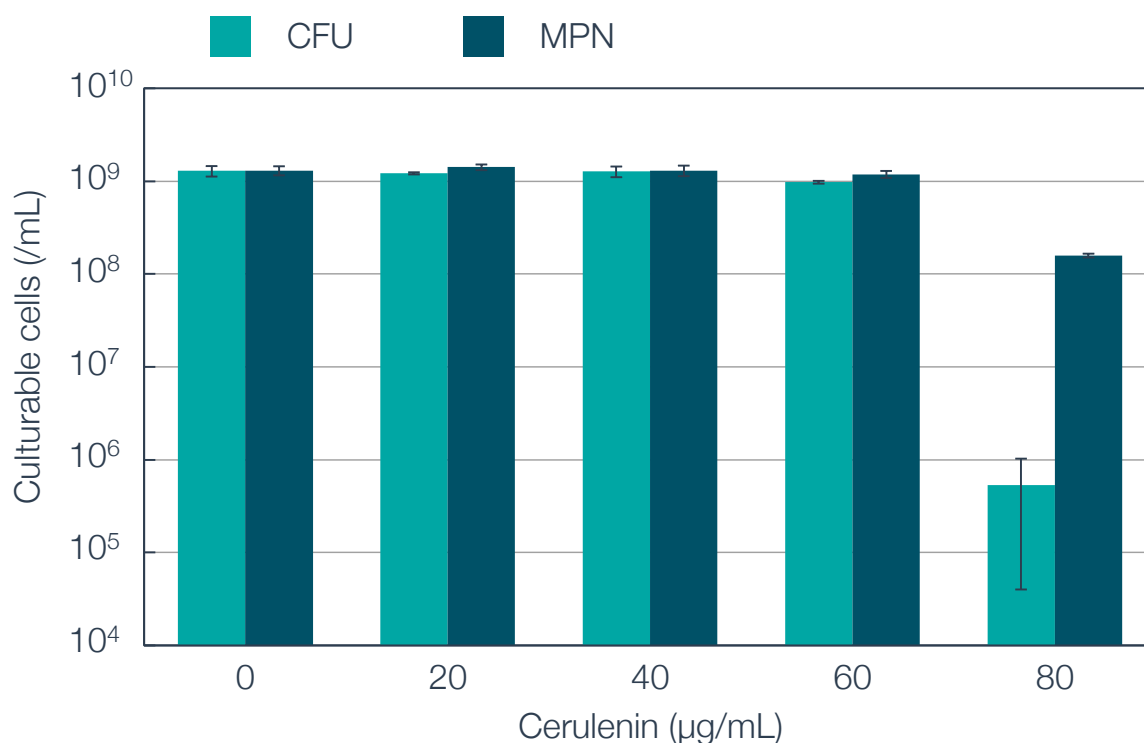


Figure 3-1. Cerulenin を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の CFU と MPN

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Cerulenin を含む M9CAGlc-agar 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）と液体培地での増殖可能菌数（MPN）を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

60 µg/mL 以下の Cerulenin 添加時には、CFU と MPN の間に差は見られなかったが、添加濃度が高くなるに従って生育速度は低下し、60 µg/mL の添加時では、目に見える増殖が確認できるまで 2 日近くかかった。80 µg/mL の Cerulenin 添加時には MPN の値が 1/10 程度に低下したが、CFU は 1/1000 以下にまで低下しており、CFU と MPN との間に約 2 桁の差が生じた。また、固体培養と液体培養のいずれでも、目に見える増殖が確認できるま

でに 2 日以上かかった。*fabB* の変異株と同様、薬剤による FabB の阻害によって脂肪酸が不足した際にも、固体培養での増殖頻度が液体培養に比べて大きく低下することが示された。

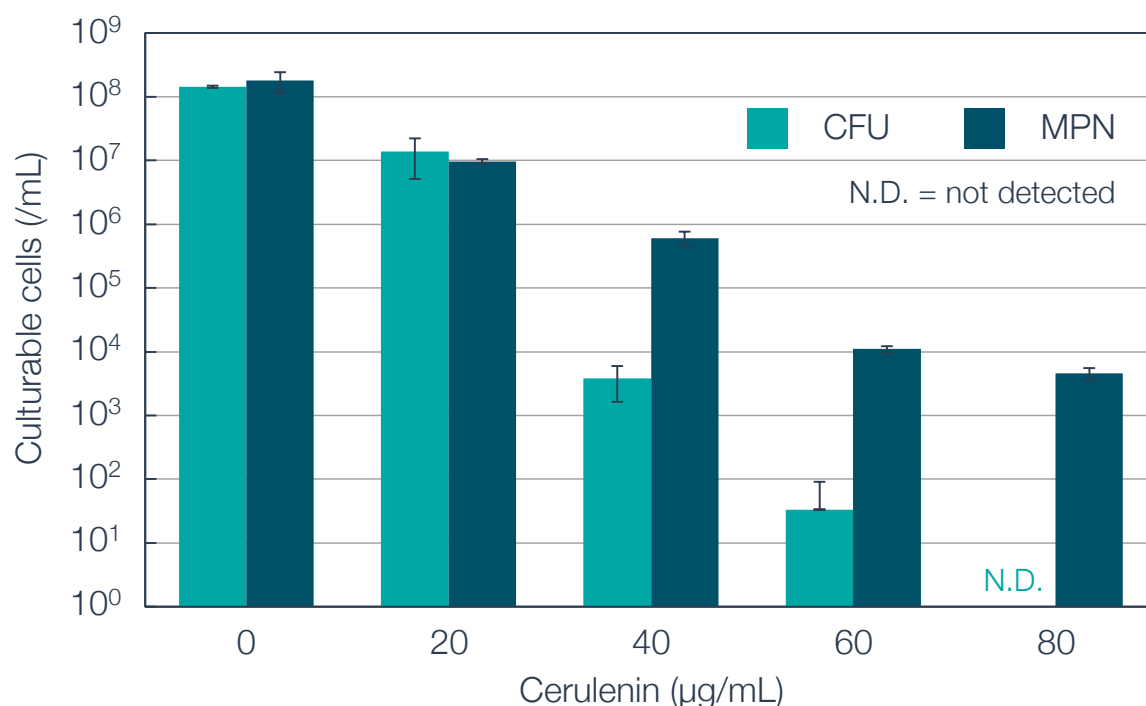


Figure 3-2. Cerulenin を添加した SPMMCAGlc 培地における *B. subtilis* の CFU と MPN

B. subtilis 168 株を、10 mL の SPMMCAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Cerulenin を含む SPMMCAGlc-agar 固体培地および SPMMCAGlc 液体培地に散布・植菌し、37°C で 8 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）と液体培地での増殖可能菌数（MPN）を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

続いて同様の実験を、*E. coli* とは系統的に離れた *B. subtilis* を対象に行った（Fig. 3-2）。*B. subtilis* は、Cerulenin を添加しない条件では CFU と MPN は同等の値を示しており、*E. coli* 同様、通常の培養条件では固体培養と液体培養における生育差は顕在化しないことがわかった。*B. subtilis* は Cerulenin に対して *E. coli* よりも高い感受性を示し 20 μg/mL の Cerulenin 添加で MPN の値が 1/10 程度に低下したが、*E. coli* とは異なり、CFU も同程度の値を示していた。しかし、より高濃度の Cerulenin 添加時には CFU と MPN の間に 2 桁

以上の差が生じ、80 $\mu\text{g/mL}$ の添加時には全くコロニー形成しないのに対し、MPN の値は比較的高く保たれていた。以上より、*B. subtilis* においても、脂肪酸合成が不足すると、固体培養での増殖がより強く抑制されることが明らかになった。なお、*B. subtilis* は KAS として FabB を持たず FabF のみを利用するため、*B. subtilis* では、Ceruleinin による FabF の阻害によって、CFU と MPN との差が生じたものと考えられる (Schujman et al., 2001; Trajtenberg et al., 2014)。

グラム陰性細菌である *E. coli* とグラム陽性細菌である *B. subtilis* という二種の系統的に離れた細菌の間でこのような共通した表現型が確認できたことから、脂肪酸不足時に固体培養で特に強くはたらく増殖抑制効果は細菌一般に存在し、FabB および FabF といった KAS が担う脂肪酸合成がコロニー形成にとって普遍的に重要であることが示唆された。

3. 3. 2. Triclosan 添加時の固体培養と液体培養における増殖頻度の比較

筆者はさらに、FabB だけでなく、第 2 章の Fig. 2-2 に示した脂肪酸合成経路に関わる酵素群も同様にコロニー形成の制限要因になる可能性を探った。そこで FabI、すなわち enoyl-ACP reductase I の活性を阻害する Triclosan (Heath et al., 1998) を利用し、前項と同様の実験を行うことで、脂肪酸合成に関わる酵素一般の重要性を検証した。

亜致死量の Triclosan を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の CFU と MPN を比較した (Fig. 3-3)。MPN は、100 ng/mL までの Triclosan 濃度域では非添加時と同等の値を示したが、CFU は 50 ng/mL の添加時で 1/4 程度に低下し、100 ng/mL の添加では 1/100 近くにまで低下していた。150 ng/mL の Triclosan 添加時には、非添加時と比較して MPN も 1/5 程度にまで低下したが、CFU はさらに低下して非添加時の $1/10^3$ 以下になっていた。さらに 200 ng/mL の添加時には MPN は 1/10 程度まで低下したが、CFU は $1/10^6$ 以下となり、CFU と MPN の差は 5 桁以上となっており、Triclosan 添加時の *E. coli* の CFU と MPN の差は Cerulenin 用いた実験よりも顕著であった。また、200 ng/mL の Triclosan 添加時に、oleic acid を添加しておく、CFU と MPN が回復して両者の差もなくなったことから、Triclosan による CFU と MPN の差は、FabI の活性低下に伴う脂肪酸合成の不足に起因することが強く示唆された。

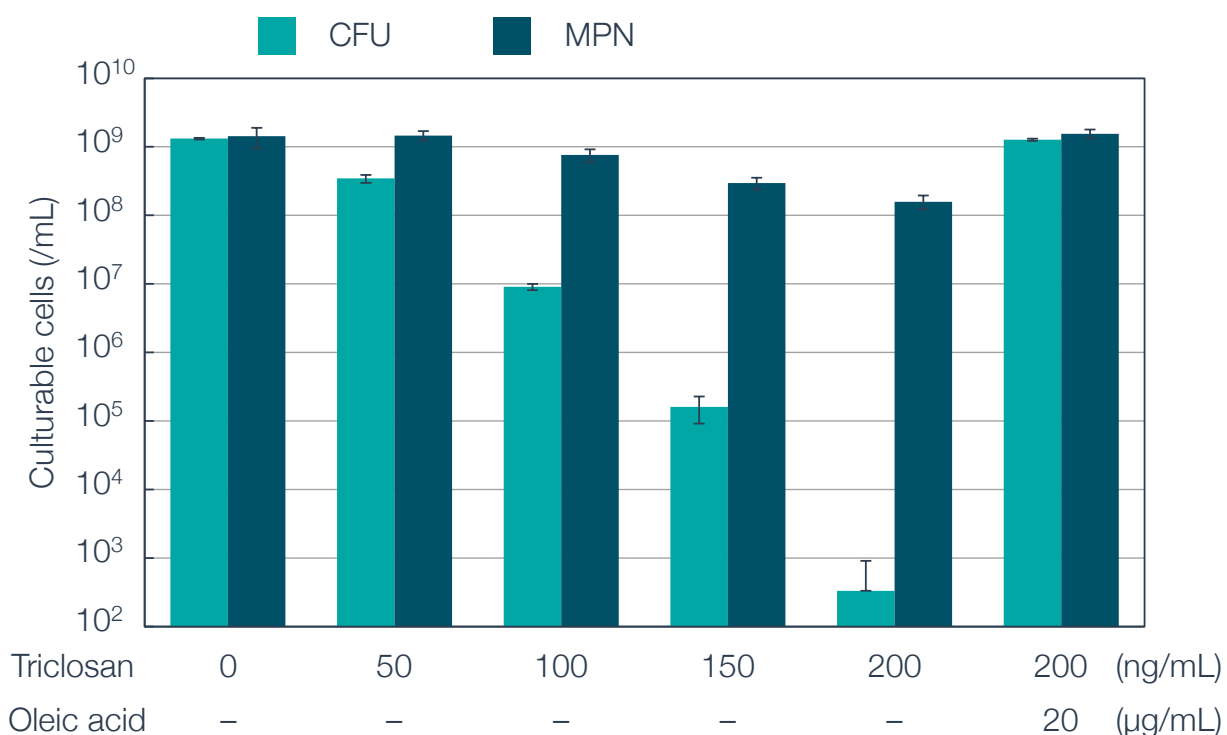


Figure 3-3. Triclosan を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の CFU と MPN

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む M9CAGlc-agar 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）と液体培地での増殖可能菌数（MPN）を算出した。なお、oleic acid の供給には、100 µg/mL の Triton X-100 を利用し、終濃度 20 µg/mL で培地に添加した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

さらに、同様の Triclosan 添加実験を、M9CAGlc 培地に代えて LB 培地で行い、CFU と MPN を比較した (Fig. 3-4)。LB 培地では、M9CAGlc 培地での同濃度の Triclosan 添加時よりも CFU・MPN とともに大きく低下していた。100 ng/mL の Triclosan 添加時には MPN は 1/100 以下に低下していたが、CFU は 1/10⁴ 以下に低下しており、CFU と MPN の差は 2 桁程度であった。200 ng/mL の Triclosan 添加時には、CFU だけでなく MPN も検出限界値以下となった。また本実験では、oleic acid だけでなく palmitoleic acid を添加した場合の生育の補完も確認した。その結果、いずれの脂肪酸供給でも CFU と MPN が大きく回復したが、palmitoleic acid の方がわずかながら Triclosan 添加時の CFU と MPN の回復への

寄与が大きかった。ただし、いずれの場合も CFU と MPN との差は完全には埋まらなかった。

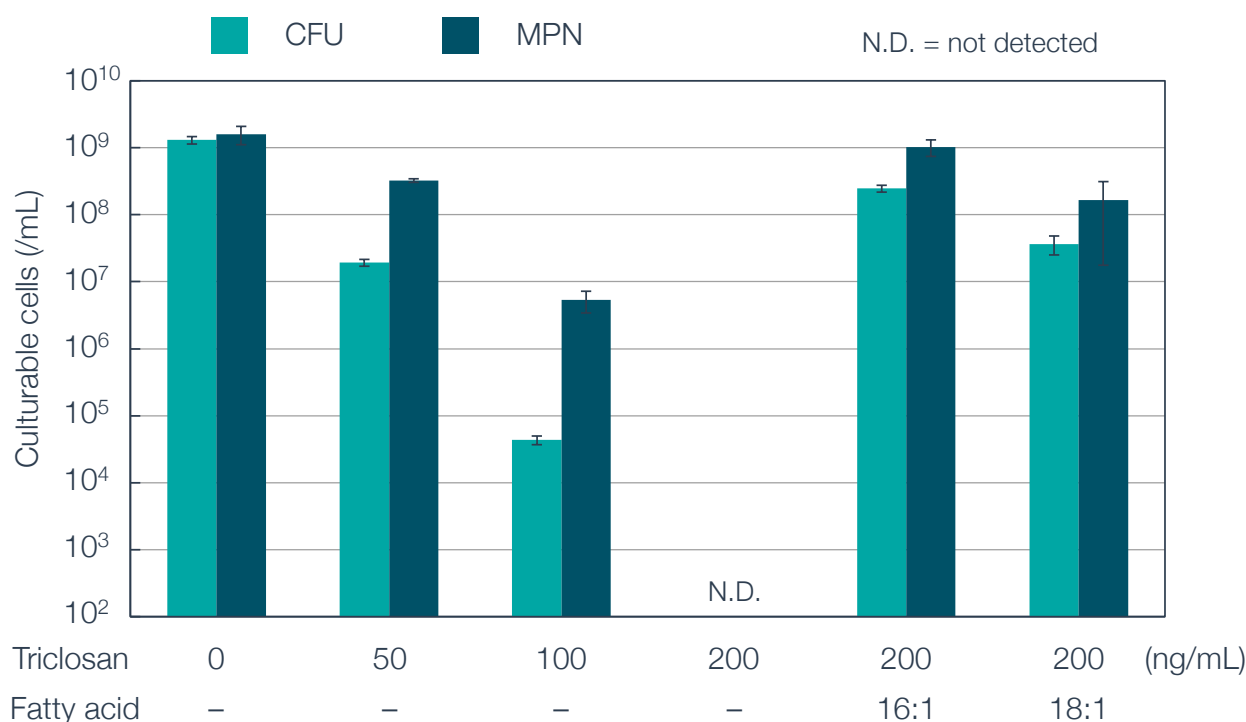


Figure 3-4. Triclosan を添加した LB 培地における *E. coli* の CFU と MPN

E. coli MG1655 株を、10 mL の LB 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む LB-agar 固体培地および LB 液体培地に散布・植菌し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。なお、palmitoleic acid (16:1) および oleic acid (18:1) の供給には、2 mg/mL の methyl- β -cyclodextrin を利用し、それぞれ終濃度 60 μ g/mL で培地に添加した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

以上より、LB 培地においても Triclosan 添加時には CFU と MPN の間に顕著な差は見られたものの、その差は M9CAGlc 培地での培養時よりも小さく、また全体として Triclosan 感受性が高かった。これについて筆者は、LB 培地における *E. coli* の細胞の生理状態は、脂肪酸不足時の増殖抑制効果を、M9CAGlc 培地での培養時よりも強く受けるためではないかと考えている。LB 培地では M9CAGlc 培地よりも増殖速度が大きくなるため (Fig. 2-9, 2-12)、細胞内の脂肪酸量を保つためには脂肪酸合成速度もより大きくならねばならない。もし増殖速度に対して脂肪酸合成速度が足りないと、細胞内ではたちまち脂肪酸が不足す

る。これを防ぐために、増殖速度が大きくなる LB 培地では、脂肪酸の不足に起因する増殖抑制効果も大きいのではなかろうか。

以上の結果から、薬剤による脂肪酸合成の阻害によって生じる固体培養と液体培養における生育差は、M9CAGlc 培地および LB 培地のいずれでも観察されることが示された。また、FabB だけでなく、FabI の阻害時にも、固体培養と液体培養における生育差が生じたことから、脂肪酸合成に関わる酵素群のコロニー形成における普遍的な重要性が明らかになった。

次に、同様の Triclosan 添加実験を、*Actinobacteria* 門の一種、*C. glutamicum* において行った (Fig. 3-5)。*C. glutamicum* も、Triclosan を添加しない条件では CFU・MPN とともに同等の値を示した。また、1 および 2 $\mu\text{g/mL}$ の Triclosan 添加時にも、非添加時と同等の CFU・MPN の値を示した。しかし、3 $\mu\text{g/mL}$ の Triclosan 添加時では、MPN が 1/5 程度に低下したのに対し、コロニー形成は全く見られなくなった。4 $\mu\text{g/mL}$ の Triclosan 添加時でも CFU は検出限界以下であったが、MPN は 1/10 程度に低下するのみで比較的高い値を維持していた。このような結果から、*C. glutamicum* においては、コロニー形成に必要な脂肪酸合成量に関して一定の閾値が存在し、その閾値を下回ると極めて強い増殖抑制が一樣にはたらくために、ほぼ全ての細胞がコロニー形成できなくなるのだと考えられる。一方で、液体培養における増殖では、そのような二値的振る舞いを示す増殖抑制は見られず、脂肪酸合成量に応じた増殖頻度を示すと考えられる。以上から、*C. glutamicum* は、他の細菌に比べて、脂肪酸合成がコロニー形成の特に強い制限要因となっていることが示された。

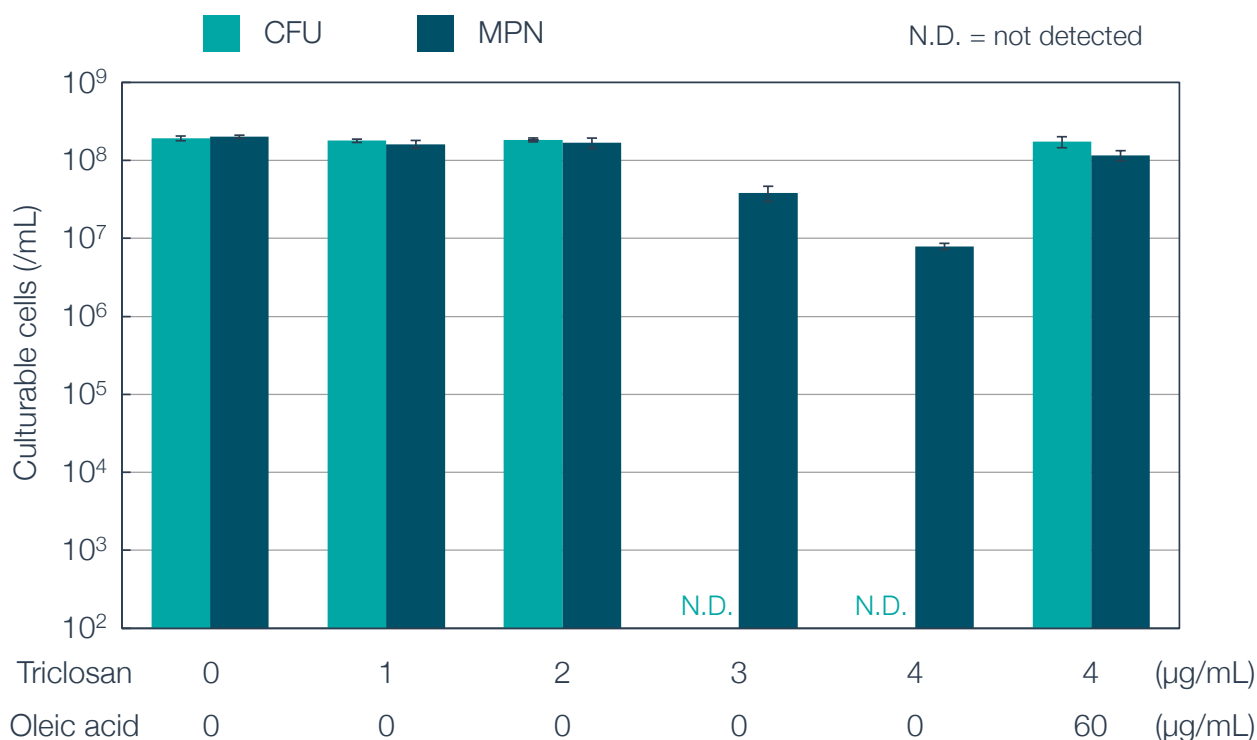


Figure 3-5. Triclosan を添加した CM2B 培地における *C. glutamicum* の CFU と MPN

C. glutamicum ATCC13032 株を、10 mL の CM2B 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む CM2B-agar 固体培地および CM2B 液体培地に散布・植菌し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）と液体培地での増殖可能菌数（MPN）を算出した。なお、oleic acid の供給には、2 mg/mL の methyl-β-cyclodextrin を利用し、終濃度 60 μg/mL で培地に添加した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

次に筆者は、本実験系における遺伝的変異の関与を疑った。すなわち、薬剤による脂肪酸合成阻害時に固体培地あるいは液体培地で増殖する菌は、薬剤耐性を獲得した変異体であった可能性を検討した。まず 100 ng/mL の Triclosan 添加時に生じたコロニー（散布した全細胞の約 1/1000 がコロニー形成、Fig. 3-6 左図）をランダムに 3 株分離し（isolates 1-3）、これらを再度培養した際の Triclosan 感受性に変化が見られるかどうかを検証した（Fig. 3-6 右図）。その結果、isolates 1-3 のいずれも感受性に違いはなく、ストックから起こした（Triclosan 処理をしていない）MG1655 野生株と同等の CFU を示した。なお、Fig. 3-6 の左図と右図の MG1655 株のデータのように、実験によっては Triclosan 添加時の CFU が 1 桁程度ずれることがある。本実験系のような、亜致死量の薬剤添加という極限的な条件で

はこのようなバラツキは概して観察されるものの、対象とする固体培養と液体培養での生育差は一貫して見られることから、このようなバラツキは許容した。

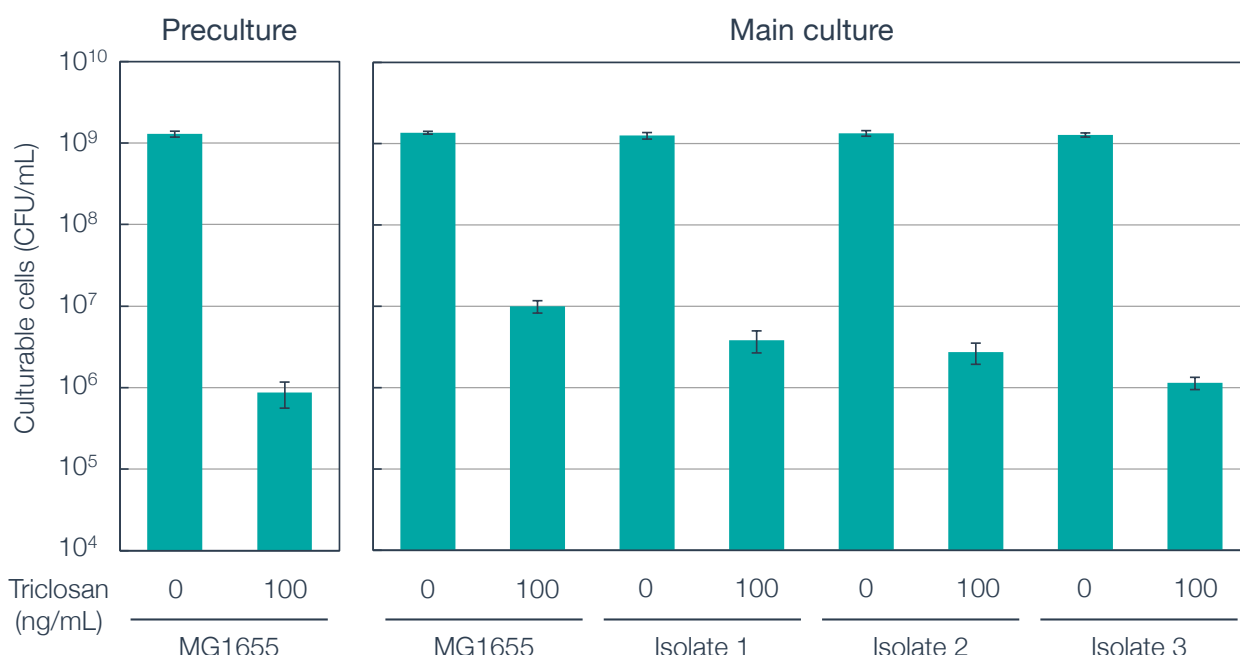


Figure 3-6. Triclosan 感受性に対する遺伝的変異の検証

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、100 ng/mL の Triclosan を含む、あるいは含まない M9CAGlc-agar 固体培地に散布し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) を算出した (左図)。次に 100 ng/mL の Triclosan を含む plate で生じたコロニーからランダムに 3 株 (isolates 1-3) を分離し、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。これらの菌を再び 100 ng/mL の Triclosan を含む、あるいは含まない M9CAGlc-agar 固体培地に散布し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) を算出した (右図)。

以上の結果から、薬剤を用いた本実験系における結果には、遺伝的変異は関与しないことが明らかになった。

3.3.3. Ampicillin 添加時の固体培養と液体培養における増殖頻度の比較

次に筆者は、ここまでに見てきた薬剤による固体培養と液体培養における生育差が、脂肪酸合成の阻害時に特異的に見られる現象なのかを確認した。実験にあたっては、細胞壁

合成を阻害する Ampicillin を利用した。Cerulenin や Triclosan 同様、亜致死量の Ampicillin 添加時の M9CAGlc 培地における *E. coli* の CFU と MPN を比較した (Fig. 3-7) 。その結果、Ampicillin 添加濃度が高くなるに従って CFU・MPN とともに低下するが、Cerulenin や Triclosan と違って、CFU と MPN の間に顕著な差は見られなかった。よって、ここまで見てきた固体培養と液体培養における生育差は、脂肪酸合成の阻害時に特異的に見られる現象であることが強く示唆された。

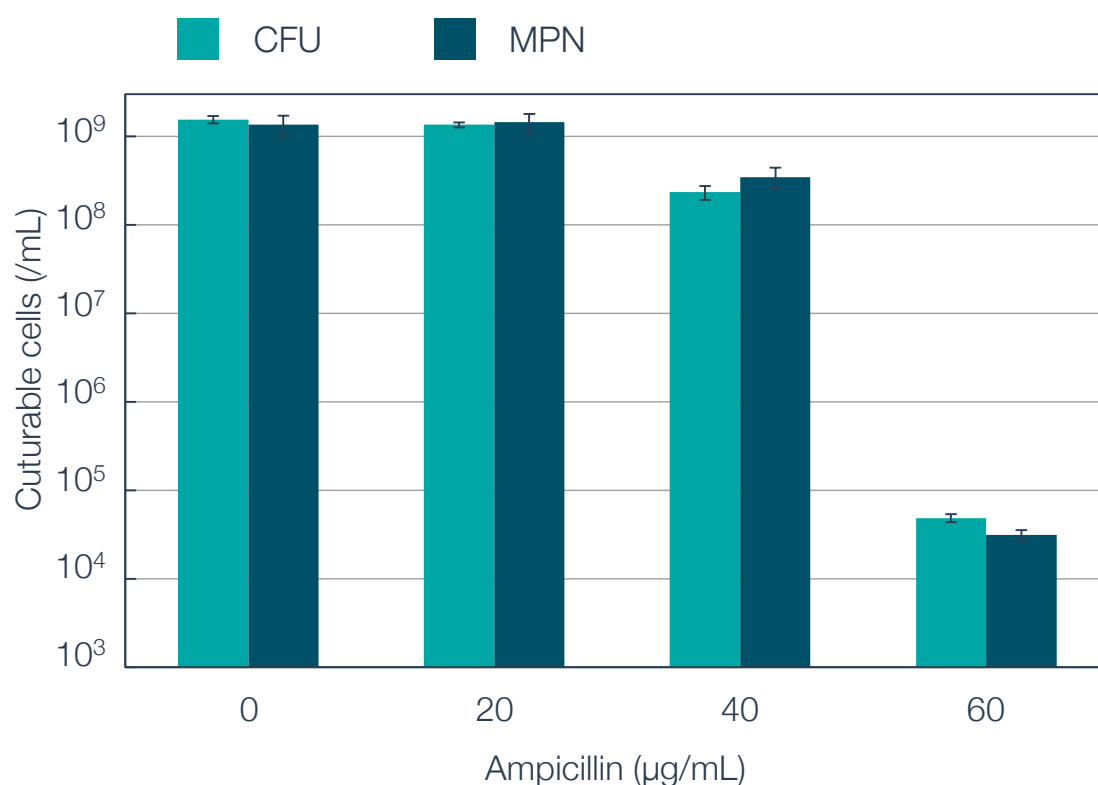


Figure 3-7. Ampicillin を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の CFU と MPN

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Ampicillin を含む M9CAGlc-agar 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

3. 4. 考察

本章では、Cerulenin による FabB の阻害によっても、*fabB* 変異株と同様の表現型、すなわち固体培養で特に強い増殖抑制が見られることを確認した (Fig. 3-1)。また FabB とともに脂肪酸合成に必須の FabI を Triclosan によって阻害した場合にも、同様の表現型が見られた (Fig. 3-3, 3-4)。これらのことから、*E. coli* においては、脂肪酸合成に関わる酵素がコロニー形成にとって普遍的に重要で、これらの活性が低下して脂肪酸が不足すると、固体培養での増殖抑制が顕著に現れることが示された。

さらにこれらの薬剤を利用することで、*B. subtilis* (Fig. 3-2) や *C. glutamicum* (Fig. 3-5) でも、脂肪酸合成の不足時には *E. coli* と同様の固体培養と液体培養における生育差が見られることを示し、細菌一般のコロニー形成における脂肪酸合成の普遍的な重要性が強く示唆された。またこのことは、自然界の細菌の大多数がコロニー形成できない原因が脂肪酸の不足にある可能性を提起する。特に、本研究で脂肪酸の不足に際して顕著な反応を示した *C. glutamicum* は、抗生物質をはじめとする有用物質の生産菌が多数含まれる *Actinobacteria* 門に属しており、これら有用物質生産菌が分離培養できない原因が脂肪酸の不足にあった場合、その応用展望の可能性は大きい。これらを受けて、第 4 章では、脂肪酸の供給によるコロニー形成能の増強効果を検証した。

本章の最後には、脂肪酸合成酵素以外をターゲットとする薬剤として Ampicillin を用いることで、固体培養と液体培養の生育差は、脂肪酸合成の阻害時に特異的に見られる現象であることを明らかにした (Fig. 3-7)。また筆者は、Ampicillin の他に、Kanamycin や Chloramphenicol といった殺菌的な薬剤を添加した場合の CFU と MPN の比較も試みた。しかしこれらの薬剤添加時は、大小入り混じったヘテロなコロニーが形成され、また液体培地での濁りも well ごとに大きく異なっていたため、増殖の判定について明確な閾値を設けることができず、データとすることができなかった。一方で、本研究で用いた Cerulenin、Triclosan および Ampicillin の添加時には、CFU と MPN の値そのもの、すなわち増殖頻度は大きく低下するものの、固体培地で生じたコロニーの形態と液体培養における濁りはいずれも一様で、薬剤を添加しない場合の生育と見かけ上同様であった (Fig. 3-8)。このことから、Cerulenin、Triclosan および Ampicillin といった静菌的な薬剤に曝された場合

には、増殖の初期段階で「積極的」に増殖を抑制するような機構が存在することが示唆される。言い換えると、これらの薬剤が阻害する生合成経路には、それぞれ増殖に必要な閾値が存在し、その閾値を下回った細胞では増殖抑制がはたらくために増殖せず、一方で閾値を上回った細胞では増殖を開始して肉眼で観察可能な程度まで一様に増殖するのではないだろうか。そしてその増殖の抑制を左右する閾値が、脂肪酸合成経路においては特に、固体培養時と液体培養時で異なるのではなかろうか。第2章では、同様の増殖抑制効果が、 $\Delta fabB$ 株の増殖において、脂肪酸不足時には固体培養で強くはたらくが、液体培養ではほとんどはたらかないために、固体培養と液体培養での生育に差が生まれるのではないかと考察した。またこのような増殖抑制は、細胞が不用意に増殖を繰り返して機能不全を引き起こすことを防いでいる可能性にも触れた。もしこの仮説が正しければ、このような固体培養での増殖を抑制する機構を解消することで、脂肪酸不足時の固体培養でも増殖を開始するようになり、CFU と MPN の差が埋まるのではなかろうか。第5章では、このような増殖を抑制する機構を想定し、その全容解明に迫った。

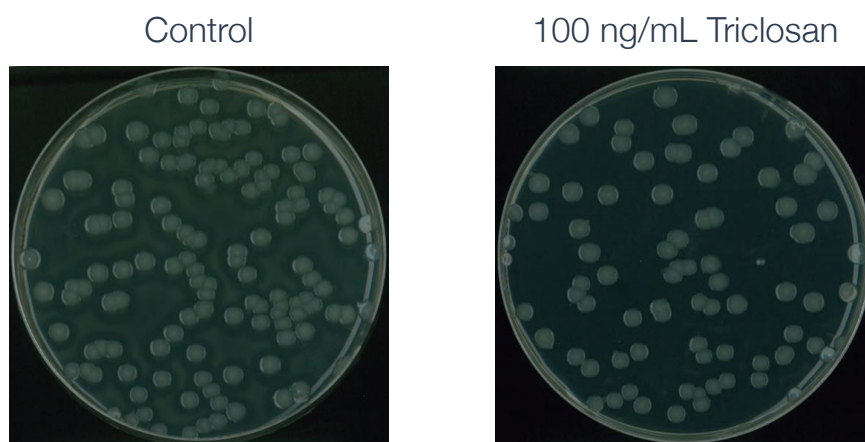


Figure 3-8. Triclosan 添加 plate における *E. coli* のコロニー

E. coli MG1655 株を、M9CAGlc-agar 固体培地および 100 ng/mL の Triclosan を添加した M9CAGlc-agar 固体培地に散布して培養した後、生じたコロニーの写真を示す。

第4章 飢餓状態の細菌のコロニー形成における脂肪酸の重要性

4.1. 緒言

第2章および第3章の実験から、*E. coli*に限らない様々な細菌において、脂肪酸が不足すると固体培養での増殖が強く抑制されるため、コロニー形成に至るには液体培養での増殖時よりも多量の脂肪酸合成を必要とすることが明らかになった。筆者は、自然界の多くの環境が飢餓条件にあることから、自然界の細菌では脂肪酸が不足しており、そのためにコロニー形成しないのではないかと予想した。これを検証するため、本章では以下のアプローチを試みた。

まず、自然界のコロニー形成しない細菌のモデルとして、VBNC化 *E. coli* に対する脂肪酸の添加効果を検証した。Colwell らの研究グループ (Colwell et al., 1985; Xu et al., 1982) および当研究室の高丸らを中心とした研究 (福嶋凡子, 2017; 西尾優宏, 2016; 高丸玲子, 2014) によって、*E. coli* は、低温飢餓条件に長期間曝しておく、と、生理活性は保ちながらも通常の固体培地に接種してもコロニーを形成しない状態、すなわち VBNC 状態に陥ることが明らかになっている。筆者は、この *E. coli* の VBNC 化は、長期の飢餓条件を経て脂肪酸が不足することに起因するのではないかと予想した。これを検証するため、固体培地に脂肪酸を供給することで VBNC 化 *E. coli* のコロニー形成能が向上するか否かを調べた。

次に筆者は、実際に自然環境中の細菌でも脂肪酸の不足がコロニー形成の制限要因となっている可能性について検討した。実験としては、土壌試料から抽出した細菌叢のコロニー形成能が脂肪酸を供給することによって向上するかを調べた。また、細菌に対する従来の脂肪酸の供給方法の改善も試みた。従来の方法では、疎水的性質を持つ脂肪酸の可溶化のために界面活性剤を用いるが、界面活性剤は一部の細菌にとって毒性を持つ可能性が高い上、界面活性剤を用いても添加濃度に限界があり、供給できる脂肪酸の種類も限られていた。そこで、界面活性剤を用いることなく種々の脂肪酸を多様な細菌に対して供給できるような方法を開発し、その有用性を示した。

このように本章では、第2章および第3章で得られた研究成果が、自然界の細菌一般のふるまいをどの程度記述できるかを検証し、さらにその応用的展望を示す。

4. 2. 材料と方法

4. 2. 1. 使用した菌株と培地

これまでの章に引き続いて、*E. coli* MG1655 株、MG1655- $\Delta fabB$ 株、*B. subtilis* 168 株および *C. glutamicum* ATCC13032 株を使用した。土壌試料は、東京大学農学生命科学研究科付属田無演習林において深さ約 20-30 cm から採取した森林土壌を使用した（サンプリングは 2015 年 8 月および 2017 年 6 月に行った）。

E. coli の培養には、LB 培地と M9CAGlc 培地を用いた（組成は 2. 2. 1.項に示した）。*B. subtilis* および *C. glutamicum* の培養には、それぞれ SPMMCAGlc 培地と CM2B 培地を用いた（組成は 3. 2. 1.項に示した）。なお、固体培地では Bacto agar (BD) あるいは agarose L03 (TAKARA) を終濃度 1.5% で添加した。

土壌試料から抽出した細菌の培養には、以下に示す組成の 1/10 LB-agarose 固体培地および 1/100 LB-agarose 固体培地を用いた。

1/10 LB-agarose 固体培地

1 g/L Bacto Tryptone (BD), 0.5 g/L Bacto Yeast Extract (BD), 0.5 g/L NaCl, 15 g/L agarose L03 (TAKARA)

1/100 LB-agarose 固体培地

100 mg/L Bacto Tryptone (BD), 50 mg/L Bacto Yeast Extract (BD), 50 mg/L NaCl, 10 g/L agarose L03 (TAKARA)

なお、上記の固体培地の作製にあたっては、agar 成分とリン酸の共オートクレーブによる過酸化水素の産生 (Tanaka et al., 2014) を避けるため、培地成分と agarose は別々にオートクレーブした。

4. 2. 2. 使用した試薬

Triton X-100 および methyl- β -cyclodextrin (Junsei Chemical) は、それぞれ 10 mg/mL および 200 mg/mL の濃度の水溶液を調製し、それぞれ適量を培地に添加して用いた。palmitoleic acid および oleic acid は、10 mg/mL の Triton X-100 水溶液に 2000 μ g/mL の濃度で溶かしたもの、あるいは 200 mg/mL の methyl- β -cyclodextrin 水溶液に 6000 μ g/mL の

濃度で溶かしたものを、それぞれ適量培地に添加して用いた。Glycerol は、10 mg/mL の濃度の水溶液を調製し、適量を培地に添加して用いた。なお、methyl- β -cyclodextrin 抱合脂肪酸の調製は、東京医科歯科大学の大隅一興研究員が行った。

PBS (-) buffer は次に示す組成のものを使用した：137 mM NaCl, 27 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄

4. 2. 3. *E. coli* の VBNC 状態の誘導および細胞数、生菌数、CFU の算出

10 mL の LB 液体培地において 37°C で対数増殖後期 (OD₆₆₀ = 0.8) まで培養した *E. coli* MG1655 株の菌液 1 mL を取り、遠心して培養上清を捨てた。菌体ペレットを、生理食塩水 (0.9%) で 2 回洗浄後、約 10⁶ cells/mL の菌密度になるよう 10 mL の滅菌水に懸濁した。この菌液を 4°C で静置し、低温飢餓条件に長時間曝すことで VBNC 状態を誘導した（以降この操作を VBNC 誘導と呼称する）。

VBNC 誘導した菌液を回収して適宜希釈し、菌液 1 mL あたりの細胞数、生菌数、CFU を次のように算出した。細胞数は Multisizer3 Coulter Counter (Beckman Coulter) を用いて測定した。生菌数は、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen) を用いた染色によって算出した生菌比率と細胞数との積により算出した。CFU は、菌液を 20 μ g/mL の oleic acid を添加した、あるいは添加しない LB-agarose 固体培地および M9CAGlc-agarose 固体培地に散布し（散布方法は 2. 2. 4. 項と同様）、37°C で終夜静置培養した後、生じたコロニー数から算出した。これを一定日数ごとに繰り返すことで、VBNC 誘導した菌液 1 mL あたりの細胞数、生菌数、CFU の経時的な変化を追跡した。

4. 2. 4. 土壌細菌の培養

土壌 1 g を 10 mL の PBS (-) buffer に懸濁し、vortex および sonicator (Tocho) を用いてそれぞれ 1 分ずつ攪拌して細胞を抽出した後、Filter Paper No. 2 (ADVANTEC) を用いた濾過によって土壌粒子を除去した。濾液を PBS (-) で適宜希釈したもの 100 μ L を固体培地に散布し（散布方法は 2. 2. 4. 項と同様）、プレートをパラフィルムでシールして 25°C で静置培養した。培養後、生じたコロニー数から、土壌 1 g あたりの CFU を算出した。

4.2.5. 土壌細菌の 16S rRNA 解析

固体培地に生じた数百コロニーから滅菌水を用いて洗い出して回収した菌体、あるいは 4 g の土壌そのものから前項の方法で抽出した濾液中の菌体から、UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) を用いて DNA を抽出した。抽出方法は kit に記載の方法に従った。

抽出した DNA に対し、以下の 2-step PCR を行うことで 16S rRNA gene の V3、V4 超可変領域の増幅・インデックスを行った。

1st round PCR

12.5 μ L の KAPA HIFI HotStart Ready Mix (KAPA)、1 μ M ずつの下記 forward および reverse primer、そして 12.5 ng の template DNA を含む合計 25 μ L の反応溶液で PCR を行った。

- forward primer:

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

- reverse primer:

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'

※ 下線部は MiSeq (Illumina) 用オーバーハングアダプター配列に相当し、下線以外の部分は 16S rRNA gene の V3、V4 超可変領域の特異的増幅プライマー、すなわち S-D-Bact-0341-b-S-17 および S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013) に相当する。

PCR は、95°C で 5 分間の初期変性反応後、「95°C で 30 秒間の変性→55°C で 30 秒間のアニーリング→72°C で 5 分間の伸長反応」のサイクルを 25 サイクル繰り返した。PCR 産物は AMPURE XP (Beckman Coulter) を用いて精製した。

2nd round PCR (index PCR)

25 μ L の KAPA HIFI HotStart Ready Mix (KAPA)、5 μ L の Nextera XT Index Primer 1 (Illumina)、5 μ L の Nextera XT Index Primer 2 (Illumina)、10 μ L の滅菌水、および 5 μ L の 1st-round-PCR 産物を含む合計 50 μ L の反応溶液で行った。PCR は上記と同様の反応条件で行い、PCR 産物は AMPURE XP (Beckman Coulter) を用いて精製した。精製は kit に記載の方法に従った。

作製したライブラリーの品質は Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies) を用いて確認した。続いて、ライブラリーに対して、MiSeq (Illumina) を用いて、paired-end の 300 bp reads の sequencing を行った。sequence データは、DNA Data Bank of Japan Sequence Reads Archive (DRA) に登録した (accession number: DRA006374)。

取得した MiSeq reads の品質は FastQC を用いて確認した。得られた reads に対して、FASTX Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) による精製と software FLASH (Magoč and Salzberg, 2011) によるアセンブルを経て、quality trim、read1 と read2 のマージ、phix 由来 reads の除去、アダプター配列の除去、primer 配列の除去および平均 quality score 30 未満の reads の除去を行い、残った reads を high quality reads として、それぞれの試料から 20 万 reads ずつ抽出した。

抽出した high quality reads を、QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) software, version 1.9.0 (Caporaso et al., 2010) を用いて解析した。SILVA 16S rRNA database ver.123 (Quast et al., 2013) を参照し、97%相同性に基づいて operational taxonomic units (OTUs) の分類を行い、QIIME による rarefaction curve の作成を行った。

なお、上記の一連の解析は、東京農大ゲノムセンターの石毛太一郎研究員が行った。

4. 2. 6. コロニーとして得られた土壌細菌の多様性解析と系統解析

QIIME を利用して、 α -多様性として Shannon index (Shannon and Weaver, 1949) および Chao1 index (Chao, 1984; Chao, 1987) を算出し、培養条件間で生じたコロニーの多様性の比較を行った。有意差の検定には、non-parametric T-test を行った。また属レベルでの系統解析は、QIIME の default の設定で行った。なお、これらの解析は、東京農大ゲノムセンターの石毛太一郎研究員が行った。

4. 2. 7. Triton X-100 または methyl- β -cyclodextrin を含む液体培地での濁度測定

対数増殖後期の *E. coli*、*B. subtilis*、または *C. glutamicum* の菌液を適宜希釈して、各種濃度の Triton X-100 または methyl- β -cyclodextrin を含む 10 mL の液体培地に植菌して 37 °C で振盪培養し、濁度の推移を ODBox-C (TAITEC) にて測定した。

4. 2. 8. $\Delta fabB$ 株を用いた脂肪酸供給のバイオアッセイ

10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 $\mu\text{g/mL}$, Triton X-100 100 $\mu\text{g/mL}$) で終夜培養した MG1655- $\Delta fabB$ 株の菌液を、生理食塩水 (0.9%) を用いて適宜希釈した。希釈液 100 μL を、Triton X-100 または methyl- β -cyclodextrin を用いて脂肪酸を供給した約 10 plates の固体培地に散布 (散布方法は 2. 2. 4. 項と同様) し、37°C で静置培養した。この固体培地における $\Delta fabB$ 株の細胞数の経時的な変化を、2. 2. 5. 項に示した方法で定量した。

4. 3. 結果

4. 3. 1. VBNC 化 *E. coli* に対する脂肪酸供給の効果

E. coli は、低温飢餓に長期にわたって曝され続けると、生理活性は保っているにもかかわらず、栄養条件の整った培地に接種してもコロニーを形成しなくなる。このような状態は VBNC 状態と呼ばれ、見かけ上は同様の表現型を示すために、自然環境中の培養できない微生物の生理状態を反映すると考えられている。筆者は、この *E. coli* の VBNC 化は、長期の飢餓条件を経て脂肪酸が不足するために起こるのではないかと予想した。これを検証するため、低温飢餓条件に曝して VBNC 化させた *E. coli* を、脂肪酸を添加しない固体培地と、脂肪酸として 20 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid を添加した固体培地とに散布して培養し、両者に生じるコロニー数を比較した (Fig. 4-1)。なお、ベースとする固体培地としては LB 培地と M9CAGlc 培地を用いた。

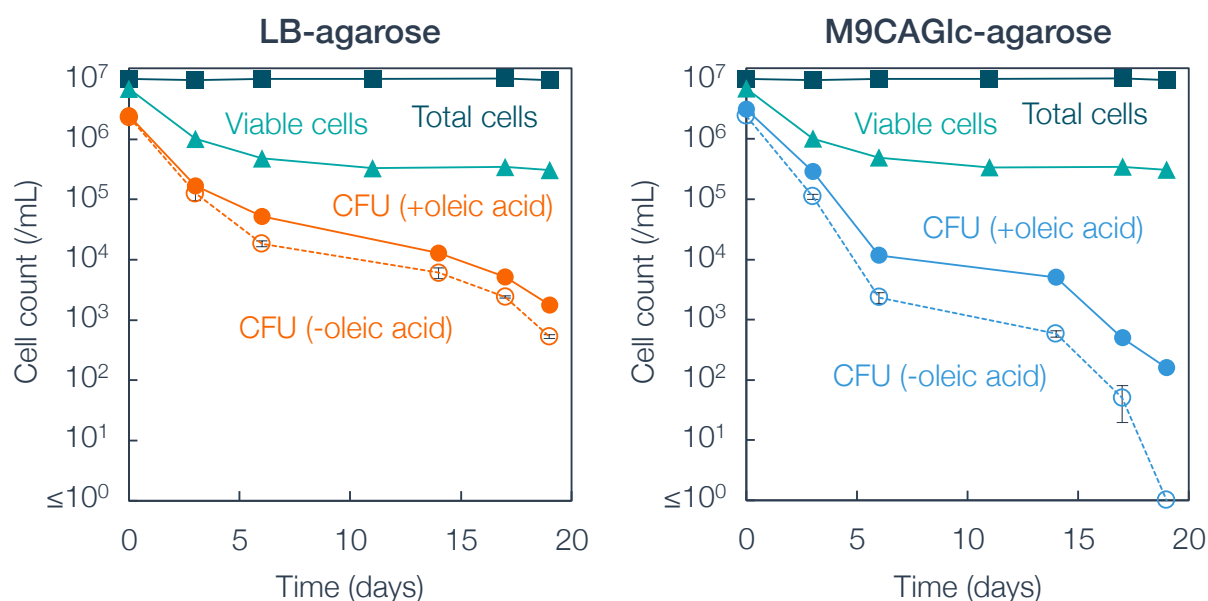


Figure 4-1. 脂肪酸添加の有無による VBNC 化 *E. coli* のコロニー形成数の比較

対数増殖後期の *E. coli* MG1655 株の培養液を滅菌水に懸濁し、4°C で静置することで VBNC 誘導した。一定日数ごとに菌液を回収し、滅菌水 1 mL あたりの細胞数、生菌数、CFU を算出した。細胞数および生菌数は、それぞれ Multisize3 および LIVE/DEAD 染色によって算出した。CFU は、20 $\mu\text{g/mL}$ の oleic acid を添加した、あるいは添加しない LB-agarose 固体培地 (左図) および M9CAGlc-agarose 固体培地 (右図) に散布して 37°C で終夜静置培養した結果、生じたコロニー数から算出した。CFU のデータは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。なお、実験データは、筆者の修士論文から引用した (納庄一樹, 2015)。

VBNC 誘導の開始以降、日数経過に従って、生菌数と CFU との差が大きくなり、VBNC 化が進行していることがわかる。しかし oleic acid を添加した場合には、LB 固体培地と M9CAGlc 固体培地のいずれでも、添加しない場合に比べて高い CFU を示していた。このような oleic acid 添加培地と非添加培地での CFU の差は、VBNC 誘導 0 日目、すなわち栄養増殖直後のストレスのない生理状態の *E. coli* では観察されなかったが、VBNC 化の経日的な進行とともにその差は大きくなっていき、LB 固体培地では最大 3 倍以上、M9CAGlc 固体培地では最大 10 倍以上の oleic acid 添加による CFU の増大が確認された。特に、観察最終日となる VBNC 誘導 19 日目の *E. coli* では、oleic acid 非添加 M9CAGlc 固体培地ではコロニーの形成が全く見られなかったのに対し、oleic acid 添加培地では数百程度のコロニーの形成が観察された。なお、本実験の M9CAGlc 固体培地は、固化剤として agar ではなく agarose を用いており、かつ調製の際には固化剤と培地成分を別々にオートクレーブしたので、本実験の結果には、agar に起因する生育阻害効果 (Hara et al., 2012; Tanaka et al., 2014) は関与しないものと考えられる。

第 2 章の $\Delta fabB$ 株の結果 (Fig. 2-9, 2-11)、すなわち固体培地での増殖開始には一定量以上の脂肪酸が必要であったことと考え合わせると、VBNC 化した *E. coli* の細胞では、長期の飢餓条件を経て脂肪酸合成機能が極端に低下しており、脂肪酸以外の栄養素が供給されても十分な脂肪酸量を合成できないがゆえに、増殖も開始することができないのではないかと推察した。ここに脂肪酸が外部から供給されることで、細胞の基本的機能の回復をもたらす初期代謝 (増殖) が可能となり、それにともなって脂肪酸合成機能も十分に上昇して、コロニー形成の初期に存在する増殖抑制効果を乗り越えてコロニー形成に至ることができると考えられる。

また、LB 培地における oleic acid 添加条件と非添加条件との間の CFU の差は、M9CAGlc 培地における差よりも小さかったが、これについては、LB 培地にはもともと微量の脂肪酸が含まれると推定される (第 2 章、Fig. 2-9 参照) ために oleic acid の添加効果が小さいのだと考えられる。また oleic acid 添加・非添加条件間の差だけでなく、絶対数として、全体的に LB 固体培地でのコロニー形成数の方が、M9CAGlc 固体培地でのコロニー形成数よりも高い。このことから、脂肪酸以外にも、LB 培地にあつて M9CAGlc 培地にはないよう

な因子がコロニー形成の制限要因として存在する可能性がある。第2章では、同様の LB 培地であって M9CAGlc 培地にはないような成分が、M9CAGlc 培地における *E. coli* 野生株の固体培養と液体培養間の増殖速度の差 (Fig. 2-12) を生む要因ではないかと推定した。

以上の結果から、*E. coli* が長期の飢餓条件に際してコロニー形成能を失う主要因の一つは脂肪酸の不足であり、脂肪酸の供給によってコロニー形成能が一部回復することが明らかになった。

4.3.2. 土壌細菌に対する脂肪酸供給の効果

通常の実験室条件では旺盛なコロニー形成能を示す *E. coli* でさえ、飢餓条件に長期間曝されるとコロニー形成に外部からの脂肪酸供給を必要とすることが明らかになった。次に筆者は、自然界の細菌も、*E. coli* と同様、脂肪酸が不足することでコロニー形成しにくい状態に陥っているのではないかと予想した。そうだとすると、VBNC 化 *E. coli* と同様、脂肪酸の供給によってコロニー形成数の増大が見込めるはずである。これを検証するため、土壌から抽出した細菌を、脂肪酸を添加しない固体培地と添加した固体培地に散布して生じるコロニー数を比較した (Fig. 4-2)。なお固体培地は、LB 培地の培地成分を 1/10 の濃度に薄めた 1/10 LB 培地をベースに、固化剤として agarose を使用し、かつ培地成分と別々にオートクレーブして作製した。

培養の結果、土壌細菌においても、VBNC 化 *E. coli* と同様、脂肪酸の供給によってコロニー形成数が増大することが明らかになった。palmitic acid と oleic acid を 20 µg/mL ずつ添加した固体培地では、添加しない培地の 8 倍以上のコロニーが形成されていた。なお、質量として脂肪酸の倍量以上の Glycerol の添加は効果がなかったことから、本実験では、palmitic acid と oleic acid は、単なる C 源として利用されたわけではなく、リン脂質を形成する脂肪酸として機能することでコロニー形成に寄与したことが示唆される。

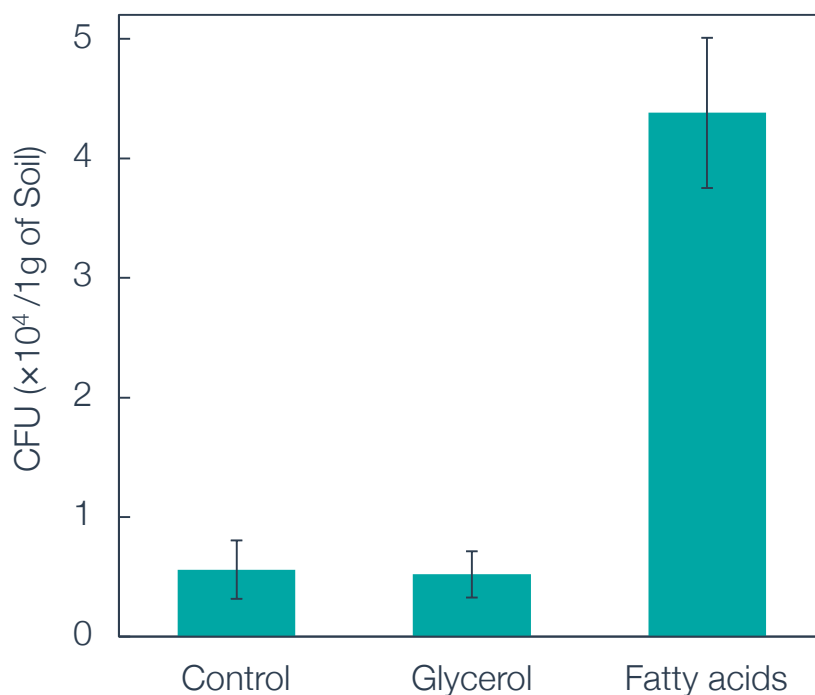


Figure 4-2. 脂肪酸の有無による土壌細菌のコロニー形成数の比較

2015 年 8 月にサンプリングした土壌 1 g から抽出した細菌を、100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 のみを含む 1/10 LB-agarose 固体培地（Control）、100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 と 100 $\mu\text{g/mL}$ の Glycerol を含む 1/10 LB-agarose 固体培地（Glycerol）、100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 と palmitic acid および oleic acid を 20 $\mu\text{g/mL}$ ずつ含む 1/10 LB-agarose 固体培地（Fatty acids）の三種の固体培地に散布して 25°C で 10 日間静置培養した。培養後、生じたコロニー数から、土壌 1 g あたりの CFU を算出した。各データは 15 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

以上より、自然界の細菌においても、脂肪酸の不足がコロニー形成しない主要な要因の一つであることが示唆された。

次に、脂肪酸の添加によって確かにコロニー形成数は増大するが、得られる細菌叢の遺伝的多様性も増大するのかを検証した。脂肪酸非添加培地および添加培地で得られたコロニー、または土壌そのものから抽出した細胞から DNA を抽出し、これら 3 グループの細菌叢の 16S rRNA 配列に基づく多様性解析を行った。

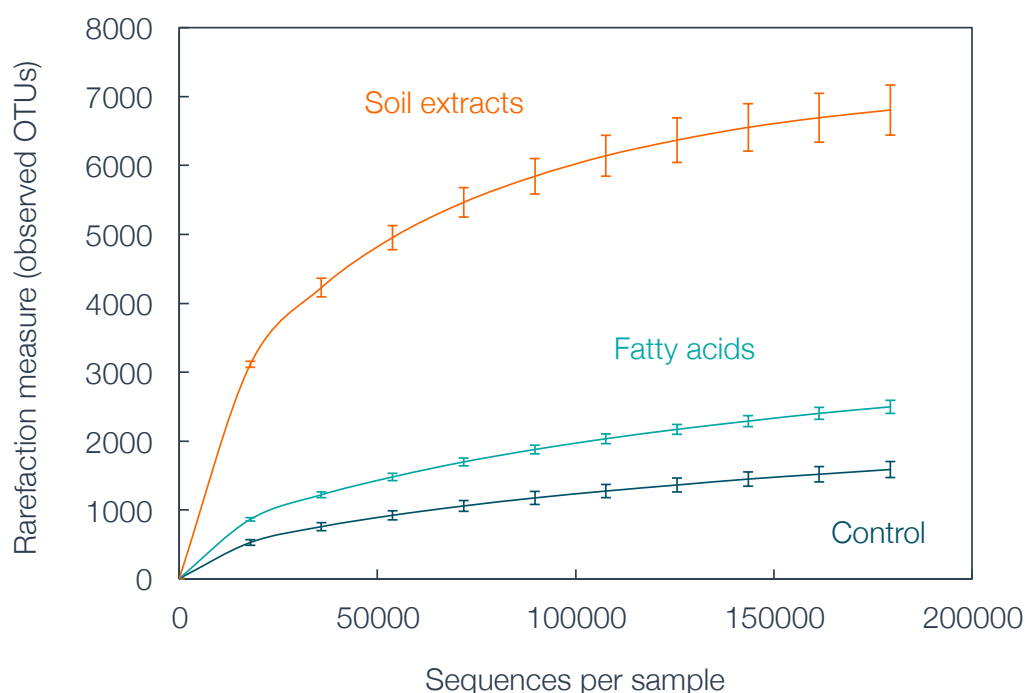


Figure 4-3. 取得した土壌細菌の OTU に基づく rarefaction curve

Fig. 4-2 で、Triton X-100 のみを添加した 1/10 LB-agarose 固体培地に生じたコロニーから抽した DNA (Control, n=3)、palmitic acid と oleic acid を添加した 1/10 LB-agarose 固体培地に生じたコロニーから抽出した DNA (Fatty acids, n=3)、あるいは土壌そのもの 4 g から抽出した DNA (Soil extracts, n=2) の 16S rRNA 配列から得られた operational taxonomic units (OTUs) に基づいて作成した rarefaction curve を示す。

まず Fig. 4-2 で、Triton X-100 のみを添加した固体培地で生じたコロニー、脂肪酸を添加した固体培地で生じたコロニー、および土壌から直接抽出した細胞のそれぞれから DNA を抽出し、16S rRNA の配列を基に OTU を分類し、rarefaction curve を作成した (Fig. 4-3)。OTU の数はプラトーに達していたため、OTU 数の推定には取得した 20 万 reads で十分と判断された。各集団で得られた OTU 数を比較すると、脂肪酸を添加した培地に生じたコロニーの OTU 数は、土壌から直接抽出した細菌叢の OTU よりは少なかったものの、脂肪酸を添加しない培地に生じたコロニーの OTU よりは高い値を示した。したがって、脂肪酸の供給によって、コロニーとして取得できる細菌の種数も増大することが明らかになった。

続いて、得られた集団の α 多様性を比較した (Fig. 4-4)。Shannon index および Chao1 index の双方とも、脂肪酸を添加した培地と添加しない培地に生じたコロニー集団間では

サンプルサイズが小さかったため (n=3) に有意差こそ出なかったものの、脂肪酸添加によって得られるコロニー集団の遺伝的多様性が増大する傾向が確認できた。

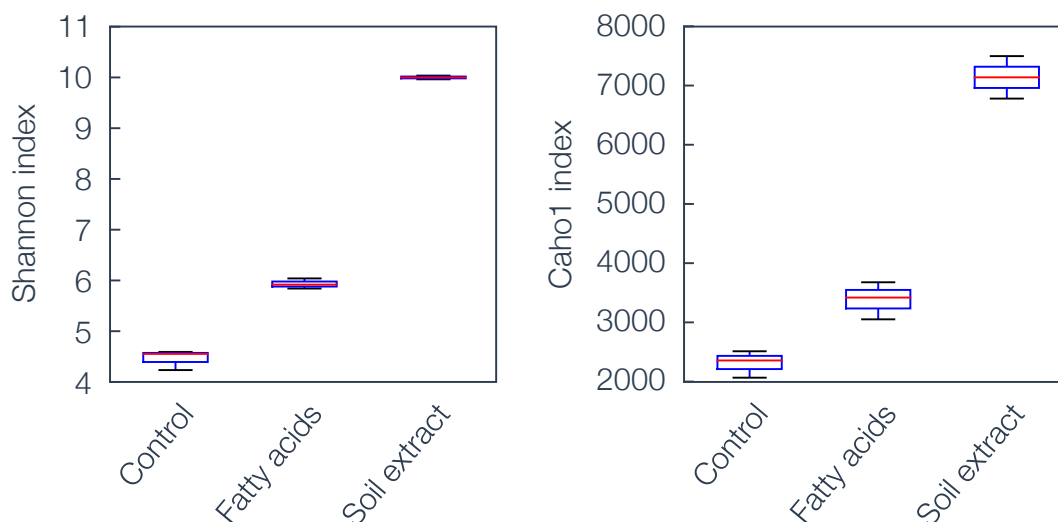


Figure 4-4. 取得した土壌細菌の α -多様性

Fig. 4-3 で取得した 16S rRNA 配列に基づいて、QIIME による Shannon index (左図) と Chao1 index (右図) の算出を行った。

さらに、脂肪酸を添加した培地と添加しない培地に生じたコロニーにおいて、サンプルごとに得られた細菌叢の属レベルでの系統解析を行った (Fig.4-5)。その結果、予想通り、脂肪酸添加培地では非添加培地に比べて得られる細菌叢の属レベルでの多様性が増大していた。特に *Xanthomonadaceae* 科の細菌は、脂肪酸を添加しない培地では検出されなかったが、脂肪酸を添加した培地では多数検出されていた。しかし、得られた細菌叢の大半が、いずれの条件も *Proteobacteria* 門で占められていた。また、Fig.4-2 で得られた CFU も、土壌 1g あたり 10^4 オーダーという低い値を示しており、本実験における培養系で取得できる細菌叢の偏りが明らかになった。

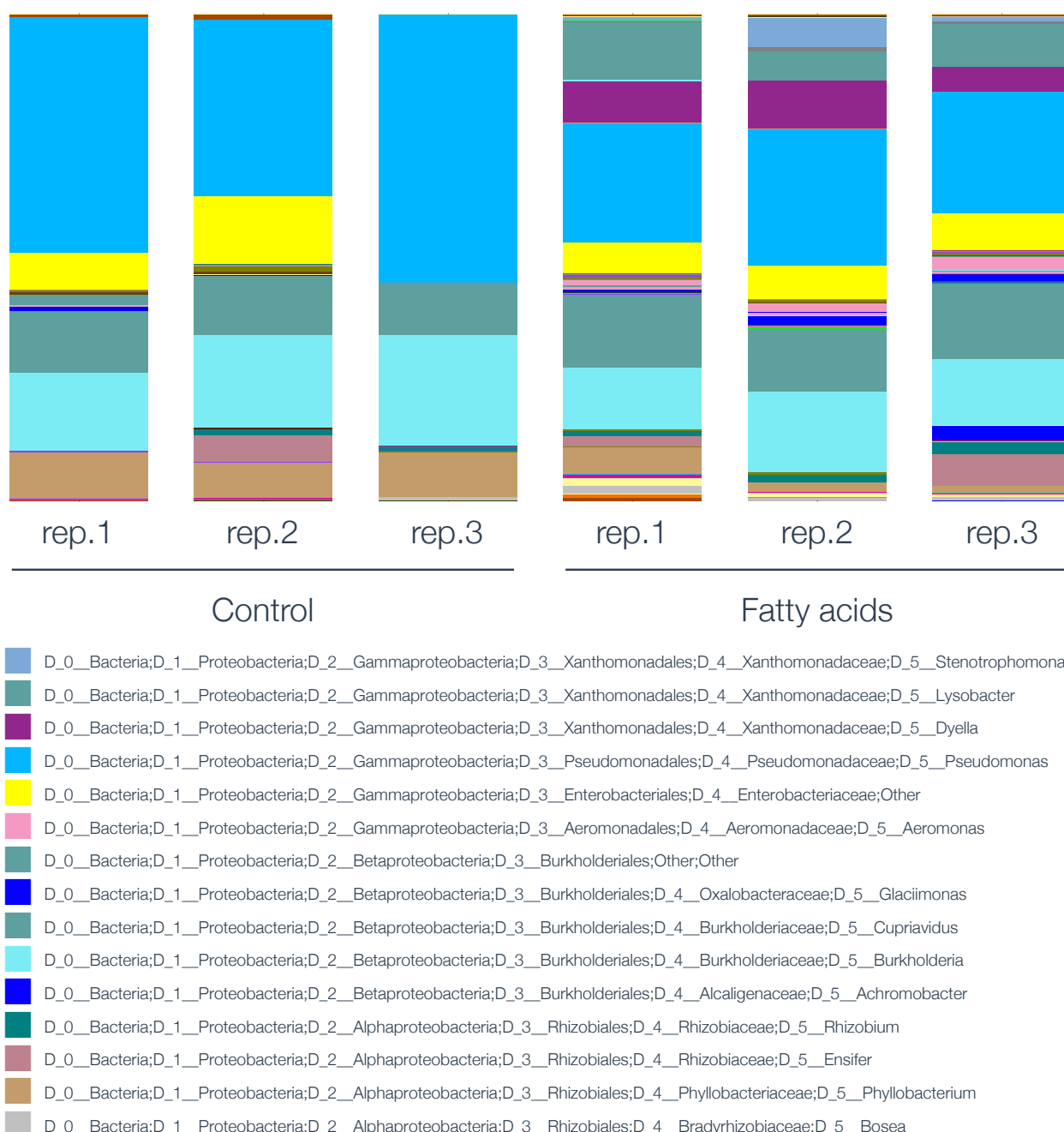


Figure 4-5. コロニーとして取得した土壌細菌の属レベルの系統解析

Fig. 4-3 で取得した 16S rRNA 配列に基づいて、脂肪酸添加および非添加固体培地で生じたコロニー間（各 n=3）の属レベルの系統解析を行った。凡例は検出された上位 15 属（population として 0.5%以上）のみを示す。

このような細菌叢の偏りを生んだ原因として、使用した培地が不適切であったことや好気培養という培養条件が、深さ 20-30 cm の土壌試料の細菌の生育には不適切であったことも考えられるが、筆者は、脂肪酸を可溶化するために用いた Triton X-100 が、*Proteobacteria* 以外の土壌細菌の生育を阻害していた可能性を最も疑い、これについて次項で調べた。

4. 3. 3. methyl- β -cyclodextrin を用いた細菌への脂肪酸供給方法の開発

脂肪酸を可溶化するために用いた Triton X-100 が、使用した濃度で毒性を持つかどうかを検証するため、10 または 100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 を添加した液体培地で *E. coli*、*B. subtilis* および *C. glutamicum* の三種の細菌を培養し、増殖を比較した (Fig. 4-6)。その結果、*E. coli* は 100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 添加時にも問題なく増殖した。筆者は、*E. coli* に対して 100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 は毒性を持たないことをすでに調べていたが (納庄一樹, 2015)、ここでもそれを再確認した。一方で、*B. subtilis* および *C. glutamicum* は 10 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 添加時には増殖に遅れが生じ、100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 添加時には生育が大きく阻害され、ほとんど増殖しないことが示された。

以上の結果から、Triton X-100 を用いた脂肪酸供給は、*E. coli* をはじめとする *Proteobacteria* 門の細菌に対しては有効だが、それ以外の細菌に対しては強い毒性を生じることが示唆された。脂肪酸供給によってコロニー形成数を増大し、取得できる細菌叢の多様性を増大させようとする試みには、Triton X-100 といった界面活性剤を利用しない脂肪酸供給方法の開発が望まれる。

そこで筆者は、東京医科歯科大学の大隅一興研究員の提案を受け、脂肪酸の供給剤として Cyclodextrin に着目した。Cyclodextrin とは 5 分子以上の D-Glucose が $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合を介して環状に繋がったもので、環状構造の内側は疎水性、外側は親水性となっているため、内側に疎水性分子を抱合することで疎水性分子を可溶化するという特徴がある (Bender and Komiyama, 1978)。Cyclodextrin として一般に用いられるものは Glucose が 6-8 分子結合したもので、それぞれ α -cyclodextrin (6 分子)、 β -cyclodextrin (7 分子)、 γ -cyclodextrin (8 分子) と呼ばれる。特に methyl 修飾基を持つ methyl- β -cyclodextrin は脂肪酸のキャリアーとして有用で、動物細胞に対する脂肪酸供給に実用化されている (Ulloth et al., 2003)。筆者および大隅一興研究員は、細菌に対しても methyl- β -cyclodextrin を利用した脂肪酸供給が可能なのではないかと考えた。ただし、methyl- β -cyclodextrin も、高濃度になると細胞膜の脂質を除去するために毒性を示すことが動物細胞で報告されており (Ulloth et al., 2003)、細菌に対する毒性の検証を行う必要がある。

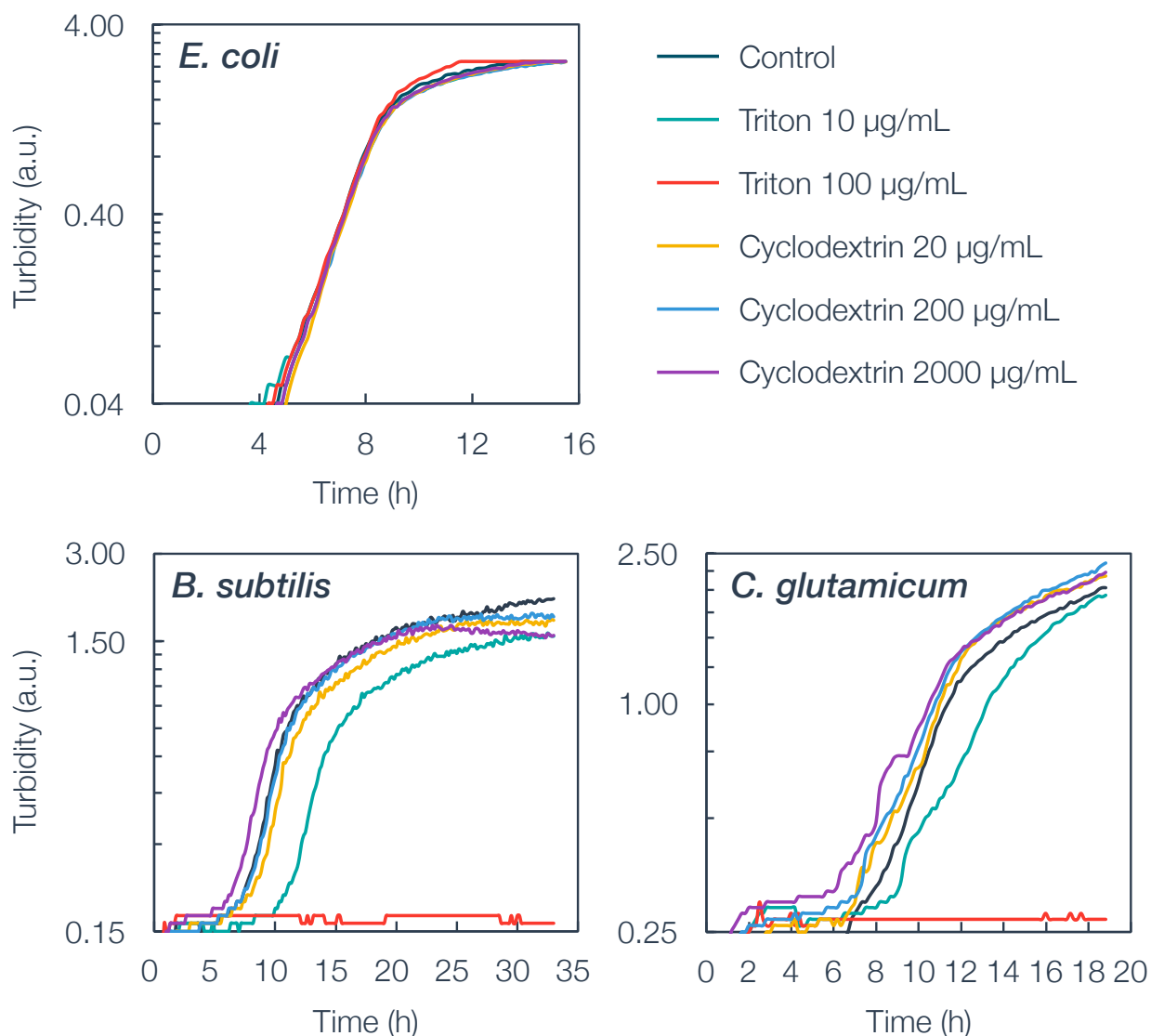


Figure 4-6. Triton X-100 または methyl- β -cyclodextrin を含む培地における細菌の生育

E. coli MG1655 株、*B. subtilis* 168 株および *C. glutamicum* ATCC13032 株を、それぞれ、各種濃度の Triton X-100 または methyl- β -cyclodextrin を含む 10 mL の M9CAGlc 液体培地、SPMMCAGlc 液体培地、および CM2B 液体培地において 37°C で振盪培養した際の濁度推移を記録した。

筆者は、各種濃度の methyl- β -cyclodextrin を添加した液体培地における *E. coli*、*B. subtilis* および *C. glutamicum* の生育を比較した (Fig. 4-6)。その結果、methyl- β -cyclodextrin は、2000 $\mu\text{g/mL}$ の濃度でも、これらの細菌の生育に影響を与えないことがわかった。2000 $\mu\text{g/mL}$ の methyl- β -cyclodextrin は、60 $\mu\text{g/mL}$ までの脂肪酸の抱合と可溶化が可能である。

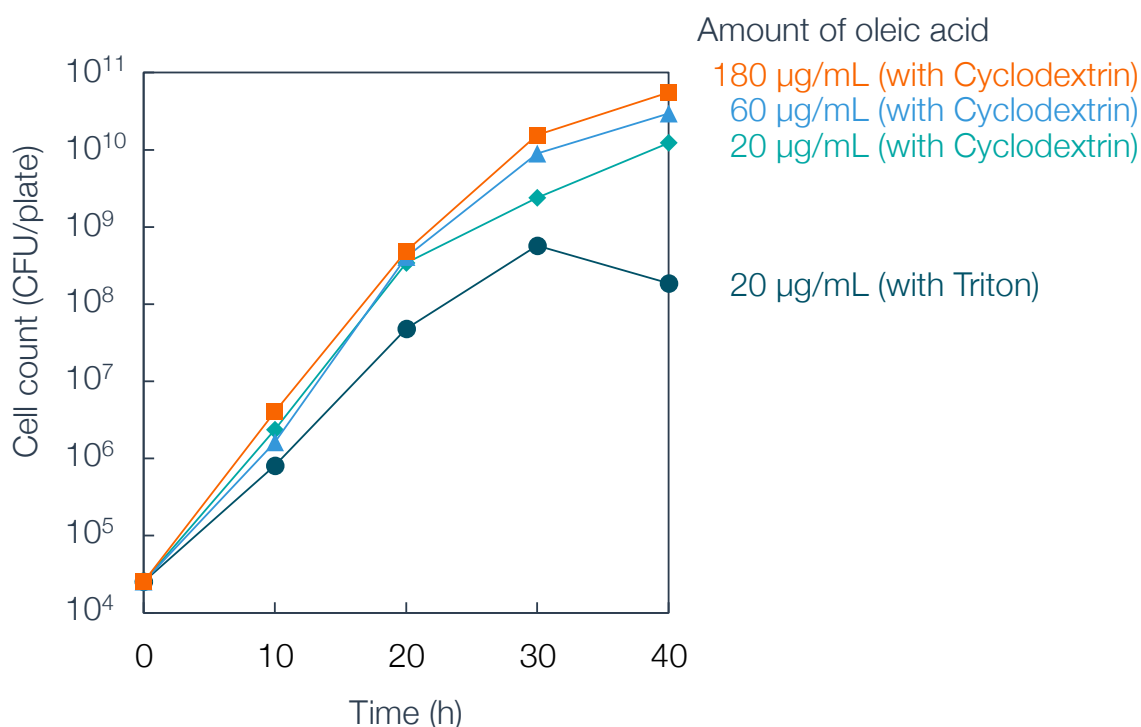


Figure 4-7. Triton X-100 または methyl- β -cyclodextrin による $\Delta fabB$ 株への oleic acid の供給能の比較

10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 20 μ g/mL, Triton X-100 100 μ g/mL) において 37°C で終夜振盪培養した MG1655- $\Delta fabB$ 株の菌液を、適宜希釈して 100 μ L ずつ、Triton X-100 または methyl- β -cyclodextrin を用いて供給した各種濃度の oleic acid を含む M9CAGlc-agarose 固体培地に散布して 37°C で静置培養した。経時的に固体培地上の細胞を回収し、LB-agar 固体培地 (oleic acid 20 μ g/mL, Triton X-100 100 μ g/mL) に散布して 37°C で終夜静置培養し、生じたコロニー数から、もとの固体培地 1 plate あたりの細胞数を推定した。

続いて筆者は、実際に、methyl- β -cyclodextrin 抱合体として脂肪酸を細菌に対して供給可能なのかを、 $\Delta fabB$ 株を用いたバイオアッセイによって検証した (Fig. 4-7)。実験としては、Triton X-100 を利用して oleic acid を供給した M9CAGlc 固体培地、および methyl- β -cyclodextrin を利用して oleic acid を供給した M9CAGlc 固体培地に $\Delta fabB$ 株を接種し、その生育を 2. 2. 5 項に示した方法で定量した。その結果、Triton X-100 を用いた場合と同様、methyl- β -cyclodextrin 抱合体として oleic acid を供給することでも、 $\Delta fabB$ 株の生育を支持できることが示された。さらに、同濃度の oleic acid 供給量にもかかわらず、methyl- β -cyclodextrin を用いた方が、Triton X-100 を用いた場合よりも、 $\Delta fabB$ 株の増殖速度が向上しており、かつ到達菌数も増大することがわかった。細菌にとって、界面活性剤によっ

て可溶化された脂肪酸よりも、methyl- β -cyclodextrin 抱合体として存在する脂肪酸の方が吸収・利用しやすいと考えられる。また第3章では、methyl- β -cyclodextrin を用いた脂肪酸供給によって、Triclosan による脂肪酸合成阻害時の *E. coli* (Fig. 3-4) および *C. glutamicum* (Fig. 3-5) の生育が回復することをすでに示している。よって、methyl- β -cyclodextrin を利用することで *E. coli* 以外の細菌に対しても、生育阻害を及ぼすことなく脂肪酸を供給できることが示された。

以上より、細菌に対する脂肪酸供給において、methyl- β -cyclodextrin は、Triton X-100 をはじめとする界面活性剤よりも優れた供給能力を有することが明らかになった。

4. 3. 4. methyl- β -cyclodextrin を用いた土壌細菌に対する脂肪酸供給の効果

上記で開発した methyl- β -cyclodextrin を利用した脂肪酸の供給方法によって、土壌細菌のコロニー形成数が、Fig. 4-2 よりもさらに増大するかを検証した (Fig. 4-8)。なお、固体培地は、Fig. 4-2 で用いた 1/10 LB 培地よりもさらに栄養分の希薄な 1/100 LB 培地をベースに、固化剤として agarose を使用し、かつ培地成分と別々にオートクレーブして作製した。

全体として CFU は高くなり、 10^5 /g オーダーに達したものの依然低く、なおかつ本実験では、脂肪酸供給によるコロニー形成数の増大が見られなかった。したがって、Fig. 4-2 で見られた脂肪酸の供給効果は、*Proteobacteria* 門に限られる可能性もある。ただし、ここで試験した脂肪酸は種類が限られており、飽和脂肪酸や分岐鎖脂肪酸など、多くの細菌で利用されている脂肪酸種 (Cho and Salton, 1966) をほとんどカバーしていない。したがって、最終結論を得るためには、多様な脂肪酸種の組み合わせを試験する必要がある。また、本研究ではベースとして用いる培地や培養条件、土壌サンプルの調製方法など検討が十分ではないため、これらを最適化した上で脂肪酸の供給効果を検証する必要がある。

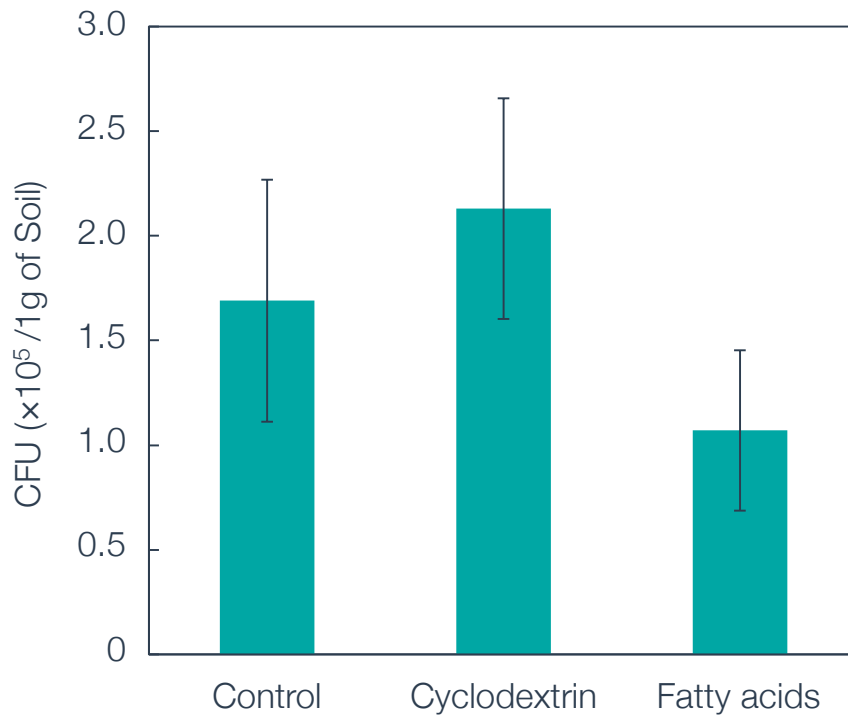


Figure 4-8. methyl- β -cyclodextrin 抱合脂肪酸の供給による土壌細菌のコロニー形成の比較
 2017 年 6 月にサンプリングした土壌 1 g から抽出した細菌を、1/100 LB-agarose 固体培地 (Control)、2 mg/mL の methyl- β -cyclodextrin を含む 1/100 LB-agarose 固体培地 (Cyclodextrin)、2 mg/mL の methyl- β -cyclodextrin と palmitic acid および oleic acid を 30 μ g/mL ずつ含む 1/100 LB-agarose 固体培地 (Fatty acids) の三種の固体培地に散布して 25°C で 43 日間静置培養した。培養後、生じたコロニー数から、土壌 1 g あたりの CFU を算出した。各データは 10 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

4. 4. 考察

本章では、実際に自然界の細菌において、脂肪酸の不足がコロニー形成できない主要因の一つである可能性について検討した。

筆者は、自然界の細菌の大半は飢餓状態にあるため、コロニー形成に必要な脂肪酸量を確保できていないのだろうと予想した。これを検証するために、まずは VBNC 化 *E. coli* を用いた実験を行った。*E. coli* の野生株は、第 2 章で示したように、通常の実験室条件では、おそらく細胞内での脂肪酸合成量が十分なため、コロニー形成に外部添加の脂肪酸を要求しない (Fig. 2-7, 2-9, 2-12)。本章では、このような *E. coli* でも、低温飢餓に長期間曝され続けると、コロニー形成に外部からの脂肪酸供給を要求するようになることが明らかとなった (Fig. 4-1)。また、第 3 章で見た薬剤による脂肪酸阻害時のコロニー (Fig. 3-8) と同様、VBNC 誘導後の *E. coli* のコロニーも均一な形状・大きさを示しており、途中で生育が止まっているような小さなサイズのコロニーは見られなかった。長期の飢餓条件に曝された細胞がコロニー形成するか否かは、初期の分裂開始が重要で、一度増殖を始めた集団は問題なく増殖を繰り返して一定サイズのコロニーを形成するのだろう。筆者は、第 2 章および第 3 章でも述べたように、固体培地での障壁を乗り越えて増殖するには一定量以上の脂肪酸が必要で、その閾値を下回った細胞では「積極的」に増殖が抑制されていると予想している。VBNC 化した大腸菌では、長期の飢餓条件を経て細胞内の脂肪酸蓄積量が低下、あるいは脂肪酸合成機能が大きく低下しており、脂肪酸以外の栄養素が供給されても上記の閾値を越える脂肪酸量を確保することができないために強い増殖抑制がかかり、コロニー形成できないのではないだろうか。脂肪酸を供給することで、一部の細胞はこの閾値を超えることができ、増殖を開始し、それにともなって脂肪酸合成機能も十分に回復するため増殖を継続し、コロニー形成に至ると考えられる。ただし、脂肪酸を供給しても全ての細胞でコロニー形成能が回復するわけではなく、生菌数との差は数桁以上開いている。これについては、FadL などの脂肪酸輸送体の活性も低下しているために細胞内へ脂肪酸を取り込めず、増殖を開始できない細胞が存在する可能性のほか、脂肪酸以外にもコロニー形成に必要な因子が存在する可能性がある。例えば、LB 培地でのコロニー形成数は、脂肪酸の添加・非添加に依らず、M9CAGlc におけるコロニー形成数よりも高かったため、LB 培

地にあつて M9CAGlc にはない成分が、脂肪酸以外にもコロニー形成に寄与する可能性は高い。このような因子を特定して供給量を増やすことで、VBNC 化 *E. coli* のコロニー形成能をさらに向上させることが可能かもしれない。

続いて筆者は、実際に自然界の細菌においても脂肪酸の不足がコロニー形成の制限要因となっているかを検証するため、土壌細菌を対象に脂肪酸の供給効果を調べた。Triton X-100 を用いた脂肪酸供給によってコロニー形成数は増大したものの、おそらくは Triton X-100 の毒性のために、そのほとんどが *Proteobacteria* 門の細菌に偏っていた (Fig. 4-2, 4-5)。そこで筆者らは、Triton X-100 の毒性を回避しつつ細菌に脂肪酸を供給する方法として、methyl- β -cyclodextrin を用いた方法を開発し、 $\Delta fabB$ 株をはじめとする細菌に対して、生育阻害効果を示すことなく効率的に脂肪酸を供給できることを実証した (Fig. 4-6, 4-7)。しかし残念ながら調べた範囲内では、この方法を用いた脂肪酸供給によって土壌細菌のコロニー形成数を増大させることはできなかった (Fig. 4-8)。ただし、本実験では試した脂肪酸の種類も少なく、培養条件の検討も不十分であった。これらを改良して最適な脂肪酸種の供給を実現することで、当研究アプローチの応用的有用性を示すことができると筆者は信じている。また、本研究で開発した細菌に対する新規の脂肪酸供給方法は、従来は難しかった飽和脂肪酸をはじめとする様々な脂肪酸の供給を原理的には可能とする。本方法は、特定の脂肪酸のみを要求する微生物種に狙いを絞った分離培養法など、脂肪酸を対象とした様々な基礎研究・応用研究に利用されることが期待される。

第5章 総括、総合討論と今後の展望

5.1. 本研究の総括

5.1.1. 本研究の位置づけと特色

微生物、特に細菌は、遺伝子や生体分子の多様性からみれば、生物多様性の圧倒的大部分を占める生物資源の宝庫である。しかし、その膨大な資源を手に入れる上での根本的な障壁は、自然界の大半の細菌がコロニーとして分離・培養できないことである。メタゲノム的手法を使えば既存知識から類推できる遺伝子を拾うことはできるが、全く新しい遺伝子や生体分子、微生物機能の発見には新規微生物の分離・培養が不可欠である。コロニー形成頻度が特定の条件下で大きく低下する事実に対し、これらを培養するための培地条件や手法を改良する試みがこれまで多くなされてきた。それらは一定の成功を収めてきたが、未だ大部分の微生物は培養出来ていない。これに対し筆者は、コロニー形成能が低いことは細菌本来の性質に基づいたものであり、それには特定の遺伝的機能が強く関わるとの仮説を立てた。本研究は、*E. coli* を用いて、自然界の細菌がコロニーを作らない状態を「変異として」モデル化し、固体培養と液体培養における生育差からコロニー形成のメカニズムに迫ろうとするものであり、既存研究の視点とは一線を画する独創的な研究である。

5.1.2. 本研究のまとめ

本研究では、固体培養での細菌の増殖には、液体培養時にない（あるいはほとんどない）何らかの障壁が存在し、それを乗り越えてコロニー形成に至るためには特定の遺伝子・生理機能が必要であるとの仮説のもと、そのような遺伝子の特定を目指した。当研究室では前任者らによって、そのような遺伝子の候補として *E. coli* の *fabB* 遺伝子が分離されていた。

第2章では、*fabB* の変異株、すなわち *fabB^{ts}* 株および Δ *fabB* 株の解析を進めた結果、脂肪酸合成が不足すると、固体培養での増殖が特に強く抑制され、増殖頻度が液体培養時に比べて大きく低下することが明らかとなった。さらなる解析の結果、固体培養での増殖開始には液体培養よりも多量の脂肪酸が必要であることが明らかになった。これについて筆者は、固体培養には増殖の障壁が存在し、脂肪酸が不足するとこの障壁を乗り越えられない

ために増殖が抑制されてしまうと考えた。一方で、 $\Delta fabB$ 株の液体培養でのふるまいを基に、このような固体培養での増殖抑制は、脂肪酸が少ない場合に細胞が不用意に増殖して機能不全に陥るのを防いでいるのではないかと推定した。

第 3 章では、脂肪酸合成の阻害剤を用いることで、*E. coli* を含む様々な細菌における脂肪酸不足時の固体培養と液体培養での生育差を調べた。*E. coli*、*B. subtilis*、および *C. glutamicum* において、脂肪酸合成酵素の活性が低下した場合には固体培養での増殖頻度が液体培養での増殖頻度に比べて大きく低下した。このように系統的に離れた 3 種の細菌で共通の表現型が確認されたことから、第 2 章の結論は、細菌一般にも拡張されると期待される。

第 4 章では、飢餓状態に陥った細菌がコロニー形成できない要因の一つが、脂肪酸の不足に起因するとの可能性を示した。まず、VBNC 化 *E. coli* を対象に実験を行った。長期の飢餓条件に曝すことで VBNC 化させた *E. coli* では、脂肪酸の供給によってコロニー形成数が最大で 10 倍以上に増大した。これについて筆者は、長期の飢餓条件を経て脂肪酸合成機能が低下するために、固体培養での障壁を乗り越えてコロニー形成することができず、VBNC 状態に陥るのではないかと推定している。さらに、一部の土壌細菌でも脂肪酸の供給によってコロニー形成数が増大したことから、脂肪酸の不足は、自然界のほとんどの細菌がコロニー形成できない主要な要因の一つとなっていることが示唆された。ただしここで得られた結論は、脂肪酸を可溶化するために用いた界面活性剤の毒性のために、*Proteobacteria* 門の細菌に限定されていた。そこで界面活性剤に代えて、methyl- β -cyclodextrin を用いた脂肪酸供給方法を確立した。今後、培養条件を十分に検討した上で、methyl- β -cyclodextrin を用いた脂肪酸供給の効果を検証し、脂肪酸の不足が自然界の細菌の分離培養の制限要因となっていることを実証するとともに、その応用、すなわち脂肪酸供給による高効率な分離培養法の確立を目指す。

本研究では、脂肪酸不足時の固体培養と液体培養での生育差の背景には、固体培養で特に大きな増殖の障壁が存在すると想定したが、そのような増殖の障壁を用意する機構、すなわち脂肪酸不足時の増殖抑制機構の全容解明には至っていない。今後、Omics 解析や遺伝学的手法を駆使した多様なアプローチによって、筆者の想定する増殖抑制機構の存在を

直接的に立証し、その分子機構の解明を目指す。なお、その解明の足がかりとなり得る一連の実験結果として現在得られているものを本論文の補章に付記した。

5.2. 総合討論

5.2.1. 固体培養と液体培養での増殖頻度に差を生むメカニズムに関する仮説

本研究で得られた結果を総合し、固体培養と液体培養での増殖頻度に差が生まれるメカニズムについて筆者が考えるモデルを、アクセルとブレーキのアナロジーを用いて以下のFig.5-1に示す。すなわち、細菌が固体培養で増殖する際には、液体培養に比べて大きな障壁（ブレーキ）が存在し、脂肪酸合成が関わる生理機能（アクセル）が不足するとその障壁を乗り越えて増殖を開始することができないために、コロニー形成数が液体培養時の増殖頻度に比べて大きく低下すると筆者は考えている。*E. coli*をはじめとする旺盛なコロニー形成能を示す実験室株では、その活発な脂肪酸合成機能のために増殖に必要なアクセルが十分で、固体培養でも液体培養でも増殖の障壁、すなわちブレーキの多寡は顕在化せず、通常の培養条件では固体培養と液体培養での生育差が観察されないであろう。しかしこのような細菌においても、長期の飢餓条件を経験するとアクセルを生じる能力が低下する、あるいはより強いブレーキがかかることで、特に固体培養での増殖能が低下するのではなかろうか。長期の飢餓条件がなぜこのような変化をもたらすかについては次項で考察する。



Figure 5-1. 固体培養と液体培養での増殖頻度に差が生まれるメカニズム（モデル）

固体培養と液体培養での細菌の増殖を規定する要素について、筆者の提唱するモデルを示す。

またこの増殖の障壁は細菌、少なくとも *E. coli* においては、積極的な生存戦略として採用されており、細胞が増殖に必要な生理機能が整う前に増殖を開始して機能不全に陥るのを防いでいると筆者は考えている。固体培養で特に顕著に増殖抑制が生じることから、細菌にとって固体培養という環境はストレスの大きい条件で、そこでコロニーを形成する、

すなわち高密度に増殖するというふるまいは一種の賭けに近いものなのだろう。増殖抑制は、元手（脂肪酸合成量など）が足りない状態でそのような賭けに出ないようにするための安全装置として機能しているのではないだろうか。

5.2.2. VBNC 化のメカニズムに関する仮説

近年、実験室条件で培養した遺伝的に同一な *E. coli* の細胞集団であっても、細胞ごとにタンパク質の存在量は異なっており、各種のタンパク質の細胞内存在量の分布・バラツキはガンマ分布に従うとの報告があった (Taniguchi et al., 2010)。筆者は、このような細胞内に存在するタンパク質量のバラツキが、長期の低温飢餓に際して、コロニー形成する細胞としない細胞とを分けるのではないかと、すなわち VBNC 化するかどうかを規定するのではないかと考えている。まず、脂肪酸合成酵素を例に筆者の考えるモデルを説明する。

E. coli において、FabB など、前項でコロニー形成のアクセラレーターになると想定した酵素を仮にタンパク質 X とする。通常の実験室条件ではタンパク質 X は、Fig. 5-2A に示すようなガンマ分布に従った細胞内存在量のバラツキを持つ。生存に必要なタンパク質 X の細胞内存在量の閾値を a_1 、コロニー形成に必要なタンパク質 X の閾値を b_1 とすると、通常の培養条件では *E. coli* のほとんどの細胞がコロニー形成することから、 a_1 と b_1 のいずれの値も低く、Fig. 5-2A のように分布の左端に位置すると考えられる。一方、長期の飢餓条件を経ると、タンパク質 X の活性が低下する、あるいはタンパク質 X の生産する物質の細胞内蓄積量が低下するために、生存およびコロニー形成に必要なタンパク質 X の閾値がそれぞれ増大し、Fig. 5-2B のような a_2 と b_2 といった値をとるようになるのではないかと筆者は予想している。生存に必要なタンパク質 X の閾値は大きく変わらないためにほとんどの細胞は生理活性を保つものの、増殖の障壁を超えてコロニー形成に至るのに必要なタンパク質 X の閾値は増大するため、それを下回った細胞がコロニー形成しない、すなわち VBNC 状態に陥るのだろう。つまり、低温飢餓に曝される前に多量のタンパク質 X を保持していた細胞ほど VBNC 化しにくく、逆にほとんど持っていなかった細胞は速やかに VBNC 化する。なお、VBNC 化 *E. coli* に対する脂肪酸供給は全ての細胞のコロニー形成能を回復させるわけでは

なかったことから、このようなふるまいを示し、増殖のアクセルとなるタンパク質 X は脂肪酸合成酵素以外にも存在すると筆者は考えている。

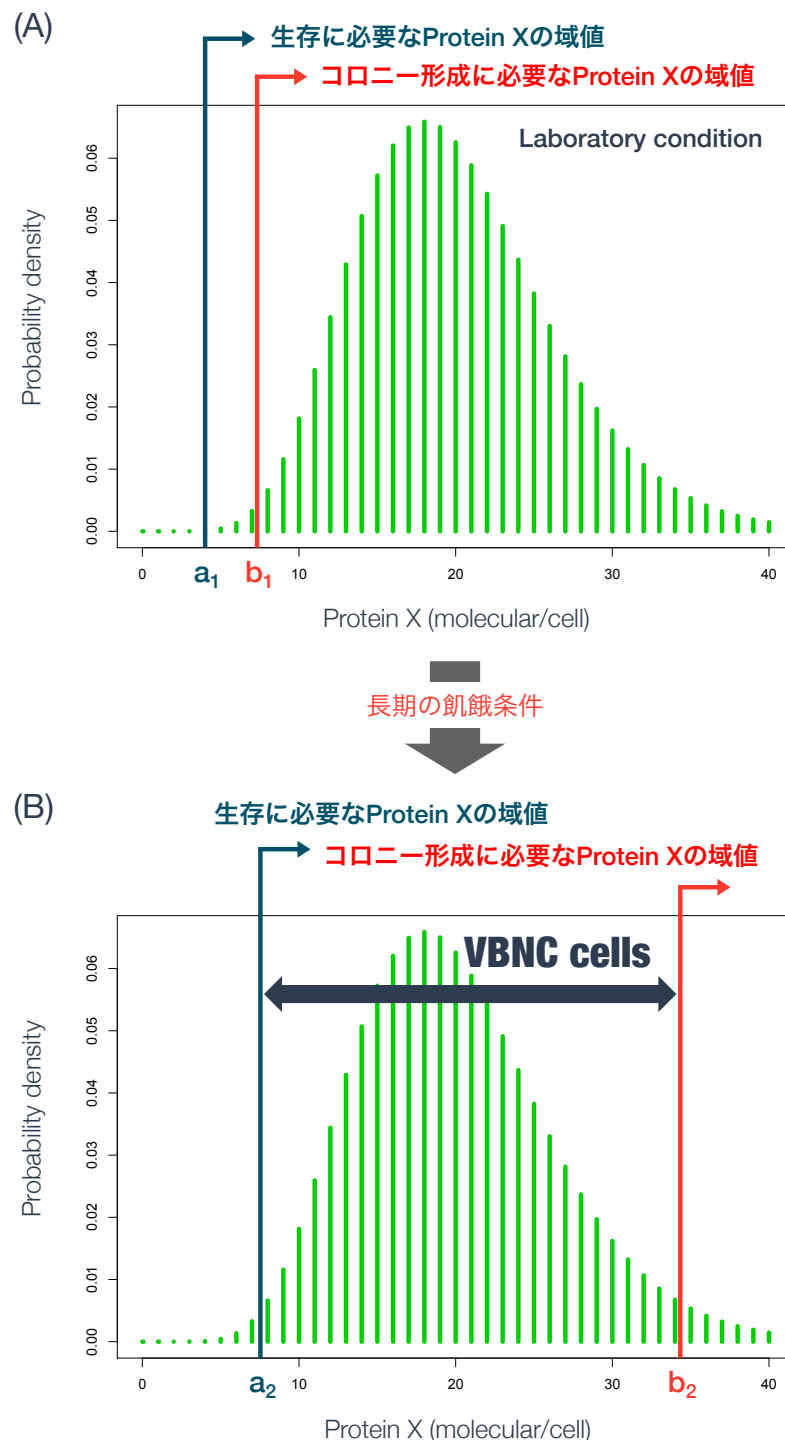


Figure 5-2. VBNC 化のメカニズム（モデル）

(A) 通常の培養条件における *E. coli* の特定のタンパク質 X の細胞内存在量の分布（ガンマ分布）と、生存およびコロニー形成に必要なタンパク質 X の閾値のモデル。(B) 長期の飢餓条件を経た後の生存およびコロニー形成に必要なタンパク質 X の閾値のモデル。

上記の例では、前項でアクセルとして機能する要素について述べたが、逆に飢餓条件などでストレスが大きくなるとブレーキを増大させるような酵素も存在し、これらが上記とは逆のふるまいをすることで増殖の障壁を増減させると筆者は予想している。これらアクセルとブレーキを上下させる因子が長期の飢餓条件を経て複合的に作用することでコロニー形成頻度が決まるのだろう。

またこのようなモデルは自然界の細菌の生理状態にも示唆を与える。すなわち、自然界に存在する細菌では、Fig. 5-2 の VBNC cells のように、最低限生理活性を保つために必要な分しか酵素群を維持していないために、コロニー形成しないのではなかろうか。そうだとすると、コロニー形成できるか否かは、特定の遺伝子を持っているかどうかよりも、特定の酵素群を細胞内にどの程度持っているかによって決まることになる。例えば、Buergerらは、土壌あるいは海洋細菌を培養し続けると、一年を経ても新たな増殖が確認され、コロニーの数は培養時間に伴って増大し続けるが、得られる微生物の多様性はほとんど変化せず、同種の細菌が、培養開始後短期間で増殖することもあれば、増殖が確認されるまでに長期間を要することがあることを明らかにした (Buerger et al., 2012)。以上より、自然界の培養できる細胞（細菌）と培養できない細胞（細菌）との違いは、遺伝的な差異以上に、どのような生理状態で存在するかによって強く規定されると考えられる。ただし当然ながら、そのような生理状態は遺伝子発現系にも大きく支配されるはずなので、いずれかのみが重要というわけではない。実際に本研究は、特定の遺伝子の変異・欠損に伴う何らかの代謝機能の低下によって、自然界の培養できない細菌の生理状態を「モデル化」できないかとのアプローチに基づいており、その結果、「脂肪酸の不足した細胞」がその一つの生理状態として見つかった。

5. 3. 今後の展望

5. 3. 1. 脂肪酸不足時の増殖の障壁の立証とその分子機構の解明

5.2.1.項では、細菌が増殖するか否かは、脂肪酸合成が強く関わる生理機能（アクセル）と増殖の障壁（ブレーキ）という独立した二つの要素によって決定されるとのモデルを提唱し、これが固体培養と液体培養との生育差を生むと予想した。しかし、これら二つの要素が独立して存在する直接の証拠は現状では得られていない。これを証明するためには、一方の要素を固定した上で、もう一方を変動させることで表現型に違いが現れることを確かめる必要がある。特に固体培養時の細胞集団は空間的に均一ではないためにヘテロな集団となっている可能性が高く、固体培養と液体培養での細胞の生理状態を正確に評価・比較することは非常に困難ではあるが、これらをクリアした上で、Omics 解析や遺伝学的解析だけでなく、多様な視点から、増殖を抑制するブレーキとして機能する分子機構を立証・解明することが必要である。

5. 3. 2. 自然界の細菌に対する脂肪酸の供給効果の検討

methyl- β -cyclodextrin を利用することで、細菌に対して生育阻害効果を与えることなく、効率良く様々な脂肪酸を供給できることを実証した。しかし同方法による脂肪酸供給では、土壌細菌の培養効率は向上しなかった。これには以下に示す問題点があった。

- 供給した脂肪酸の種類が限られていた。
- 培養条件の検討が不十分で、脂肪酸の有無にかかわらず培養効率が低かった。

今後、培養条件を最適化した上で、様々な脂肪酸の供給効果を検証し、自然界の細菌のほとんどがコロニー形成しない要因の一つが脂肪酸の不足にあることを実証したい。

5. 3. 3. VBNC 化細胞の Omics 解析

筆者は VBNC 化のメカニズムについて 5.2.2.項に示したモデルを提唱しており、タンパク質の細胞内存在量のバラツキが VBNC 化の程度を規定すると考えている。これを検証するため、筆者は以下のようなアプローチを考案している。

E. coli において、FabB などのコロニー形成に特に必要なタンパク質 X を蛍光標識し、この蛍光量に基づいて細胞内のタンパク質 X の量を定量できる系を構築する。そして、実際に細胞ごとにタンパク質 X の量がバラつくことを確認し、これが Fig. 5-3 のようなガンマ分布に従うことを確認する。次に、Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 等を利用して、タンパク質 X の量に応じて細胞を分画・グループ化する (Fig. 5-3 では分画 1-4 にグループ化)。それぞれのグループで、長期間の飢餓条件に曝したあとのコロニー形成率を調べることで、Fig. 5-3 のようにタンパク質 X の量に応じてコロニー形成頻度が増大することを確認し、5.2.2.項のモデルを実証する。

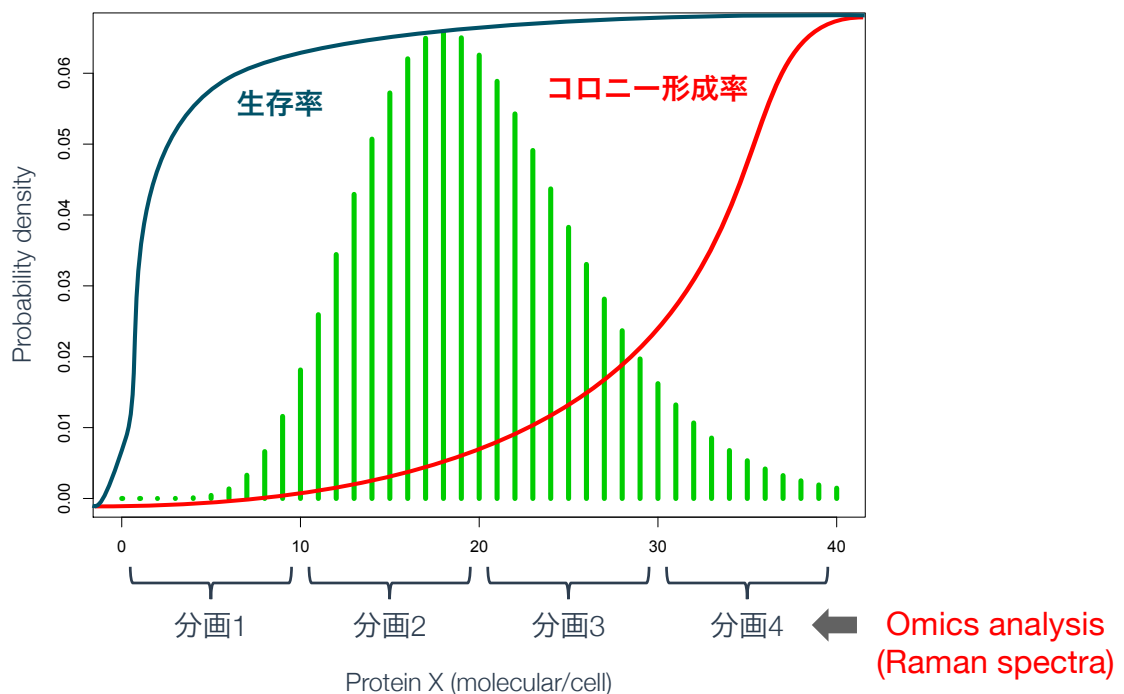


Figure 5-3. VBNC 細胞の Omics 解析アプローチの概要 (予想)

細胞内 Protein X の量と飢餓条件を経た後の各細胞のコロニー形成頻度について筆者の予想するデータと実験アプローチの概要を示す。

さらに筆者は、これらのグループ間で Omics 解析を実施することで、VBNC 化した細胞と VBNC 化していない細胞の生理状態・代謝系の違いが明らかになるのではないかと考えている。それらが明らかになれば、自然界の細菌が培養できない要因について、大きな手がかりが得られるものと考えられる。ただし、これらの細胞は長期の飢餓条件のなかで転

写活性が大きく低下していると考えられ、また実験上、細胞数も少なくなることからトランスクリプトーム・メタボローム解析は難しいと予想される。筆者は現在、本研究とは別にラマン分光解析を用いた Single cell レベルでの Omics 解析技術の確立を共同研究者とともに進めており、同技術を用いることでこれらの細胞の Omics 解析も可能になることを期待している。

以上のようなアプローチで筆者の提唱するモデルを検証し、細菌のコロニー形成メカニズムの全容解明を目指す。

補章 脂肪酸の不足がコロニー形成を阻害する要因

6. 1. 緒言

第4章までの実験で、*E. coli*をはじめとする様々な細菌において、脂肪酸が不足すると、固体培養での増殖が抑制され、増殖頻度が液体培養時に比べて大きく低下することが明らかになった。本章では、*E. coli*を対象に、特に筆者の想定する固体培養での増殖抑制機構に着目し、なぜ脂肪酸が不足すると増殖が抑制されるのか、その要因の解明に迫った。

固体培養と液体培養との違いは何か。最初に想起されるのは、固体培地には固化剤として agar が含まれるという点である。第1章でも述べた通り、agar に含まれる成分は、直接的あるいは間接的に一部の細菌の生育を阻害することが報告されており (Hara et al., 2012; Tanaka et al., 2014)、当研究室の三井も agar に含まれる成分が $\Delta fabB$ 株の生育を阻害することを示していた (三井智玄, 2013)。本章では、agar に含まれる成分が、脂肪酸不足時の固体培養での増殖を阻害し、液体培養との生育差を生じる可能性について検討した。

固化剤による生育阻害以外の可能性として、筆者は、当研究室の福嶋の報告を基に、内的要因、すなわち特定の遺伝子・代謝系が脂肪酸不足時のコロニー形成の抑制に関わっている可能性を考えた。福嶋は、cAMP-CRP の機能を欠損させた *E. coli* が、長期の飢餓条件に曝され続けてもコロニー形成能を失わないことを明らかにした (福嶋凡子, 2017)。つまり *E. coli* において、cAMP-CRP は飢餓状態にある細胞のコロニー形成を積極的に抑制する負の制御因子として機能する。cAMP-CRP のようなグローバルレギュレーターが、筆者が想定するようなコロニー形成の障壁を高めるのか、あるいは障壁を乗り越えるための機能を低下させるのかはわからないが、cAMP-CRP あるいは類似の因子が脂肪酸不足時のコロニー形成の抑制にも関わっており、これが固体培養と液体培養における生育差を生むのではないかと予想した。そこで、cAMP-CRP や類似の因子の欠失株または発現増強株を用いた遺伝学的アプローチを試み、脂肪酸不足時にも固体培養と液体培養での増殖頻度に差が出ないような変異株を探索したが、今のところ目的の変異株を取得できていない。ところがその過程で偶然にも、脂肪酸が不足してもコロニー形成が抑制されず、液体培養時に匹敵する増殖頻度を示すような培養条件を発見した。本章の後半では、この条件下での *E. coli*

のふるまいを基に、脂肪酸不足時に固体培養と液体培養での増殖頻度に差が生じるという現象の背景にある増殖抑制機構の解明を目指した。

6. 2. 材料と方法

6. 2. 1. 使用した菌株と培地

E. coli MG1655 株および MG1655- $\Delta fabB$ 株を使用した。

E. coli の培養には、LB 培地と M9CAGlc 培地を用いた（組成は 2. 2. 1. 項に示した）。なお、固体培地では終濃度 1.5% の Bacto agar (BD) あるいは 1.0% の agarose L03 (TAKARA) を添加した。

6. 2. 2. 使用した試薬

Triclosan は、50% の EtOH 水溶液に適切な濃度で溶解させ、1/100 量を培地に添加して用いた。Triton X-100 および Sodium dodecyl sulfate (SDS) は、それぞれ 10 mg/mL および 50 mg/mL の濃度の水溶液を調製し、適量を培地に添加して用いた。palmitoleic acid および oleic acid は、200 mg/mL の methyl- β -cyclodextrin (Junsei Chemical) 水溶液に抱合体として 6000 μ g/mL の濃度で溶解させ、それぞれ 1/100 量を培地に添加して用いた。なお、methyl- β -cyclodextrin 抱合脂肪酸の調製は、東京医科歯科大学の大隅一興研究員が行った。

6. 2. 3. CFU と MPN の計測

2. 2. 4. 項と同様の方法で行った。なお、メンブレンフィルターを敷いた固体培地における CFU の計測では、ポアサイズ 0.45 μ m、直径 90 mm、セルロース混合エステルタイプのメンブレンフィルター (ADVANTEC) を使用し、オートクレーブしたものを固体培地の上に敷いて用いた。このメンブレンフィルターの上に直接菌液を散布して培養することで CFU 計測を行った（散布方法は 2. 2. 4. 項と同様）。

6. 2. 4. Triton X-100、Triclosan を含む液体培地での増殖速度の測定

対数増殖後期の菌液を適宜希釈して、各種濃度の Triton X-100 および Triclosan を含む 10 mL の液体培地に植菌して 37 °C で振盪培養し、濁度の推移を ODBox-C (TAITEC) にて測定した。

6. 2. 5. 細胞数と粒径サイズの計測

10 mL の液体培地において 37°C で対数増殖後期 ($OD_{660} = 0.8$) まで培養した *E. coli* MG1655 株の菌液を適宜希釈して、Multisizer3 Coulter Counter (Beckman Coulter) による細胞数と粒径サイズの計測を行った。

6. 3. 結果

6. 3. 1. 固化剤による生育阻害効果の検証

固化剤として用いられる agar には、細菌の遊走を阻害するフランカルボン酸が含まれている (Hara et al., 2012)。さらに agar は、リン酸とオートクレーブされることで過酸化水素を発生させるとの報告もある (Tanaka et al., 2014)。後者の過酸化水素の生成は、カタラーゼを持つ *E. coli* の生育には影響しないとされているが、筆者は、agar に含まれる未同定の物質が、脂肪酸不足時の *E. coli* のコロニー形成を阻害している可能性を疑った。事実、当研究室の三井は、agar には含まれるが、agarose には含まれない何らかの物質が $\Delta fabB$ 株の生育を強く阻害することを示していた (三井智玄, 2013)。そこで、脂肪酸合成を阻害した際の、Bacto agar を用いた固体培地と agarose を用いた固体培地における *E. coli* のコロニー形成能を比較することで、agar に含まれる成分が第 3 章で見てきた CFU と MPN の差にどの程度影響するのかを調べた。実験としては、各種濃度の Triclosan 添加時の M9CAGlc-agar 固体培地における CFU、M9CAGlc-agarose 固体培地における CFU、および M9CAGlc 液体培地における MPN を比較した (Fig. 6-1)。

Triclosan を添加しない条件では、agarose 固体培地での CFU は agar 固体培地での CFU と同程度の値を示し、MPN との差もなかった。しかし、100 ng/mL の Triclosan 添加時には、agar 固体培地での CFU は $1/10^3$ にまで低下しているのに対し、agarose 固体培地での CFU は $1/5$ 程度にしか低下しておらず、MPN と同程度の値を示していた。200 ng/mL の Triclosan 添加時には、agar 固体培地での CFU はさらに低下して $1/10^6$ 以下になり、agarose 固体培地上での CFU も大きく低下して $1/10^5$ 程度になったが、MPN の値は $1/40$ 程度にしか低下しておらず、agarose を用いても CFU との差は埋まらなかった。

以上の結果から、agar に含まれ、agarose には含まれない（あるいは少量しか残存していない）何らかの物質が、脂肪酸不足時の *E. coli* の増殖を阻害し、固体培養と液体培養での生育差に一部寄与することが示唆された。本実験の固体培地の作製では、リン酸成分と固化剤は別々にオートクレーブしていたため、過酸化水素の生成はこれらの差には関与しないと考えられる。また、agar に含まれるとされるフランカルボン酸類は、*E. coli* の遊走は阻害するものの、生育そのものは阻害しないため (Hara et al., 2012)、本実験の agar と

agarose との差には関与しないと考えられる。よって筆者は、agar にのみ含まれ、 $\Delta fabB$ 株の生育を阻害する物質として三井が報告したのと同じ成分が、Triclosan による脂肪酸不足時のコロニー形成を阻害したのではないかと考えた。しかし、固化剤として agarose を用いても、高濃度の Triclosan 添加時には CFU と MPN との差は埋まらず、両者に大きな差が生じた。よって、固体培養と液体培養での生育差は、agar に含まれる生育阻害成分による違い以上に、固体培養における生理状態と液体培養における生理状態の違いに起因すると筆者は考えている。ただし、agarose には想定する阻害物質が本当に含まれないのかを確かめる必要はある。

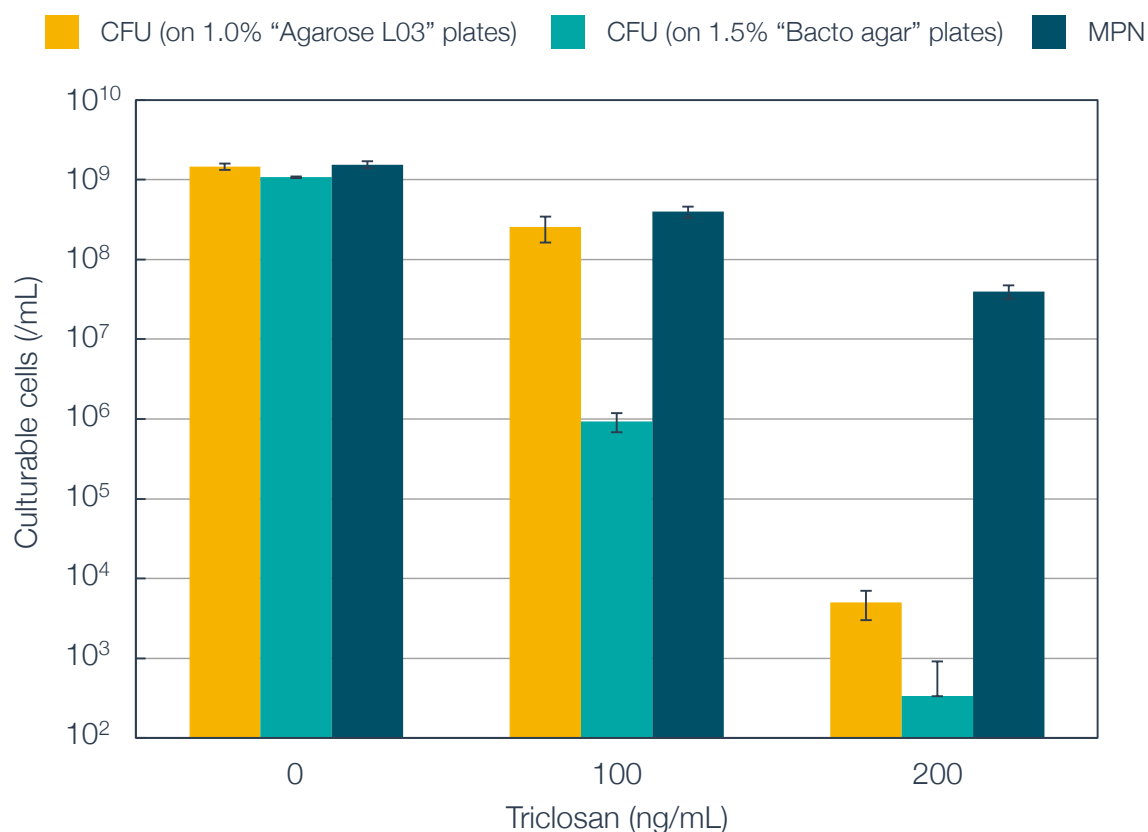


Figure 6-1. agarose または agar を用いた固体培地における *E. coli* の CFU の比較

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む M9CAGlc-agarose 固体培地、M9CAGlc-agar 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

6.3.2. 脂肪酸合成阻害時の固液間生育差に対する界面活性剤の作用

本章の第1節で述べたように、筆者は、cAMP-CRP あるいは類似の因子が関わる代謝系・生理機能が直接的あるいは間接的に脂肪酸不足時のコロニー形成を抑制するために、固体培養と液体培養での生育差が生じるのではないかと予想した。これを検証するため、これらの因子の欠失株あるいは関連する代謝系の遺伝子の発現増強株を用いた実験を行ったが、調べた範囲内では固体培養と液体培養での生育差がなくなるような変異株は見つからなかった。しかしその過程で、脂肪酸の可溶化のために用いていた Triton X-100 を添加した培地では、脂肪酸を供給せずとも、脂肪酸不足時の *E. coli* のコロニー形成数が大きく増大し、液体培養時に匹敵する増殖頻度を示すことを発見した。そこで、この Triton X-100 による効果を定量的に検証するため、Triton X-100 を添加した条件と添加しない条件で、各種濃度の Triclosan を添加した M9CAGlc 固体培地および M9CAGlc 液体培地における CFU と MPN を比較した (Fig. 6-2)。

Triton X-100 を添加しない条件では、第3章 Fig. 3-3 と同様のデータが再現され、Triclosan による脂肪酸合成の阻害時に CFU と MPN の間に大きな差が生じることを再確認できた。一方、100 µg/mL の Triton X-100 を添加した条件では、200 ng/mL の Triclosan を添加しても CFU・MPN はいずれも 1/4 程度に低下しただけで、400 ng/mL の Triclosan 添加時にも、CFU・MPN は 1/50 程度に低下しただけであった。すなわち、Triton X-100 の供給によって、Triclosan 添加時の固体培養と液体培養での増殖頻度がともに増大し、かつ両者の差がなくなっていた。これについて筆者は、Triton X-100 の添加によって *E. coli* の生理状態が大きく変化し、脂肪酸不足時に固体培養で特に強く顕在化する増殖の障壁、すなわち筆者の想定する増殖抑制機構が解消したために、固体培養と液体培養での増殖頻度に差がなくなったのではないかと推察した。

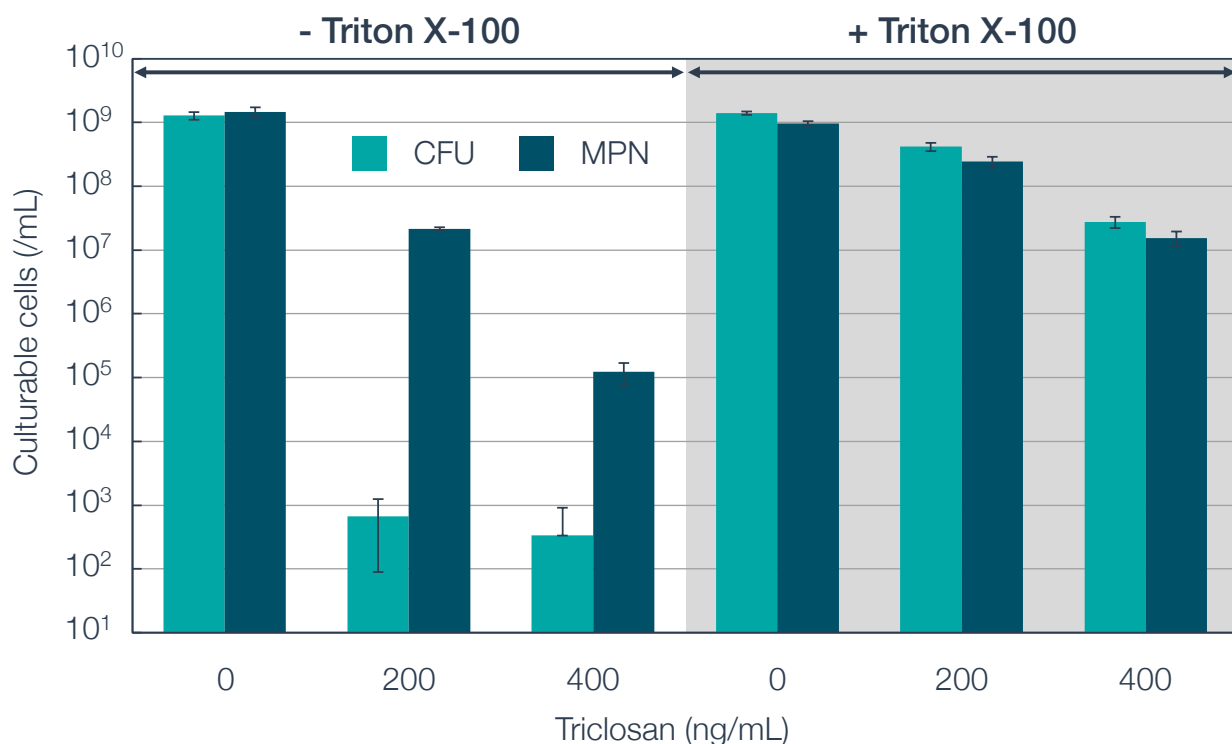


Figure 6-2. Triclosan、Triton X-100 を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の CFU と MPN

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む M9CAGlc-agar 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。また実験は、固体培地・液体培地のそれぞれに、100 μ g/mL の Triton X-100 を添加した条件と添加しない条件の 2 条件で行った。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

続いて、Fig. 6-2 と同様の実験を、ベースとする培地を LB 培地に代えて行った (Fig. 6-3)。ここでも、Triton X-100 を添加しない条件では、第 3 章の Fig. 3-4 と同様のデータが再現され、Triclosan による脂肪酸合成の阻害時に CFU と MPN の間に大きな差が生じることが確認された。一方、100 μ g/mL の Triton X-100 を添加した条件では、やはり Triclosan 添加時でも CFU・MPN とともに大きく増大し、その差がほとんどなくなった。特に 200 ng/mL の Triclosan 添加時には、Triton X-100 がないと CFU・MPN とともに検出限界以下になるのに対し、Triton X-100 があるといずれも比較的高い値を保っていた。以上より、Triton X-100 は、LB 培地においても脂肪酸不足時の増殖抑制を解消することが示唆された。

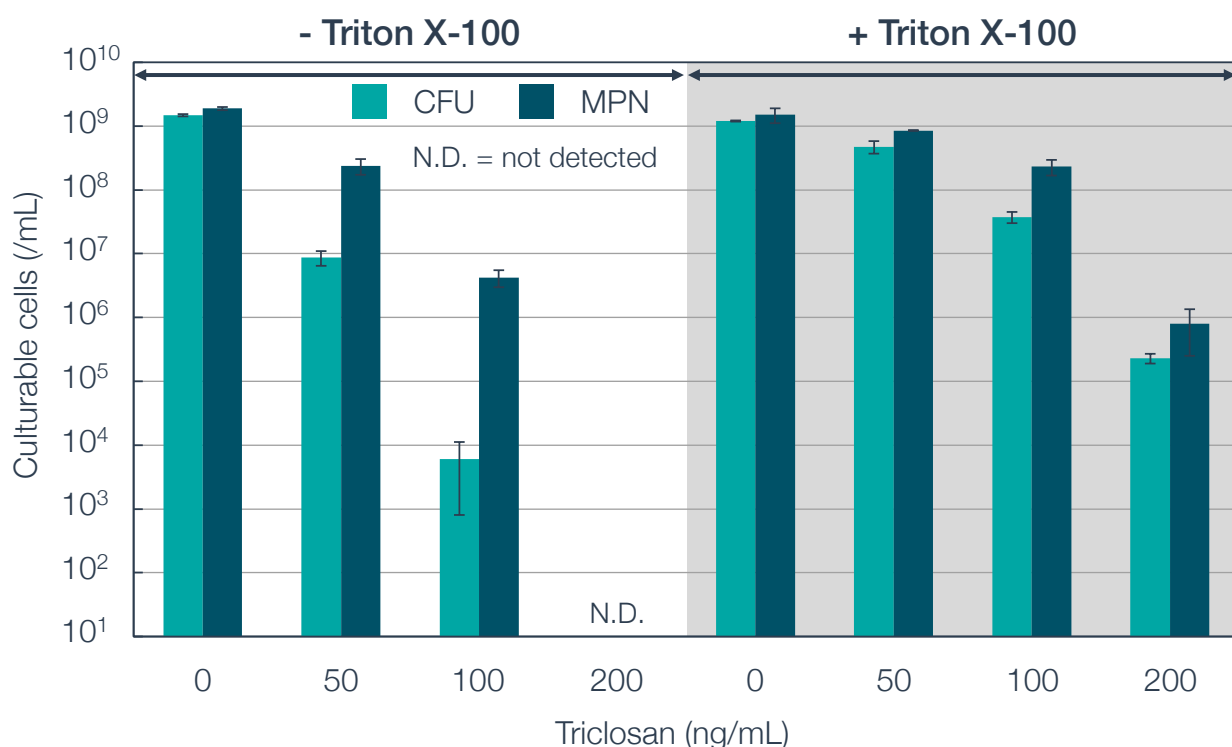


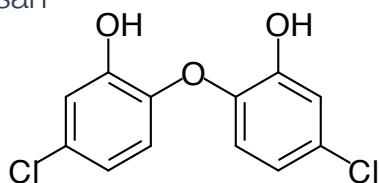
Figure 6-3. Triclosan、Triton X-100 を添加した LB 培地における *E. coli* の CFU と MPN

E. coli MG1655 株を、10 mL の LB 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む LB-agar 固体培地および LB 液体培地に散布・植菌し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）と液体培地での増殖可能菌数（MPN）を算出した。また実験は、固体培地・液体培地のそれぞれに、100 $\mu\text{g/mL}$ の Triton X-100 を添加した条件と添加しない条件の 2 条件で行った。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

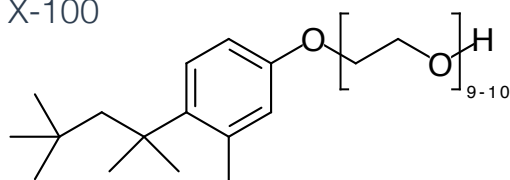
以上の結果より、M9CAGlc 培地と LB 培地のいずれでも、Triton X-100 の供給によって、脂肪酸不足時に増殖を抑制する生理反応・メカニズムが何らかの理由で解消し、そのために *E. coli* は固体培養でも液体培養でも同程度の増殖頻度を示すようになったのではないかと筆者は考えた。しかし、Triton X-100 添加時と非添加時の両方で Triclosan が同じ程度作用していて、正味の脂肪酸合成量が両条件の細胞集団で同等であった保証はない。例えば、Triclosan と Triton X-100 の化学構造（Fig. 6-4）を比較すると、Triton X-100 と Triclosan との間に何らかの相互作用が生じたために Triclosan の実効濃度が低下していた可能性もある。実際、Fig. 6-3 では、「Triton X-100 非存在下で 200 ng/mL の Triclosan 添加時の

MPN」と「Triton X-100 存在下で 400 ng/mL の Triclosan 添加時の MPN」が同程度の値を示しており、同様のことが Fig. 6-4 のデータでも成立しているので、これら MPN のデータのみを見ると、「Triton X-100 は Triclosan の実効濃度を半分にする」とも考えられる。しかし、その場合は CFU も相当する値だけ低くなり、MPN との差は保存されるはずであるが、実際の CFU は MPN と同等の値を示している。つまり、Triton X-100 による実効濃度の低下の程度が固体培地と液体培地で同等だとすると、CFU と MPN の絶対値が上下することはあっても、Fig. 6-2 と 6-3 のように CFU と MPN との相対的な差が埋まることはないはずである。したがって筆者は、Triton X-100 添加時には、増殖の障壁を低下させ、増殖抑制を解除する何らかの生理状態の変化あるいは代謝系の変動が起きていると考えている。

Triclosan



Triton X-100



Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

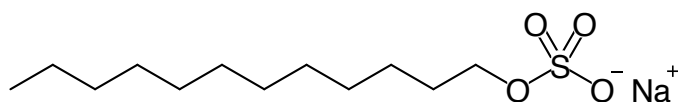


Figure 6-4. Triclosan、Triton X-100 および SDS の構造

本研究で使用した脂肪酸合成阻害剤 Triclosan と、界面活性剤 Triton X-100 および Sodium dodecyl sulfate (SDS) の化学構造を示す。

次に、Triclosan と Triton X-100 の特異的な相互作用の可能性を否定し、かつ上記の Triton X-100 のような効果が界面活性剤一般に見られる現象なのかを確認する目的で、構造的に

Triclosan との相互作用が少ないと予想される別の界面活性剤、Sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いて同様の実験を試みた (SDS の化学構造は Fig. 6-4 に示す)。

まず、一般的な界面活性剤の性質として、SDS も高濃度になると *E. coli* に対して毒性を示すため (Woldringh and van Iterson, 1972)、実験にあたって生育阻害が生じない濃度域を調べておく必要がある。各種濃度の SDS を添加した M9CAGlc 液体培地における *E. coli* の増殖を調べた (Fig. 6-5)。その結果、M9CAGlc 液体培地での *E. coli* の増殖において、500 $\mu\text{g/mL}$ 以下の SDS の添加は生育に影響を与えないことがわかったので、以降の実験は 500 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度域の SDS を用いて行った。

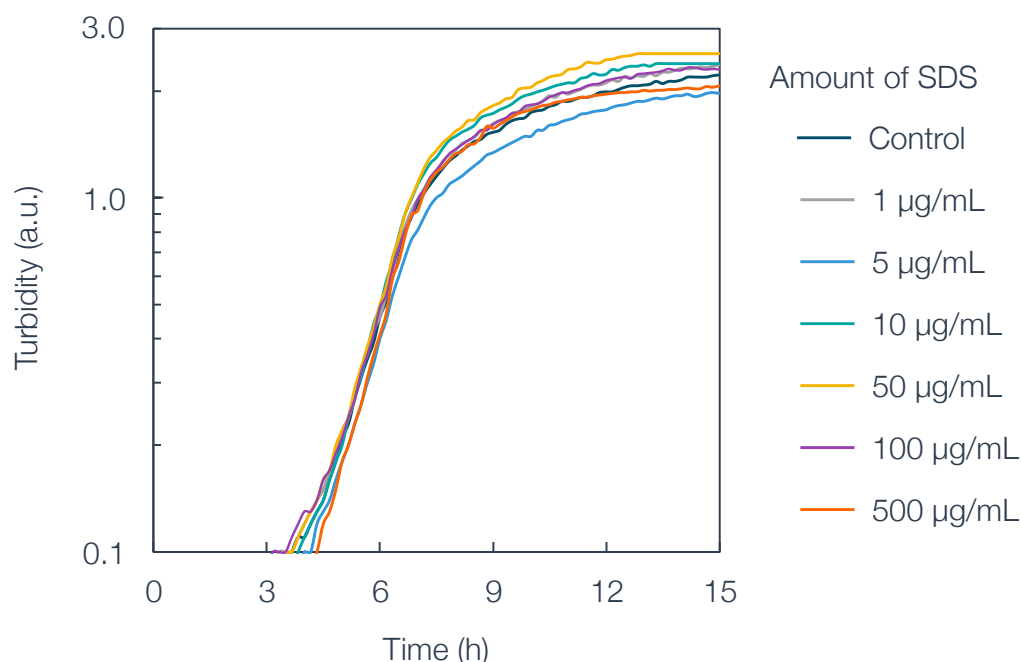


Figure 6-5. SDS を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の生育

E. coli MG1655 株を、各種濃度の SDS を含む 10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で振盪培養した際の濁度推移を示す。

次に、Triton X-100 同様、SDS も脂肪酸不足時の増殖抑制を解消するのか、まずは CFU のみを対象に検証した。100 ng/mL の Triclosan を添加した M9CAGlc 固体培地に、各種濃度の SDS を供給した場合に CFU がどの程度回復するかを調べた (Fig. 6-6)。

SDS を添加しないと、100 ng/mL の Triclosan の添加によって CFU は 1/100 程度に低下するが、SDS を添加しておくと、その添加濃度が高くなるに従って CFU が増大し、500

μg/mL の SDS 添加時には、Triclosan を添加しない場合と同程度まで回復した。なお、500 μg/mL の SDS のみを添加しても CFU の値は変化しないことも確認した。したがって、Triton X-100 同様、SDS も脂肪酸合成阻害時の増殖抑制を解除し、CFU と MPN の差を解消できる可能性が高いと考えられる。

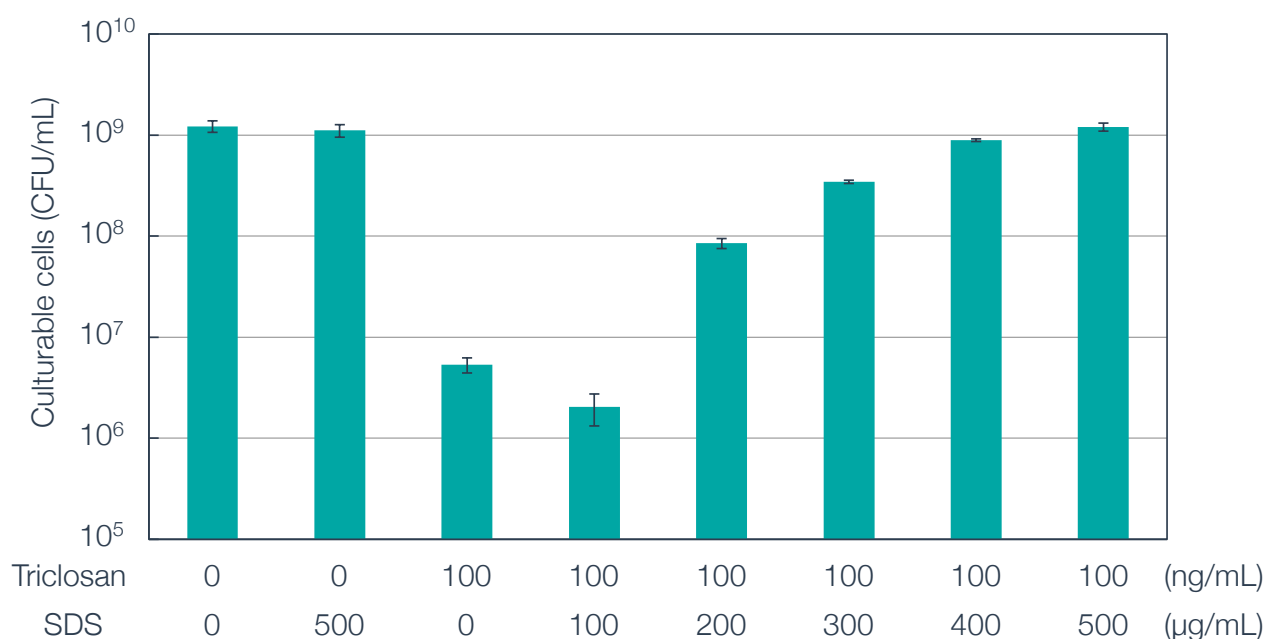


Figure 6-6. Triclosan、SDS を添加した M9CAGlc 固体培地における *E. coli* の CFU

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan および SDS を含む M9CAGlc-agar 固体培地に散布し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

続いて、脂肪酸の不足に起因する CFU と MPN の差が SDS によっても解消されるのかを検証した。実験としては、500 μg/mL の SDS を添加しない条件と添加した条件のそれぞれで、各種濃度の Triclosan を添加した M9CAGlc 培地における CFU と MPN を比較した (Fig. 6-7)。

SDS を添加しない条件では、Triclosan の添加濃度が高くなるに従って CFU と MPN の値が低下し、かつ両者に大きな差が生じることを確認したが、MPN の値が Fig. 6-2 よりは高かった。これは亜致死量の薬剤添加という極限状態では、培地調製時のごくわずかな試

薬濃度の違い等が大きく影響するためと思われるが、CFU と MPN の顕著な差は一貫して観察されるため、このようなバラツキは許容した。一方、SDS を添加した条件では、予想どおり Triclosan 添加時の CFU と MPN がいずれも増大し、その差がほとんどなくなった。

以上の結果から、Triton X-100 だけでなく界面活性剤一般が、脂肪酸不足時の *E. coli* の増殖抑制を解消し、固体培養と液体培養での増殖頻度の差をなくす効果をもつことが強く示唆された。

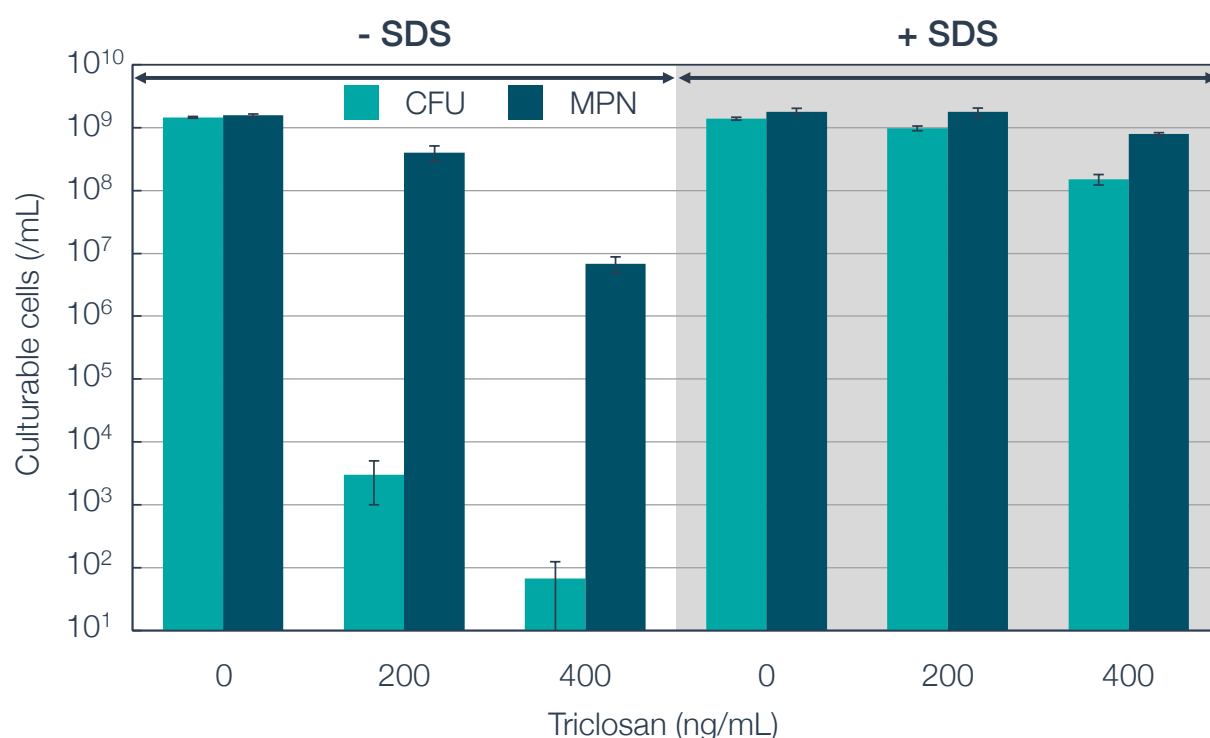


Figure 6-7. Triclosan、SDS を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の CFU と MPN

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む M9CAGlc-agar 固体培地および M9CAGlc 液体培地に散布・植菌し、37°C で 3 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数（CFU）と液体培地での増殖可能菌数（MPN）を算出した。また実験は、固体培地・液体培地のそれぞれに、500 µg/mL の SDS を添加した条件と添加しない条件の 2 条件で行った。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

6.3.3. 脂肪酸合成阻害時の増殖速度に対する界面活性剤の作用

一般に、細菌の増殖速度と細胞サイズには正の相関が見られるが、*E. coli* では、様々な代謝系の中でも脂肪酸合成系がもっともこの相関に寄与することが最近報告された (Vadia

et al., 2017)。Vadia らは、RNA やタンパク質の合成量を低下させても、増殖速度だけが低下して細胞サイズはあまり変わらないのに対し、脂肪酸の合成量を低下させた場合には、増殖速度の低下に相関して細胞サイズも小さくなることを示した。このことから筆者は、脂肪酸合成阻害時の CFU と MPN の差も、細胞サイズが小さくなったために起こるもので、界面活性剤の添加は、脂肪酸合成阻害時にも細胞サイズを維持することによって CFU と MPN との差をなくすのではないかと考えた。

以上の予想を検証するため、まずは実際に脂肪酸合成の阻害の程度に従って増殖速度が低下するかを確認した。各種濃度の Triclosan を添加した M9CAGlc 液体培地における *E. coli* の増殖速度を比較した (Fig. 6-8)。

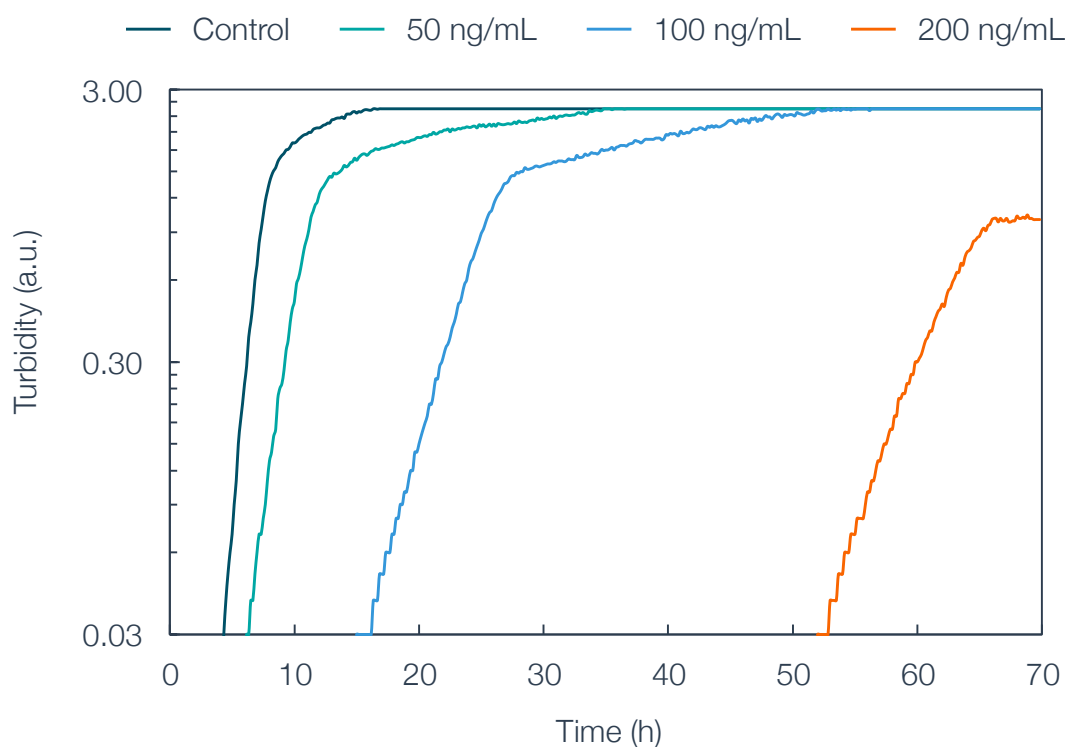


Figure 6-8. Triclosan を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の増殖速度

E. coli MG1655 株を、各種濃度の Triclosan を含む 10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で振盪培養した際の濁度推移を記録した。

その結果、Triclosan 濃度が高くなるに従って増殖速度が低下することが確認できた。ただし増殖速度の低下はわずかで、それ以上に、誘導期の期間が Triclosan 濃度に依存して増大していた。これは、Triclosan の添加によって増殖の開始が遅れる可能性のほか、増殖を

開始できる細胞の割合が低下することにも起因すると考えられる（例えば 200 ng/mL の Triclosan 添加時には、MPN は 1/100 程度になる）。

次に、このような Triclosan による増殖速度の低下が、Triton X-100 の供給によって回復さするかを検証した。実験としては、何も添加しないコントロール、100 μ g/mL の Triton X-100 を添加した条件、100 ng/mL の Triclosan を添加した条件、100 μ g/mL の Triton X-100 と 100 ng/mL の Triclosan を添加した条件の 4 条件の M9CAGlc 液体培地における *E. coli* の増殖を比較した（Fig. 6-9）。

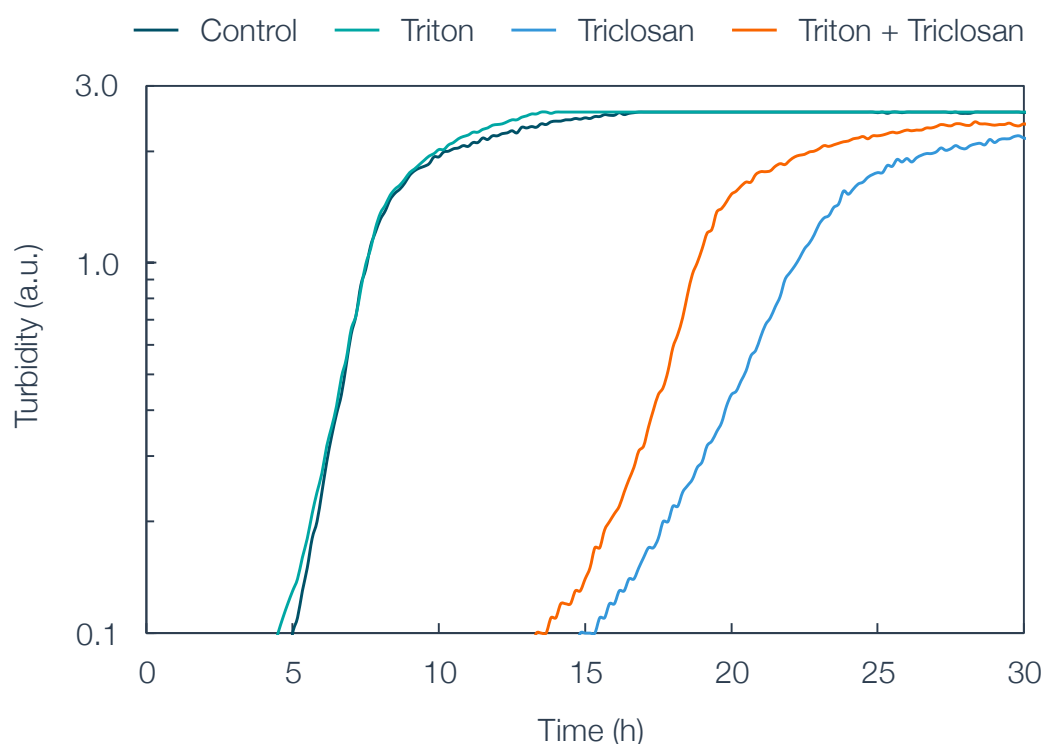


Figure 6-9. Triclosan、Triton X-100 を添加した M9CAGlc 培地における *E. coli* の増殖速度 *E. coli* MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地（Control）、100 μ g/mL の Triton X-100 を含む M9CAGlc 液体培地（Triton）、100 ng/mL の Triclosan を含む M9CAGlc 液体培地（Triclosan）、および 100 μ g/mL の Triton X-100 と 100 ng/mL の Triclosan を含む M9CAGlc 液体培地（Triton + Triclosan）の 4 種の培地において 37°C で振盪培養した際の濁度推移を記録した。

Triton X-100 のみを添加しても増殖速度はコントロールと変わらなかった。100 ng/mL の Triclosan を添加すると増殖速度は低下した。しかし Triclosan に加えて、Triton X-100 を添加した場合には、増殖速度がコントロールと同程度まで回復した。ただし、誘導期の長

さは大きくは変わらなかった。以上より、Triton X-100 の添加は脂肪酸不足時の増殖速度の低下を抑制することが明らかになった。

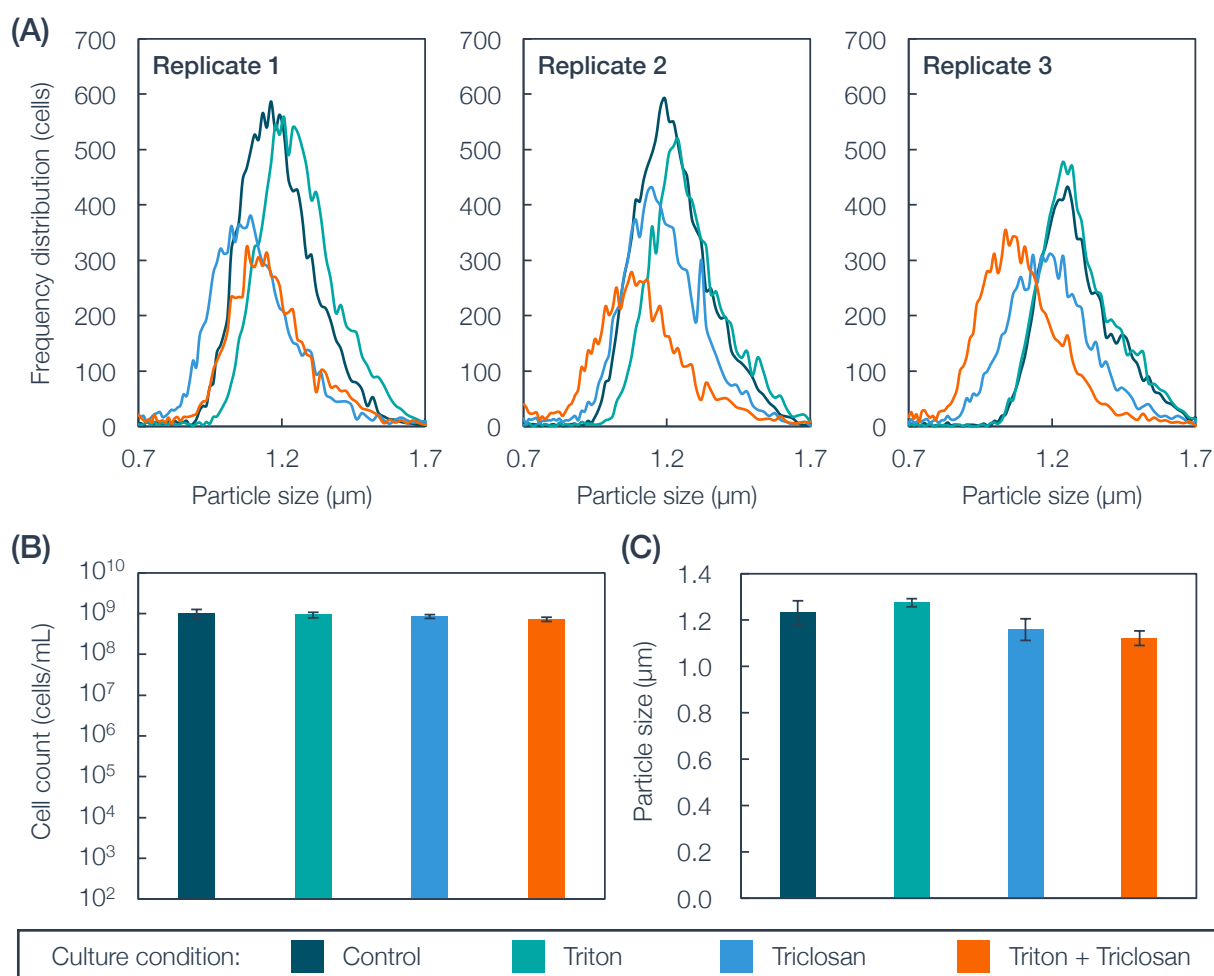


Figure 6-10. Triclosan、Triton X-100 を添加した M9CAGlc 培地で増殖中の *E. coli* の細胞サイズ

(A) Fig. 6-9 と同様の 4 条件 (Control、Triton、Triclosan、Triton + Triclosan) の M9CAGlc 液体培地において、37°C で $OD_{660}=0.8$ まで振盪培養した *E. coli* の菌液を、それぞれ Multisizer3 による細胞数と粒径サイズの計測に供した。培養は 3 連で行い、各レプリケートの結果を示す。(B, C) 計測したデータを基に、細胞数の計数結果 (B) と粒径サイズの計測結果 (C) をまとめた。各データは 3 連の計測結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

続いて、このような Triclosan による増殖速度の低下時には、Vadia らの報告と同様に細胞サイズも小さくなるのか、また Triton X-100 の添加によって増殖速度が回復する際には細胞サイズも回復するのかを調べた。実験としては、Fig. 6-9 と同じ 4 条件の M9CAGlc 液

体培地で対数増殖後期 ($OD_{660}=0.8$) まで培養した細胞集団の細胞数と細胞サイズの分布を計測した (Fig. 6-10)。

計測の結果、確かに Triclosan の添加時には、細胞サイズが僅かながら小さくなる傾向が見られたが (Fig. 6-10A および C)、Vadia らの報告ほどの差 (1.5 倍以上) はなかった。また Triclosan の有無にかかわらず、Triton X-100 を添加しても細胞サイズは変わらなかった。

以上の結果をまとめると、Triclosan による脂肪酸合成の阻害時には、確かに増殖速度が低下するものの、細胞サイズはあまり変わらなかった。Triton X-100 は、この際の増殖速度の低下を抑制するが、細胞サイズには大きな影響を与えないため、6. 3. 2.項で見た Triton X-100 による CFU と MPN の差の解消に、Vadia らの示した細胞サイズの違いはあまり関与しないと考えられる。筆者は、細胞サイズ以外に、Triton X-100 をはじめとする界面活性剤の添加によってもたらされる細胞内の生理状態の違い、あるいは何らかの代謝系の変動が、脂肪酸の不足に伴う増殖抑制を解消し、6. 3. 2.項で見た表現型、すなわち CFU と MPN の一致を生むと予想している。

6. 3. 4. 脂肪酸合成阻害時のコロニー形成に対するメンブレンフィルターの効果

前項で行ったアプローチとは別に、筆者は、界面活性剤による固体培地表層の物理的環境の変化も、脂肪酸不足時のコロニー形成に影響するのではないかと考えた。というのも、界面活性剤の有無によって、固体培地表面の撥水性が大きく変わるという経験則があるからだ。Triton X-100 を添加しない通常の固体培地上では、散布した菌液 (あるいは水滴) は液滴状に凝集してあまり拡がらないのに対し、Triton X-100 を添加した固体培地上では広範囲に拡がって迅速に染み込む。このような違いから、界面活性剤は、固体培地上で微生物が利用できる水分量、すなわち水分活性を向上させ、それがコロニー形成にとって有利にはたらくのではないかと考えた。そこで、ポアサイズ $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを固体培地の上に敷き、その上で細菌を培養すると、水分の浸潤によって水分活性が上昇し、界面活性剤の添加時と同様にコロニー形成能が向上するのではないかと予想した。これを検証するため、各種濃度の Triclosan 添加条件で、通常の M9CAGlc 固体培地と

M9CAGlc 液体培地における CFU と MPN に加え、メンブレンフィルターを敷いた M9CAGlc 固体培地上での CFU も調べて、それぞれを比較した (Fig. 6-11) 。なお、メンブレンフィルター上での培養では、通常の固体培地の上に滅菌したメンブレンフィルターを敷いて培地表面に吸着させ、その上から直接菌を散布して培養することで CFU を計数した。

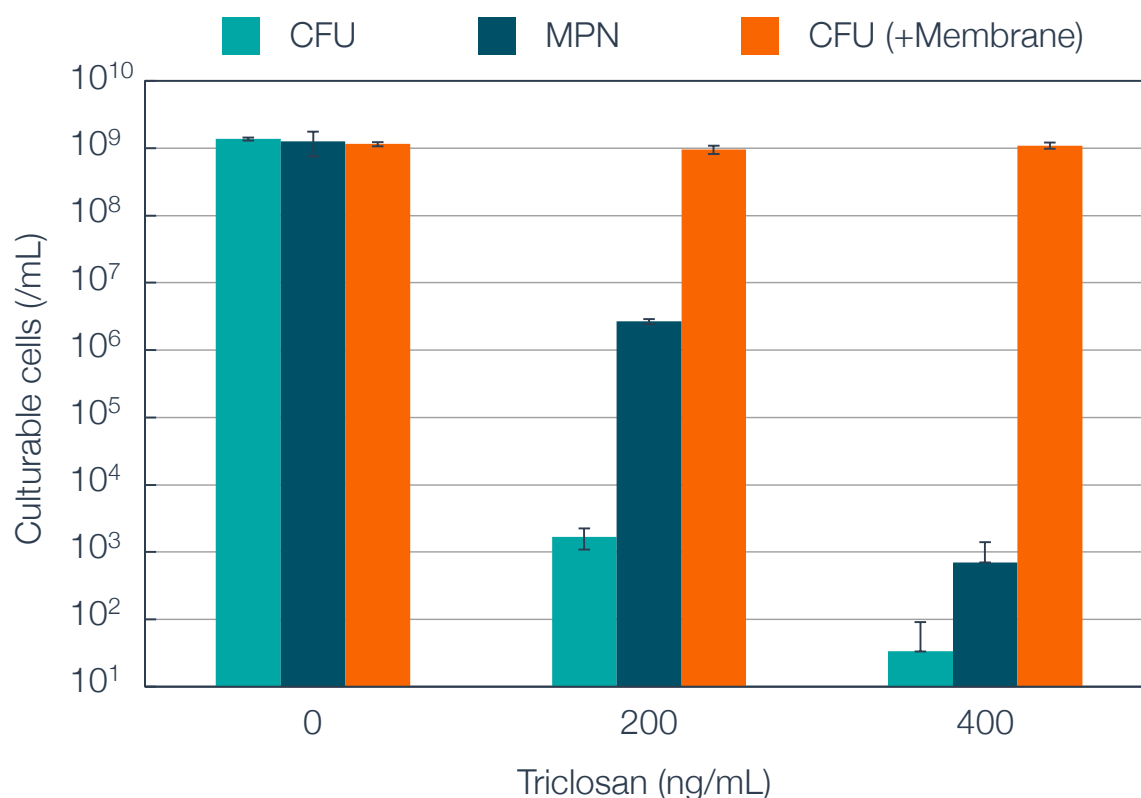


Figure 6-11. メンブレンを敷いた M9CAGlc 固体培地における *E. coli* のコロニー形成

E. coli MG1655 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、各種濃度の Triclosan を含む M9CAGlc-agar 固体培地、M9CAGlc 液体培地、および培地表面にメンブレンフィルターを敷いた M9CAGlc-agar 固体培地に散布・植菌し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数および濁った well の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの、固体培地での増殖可能菌数 (CFU) と液体培地での増殖可能菌数 (MPN) を算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

培養の結果、メンブレンフィルターを敷かない固体培地での CFU と液体培地での MPN は Triclosan 濃度に依存して低下し、両者に顕著な差が生じることが確認できた。一方、メンブレンフィルター上で培養した場合には、200 ng/mL の Triclosan 添加時でも CFU は全

く低下せず、MPN よりも高い値を示していた。さらに、400 ng/mL の Triclosan 添加時でもメンブレンフィルター上での CFU はほとんど低下せず、Triclosan を添加しない場合と同等の値を示していた。またメンブレンフィルター上で形成されたコロニーも、Triclosan の有無にかかわらず一定かつ均一なサイズであった (Fig. 6-12)。

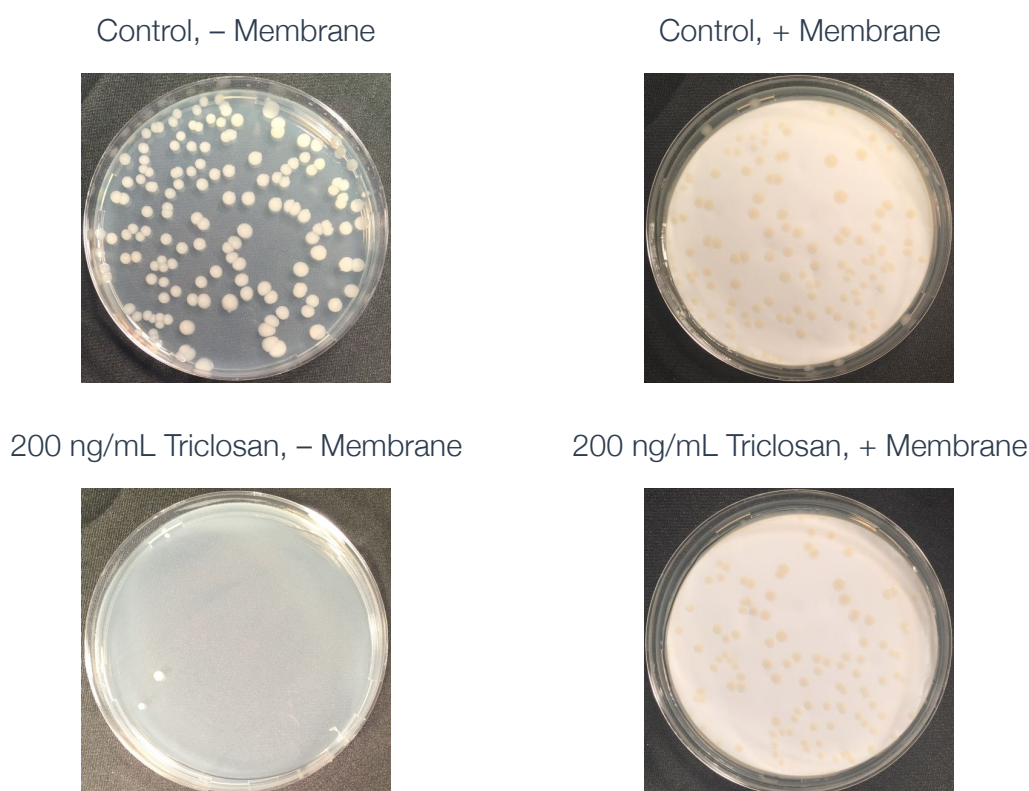


Figure 6-12. メンブレンを敷いた M9CAGlc 固体培地における *E. coli* のコロニー写真

Fig. 6-11 の培養の結果、メンブレンフィルターを敷かなかった固体培地と敷いた固体培地に生じた *E. coli* のコロニーの写真を示す。

以上の結果について、メンブレンフィルターが Triclosan を通さなかった可能性もあるが、セルロース混合エステルから成る 0.45 μm 径のポアを Triclosan が通らないとは考えづらい。また、メンブレンフィルターに Triclosan が吸着して実効濃度が低下した可能性もあるが、Fig. 3-3 のデータから、たとえ実効濃度を 1/5 にまで低下させたとしても CFU は低下するはずなので、吸着による実効濃度の低下も考えにくい。これらのことから、水分活性の向上が直接の原因かは定かではないものの、メンブレンフィルター上では脂肪酸合成が不足しても旺盛なコロニー形成能を維持できることが示唆された。

続いて、Triclosan のように水に溶けにくい物質がメンブレンフィルターのポアを通ることは可能かを検証するため、メンブレンフィルター上で培養した $\Delta fabB$ 株に対して疎水性の脂肪酸を供給できるのか、バイオアッセイを行った (Fig. 6-13)。

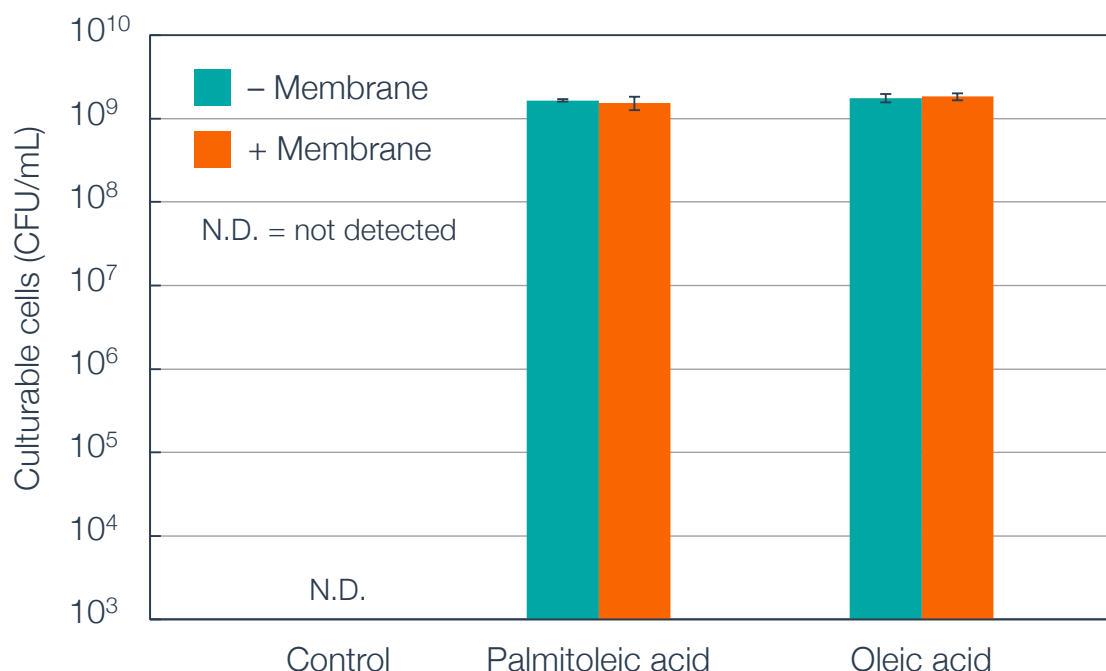


Figure 6-13. メンブレンを介した $\Delta fabB$ 株への脂肪酸供給

E. coli MG1655 $\Delta fabB$ 株を、10 mL の M9CAGlc 液体培地 (oleic acid 60 μ g/mL) において 37°C で対数増殖後期まで振盪培養した。この菌液を適宜希釈し、M9CAGlc-agar 固体培地、methyl- β -cyclodextrin 抱合体として 60 μ g/mL の palmitoleic acid を供給した M9CAGlc-agar 固体培地、同様に 60 μ g/mL の oleic acid を供給した M9CAGlc-agar 固体培地の 3 種の培地に散布し、37°C で 4 日間静置培養した後、コロニー数の計数を行うことで、もとの培養液 1 mL あたりの固体培地での増殖可能菌数 (CFU) を算出した。またメンブレンフィルターを敷いた同 3 条件の固体培地での CFU も同様に算出した。各データは 3 連の培養結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

メンブレンフィルターの有無にかかわらず、脂肪酸を供給しない M9CAGlc 固体培地では $\Delta fabB$ 株はコロニー形成を全くしなかった。methyl- β -cyclodextrin 抱合体として palmitoleic acid および oleic acid を供給した固体培地上で $\Delta fabB$ 株はコロニー形成するが、メンブレンフィルター上でも、脂肪酸を培地に供給しておくと $\Delta fabB$ 株はコロニーを形成した。よって、メンブレンフィルターを介しても、methyl- β -cyclodextrin 抱合体として

palmitoleic acid および oleic acid を供給することが可能で、 $\Delta fabB$ 株のコロニー形成能を十分に支持できることが明らかとなった。

以上の結果から、メンブレンフィルターは疎水性の物質も通すことが可能であると考えられ、Fig. 6-11 の結果も、Triclosan が *E. coli* の細胞に届いた上での結果であることが示唆されるが、今後、同材質・同径のメンブレンフィルターを実際に Triclosan が通過できるのかを詳細に調べる必要がある。また異素材のフィルターの効果も検証する必要があるだろう。もしメンブレンフィルターを敷くことで固体培養での増殖の障壁が小さくなり、細菌一般のコロニー形成能が向上するのであれば、methyl- β -cyclodextrin を用いた脂肪酸供給と組み合わせることで、自然界の細菌の高効率な分離培養法の開発につながると期待される。

6. 4. 考察

本章では、*E. coli* において、脂肪酸不足時に固体培養と液体培養での増殖頻度に差が生じる要因の解明を目指した。

まず筆者は、agar 成分による生育阻害を疑い、agar に含まれる成分が脂肪酸不足時の *E. coli* のコロニー形成を阻害することを発見した (Fig. 6-1)。しかし、agarose を用いた固体培地でも、液体培養との生育差は埋まらなかったことから、固体培養と液体培養での増殖時の生理状態の違いがより重要であると予想した。ただし、ここで見出した生育阻害成分が agarose には含まれない、あるいは阻害効果を生じないほど微量しか含まれないことを確認する必要がある。例えば当研究室の三井は、agar から水抽出した成分を培地に加えると、液体培養でも $\Delta fabB$ の生育が阻害されるが、agarose から抽出した成分にはそのような阻害効果はないことを示し、agar にのみ含まれる物質が脂肪酸不足時の *E. coli* の生育を阻害することを強く示唆していた (三井智玄, 2013)。筆者は、本章で確認した阻害成分は三井の報告のものと同成分であると予想しているが、これを確かめるためには三井と同様の実験を行い、かつ阻害成分を特定し、構造決定する必要がある。その化学構造と作用点を解明することで、脂肪酸不足時の増殖抑制効果の一端が明らかになると期待される。さらに、そのような成分を同定し、阻害成分を極力除去した固化剤が開発できれば、自然界の微生物の分離培養への応用が可能である。

続いて筆者は、固体培養での増殖には何らかの内在的な障壁が存在し、脂肪酸が不足するとこれを乗り越えることができず、増殖が抑制されるために固体培養と液体培養での増殖頻度に差が生じるのではないかとこの予想を検証した。当初は、低温飢餓時におけるコロニー形成の負の制御因子として同定された cAMP-CRP や類似の因子が、脂肪酸の不足時のコロニー形成の抑制にも関与するのではないかと考え、これらの欠失株や関連する遺伝子の発現増強株を用いた実験を行ったが、今のところ有力な候補は得られていない。その他にも、*E. coli* において、outer membrane の脂肪酸組成が変化して不安定化すると、inner membrane における脂肪酸が不足して細胞死が誘導されるとの報告があり (Sutterlin et al., 2016)、本実験における生育差にも当該経路の関与を疑ったが、芳しい成果は得られなかった。しかし、これらの途上で、Triton X-100 をはじめとする界面活性剤を添加すると、脂肪

酸不足時でもコロニー形成能が大きく回復し、固体培養と液体培養での生育差がほとんどなくなることを発見した (Fig. 6-2, 6-3, 6-7)。これについて筆者は、脂肪酸不足時に顕在化する増殖の障壁、すなわち増殖抑制機構を界面活性剤が何らかの理由で解除するのではないかと考えた。なお、第2章で行った $\Delta fabB$ 株の培養 (Fig. 2-11) では、oleic acid 供給のために Triton X-100 を供給していたにもかかわらず、固体培養と液体培養での増殖に顕著な差が確認されていたため、界面活性剤が存在しても $\Delta fabB$ 株では増殖の障壁がなくなることが示唆される。おそらく、野生株と異なり FabB が全くないという極端な生理状態では致死的になるために、界面活性剤を添加しても増殖抑制が解除されないのではないかとと思われる。

続いて、増殖抑制機構の正体を知るために、Triton X-100 の添加によって生じる生理状態の違いを明らかにすることを目指した。まず、脂肪酸の不足による細胞サイズの減少 (Vadia et al., 2017) が、Triton X-100 によって緩和されるのではないかと予想したが、脂肪酸不足時にも細胞サイズの減少はあまり見られず、かつ Triton X-100 を添加しても細胞サイズに大きな変化は見られなかったため、Triton X-100 による増殖頻度の差の解消に、細胞サイズの増減はほとんど関与しないと結論した (Fig. 6-10)。続いて、培地表面の物性の違いに着目し、メンブレンフィルターを固体培地上に敷いておくと、高濃度の Triclosan 添加時でもコロニー形成能がほとんど低下しないことを発見したが (Fig. 6-11)、これが界面活性剤による効果と原因を同じにするのかは明らかになっていない。

以上のように、脂肪酸が不足するとなぜコロニー形成が特異的に抑制されるのか、その生理メカニズムの解明を目指して多面的な取り組みを行った。界面活性剤を添加することでその抑制機構が無くなることが強く示唆されたが、その正体、つまり生理状態の違いを分子レベルで明らかにすることはできなかった。今後、界面活性剤添加時の細胞の生理状態を詳細に解析することで、コロニー形成の制限要因となっているメカニズムの全容解明を目指したい。

-論文の内容の要旨-

研究の背景

微生物、特にバクテリアは、遺伝子や生体分子の観点では生物多様性の圧倒的大部分を占めており、生物資源の宝庫である。この膨大な生物資源を活用するため、微生物学者は、寒天平板培地を用いて、自然環境から多様な微生物をコロニーとして分離することに挑戦してきた。しかしその過程で、自然環境中の微生物のほとんどが生きていてもコロニーを形成しない状態にあることが明らかになってきた。既存知識から類推できる遺伝子を拾うにはメタゲノム的手法も有効だが、全く新しい遺伝子や生体分子、微生物機能の発見・利用には新規微生物の分離培養が不可欠である。現在までに様々な研究がなされているにもかかわらず、自然界の微生物のほとんどがコロニー形成できない根本的な原因はわかっていない。我々は、コロニー形成に依存する現行の平板培養法では、遺伝子や生体分子の多様性に富む膨大な微生物資源の大半に手が届かないという問題に直面しているのである。

本研究の目的

自然環境中のほとんどの細菌は、平板培養法ではコロニー形成しないものの、液体培養でならより高い効率で増殖することが、液体培養による新規未培養細菌の分離培養の成功例から明らかになってきた。そこで、当研究室では、固体培地で細胞がコロニー形成に至るまでには、液体培養時にはない（あるいは少ない）何らかの障壁があると予想した。そして、この障壁を乗り越えるには、特別な能力、すなわち特定の遺伝子・生理機能が必要であると考えた。この仮説のもと、遺伝学的ツールが完備されたモデル生物である *Escherichia coli* において、「コロニー形成できないが液体培地では増殖できる」変異株を取得することで、コロニー形成に重要な遺伝子・生理機能を特定することを試みた。

筆者の研究開始前に、当研究室の前任者が、上記の表現型を示す *E. coli* 変異株を温度感受性（Temperature-sensitive, ts）変異株ライブラリーから複数分離していた。なかでも、長鎖不飽和脂肪酸合成に必須の β -ketoacyl-ACP synthase I をコードする *fabB* 遺伝子に異

なる点変異を持つ 2 株 (*fabB^{ts}*-1 株および *fabB^{ts}*-2 株) が最も再現性よく目的の表現型を示した。また、*E. coli* MG1655 野生株ベースの *fabB* 遺伝子の破壊株も作製されていた。

本研究は、これらの *fabB* 変異株の解析を通して固体培養と液体培養での生育差を生む要因を特定し、バクテリアがコロニー形成しない根本的な要因を解明することを目指す。

E. coli fabB 変異株の解析

fabB^{ts}-1 株と *fabB^{ts}*-2 株を、30°C (非制限温度) と 39°C (制限温度) で培養し、固体培養でのコロニー形成数 (Colony Forming Unit, CFU) と液体培養での増殖可能菌数 (Most Probable Number, MPN) を比較した。いずれの *fabB^{ts}* 株も、非制限温度では CFU と MPN に差は見られなかったが、制限温度では、CFU が MPN よりも数桁低かった。FabB が担う脂肪酸合成機能の低下により、固体培養での増殖が、液体培養時よりも大きく阻害されることが示唆された。

コロニー形成と *fabB* 遺伝子との関係をより詳細に解析するために、前任者が作製した *fabB* 遺伝子の破壊株 ($\Delta fabB$ 株) を用いた実験を行った。 $\Delta fabB$ 株は、oleic acid を添加した天然培地 (LB 培地) では固体培養でも液体培養でも野生株と同程度に増殖し、増殖頻度に固体培養と液体培養間での差はなかったが、oleic acid 非添加培地では固体培養で増殖しないのに対して液体培養では増殖が確認された。このことから $\Delta fabB$ 株は、液体培養でなら LB 培地に含まれる微量の脂肪酸だけで増殖できるが、固体培養では増殖を開始できないと推定された。

脂肪酸量と固体培養・液体培養での増殖の関係をより定量的に検証するため、oleic acid の供給量を厳密にコントロールした最少培地で固体培養および液体培養した際の $\Delta fabB$ 株の細胞数の経時的変化を観察・比較した。終濃度 0.01 $\mu\text{g/mL}$ の添加では、固体培養と液体培養のいずれでも増殖しなかった。終濃度 0.075 $\mu\text{g/mL}$ の添加では、固体培養での細胞数は植菌時から変化しないのに対し、液体培養では増加して植菌数の 10^3 倍以上に達した。さらに終濃度 1 $\mu\text{g/mL}$ の添加では、固体培養でも増加して植菌数の 10^2 倍になったが、液体培養では更に大きく増加して植菌数の 10^5 倍以上に達した。

以上より、*E. coli* が固体培養で増殖するためには、液体培養での増殖時よりも多量の脂肪酸を必要とすることが示された。固体培地での増殖開始には何らかの障壁があり、これを乗り越えるのに一定量の脂肪酸を要する何らかの生理機能が必要なのであろう。

様々な細菌における脂肪酸合成阻害時のコロニー形成能

次に筆者は、様々な細菌の脂肪酸合成を阻害する薬剤である Cerulenin と Triclosan を用いて、*E. coli* 以外の細菌におけるコロニー形成に対する脂肪酸合成の重要性を検証した。亜致死量の各薬剤を培養時に加えると、*E. coli* 野生株でも、 $\Delta fabB$ 株で観察したのと同様、CFU が MPN に比べて大きく低下する現象を確認した。*Bacillus subtilis* に対しては Cerulenin を用いて、*Corynebacterium glutamicum* に対しては Triclosan を用いて、脂肪酸合成阻害時の固体培養と液体培養での増殖を比較したところ、いずれの細菌でも CFU が MPN に比べて大きく低下した。

E. coli に加えて、系統的に大きく離れた 2 種の細菌でも一貫した表現型が観察されたことから、バクテリアにおいて、脂肪酸が関わる生理機能が固体培地での増殖開始に普遍的に重要であることが強く示唆された。

飢餓状態の細菌のコロニー形成における脂肪酸の重要性

自然界の多くの環境は、栄養素の限られた条件となっている。そこで筆者は、飢餓状態にある自然界の細菌におけるコロニー形成能の低下は、脂肪酸合成機能の低下に起因するとの仮説を立て、これを検証した。

実験室の富栄養条件では旺盛なコロニー形成能を有する *E. coli* も、長期の飢餓状態を経験すると、生理活性は保っているにもかかわらず、富栄養条件に戻してもコロニー形成しなくなることが知られており、このような状態の *E. coli* は自然界のコロニー形成しない（培養できない）細菌の性質を反映していると考えられている。そこで低温飢餓に長期間曝した *E. coli* に対する脂肪酸の供給効果を検証した結果、oleic acid を供給するだけで、供給しない場合の 10 倍以上にまでコロニー形成数が増大することがわかった。上に記した $\Delta fabB$ 株での観察のとおり、固体培地での増殖開始には一定量以上の脂肪酸が必要であったこと

と考え合わせると、飢餓状態に陥った *E. coli* の細胞では、脂肪酸合成機能が極端に低下しており、脂肪酸以外の栄養素が供給されても十分な脂肪酸量を合成できないがゆえに、増殖も開始することができないのではないかと推察した。ここに脂肪酸が外部から供給されることで、細胞の基本的機能の回復をもたらす初期代謝（増殖）が可能となり、それにもなって脂肪酸合成機能も十分に上昇して、コロニー形成の初期に存在する障壁を乗り越えられるようになるのだろう。

さらに、上記の現象が自然界の細菌でも観察されるかを検証した。すなわち、土壌細菌を対象に、脂肪酸の有無による固体培地上でのコロニー形成数を比較した。その結果、脂肪酸の添加によって土壌細菌のコロニー形成数が8倍以上に増大することがわかった。16S rRNA 解析の結果、脂肪酸添加によってコロニーとして取得できる細菌の種数も増大することが明らかとなったが、そのほとんどが *Proteobacteria* 門の細菌に偏っていた。脂肪酸添加の際には、脂肪酸を可溶化するために界面活性剤も同時に添加する必要がある。今回、界面活性剤としては Triton X-100 を用いたが、使用した濃度域で *E. coli* の増殖は阻害されないものの、*B. subtilis* と *C. glutamicum* の増殖は大きく阻害されることがわかった。このことより、土壌からの分離株が *Proteobacteria* 門の細菌に偏ったのは、他の細菌の生育が Triton X-100 により阻害されたためであると考えられる。

そこで、界面活性剤を用いない脂肪酸供給方法として、methyl- β -cyclodextrin を利用した脂肪酸供給を試みた。methyl- β -cyclodextrin 抱合体として多様な脂肪酸を、*E. coli* だけでなく、*B. subtilis* や *C. glutamicum* に対しても増殖阻害を示すことなく供給可能であることを実証した。現在、本方法による脂肪酸供給を利用した、自然界の細菌の高効率な分離培養方法の確立に取り組んでいる。

本研究の総括

本研究では、細菌が固体培地で増殖を開始する際には何らかの障壁が存在し、それを乗り越えてコロニー形成に至るためには特定の遺伝子・生理機能が必要であるとの仮説のもと、そのような遺伝子の特定を目指した。第一の候補は、*E. coli* の *fabB* 遺伝子であった。その変異株の解析を進めた結果、固体培地で増殖を開始するためには液体培養時よりも多

量の脂肪酸合成が必要であることが示された。したがって、*E. coli* では、脂肪酸を必要とする何らかの生理機能がコロニー形成に必要で、それが不足すると固体培地での初期増殖が大きく阻害されると考えられる。また脂肪酸合成の阻害剤を用いることで、*E. coli* を含む系統的に離れた 3 種の細菌で同様の現象を確認した。したがって、上記の結論は、バクテリア一般にも拡張されると期待される。さらに、飢餓状態に陥った *E. coli* や土壌細菌でも、脂肪酸を供給するとコロニー形成に至ることを確認した。これらを通して、脂肪酸が関わる生理機能の不足がコロニー形成の制限要因となっている可能性を示し、自然界の細菌のほとんどが培養できない理由の一端を明らかにした。

脂肪酸が不足するとなぜコロニー形成が特異的に阻害されるのか、その障壁となっている要因の全容解明には至ることはできなかった。ただし、Triton X-100 をはじめとする界面活性剤を供給すると、何らかの代謝系が変化した結果、脂肪酸不足時でも *E. coli* のコロニー形成能が大きく回復し、固体培養と液体培養との生育差がほとんどなくなることを発見しており、今後、界面活性剤添加による細胞の生理状態の変化を解析の足場にすることで、なぜ脂肪酸不足時にバクテリアのコロニー形成が特異的に阻害されるのか、その要因が解明できると期待される。

-引用文献-

- Abe, A., Ohashi, E., Ren, H., Hayashi, T., Endo, H., 2007. Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*. Microbiol. Res. 162(2), 130-138.
- Achtman, M., Wagner, M., 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. Nat. Rev. Microbiol. 6(6), 431-440.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59(1), 143-169.
- Arana, I., Muela, A., Iriberry, J., Egea, L., Barcina, I., 1992. Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem. Appl. Environ. Microbiol. 58(12), 3903-3907.
- Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S.i., Okada, Y., Yamamoto, S., Igimi, S., 2007. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. Environ. Microbiol. 9(4), 869-879.
- Battesti, A., Bouveret, E., 2006. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. Mol. Microbiol. 62(4), 1048-1063.
- Battesti, A., Bouveret, E., 2009. Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction. J. Bacteriol. 191(2), 616-264.
- Bender, M.L., Komiyama, M., 1978. Inclusion Complex Formation, Cyclodextrin Chemistry. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 10-17.
- Besnard, V., Federighi, M., Cappelier, J.M., 2000. Evidence of Viable But Non-Culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. Food Microbiol. 17(6), 697-704.
- Besnard, V., Federighi, M., Declerq, E., Jugiau, F., Cappelier, J.-M.M., 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. Vet. Res. 33(4), 359-370.
- Bessman, M.J., Lehman, I.R., Simms, E.S., Kornberg, A., 1958. Enzymatic synthesis of

- deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. J. Biol. Chem. 233(1), 171-177.
- Bhuiyan, M.N., Takai, R., Mitsunashi, S., Shigetomi, K., Tanaka, Y., Kamagata, Y., Ubukata, M., 2016. Zincmethylpyrins and coproporphyrins, novel growth factors released by *Sphingopyxis* sp., enable laboratory cultivation of previously uncultured *Leucobacter* sp. through interspecies mutualism. J. Antibiot. 69(2), 97-103.
- Blevins, S.M., Bronze, M.S., 2010. Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. Int. J. Infect. Dis. 14(9), e744-751.
- Boaretti, M., Lleò, M.M., Bonato, B., Signoretto, C., Canepari, P., 2003. Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. Environ. Microbiol. 5(10), 986-996.
- Bomar, L., Maltz, M., Colston, S., Graf, J., 2011. Directed culturing of microorganisms using metatranscriptomics. MBio 2(2), e00012-00011.
- Broekman, J.H., Steenbakkens, J.F., 1974. Effect of the osmotic pressure of the growth medium on *fabB* mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 117(3), 971-977.
- Bruns, A., Cypionka, H., Overmann, J., 2002. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. Appl. Environ. Microbiol. 68(8), 3978-3987.
- Bruns, A., Nübel, U., Cypionka, H., 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol. 69(4), 1980-1989.
- Buerger, S., Spoering, A., Gavrish, E., Leslin, C., Ling, L., Epstein, S.S., 2012. Microbial scout hypothesis and microbial discovery. Appl. Environ. Microbiol. 78(9), 3229-3233.
- Burg, A.W., Brown, G.M., 1968. The biosynthesis of folic acid. VIII. Purification and properties of the enzyme that catalyzes the production of formate from carbon atom 8 of guanosine triphosphate. J. Biol. Chem. 243(9), 2349-2358.
- Busmann, I., Philipp, B., Schink, B., 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. J. Microbiol. Methods 47(1), 41-50.
- Button, D.K., Schut, F., Quang, P., Martin, R., Robertson, B.R., 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. Appl. Environ.

Microbiol. 59(3), 881-891.

Béjà, O., Aravind, L., Koonin, E.V., Suzuki, M.T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich, S.B., Gates, C.M., Feldman, R.A., Spudich, J.L., Spudich, E.N., DeLong, E.F., 2000a. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 289(5486), 1902-1906.

Béjà, O., Suzuki, M.T., Koonin, E.V., Aravind, L., Hadd, A., Nguyen, L.P., Villacorta, R., Amjadi, M., Garrigues, C., Jovanovich, S.B., Feldman, R.A., DeLong, E.F., 2000b. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ. Microbiol.* 2(5), 516-529.

Campbell, J.W., Cronan, J.E., 2001. *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.* 183(20), 5982-5990.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7(5), 335-336.

Chao, A., 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* 11(4), 265-270.

Chao, A., 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43(4), 783-791.

Cho, J.C., Vergin, K.L., Morris, R.M., Giovannoni, S.J., 2004. *Lentisphaera araneosa* gen. nov., sp. nov, a transparent exopolymer producing marine bacterium, and the description of a novel bacterial phylum, *Lentisphaerae*. *Environ. Microbiol.* 6(6), 611-621.

Cho, K.Y., Salton, M.R., 1966. Fatty acid composition of bacterial membrane and wall lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 116(1), 73-79.

Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A., Palmer, L.M., 1985. Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. *BIO/TECHNOLOGY* 3(9), 817-820.

Connon, S.A., Giovannoni, S.J., 2002. High-throughput methods for culturing

microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. Appl. Environ. Microbiol. 68(8), 3878-3885.

Cronan, J.E., 1975. Thermal regulation of the membrane lipid composition of *Escherichia coli*. Evidence for the direct control of fatty acid synthesis. J. Biol. Chem. 250(17), 7074-7077.

Cronan, J.E., Birge, C.H., Vagelos, P.R., 1969. Evidence for two genes specifically involved in unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 100(2), 601-604.

Cronan, J.E., Gelmann, E.P., 1973. An estimate of the minimum amount of unsaturated fatty acid required for growth of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 248(4), 1188-1195.

Cunningham, E., O'Byrne, C., Oliver, J.D., 2009. Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. Food Control 20(12), 1141-1144.

Cuny, C., Dukan, L., Frayssé, L., Ballesteros, M., Dukan, S., 2005. Investigation of the first events leading to loss of culturability during *Escherichia coli* starvation: future nonculturable bacteria form a subpopulation. J. Bacteriol. 187(7), 2244-2248.

D'Agnolo, G., Rosenfeld, I.S., Awaya, J., Omura, S., Vagelos, P.R., 1973. Inhibition of fatty acid synthesis by the antibiotic cerulenin. Specific inactivation of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthetase. Biochim. Biophys. Acta 326(2), 155-166.

D'Ari, L., Rabinowitz, J.C., 1991. Purification, characterization, cloning, and amino acid sequence of the bifunctional enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 266(35), 23953-23958.

D'Onofrio, A., Crawford, J.M., Stewart, E.J., Witt, K., Gavrish, E., Epstein, S., Clardy, J., Lewis, K., 2010. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. Chem. Biol. 17(3), 254-264.

de Mendoza, D., Klages Ulrich, A., Cronan, J.E., 1983. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. J Biol Chem 258(4), 2098-2101.

Fijalkowska, I.J., Schaaper, R.M., Jonczyk, P., 2012. DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. FEMS Microbiol. Rev. 36(6), 1105-1121.

- Gangaiah, D., Kassem, I.I., Liu, Z., Rajashekara, G., 2009. Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable-but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(24), 7838-7849.
- Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309(5739), 1387-1390.
- Garwin, J.L., Klages, A.L., Cronan, J.E., 1980a. Structural, enzymatic, and genetic studies of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases I and II of *Escherichia coli*. *J. Biological. Chem.* 255(24), 11949-11956.
- Garwin, J.L., Klages, A.L., Cronan, J.E., 1980b. β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 255(8), 3263-3265.
- Geissinger, O., Herlemann, D.P., Mörschel, E., Maier, U.G., Brune, A., 2009. The ultramicrobacterium "*Elusimicrobium minutum*" gen. nov., sp. nov., the first cultivated representative of the termite group 1 phylum. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(9), 2831-2840.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J., 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* 177(14), 4121-4130.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5(10), R245-249.
- Hara, S., Isoda, R., Tahvanainen, T., Hashidoko, Y., 2012. Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine the quality of solid agar plates for bacterial culture. *PLOS ONE* 7(7), e41142.
- He, X., McLean, J.S., Edlund, A., Yooseph, S., Hall, A.P., Liu, S.Y., Dorrestein, P.C., Esquenazi, E., Hunter, R.C., Cheng, G., Nelson, K.E., Lux, R., Shi, W., 2015. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(1), 244-224 249.
- Heath, R.J., Jackowski, S., Rock, C.O., 1994. Guanosine tetraphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in *Escherichia coli* is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (*plsB*). *J. Biol. Chem.* 269(42), 26584-26590.

- Heath, R.J., Rock, C.O., 1996. Roles of the FabA and FabZ β -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Dehydratases in *Escherichia coli* Fatty Acid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271(44), 27795-27801.
- Heath, R.J., Yu, Y.-T., Shapiro, M.A., Olson, E., Rock, C.O., 1998. Broad Spectrum Antimicrobial Biocides Target the FabI Component of Fatty Acid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 273(46), 30316-30320.
- Heim, S., Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C.A., Canepari, P., 2002. The Viable but Nonculturable State and Starvation Are Different Stress Responses of *Enterococcus faecalis*, as Determined by Proteome Analysis. *J. Bacteriol.* 184(23), 6739–6745.
- Hengge-Aronis, R., 1993. Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72(2), 165-168.
- Henry, M.F., Cronan, J.E., 1991. *Escherichia coli* transcription factor that both activates fatty acid synthesis and represses fatty acid degradation. *J. Mol. Biol.* 222(4), 843-849.
- Hitchens, A.P., Leikind, M.C., 1939. The Introduction of Agar-agar into Bacteriology. *J. Bacteriol.* 37(5), 485-493.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., Hernsdorf, A.W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K.M., Amundson, R., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2016. A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* 1(5), 16048.
- Ingeborg, B., Bodo, P., Bernhard, S., 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *J. Microbiol. Methods* 47(1), 41-50.
- Ingham, C.J., Sprenkels, A., Bomer, J., Molenaar, D., van den Berg, A., van Hylckama Vlieg, J.E., de Vos, W.M., 2007. The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(46), 18217-18222.
- Isono, K., Krauss, J., Hirota, Y., 1976. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* with altered ribosomal proteins. *Mol. Gen. Genet.* 149(3), 297-302.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M., Sait, M., 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria,

Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. Appl. Environ. Microbiol. 68(5), 2391-2396.

Jones, K.L., Keasling, J.D., 1998. Construction and characterization of F plasmid-based expression vectors. Biotechnol. Bioeng. 59(6), 659-665.

Kaeberlein, T., Lewis, K., Epstein, S.S., 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. Science 296(5570), 1127-1129.

Katzenmeier, G., Schmid, C., Kellermann, J., Lottspeich, F., Bacher, A., 1991. Biosynthesis of tetrahydrofolate. Sequence of GTP cyclohydrolase I from *Escherichia coli*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 372(2), 991-998.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 41(1), e1.

Koch, R., 1882. Die Aetiologie der Tuberkulose. Berl. Klin. Wochenschr. 19(15), 221-230.

Kogure, K., Simidu, U., Taga, N., 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol. 25(3), 415-420.

Kusumoto, A., Asakura, H., Kawamoto, K., 2012. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. Microbiol. Immunol. 56(4), 228-237.

Lai, C.J., Chen, S.Y., Lin, I.H., Chang, C.H., Wong, H.C., 2009. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. Int. J. Food Microbiol. 135(2), 118-124.

Lange, R., Hengge-Aronis, R., 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5(1), 49-59.

Lehman, I.R., Bessman, M.J., Simms, E.S., Kornberg, A., 1958. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 233(1), 163-170.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P., 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Frontiers Microbiol. 5, 258.

- Lightner, V.A., Larson, T.J., TAILLEUR, P., Kantor, G.D., Raetz, C.R., Bell, R.M., Modrich, P., 1980. Membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Cloning of a structural gene (*plsB*) of the *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase. J. Biol. Chem. 255(19), 9413-9420.
- Lin, S., Cronan, J.E., 2011. Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. Mol. Biosyst. 7(6), 1811-1821.
- Lin, S., Hanson, R.E., Cronan, J.E., 2010. Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway. Nat. Chem. Biol. 6(9), 682-688.
- Linder, K., Oliver, J.D., 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 55(11), 2837-2842.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., Lewis, K., 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature 517(7535), 455-459.
- Lleò, M., Pierobon, S., Tafi, M., Signoretto, C., Canepari, P., 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. Appl. Environ. Microbiol. 66(10), 4564-4567.
- Lleò, M., Tafi, M., Canepari, P., 1998. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. System. Appl. Microbiol. 21(3), 333-339.
- Ma, L., Kim, J., Hatzenpichler, R., Karymov, M.A., Hubert, N., Hanan, I.M., Chang, E.B., Ismagilov, R.F., 2014. Gene-targeted microfluidic cultivation validated by isolation of a gut bacterium listed in Human Microbiome Project's Most Wanted taxa. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(27), 9768-9773.
- Maalej, S., Gdoura, R., Dukan, S., Hammami, A., Bouain, A., 2004. Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. J. Appl. Microbiol. 97(3), 557-565.
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve

genome assemblies. *Bioinformatics* 27(21), 2957-2963.

Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., de Mendoza, D., 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* 186(20), 6681-6688.

Marr, A.G., Ingraham, J.L., 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 84(6), 1260-1267.

Mary, P., Chihib, N.E., Charafeddine, O., Defives, C., Hornez, J.P., 2002. Starvation survival and viable but nonculturable states in *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Ecol.* 43(2), 250-258.

Mori, K., Yamaguchi, K., Sakiyama, Y., Urabe, T., Suzuki, K., 2009. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59(Pt 11), 2894-2898.

Morris, J.J., Johnson, Z.I., Szul, M.J., Keller, M., Zinser, E.R., 2011. Dependence of the cyanobacterium *Prochlorococcus* on hydrogen peroxide scavenging microbes for growth at the ocean's surface. *PLoS ONE* 6(2), e16805.

Morris, J.J., Kirkegaard, R., Szul, M.J., Johnson, Z.I., Zinser, E.R., 2008. Facilitation of Robust Growth of *Prochlorococcus* Colonies and Dilute Liquid Cultures by "Helper" Heterotrophic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(14), 4530-4534.

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., Epstein, S.S., 2010. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(8), 2445-2450.

Nilsson, L., Oliver, J.D., Kjelleberg, S., 1991. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 173(16), 5054-5059.

Nunn, W.D., Simons, R.W., 1978. Transport of long-chain fatty acids by *Escherichia coli*: mapping and characterization of mutants in the *fadL* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75(7), 3377-3381.

Ohta, H., Hattori, T., 1980. Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 26(1), 99-107.

Oliver, J.D., Bockian, R., 1995. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable

but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 61(7), 2620-2623.

Oliver, J.D., Hite, F., McDougald, D., Andon, N.L., Simpson, L.M., 1995. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. 61(7), 2624-2630.

Omura, S., 1976. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. Bacteriol. Rev. 40(3), 681-697.

Paolo, L., Thomas, E., Johannes, W., Stephan, L., 2014. sigmaS, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. Env. Microbiol. Rep. 6(1), 1-13.

Pawlowski, D.R., Metzger, D.J., Raslawsky, A., Howlett, A., Siebert, G., Karalus, R.J., Garrett, S., Whitehouse, C.A., 2011. Entry of *Yersinia pestis* into the viable but nonculturable state in a low-temperature tap water microcosm. PloS ONE 6(3), e17585.

Pope, P.B., Smith, W., Denman, S.E., Tringe, S.G., Barry, K., Hugenholtz, P., McSweeney, C.S., McHardy, A.C., Morrison, M., 2011. Isolation of Succinivibrionaceae implicated in low methane emissions from Tammar wallabies. Science 333(6042), 646-648.

Porter, J.R., 1976. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. Bacteriol. Rev. 40(2), 260-269.

Price, A.C., Choi, K.-H., Heath, R.J., Li, Z., White, S.W., Rock, C.O., 2001. Inhibition of β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthases by Thiolactomycin and Cerulenin. J. Biol. Chem. 276(9), 6551-6559.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41(Database issue), D590-596.

Rahman, I., Shahamat, M., Kirchman, P.A., Russek-Cohen, E., Colwell, R.R., 1994. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. Appl. Environ. Microbiol. 60(10), 3573-3578.

Rahman, M.H., Suzuki, S., Kawai, K., 2001. Formation of viable but non-culturable state (VBNC) of *Aeromonas hydrophila* and its virulence in goldfish, *Carassius auratus*. Microbiol. Res. 156(1), 103-106.

Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Giovannoni, S.J., 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418(6898), 630-633.

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 369-394.

Razumov, A.S., 1932. A method for direct bacteria count in waters and its comparison with KOCH's method. *Mikrobiologija* 1, 131-146.

Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.-F.F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B.K., Gies, E.A., Dodsworth, J.A., Hedlund, B.P., Tsiamis, G., Sievert, S.M., Liu, W.-T.T., Eisen, J.A., Hallam, S.J., Kyrpides, N.C., Stepanauskas, R., Rubin, E.M., Hugenholtz, P., Woyke, T., 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499(7459), 431-437.

Roszak, D.B., Grimes, D.J., Colwell, R.R., 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30(3), 334-338.

Saka, K., Tadenuma, M., Nakade, S., Tanaka, N., Sugawara, H., Nishikawa, K., Ichiyoshi, N., Kitagawa, M., Mori, H., Ogasawara, N., Nishimura, A., 2005. A complete set of *Escherichia coli* open reading frames in mobile plasmids facilitating genetic studies. *DNA Res.* 12(1), 63-68.

Schujman, G., Choi, K., Altabe, S., Rock, C., de Mendoza, D., 2001. Response of *Bacillus subtilis* to Cerulenin and Acquisition of Resistance. *J. Bacteriol.* 183(10), 3032-3040.

Schut, F., Vries, E.J., Gottschal, J.C., Robertson, B.R., Harder, W., Prins, R.A., Button, D.K., 1993. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(7), 2150-2160.

Shannon, C., Weaver, W., 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

Shigematsu, T., Hayashi, M., Kikuchi, I., Ueno, S., Masaki, H., Fujii, T., 2009. A culture-dependent bacterial community structure analysis based on liquid cultivation and its application to a marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 293(2), 240-247.

Shigematsu, T., Ueno, S., Tsuchida, Y., Hayashi, M., Okonogi, H., Masaki, H., Fujii, T., 2007.

Comparative analyses of viable bacterial counts in foods and seawater under microplate based liquid- and conventional agar plate cultivation: increased culturability of marine bacteria under liquid cultivation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(12), 3093-3097.

Silbert, D.F., Vagelos, P.R., 1967. Fatty acid mutant of *E. coli* lacking a beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58(4), 1579-1586.

Skinner, F.A., Jones, P.C., Mollison, J.E., 1952. A comparison of a direct- and a plate counting technique for the quantitative estimation of soil micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* 6(3-4), 261-271.

Smit, P., Heniger, J., 1975. Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723) and the discovery of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 41(1), 217–228.

Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39(1), 321-346.

Streit, W.R., Entcheva, P., 2003. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(1), 21-31.

Sutterlin, H.A., Shi, H., May, K.L., Miguel, A., Khare, S., Huang, K., Silhavy, T.J., 2016. Disruption of lipid homeostasis in the Gram-negative cell envelope activates a novel cell death pathway. *Proc. National. Acad. Sci. USA* 113(11), E1565-E1574.

Suzuki, S., Horinouchi, S., Beppu, T., 1988. Growth of a Tryptophanase-producing Thermophile, *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., Is Dependent on Co-culture with a *Bacillus* sp. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2353-2362.

Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y., Kamagata, Y., 2009. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ. Microbiol.* 11(7), 1827-1834.

Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M., Kamagata, Y., 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4), 2162-2169.

Tamaki, H., Tanaka, Y., Matsuzawa, H., Muramatsu, M., Meng, X.Y., Hanada, S., Mori, K.,

- Kamagata, Y., 2011. *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61(Pt 6), 1442-1447.
- Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C.H., Kamagata, Y., 2014. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. Appl. Environ. Microbiol. 80(24), 7659-7666.
- Tanaka, Y., Hanada, S., Manome, A., Tsuchida, T., Kurane, R., Nakamura, K., Kamagata, Y., 2004. *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54(3), 955-959.
- Tanaka, Y., Hanada, S., Tamaki, H., Nakamura, K., Kamagata, Y., 2005. Isolation and Identification of Bacterial Strains Producing Diffusible Growth Factor(s) for *Catellibacterium nectariphilum* strain AST4^T. Microbes Environ. 20(2), 110-116.
- Taniguchi, Y., Choi, P.J., Li, G.W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., Xie, X.S., 2010. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. Science 329(5991), 533-538.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56(3), 782-787.
- Trajtenberg, F., Altabe, S., Larrieux, N., Ficarra, F., Mendoza, D., Buschiazzi, A., Schujman, G.E., 2014. Structural insights into bacterial resistance to cerulenin. FEBS J. 281(10), 2324-2338.
- Ulloa, J.E., Casiano, C.A., De Leon, M., 2003. Palmitic and stearic fatty acids induce caspase-dependent and -independent cell death in nerve growth factor differentiated PC12 cells. J. Neurochem. 84(4), 655-668.
- Vadia, S., Tse, J.L., Lucena, R., Yang, Z., Kellogg, D.R., Wang, J.D., Levin, P.A., 2017. Fatty Acid Availability Sets Cell Envelope Capacity and Dictates Microbial Cell Size. Curr. Biol. 27(12), 1757-1767.e1755.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch,

- C., Rogers, Y.H., Smith, H.O., 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304(5667), 66-74.
- Watsuji, T.O., Kato, T., Ueda, K., Beppu, T., 2006. CO₂ supply induces the growth of *Symbiobacterium thermophilum*, a syntrophic bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(3), 753-756.
- Watsuji, T.O., Yamada, S., Yamabe, T., Watanabe, Y., Kato, T., Saito, T., Ueda, K., Beppu, T., 2007. Identification of indole derivatives as self-growth inhibitors of *Symbiobacterium thermophilum*, a unique bacterium whose growth depends on coculture with a *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(19), 6159-6165.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(12), 6578-6583.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(12), 4576-4579.
- Woldringh, C.L., van Iterson, W., 1972. Effects of treatment with sodium dodecyl sulfate on the ultrastructure of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 111(3), 801-813.
- Wolf, P.W., Oliver, J.D., 1992. Temperature effects on the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 10(1), 33-39.
- Wong, H.-C., Liu, S.-H., 2008. Characterization of the low-salinity stress in *Vibrio vulnificus*. *J. Food Protect.* 71(2), 416-419.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R., 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 8(4), 313-323.
- Yamamoto, K., Kataoka, E., Miyamoto, N., Furukawa, K., Ohsuye, K., Yabuta, M., 2003. Genetic engineering of *Escherichia coli* for production of tetrahydrobiopterin. *Metab. Eng.* 5(4), 246-254.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., Keller, M., 2002. Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(24), 15681-15686.
- Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., Nakamura, K., 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-

accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(Pt 4), 1155-1163.

Zhang, Y.-M., Rock, C.O., 2016. Chapter 3 - Fatty Acid and Phospholipid Biosynthesis in Prokaryotes, in: Ridgway, N.D., McLeod, R.S. (Eds.), Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier, pp. 73-112.

Zhang, Y.M., Marrakchi, H., Rock, C.O., 2002. The FabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 277(18), 15558-15565.

三井智玄, 2013. コロニー形成能に欠陥のある大腸菌変異株の研究, 修士論文.

別府輝彦, 1989. 微生物実験法, in: 村松正實 (Ed.) 新生化学実験講座. 東京化学同人, pp. 135-158.

安原幸司, 2007. 大腸菌のコロニー形成能の再検討, 修士論文.

池端佑仁, 2010. 大腸菌のコロニー形成に関わる遺伝子の探索, 修士論文.

福嶋凡子, 2017. 低温飢餓に曝した大腸菌のコロニー形成能を制御する遺伝子の解析, 修士論文.

納庄一樹, 2015. 大腸菌におけるコロニー形成にとって重要な遺伝子機能の解析, 修士論文.

西尾優宏, 2016. 大腸菌の低温飢餓におけるコロニー形成数の低下を抑制する遺伝子の研究, 修士論文.

高丸玲子, 2014. 大腸菌の VBNC 化を緩和する遺伝子のスクリーニング, 修士論文.

-謝辞-

本研究の遂行にあたり、終始適切かつ丁寧なご指導、ご助言を賜りました東京大学分子育種学研究室の日高真誠准教授に深く感謝いたします。私が道に迷い、悩んだ際に最も頼ったのは日高先生でした。その際は、安易な答えを与えるのではなく、自分自身で考え抜いた上で正しい道を選択できるよう導いてくださいました。誰よりも厳しく、誰よりも優しく、そして誰よりも私のことを信じてくれた先生には心の底より感謝いたします。大変お世話になりました。

同研究室の小川哲弘助教にも感謝いたします。論文投稿の際には幾度も励まされました。もし小川さんがいなければ、とっくの昔に研究者としての道を諦めていたと思います。失礼ながら、今では苦楽を共にした戦友の様に感じております。

また、昨年度に同研究室を退官された正木春彦名誉教授にも深く感謝いたします。幾度となく反抗し、無礼な物言いばかりしてしまいましたが、正木先生の寛大な人柄のおかげでここまで研究を続けることができました。正木先生に憧れて当研究室に入ってきましたが、私にとって今でも正木先生は世界一格好良い研究者です。

Cyclodextrin 抱合脂肪酸の調製から特許の出願に至るまで多大な支援をいただいた、東京医科歯科大学研究員兼株式会社グリーンデイ代表取締役の大隅一興様に心から感謝いたします。また研究にあたって、菌株を分譲していただいた東京農業大学の吉川博文教授および東京大学の古園さおり特任准教授にも感謝いたします。東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの石毛太一郎研究員には、分離した土壌細菌の 16S rRNA 解析を担当していただき大変感謝しております。また、産業技術総合研究所の玉木秀幸主任研究員、東京大学の野尻秀昭教授、および同大学の若本祐一准教授には論文の投稿先や研究の方向性に対して貴重なアドバイスをいただき、大変感謝しております。その他にも、東京大学農学生命科学研究科の教員の方々には、多大な励ましをいただきました。感謝申し上げます。

日々生活を共にし、楽しく過ごしてきた研究室の先輩や後輩、同期の皆様にも深く感謝いたします。特に同室の西尾優宏君は最後まで本論文の添削とお酒に付き合ってくれました。本当にありがとうございました。

最後に、私が研究者としての道を進むことを支援してくれた両親、そして暖かく見守ってくれた高丸玲子さんに心から感謝いたします。

2018 年 3 月

納庄 一樹