

セルロース分解能を有する安定な人工生態系における  
微生物間ネットワークの解析

応用生命工学専攻  
平成 15 年度 博士課程進学  
加藤 創一郎  
指導教員 五十嵐 泰夫

# 目次

目次	1
序論	5
1. 本研究の背景	6
2. 安定な高効率セルロース分解微生物群集 (original microflora)	7
3. 微生物群集によるセルロース分解	11
4. 微生物群集の安定性と微生物間ネットワーク	11
5. 本研究の目的	12
材料と方法	13
1. 培地	14
2. 培養条件	18
3. 混合培養系の構築	19
4. DNA 抽出	19
5. PCR-DGGE 解析	20
6. 16S rRNA 遺伝子を指標とした分子系統分類学的解析	22
7. DNA-DNA 相同性試験	22
8. GC 含量測定	24
9. 好気性分離株の基質利用性試験	25
10. 嫌気性分離株の糖利用性試験	25
11. <i>C. straminisolvens</i> CSK1 株のセルロース分解代謝産物の検出	26
12. 酸素耐性試験	26
13. <i>C. straminisolvens</i> CSK1 株の生理学的試験	27
14. 特異的プライマーの設計	28
15. 特異的 PCR	28
16. 定量的 real-time PCR	29
17. セルロース分解過程の解析	30
18. 顕微鏡観察による全菌数測定	31
19. <i>C. straminisolvens</i> CSK1 株培養濾液での非セルロース分解分離株の培養実験	31
20. 培養濾液添加培地での培養実験	31
21. 培養上清タンパク質の解析 (SDS-PAGE)	32
22. 2次元電気泳動 (2D-GE) 解析	32
Abbreviation list	34





第3章 5種の分離株の混合培養による安定な人工生態系の構築.....	63
第1節 緒言 .....	64
第2節 セルロース分解能を有する安定な人工生態系 (SF356) .....	65
第3節 ノックアウト群集の構築とその安定性の検討.....	65
第4節 SF356 とノックアウト群集のセルロース分解過程の解析.....	68
第1項 セルロース分解効率	
第2項 培養液 pH の推移	
第3項 培養液中のセルロース分解代謝産物	
第5節 非セルロース分解分離株の機能の再検討 .....	70
第6節 考察 .....	71
第4章 人工生態系における微生物間ネットワークの解析.....	75
第1節 緒言 .....	76
第2節 培養濾液による他菌の生育の促進、抑制 .....	77
第1項 培養濾液添加培地での培養実験	
第2項 <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3 株培養濾液中の <i>C. straminisolvens</i> CSK1 株セルロース分解促進物質	
第3節 2菌株間の関係性、相互作用の詳細な解析 .....	82
第1項 <i>C. straminisolvens</i> CSK1 株と <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3 株の関係性	
第2項 <i>C. straminisolvens</i> CSK1 株と <i>Clostridium</i> sp. FG4 株の関係性	
第3項 <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3 株と <i>Brevibacillus</i> sp. M1-5 株の関係性	
第4節 混合培養系における群集ダイナミクスの数理的解析 .....	93
第5節 考察 .....	98
総括と展望.....	104
参考文献.....	110
謝辞.....	120
論文の内容の要旨.....	121

## 序論

## 1. 本研究の背景

従来までの微生物学の研究では、環境中から1種の微生物を純粋分離し、実験的環境下(人工的な培地、一定の環境条件)で培養をおこないその性質を詳細に解析するという、培養に依存した方法が主流であった。しかし Woese ら[130, 131]による SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) 遺伝子を指標とした分子系統学的手法の適用、および Amann ら[6, 7]による SSU rRNA をターゲットとした oligonucleotide probe をもちいた微生物検出法 (FISH (fluorescence in situ hybridization) 法) の適用などにより環境中に存在している微生物の系統学的な情報を得ることが可能になったことで、自然界には従来までに考えられた以上に多様な微生物が存在していることが示された。このため、従来までの培養に完全に依存した解析手法だけでは、自然生態系における実際の微生物の働きを完全に理解することはできない、という考え方が主流となった。以降、様々な分子生態学的解析手法 (e.g., cloning of SSU rRNA gene, PCR-DGGE) [e.g., 24, 112, 119]が多くの環境に適用され、対象とする環境中に(系統学的に)どのような微生物がどのくらい存在しているのかがわかるようになった。また得られた系統学的情報(主に SSU rRNA 遺伝子配列情報)から、その近縁の既知微生物を特定しその性質と照らし合わせることで、検出された微生物の機能を推察することも可能である。また近年になって、その系統学的情報とメタゲノム解析(微生物群集から得られた DNA を用いての direct amplification, cloning, sequencing による解析) [e.g., 107, 121, 124]や生物化学的解析 (e.g., MAR-FISH (microautoradiography-fluorescence in situ hybridization)、RING-FISH (recognition of individual genes fluorescence in situ hybridization)) [e.g., 8, 54, 137]などを組み合わせることで、環境中での対象微生物の実際の機能や役割を推察することが可能となった。しかし、その検出された微生物と近縁な微生物が未だ分離されていない場合には特に、その微生物を純粋分離しなければその環境中における実際の機能を知ることは非常に困難である。そこで近年では、分子生態学的解析手法により優占種として検出された、あるいは重要な機能を担う微生物として予想された微生物をターゲットとして純粋分離をおこない、実際にその機能を検証した、という報告が多くなされている。例としては、高温性メタン発酵槽でメタン生成古細菌と共生関係にある水素発生型嫌氣的有機酸酸化細菌 *Pelotomaculum thermopropionicum* [52]、海洋から高頻度に検出されていながらそれまで分離されていなかった SAR11 clade の細菌[96]、Marine groupe I に属する海洋性アンモニア酸化古細菌[63]などの純粋分離の報告があげられる。しかしこのようなそれまでに純粋分離されていなかった新規の微生物の純粋分離には様々な困難が伴い、分離に使用する培地や培養条件などに様々な工夫を凝らすことが必要である[e. g., 59, 60, 71]。

自然環境、あるいは様々な人工的環境においては、ある種の微生物が単独で存在していることはほとんど無く、複数種の微生物が互いに影響を及ぼしあいながら共存している。そのような環境において微生物は、他種生物との共存という状況下において、はじめて効果的にその機能を発揮しているものと考えられる[4]。そのため実際の環境中における微生物の働きを理解するためには、その対象とする微生物の機能を明らかにすることに加えて、異種(微)

生物との関係性、相互作用を明らかにすることが重要であると考えられる。このような異種微生物間の関係性、相互作用に関しては、代謝産物を介した相利（片利）共生関係[e.g., 50, 89, 106]、炭素源、窒素源などを奪い合う競争関係[e.g., 18, 39]、バクテリオシンなどの抗生物質を介した阻害作用[e.g., 30, 62, 95]など、多くの例が知られている。しかし、そのような2種の微生物間の関係性が実際に環境中で機能しているのか、また環境中の微生物群集構造に対してどれほど寄与しているのか、まで明らかにした例はほとんどない。

またこのような微生物間の相互作用は、群集の構造、及びその安定性を決定する要因となっていると考えられる。自然環境、ならびに様々な人工的環境において、その環境における機能の効率的な発揮、ならびに攪乱などに対する安定性、柔軟性の保持のためには、生物群集における多様性、ならびにそれら多様な生物種の安定的な共存が必要であると考えられている[e.g., 34, 35, 76, 80, 120]。特に有機性廃棄物や廃水の微生物による処理過程などの人工的環境においては、長期間の運転や様々な攪乱などに対する微生物群集の機能、構造の安定性を維持することは非常に重要な問題と考えられている[14, 34, 35, 47, 109, 125]。しかし複数種の微生物が安定に共存するメカニズムは未だ明確にされていない。

以上のような、微生物群集における機能や安定性を解析するにあたって、その理解を阻む大きな障壁となっているのは、複雑な微生物群集における全ての構成微生物種の特定が困難である、という点と、再現的な実験系を構築するのが困難である、という点にあると考えられる。この様な条件下では微生物の群集中での機能や相互作用を明らかにすることは非常に困難である。そこで本研究では、ひとつの微生物群集から分離した微生物の混合培養により、その微生物群集の機能と安定性を再現した人工生態系を構築することを第一の目的とした。さらにこの人工生態系における各微生物種の機能や相互作用を解析することで、複数種の微生物による効率的な機能の発揮、および複数種の微生物の安定な共存に関する一般的なメカニズムを解明することを最終的な目的とした。

## 2. 安定な高効率セルロース分解微生物群集 (original microflora) [45, 140]

本研究では、高い機能と安定性を併せ持つ人工生態系の構築に使用するための微生物源として、Haruta ら[45]によって構築された高効率セルロース分解能を有する安定な微生物群集 (original microflora) を使用した。

original microflora の構築過程を Fig. 0-1 に示す。original microflora は稲わらの堆肥化過程を微生物源として、濾紙を炭素源とした培地 (PCS-FP 培地、材料と方法 1(a)参照) を使用し、継代培養を繰り返すことにより構築された。堆肥土壌サンプルを培地に接種し、50°C、好気条件下で静置培養をおこなうと、数日のうちに濾紙の分解がみられた。しかしここで得られた微生物群集は、継代培養を繰り返すうちに濾紙分解能を失ってしまう不安定な群集であった。このようにして得られた複数の不安定な群集を混ぜ合わせて同様に継代培養をおこなったところ、継代培養を繰り返すおこなっても濾紙分解活性が失われない安定な微生物群集 (original microflora) が得られた。

original microflora は稲わらを炭素源とした培地(PCS-straw 培地、材料と方法 1(a)参照)、50°C、好気静置条件での培養で、4 日間で約 50%、8 日間で約 80%の稲わらを分解するほどの高いセルロース分解能力を有していた (Fig. 0-2)。この分解能力は、高いセルロース分解能を有する既知細菌 (*Clostridium thermocellum*) の純粋培養よりも有意に高い分解効率であった[140]。

original microflora の稲わら分解過程の解析により以下の様な知見が得られている。original microflora の稲わら分解過程における、pH、oxidative reductive potential (ORP、酸化還元電位) の測定結果を Fig. 0-3 に示す。pH は培養初期に一時的に低下し (セルロース分解に伴う有機酸生成によるものと推察される)、その後中性付近にまで上昇した。original microflora の構築の途中段階において、このような pH の回復がみられない群集が不安定であったことから、この pH の回復は original microflora の重要な特徴であると考えられる。ORP 値は培養開始数時間後には-400 mV 以下にまで低下し、その後もほぼ変わらぬ値を示し、培養液中は嫌氣的であることが示された。

original microflora の稲わら分解過程における、セルロース分解代謝産物 (水溶性糖、グルコース、エタノール、乳酸、酢酸) の定量結果 (材料と方法 17) を Fig. 0-4 に示す。稲わら分解に伴って放出される生成物は培養初期には一時的に蓄積するがその後消費された。稲わらの分解に伴う生成物が消費されることが、高効率分解の一因であると考えられた。

original microflora からカビなどの真菌類、および古細菌は検出されず、original microflora は真性細菌のみからなる群集であることが示された。original microflora から DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子配列をターゲットにしたプライマーを用いて PCR 増幅をおこない、その産物を denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法 (材料と方法 5 参照) により解析した結果を Fig. 0-5 に示す。好気性細菌 (*Pseudoxanthomonas* 属、*Brevibacillus* 属、*Bordetella* 属) に近縁な配列に加えて、嫌気性細菌である *Clostridium* 属の細菌に近縁な配列も優占種として検出され、original microflora には好気性細菌と嫌気性細菌が共存していることが示された。

また original microflora は長期間の継代培養や攪乱に対して高い安定性、柔軟性を有していた。original microflora は数十回にわたる継代培養や凍結保存の後でも変わらぬセルロース分解能を保持しており、また PCR-DGGE 解析で検出される微生物種にも変化はみられなかった。また異なる初期 pH で培養をおこないその pH 推移を調べたところ、培養初期に一度中性付近になり、その後 pH 6 付近にまで一時的に低下し、その後徐々に上昇していくといった、典型的な推移を示した (Fig.0-6)。

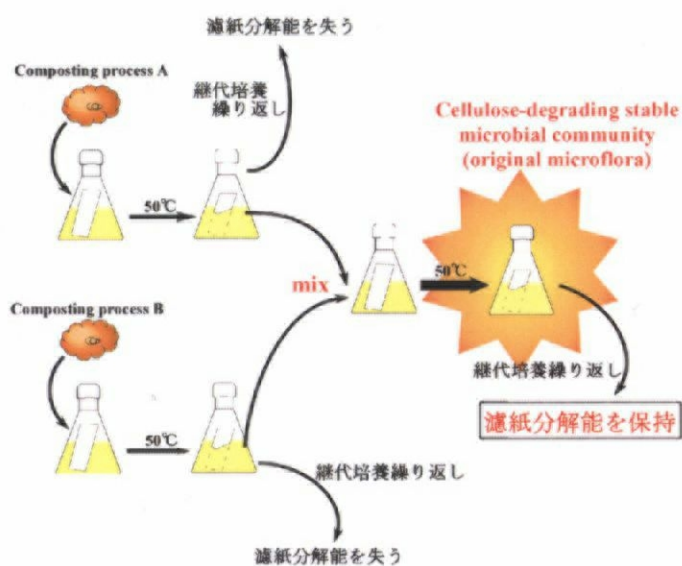


Fig. 0-1. original microflora の構築過程

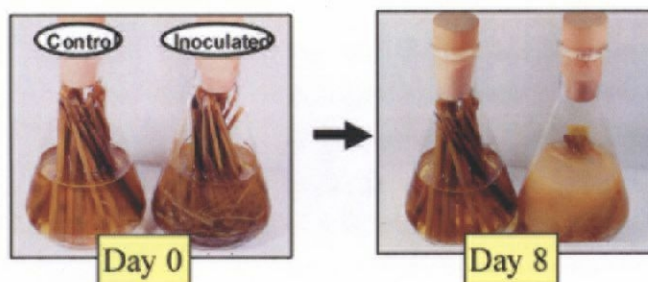


Fig. 0-2. original microflora による稲わら分解。培養は PCS-straw 培地、50°C、好気静置条件でおこなった。図中左のフラスコは菌未接種のコントロール。

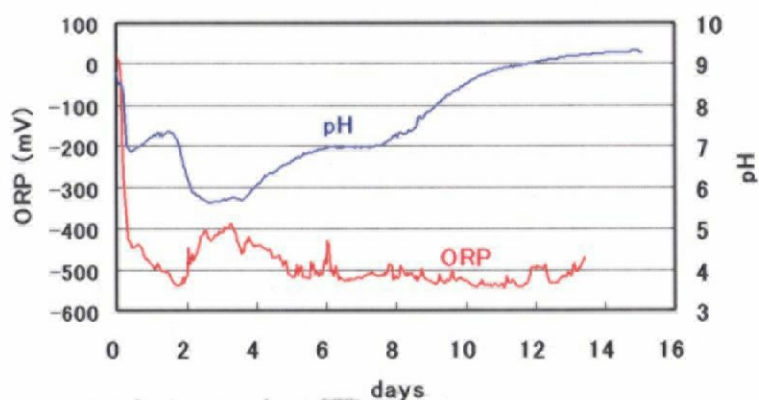


Fig. 0-3. original microflora による稲わら分解過程の pH、酸化還元電位 (ORP) 測定結果 (参考文献[45]より)。培養は PCS-straw 培地、50°C、好気静置条件でおこなった。

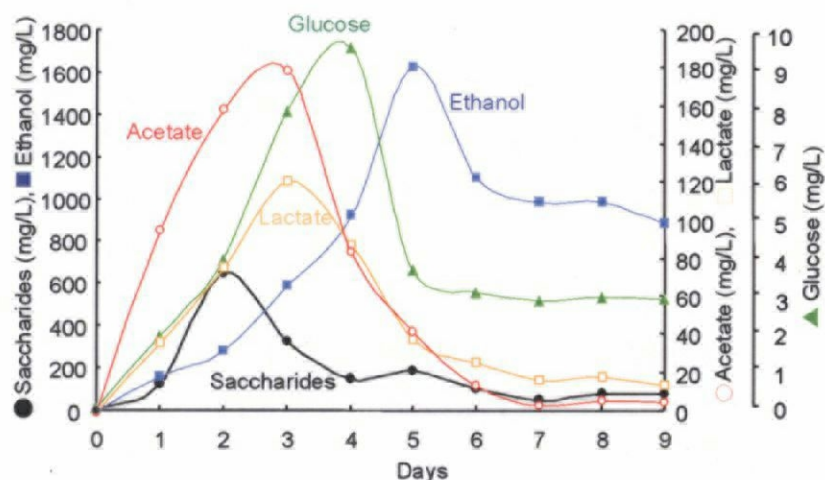


Fig. 0-4. original microflora による稲わら分解過程における生成物（水溶性糖、グルコース、エタノール、乳酸、酢酸）の定量結果（参考文献[45]より）。培養は PCS-straw 培地、50°C、好気静置条件でおこなった。

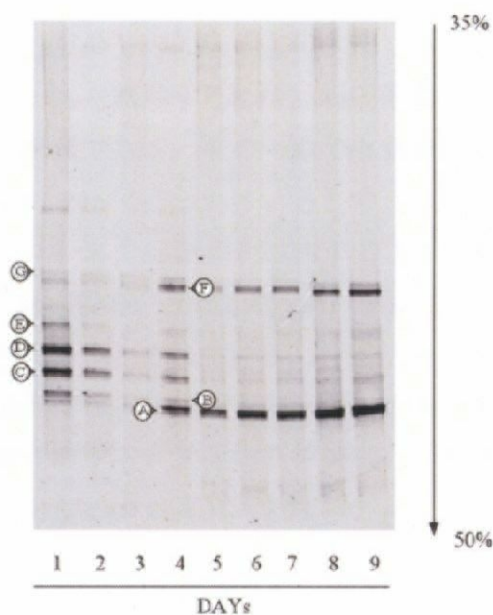


Fig. 0-5. original microflora の稲わら分解過程の PCR-DGGE 解析結果（参考文献[45]より）。培養は PCS-straw 培地、50°C、好気静置条件でおこなった。各バンドの塩基配列から高い相同性を示した既知微生物は以下の通り（括弧内は相同性）。  
 Band A: *Pseudoxanthomonas taiwanensis* (100%)  
 Band B, C, D: *Brevibacillus* sp. Riau (94.1-99.4%)  
 Band E: *Bordetella avium* (94.9%)  
 Band F: *Clostridium thermosuccinogenes* (100%)  
 Band G: not assigned  
 ただし Band G は後の解析により、*Clostridium straminisolvens* CSK1 株のバンドと判明。

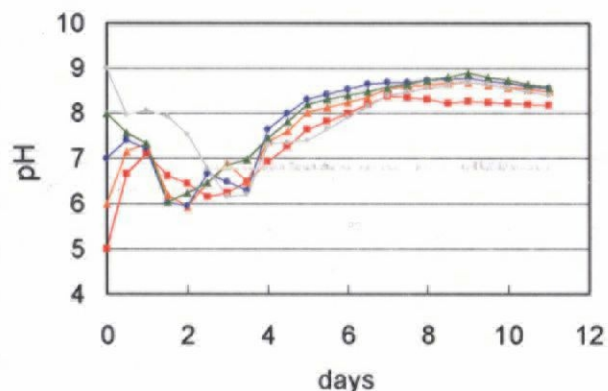


Fig. 0-6. original microflora を異なる初期 pH (5-9) で培養したときの培養液 pH の推移（参考文献[45]より）。培養は PCS-straw 培地、50°C、好気静置条件でおこなった。

### 3. 微生物群集によるセルロース分解

セルロースは植物バイオマスの乾燥重量の約 50%を占めており、地球上で最も多く存在する有機物質である。また農林業などにおける産業廃棄物、家庭から排出されるゴミに関しても、その重量の約 50%はセルロースであると言われている[20]。このように自然界に豊富に存在するセルロースは、廃棄物と言う側面を持つ一方で、昨今のエネルギー、資源枯渇問題や環境汚染問題の解決手段としての利用可能な資源である、とも捉えることができる。セルロースは、D-グルコースが $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 グルコシド結合で連なった、構造的には単純な高分子である。しかしながら自然環境におけるセルロースの大部分は、酵素による加水分解が非常に困難な不溶性の結晶性微繊維として存在している [12]。さらに他の植物構成成分、すなわちヘミセルロースやリグニンと共存、結合した状態（リグノセルロース）にあることで、さらに分解が困難な状態で存在している [12]。そのためリグノセルロースは環境中に残存しやすく、その分解、有効利用は非常に重要な問題として捉えられている[20, 43]。

リグノセルロースを分解する微生物、およびその酵素群（cellulase、xylanase、peroxidase など）については、古くから多くの研究がなされており [e.g., 13, 37, 48, 78]、繊維、食品、製紙工業などの分野に広く応用されている。しかし単独の微生物や酵素で自然界由来のリグノセルロースを処理するには、物理化学的処理や滅菌といった前処理無しには非常に困難であるのが現状である。その一方で自然界におけるリグノセルロースの分解は複数の微生物の共同作用によって行われていると考えられている。また実際にセルロース分解微生物と、余剰なセルロース分解産物を除去するような非セルロース分解微生物（e.g., 水素消費微生物[88, 128]、糖消費微生物[72, 86, 94, 123]）との混合培養によりセルロース分解効率が高められる、という報告もなされている。

本研究では、original microflora から分離した微生物の混合培養によって高効率セルロース分解能を有する人工生態系を構築し、その解析を通して複数種の微生物によるセルロースの効率的分解のメカニズムを探った。

### 4. 微生物群集の安定性と微生物間ネットワーク

生態学の分野において、2 種の生物間の関係性は以下の 6 パターンに分類されている[e.g., 144, 145]; (1) 互いに利益を与え合う「相利共生」、(2) 自分にとっては利益、相手には害を与える「捕食、寄生」、(3) 自分にとっては利益、相手には影響を与えない「片利共生」、(4) 両者ともに害を与え合う「競争、競合」、(5) 自分にとっては害も利益もないが、相手には害を与える「片害作用」、(6) 両者ともに影響がない「中立作用」。このような関係性は、微生物の世界でも同様にみられるものであり、代謝産物を介した相利(片利)共生関係[e.g., 50, 89, 106]、炭素源、窒素源などを奪い合う競争関係[e.g., 18, 39]、バクテリオシンなどの抗生物質を介した片害作用(阻害作用) [e.g., 30, 62, 95]など、多くの例が解析されている。しかし、そのような 2 種の微生物間の関係性が実際に環境中で機能しているのか、また環境中の微生物群集構造に対してどれほど影響を及ぼしているのか、まで明らかにした例はほとんどない。また実



際の環境中では、上記のような 2 種間の関係性や相互作用は静的で不変なものではなく、環境条件に依存した動的、可塑的なものであると考えられる[e.g., 26, 62]。さらに複数の相互作用が連鎖、交差することによって生じる間接的な関係（生態学の分野では間接効果、間接的相互作用と呼ばれている。例えば A 種が B 種に影響を与えることで B 種が C 種に与える影響を変化(増幅、軽減など)させるときの、A 種と C 種の関係性)が、生物群集のダイナミクスや安定性の維持に対して非常に重要であることが示されている[e.g., 62, 91, 108]。本研究の目的の一つである、複数種の微生物が安定に共存するメカニズムの解明のためには、そのメンバー間の関係性、相互作用のネットワーク（微生物間ネットワーク）を理解していくことが必要であると考えられる。

そこで本研究では、original microflora から分離した微生物の混合培養によって複数種の微生物が安定に共存する人工生態系を構築し、その微生物間ネットワークの解析を通して複数種の微生物が安定に共存するメカニズムを探った。

## 5. 本研究の目的

本研究では、高効率セルロース分解能を有する安定な微生物群集、original microflora を材料として、その構成メンバーである微生物の純粋分離をおこない、その分離株を用いた混合培養によって original microflora が有する特性、すなわち高効率セルロース分解能と安定性を再現した人工生態系を構築することを第一の目的とした。さらにその人工生態系の解析により各メンバーが群集内で果たす役割、メンバー間の関係性や相互作用（微生物間ネットワーク）を明らかにすることで、微生物群集が高い機能（高効率セルロース分解）を発揮するメカニズム、および複数種の微生物が安定に共存するメカニズムを解明することを目的とした。

## 材料と方法

## 1. 培地

### (a) PCS 培地

PCS 培地は original microflora を構築する際に使用されていた培地である[45]。本研究では original microflora、混合培養系、好気性分離株の培養などに使用した。PCS 培地の基本組成を Table 0-1 に示す。使用する炭素源は培養の目的に応じて変更した。またその際の  $\text{CaCO}_3$  添加の有無、初期 pH 等の条件を以下に示す。また嫌気条件下で培養する場合には、還元剤 L-cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O を 0.5 g/L、酸化還元指示薬 resazurin を 1 mg/L 添加した。

- ・ PCS-straw 培地：炭素源は 10 g/L の稲わら（日本産の *Oryza sativa* subsp. *japonica* の茎部分をよく乾燥し、1 日間室温で水酸化ナトリウム水溶液（1% w/v）に浸し、よく水で洗い、再度よく乾燥させたもの）、 $\text{CaCO}_3$  添加、pH 8.0
- ・ PCS-FP 培地：炭素源は 10 g/L の濾紙（Advantec quantitative filter paper No. 5A (Toyo Roshi, Japan)） $\text{CaCO}_3$  添加、pH 8.0
- ・ PCS-ethanol 培地：炭素源は 0.5 g/L のエタノール、 $\text{CaCO}_3$  無添加、pH 7.2
- ・ PCS-basal 培地：炭素源無添加、 $\text{CaCO}_3$  無添加、pH 7.2

Table 0-1. Composition of PCS medium

	g/L
Peptone	5
Yeast extract	1
NaCl	5
(Carbon source)	(0.5-10)
( $\text{CaCO}_3$ )	(2)

### (b) tryptic soy broth (TSB)寒天培地

TSB 培地は従属栄養性の好気性細菌の培養に一般的に使用される培地である。本研究では好気性細菌の分離に使用した。TSB 寒天培地（pH 7.2）の組成を Table 0-2 に示す。

Table 0-2. Composition of TSB-agar medium

	g/L
Pancreatic digest of casein*	17
Enzymatic digest of soybean meal*	3
Glucose*	2.5
NaCl*	5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ *	2.5
Agar	15

\*These materials are originally contained in Tryptic Soy Broth (DIFCO).

## (c) VLG 寒天培地

VLG 培地は酸生成嫌気性細菌の培養に一般的に使用される培地である[51, 139]。本研究では好気性分離株の嫌気条件下での培養実験に使用した。VLG 寒天培地 (pH 7.0) の組成を Table 0-3 に示す。

Table 0-3. Composition of VLG-agar medium

	g/L
Peptone	10
Yeast extract	5
Meat extract	2
Glucose	10
NaCl	5
L-cysteine·HCl·H <sub>2</sub> O	0.5
Agar	15

## (d) DSM502 培地

DSM502 培地は *Clostridium thermosuccinogenes* の分離に使用された培地である[27, 147]。本研究では *Clostridium straminisolvens* CSK1 株の分離、および *Clostridium* sp. FG4 株の糖利用率試験に使用した。DSM502 培地 (pH 7.0) の組成を Table 0-4 に示す。

Table 0-4. Composition of DSM502 medium

per liter		Composition of vitamin solution [49]		Composition of trace elements[93]	
			mg/L		per lite
NaCl	1.20 g	Biotin	10	HCl (25 %)*	10 ml
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.40 g	Folic acid	10	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.5 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.15 g	Pyridoxine-HCl	50	ZnCl <sub>2</sub>	70 mg
NH <sub>4</sub> Cl	0.27 g	Thiamine-HCl·2H <sub>2</sub> O	25	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.21 g	Riboflavin	25	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.10 g	Nicotinic acid	25	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	190 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	2.66 g	D-Ca-panthotenate	2	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 mg
KCl	0.30 g	Cyanocobaramine	0.5	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	24 mg
NaHCO <sub>3</sub> *	2.50 g	<i>p</i> -aminobenzoic acid	25	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36 mg
Yeast extract*	0.03 g	Lipoic acid	25		
Casamino acids*	0.03 g				
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O*	0.15 g				
Resazurin	1 mg				
Vitamin solution**	10 ml				
Trace elements <sup>b*</sup>	1 ml				
Carbon source	5-10 g				

\* Sterilize separately stock solutions of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, yeast extract, casamino acids, Na<sub>2</sub>S, vitamin solution and trace elements.

\* First dissolve FeCl<sub>2</sub> in the HCl, then dilute in water, add and dissolve the other salts.

**(e) PY 培地**

PY 培地は酸生成嫌気性細菌の培養に一般的に使用される培地である[51, 139]。本研究では *Clostridium* sp. FG4 株の分離、培養に使用した。PY 培地 (pH 7.0) の組成を Table 0-5 に示す。炭素源としては、glucose、fructose、inulin (植物の根に多く含まれる多糖、主として fructose の  $\beta$ -2 $\rightarrow$ 1 結合から構成される) を使用した (それぞれ PY-glucose、PY-fructose、PY-inulin 培地と表記)。

Table 0-5. Composition of PY medium

per liter		* Composition of salt solution	
			g/L
Peptone	10 g	CaCl <sub>2</sub>	0.2
Yeast extract	10 g	MgSO <sub>4</sub>	0.2
Salt solution*	40 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
Resazurin	1 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
L-cysteine·HCl·H <sub>2</sub> O	0.5 g	NaHCO <sub>3</sub>	10
Carbon source	5 g	NaCl	2.0

**(f) IAM B46 培地**

IAM B46 培地は好熱性セルロース分解細菌 *Clostridium thermocopriae* の培養用の培地である [56, 138]。本研究では *C. straminisolvens* CSK1 株の培養試験、および *Clostridium* sp. FG4 株の分離に使用した。IAM B46 培地 (pH 7.0) の組成を Table 0-6 に示す。炭素源としては、glucose、fructose、または inulin を使用した。

Table 0-6. Composition of IAM B46 medium

	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.4
Urea	1.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub>	0.001
L-cysteine·HCl·H <sub>2</sub> O	1.0
Yeast extract	6.0
MOPS*	20.0
Carbon source	10.0

\* 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid

**(g) DSM122 培地**

DSM122 培地は *C. straminisolvans* CSK1 株の近縁種である *Clostridium thermocellum* の至適培地である[102, 146]。本研究では *C. straminisolvans* CSK1 株、および *Clostridium* sp. FG4 株の培養に使用した。DSM122 培地 (pH 7.0) の組成を Table 0-7 に示す。*C. straminisolvans* CSK1 株の培養には炭素源としてセルロースパウダー (Avicel® (Merck)、5 g/L)、濾紙 (10 g/L)、もしくは cellobiose (5 g/L) を使用した (それぞれ DSM122-cellulose、DSM122-FP、DSM122-cellobiose 培地と表記)。*Clostridium* sp. FG4 株の培養には炭素源として fructose、または cellobiose を使用した。

Table 0-7. Composition of DSM122 medium

	per liter
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.30 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.60 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.43 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.52 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.13 g
Na-β-glycerophosphate·6H <sub>2</sub> O	6.00 g
Yeast extract	4.50 g
Glutathione	0.25 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.10 mg
Resazurin	1.00 mg
Carbon source	5-10 g

**(h) gellan gum を使用した固体培地作成**

gellan gum は *Sphingomonas* 属細菌が産生する菌体外多糖であり[44, 101]、高温、酸性、アルカリ性条件でも使用可能で、その透明度も高いことから特に極限環境微生物の培養の際に寒天(agar)に代わるゲル化剤として使用される。また土壌や湖沼などの一般環境においても、gellan gum をゲル化剤として使用することで agar を使用した場合よりも培養可能な微生物種が増加する、との報告もなされている[22, 60, 115]。本研究では *Clostridium* sp. FG4 株の分離に際し、agar の代わりに gellan gum (gelrite® (Wako chemicals, Japan)) を使用した固体培地を使用した。gellan gum を使用した固体培地は、1% (w/v) の gellan gum、終濃度 10 mg/L の CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O を培養液に添加し、オートクレーブ滅菌後に常温下で固化させることで作成した。

## 2. 培養条件

本研究では特に明記しない限り培養は全て 50°C でおこなった。

### (a) 好気静置培養

original microflora、混合培養系、好気性分離株は、特に明記しない限り好気静置条件で培養した。培養器には、植物培養用試験管（ $\phi 40 \times 170$  mm, for 70 ml scale）、50 ml 容ポリプロピレンチューブ（for 30 ml scale）、スクリューキャップつき試験管（ $\phi 16 \times 100$  mm, for 4-5 ml scale）のいずれかを使用した。培養の際にはふたを緩めるなどして、気相が大気と通ずるようにした。

### (b) 好気振とう培養

ゲノム DNA 抽出などに供するための好気性分離株の培養は好気振とう条件でおこなった。培養器には試験管（for 5 ml scale）、もしくは坂口フラスコ（for 50-300 ml scale）を使用した。ふたにはシリコ栓を使用し、100-150 rpm で振とうして培養した。

### (c) 嫌気操作

*C. straminisolvans* CSK1 株、および *Clostridium* sp. FG4 株の取り扱いは、基本的には全て嫌気チャンバー Anaero Box Hard (Hirasawa works, Japan) を使用して、嫌気条件下でおこなった。嫌気チャンバーは嫌気混合ガス（90% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>）で満たされ、内部に水素と酸素を反応させる触媒を置くことで無酸素状態を保たせた。嫌気培養に使用する培地には還元剤（Glutathione、L-cysteine-HCl-H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>S のいずれか）を添加し、オートクレーブ滅菌後に嫌気チャンバー内で数時間静置して還元化した。また培地には酸化還元指示薬 resazurin を添加し、赤色を呈していない培地（すなわち還元状態にある培地）のみを培養に使用した。

### (d) 窒素ガス置換による嫌気培養

*C. straminisolvans* CSK1 株、および *Clostridium* sp. FG4 株の純粋培養は、ガス置換による嫌気培養でおこなった。培養器には 10 ml 容バイアル（for 4-5 ml scale）、もしくは 50 ml 容バイアル（for 20 ml scale）を使用した。嫌気チャンバー内で還元化した培地に菌を接種後、バイアルをブチルゴム栓、およびアルミキャップで密封し、無酸素ガス注入加圧装置（Sanshin Industrial, Japan）により気相を 100%窒素ガスに置換し、培養をおこなった。

### (e) Anaeropack を使用した嫌気培養

混合培養系の嫌気条件下での培養、*C. straminisolvans* CSK1 株のセルロース分解過程の解析、好気性分離株の嫌気条件下での培養は、酸素吸収・二酸化炭素発生触媒 Anaeropack® (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を使用して嫌気条件下でおこなった。培養器には本項(a)の好気静置培養と同様の植物培養用試験管、スクリューキャップつき試験管のいずれかを使用した。ふたを緩めた状態の培養器を Anaeropack とともにジャー、もしくはパウチバッグに入れ密閉状態にして培養をおこなった。

### 3. 混合培養系の構築

#### (a) 前培養

好気性分離株は PCS-basal 培地で 18-24 時間好気静置培養したものを使用した。 *Clostridium* sp. FG4 株は PY-fructose 培地で、窒素ガス置換による嫌気条件下、4-5 日間培養したものを使用した。 *C. straminisolvens* CSK1 株は DSM122-cellulose 培地で、窒素ガス置換による嫌気条件下、4-5 日間培養したものを使用した。

#### (b) 混合培養

混合培養系の培養には PCS-FP 培地を使用した。各分離株の前培養液をそれぞれ 1% (v/v) ずつ接種し、好気静置条件下で培養した。ここで構築した混合培養系を 1st generation と定義する。6 日間培養した培養液を新しい培地に 1% (v/v) 接種することで継代培養した。このようにして継代培養を 1 度おこなった群集を 2nd generation とする。以後同様に継代培養を繰り返し、安定性の評価をおこなった。

### 4. DNA 抽出

純粋培養した分離株、および混合培養系からのゲノム DNA の抽出は、Zhu ら[136]の benzyl chloride 法を一部改変した方法によりおこなった。その後 RNase、および polyethylene glycol (PEG) 処理[104]をおこない、最終的な DNA サンプルを得た。DNA 濃度は 260 nm の吸光度を測定することで算出した。

#### (a) DNA extraction

以下 benzyl chloride 法による DNA 抽出方法を示す。必要に応じて、50 ml 容遠心チューブを使用した 10 倍の反応スケールでもおこなった。

- (i) 菌体を DNA extraction buffer (100mM Tris-HCl pH 9.0、40mM EDTA) 500  $\mu$ l に懸濁
- (ii) 20% SDS 50  $\mu$ l、benzyl chloride 300  $\mu$ l を添加、振盪しながら 50°C、30 分間インキュベート
- (iii) 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.0) 300  $\mu$ l を添加、氷上に 15 分間静置
- (iv) 遠心 (4°C、15,000rpm、10 分、以下同様) し、上清を Tris saturated phenol 600  $\mu$ l に添加、緩やかに混合攪拌
- (v) 遠心し、上層を CIAA (chloroform-isoamylalcohol(24:1)) 600  $\mu$ l に添加、緩やかに混合攪拌
- (vi) 遠心し、上層を 600  $\mu$ l isopropanol に添加、緩やかに混合攪拌し、4°C、10 分間静置
- (vii) 遠心し、上清を捨て、冷 70% ethanol 800  $\mu$ l を添加
- (viii) 遠心し、上清を捨て、ペレットを減圧下で乾燥
- (iv) TE buffer (10mM Tris-HCl、1mM EDTA) 100  $\mu$ l を添加、DNA を膨潤させる

#### (b) RNase treatment

- (i) 核酸溶液 100  $\mu$ l に RNase A (2 mg/ $\mu$ l) 5  $\mu$ l を添加
- (ii) 37°C、30 分間インキュベート



- (iii) 2×PEG (20% PEG6000、0.6M NaCl) 105 µl を添加
- (iv) 遠心し、上清を捨て、冷 70% ethanol 500 µl を添加
- (v) 遠心し、上清を捨て、ペレットを減圧下で乾燥
- (vi) TE buffer 100 µl を添加、4°C、1 晩静置して DNA を膨潤させる

## 5. PCR-DGGE 解析

denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 法は核酸二本鎖変性剤 (urea、formamide) の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルを使用した電気泳動法であり、同じ長さの DNA 断片をその配列の違いで分離することができる。原理は変性剤により部分解離した DNA 断片の泳動度が遅くなることに基づいている。配列の違い (すなわち由来する微生物の違い) により部分解離する変性剤濃度が異なるので、DGGE のゲル上の異なる位置にバンドとして検出される。本研究では Mulyzer らの方法[82]を一部改変した方法[46, 141]により PCR-DGGE 解析をおこなった。

### (a) PCR による 16S rRNA 遺伝子可変領域 III の増幅

微生物群集から benzyl chloride 法 (材料と方法 4) により抽出した DNA サンプルをテンプレートとして、polymerase chain reaction (PCR) により細菌 16S rRNA 遺伝子の可変領域 III (positions 341-534 according to *Escherichia coli* 16S rRNA gene numbering) を増幅した。PCR は AmpliTaqGold™ (Perkin Elmer, Japan) を使用して、そのプロトコールに従いおこなった。thermal cycler は Peltier Thermal Cycler PTC-200 DNA Engine™ (MJ Reserch, Japan) を使用した。PCR 反応液の組成を Table 0-8 に示す。プライマーは 357F-GC と 517R (Table 0-9) を使用した。PCR 反応は以下に示す温度条件でおこなった。

95°C 10min

(93°C 30sec、65°C 30sec、72°C 1min)×10cycle

(93°C 30sec、60°C 30sec、72°C 1min)×10cycle

(93°C 30sec、55°C 30sec、72°C 1min)×10cycle

94°C 1min、55°C 1min、72°C 5min

PCR 産物は 2% agarose gel を使用した電気泳動法により確認し、QIAEX II® Gel Extraction Kit (Qiagen) により濃縮、脱塩した。Fluorescent DNA Quantitation Kit (BIO-RAD) により濃縮後の PCR 産物濃度を測定し、約 100 ng の PCR 産物を DGGE 解析に供した。

### (b) 電気泳動、染色

本研究で使用したゲルは、変性剤濃度勾配に加えて polyacrylamide の濃度勾配をかけた double gradient gel [21, 46, 141]を、Gradient Delivery System Model475 (BIO-RAD) を使用して作成した。ゲルサイズは 16 cm×16 cm、厚さ 1 mm で、濃度勾配はそれぞれ 6-12%(w/v) acrylamide - N,N-methylenebisacrylamide (37.5:1) と 35-50%変性剤 (100%は 7M urea、40%

formamide) とした。重合には ammonium persulfate (APS、終濃度 0.03%) と N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED、終濃度 0.06%) を使用した。ウェルには変性剤を含まない 6%(w/v) acrylamide - N,N-methylenebisacrylamide (37.5:1) を使用した。

電気泳動は DCode™ Universal Mutation Detection system (BIO-RAD) を使用し、200 V 定電圧、61°C で 5 時間おこなった。泳動バッファーには 0.5×TAE buffer (20 mM Tris-acetate (pH 7.4)、10 mM acetate、0.5 mM EDTA) を使用した。電気泳動終了後、0.5×TAE buffer で 10,000 倍希釈した SYBR<sup>R</sup> Green I (Molecular Probes) で 30 分間染色し、Gel Print™ 2000i (Genetics Solutions, USA) を附属したトランスイルミネーターで観察、撮影をおこなった。

必要に応じてゲルからバンドを切り出し、QIAEX II® Gel Extraction Kit (Qiagen) を使用してゲルから DNA を抽出し、PCR (材料と方法 5(a)) で再増幅し、その塩基配列決定 (材料と方法 6) をおこなった。

Table 0-8. Composition of reaction mixture of PCR for DGGE analysis

	μl
10×PCR Gold buffer	5
25mM MgCl <sub>2</sub>	4
2mM dNTP mix	5
Forward primer (357F-GC, 45pmol/μl)*	1
Reverse primer (517R, 45pmol/μl)*	1
Ampli Taq Gold (5unit/μl)	0.1
DNA solution	0.5-1.5
SDW	up to 50

\* Sequences of these primers are shown in Table 0-9

Table 0-9. Bacterial universal primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Position <sup>a</sup>
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27
357F-GC	GC clamp <sup>b</sup> -CCTACGGGAGGCAGCAG	341-357
515F	GTGCCAGC(A/C)GCCGCGG	515-531
517R	ATTACCGCGGCTGCTGG	518-535
907R	CCCCGTC AATTCCTTTGAGTTT	907-929
968F	AACGCGAAGAACCTTAC	968-985
1512R	ACGGCTACCTTGTTACGACT	1493-1512

<sup>a</sup> positions 27-1512 according to *Escherichia coli* 16S rRNA gene numbering

<sup>b</sup> 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'

## 6. 16S rRNA 遺伝子を指標とした分子系統分類学的解析

### (a) PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅

各分離株から benzyl chloride 法（材料と方法 4）により抽出した DNA サンプルをテンプレートとして、PCR により 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長（positions 27-1512 according to *E. coli* 16S rRNA gene numbering）を増幅した。プライマーは 27F、1512R（Table 0-9）[25]を使用した。PCR は以下に示す温度条件でおこなった。それ以外は材料と方法 5(a)と同様の条件でおこなった。

95°C 10min

(93°C 30sec、55°C 30sec、72°C 2min)×30 cycle

93°C 1min、55°C 1min、72°C 5min

PCR 産物は 0.8% agarose gel を使用した電気泳動法により確認し、QIAquick® PCR Purification Kit（Qiagen）により濃縮、脱塩、脱プライマーをおこなった。

### (b) 塩基配列決定

(a)で得られた PCR 産物をテンプレートとして、Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit（Perkin Elmer）を使用し、sequence 反応をおこなった。16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定には、プライマー27F、515F、968F、517R、907R、1512R（Table 0-9）[25]を使用した。その産物は ABI Prism™ 377 DNA sequencer（Perkin Elmer）で解析した。

### (c) 系統学的解析

(b)で得られた各分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列情報は、DDBJ nucleotide sequence database に登録されている配列から BLAST [5]により相同性を有する配列を検索した。*C. straminisolvens* CSK1 株に関しては、その系統学的な位置を明らかにするため、*Clostridium* 属の近縁種の配列と、CLUSTAL X (version 1.81) [118]を使用してマルチプルアライメントをおこなない、MEGA (version 2.1) [65]を使用して neighbour-joining 法[103]による系統樹の作成をおこなった。作成した系統樹の信頼性を確認するための bootstrap resampling は Felsenstein の方法[33]にもとづき 1,000 回繰り返した。

## 7. DNA-DNA 相同性試験

DNA-DNA 相同性試験は、未知菌株が帰属する種を決定するうえで欠かせない試験であり、特に新種を提案する際には、既存の種との DNA-DNA 相同性試験が必須である。DNA-DNA 相同性については国際細菌分類命名委員会により、「種は 70%あるいはそれ以上の DNA 相同値がある菌株を含む」と定義されている[126]。本研究では、Ezaki らの方法[32]にもとづき、 $\beta$ -galactosidase を使用したマイクロプレート法により DNA-DNA 相同性試験をおこなった。

**(a) ゲノム DNA の調製**

本実験に使用した *C. straminisolvens* CSK1 株、*Clostridium thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> 株、*E. coli* K12 株からの DNA 抽出は、benzyl chloride 法（材料と方法 4）によりおこなった。

**(b) マイクロプレートへのターゲット DNA の固定**

- (i) 各菌株の DNA を TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) で 100 µg/µl に調整
- (ii) 沸騰水中で 5 分間加温し、ただちに氷水中で急冷 (DNA の熱変性)
- (iii) PBSM (PBS [137mM NaCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4] with 100mM MgCl<sub>2</sub>) で 10 µg/µl に希釈
- (iv) 96 穴マイクロプレートのウェルに 100 µl ずつ分注 (各菌株 5 連ずつ)
- (v) 28°C、3 時間放置
- (vi) 液を捨て、45°C で 3 時間放置、乾燥させる

**(c) フォトビオチンによるプローブ DNA の標識**

- (i) プローブとして使用する *C. straminisolvens* CSK1 株 DNA を滅菌蒸留水で 500 µg/µl に調整
- (ii) DNA 溶液 10 µl に、フォトビオチン溶液 (1 mg/ml photo biotin acetate) を 10 µl 添加、混合
- (iii) 氷上、水銀ランプ照射下、20 分静置
- (iv) 100mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 9.0) を 80 µl 添加、混合
- (v) 1-ブタノール 100 µl を添加、よく混合
- (vi) 遠心 (15,000 rpm、10 秒、室温) し、上層 (1-ブタノール層) を除く
- (vii) 1-ブタノール抽出をもう一度おこなう

**(d) ハイブリダイゼーション**

- (i) プレハイブリダイゼーション液 (300mM NaCl, 30mM trisodium citrate, 1 g/L bovine serum albumin (BSA), 1 g/L polyvinyl-pyrrolidone, 1 g/L ficoll 400, 50% (v/v) formamide, 100 µg/ml denatured salmon DNA) 200 µl を (b) で DNA を結合したウェルに分注
- (ii) 37°C、30 分間放置
- (iii) プレハイブリダイゼーション液を捨て、ハイブリダイゼーション液 (プレハイブリダイゼーション液に 25 g/L dextran sulfate と 2 µg/ml の (c) で調製した標識 DNA プローブを含む) を 100 µl ずつ分注
- (iv) シールで密封し、45°C、3 時間放置
- (v) 液を捨て、1×SSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate) で 3 回洗浄

**(e) ストレプトアビジンの結合**

- (i) Streptoavidin-酵素溶液 (1 U/ml streptoavidin β-D-galactosidase, 0.5% BSA in PBS) を 100 µl ずつ分注
- (ii) 37°C、10 分間放置
- (iii) 液を捨て、1×SSC で 3 回洗浄

**(f) 測定**

- (i) 蛍光基質溶液 (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside 1 mg を 20  $\mu$ l DMSO に溶解、これを 10 ml PBS に添加) を 100  $\mu$ l ずつ分注
- (ii) 37°C でプレートを保温し、15 分毎に蛍光強度をマイクロプレートリーダー (excitation, 360 nm; emission 450 nm) で測定

**(g) 相同性の計算**

*C. straminisolvens* CSK1 株と *C. thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> 株との相同性は以下のように計算し、算出した。

$$\text{DNA 相同性 (\%)} = 100 \times (X-N)/(P-N)$$

X : ターゲットが *C. thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> 株 (調べたい菌株) の DNA での測定値

P : ターゲットが *C. straminisolvens* CSK1 株 (プローブに使用した菌株) の DNA での測定値

N : ターゲットが *E. coli* K12 株 (ネガティブコントロール) DNA での測定値

**8. GC 含量測定**

DNA は二重らせん構造でアデニン (A) とチミン (T)、グアニン (G) とシトシン (C) が対合しているので、全塩基中の G と C の和のモル比率が染色体にとって固有の数値になる。特に微生物ではこれが有効な分類指標になり、新分類群の記載には不可欠な情報である。本研究では、Mesbah らの方法[81]にもとづく HPLC 法により、*C. straminisolvens* CSK1 株のゲノム DNA の GC 含量を測定した。

**(a) ヌクレオシド試料の調製**

- (i) *C. straminisolvens* CSK1 株のゲノム DNA を滅菌蒸留水で 300  $\mu$ g/ml に調整
- (ii) この DNA 溶液 20  $\mu$ l を 100°C、10 分間放置、直ちに氷水中で急冷 (DNA の熱変性)
- (iii) 20  $\mu$ l のヌクレアーゼ PI 溶液 (0.1 mg/ml nuclease PI, 40mM 酢酸ナトリウム, 2mM ZnSO<sub>4</sub> (pH 5.3)) を添加、50°C、1 時間放置
- (iv) 20  $\mu$ l のアルカリフォスファターゼ溶液 (2.4 U/ml alkalinephosphatase, 0.1M Tris-HCl (pH 8.0)) を添加、37°C、1 時間放置

**(b) HPLC 解析**

カラムは Cosmosil 5C18 (4.6 mm  $\times$  15 cm) (nakarai) を使用した。溶離液には 0.02M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-アセトニトリル (20:1, v/v) を使用し、流速は 1 ml/min とし、室温で実験をおこなった。検出は SPD-7a (Shimadzu, Japan) により 270 nm の吸光度をモニターすることでおこなった。

## 9. 好気性分離株の基質利用性試験

### (a) carboxymethyl-cellulose (CMC) agar 法

好気性分離株のセルロース利用性 ( $\beta$ -glucosidase 活性の有無) を染谷ら[143]の方法にもとづき carboxymethyl-cellulose (CMC) agar 法により調べた。CMC はセルロースをカルボキシメチル化し、水溶性化した物質である。CMC のナトリウム塩 (5 g/L) を炭素源とした PCS 寒天培地に好気性分離株を植菌し、50°C で3日間培養した。培養後、1% cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 水溶液を寒天培地上にかけ流し CMC を白色沈殿させ、コロニー周辺のクリアゾーンの有無を観察した。

### (b) BiOLOG 解析

BiOLOG system (BiOLOG Inc., USA) は、基質の酸化に伴う tetrazolium 塩の還元による呈色を測定することで、95種類の化合物(糖、有機酸、アミノ酸、核酸など)の基質利用性を調べることができるシステムである。この BiOLOG system を使用して好気性分離株の基質利用性を調べた。グラム陰性細菌 (*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Bordetella* sp. M1-6 株) は TSB 寒天培地で 50°C、約 16 時間前培養して得たコロニーを Inoculation buffer に約 52% 透過率に懸濁し、その懸濁液を microplate GN2 の各ウェル (それぞれ異なる基質がはいっている) に 150  $\mu$ l ずつ添加し、インキュベートに供した。グラム陽性細菌 (*Bacillus* sp. M1-1 株、*Virgibacillus* sp. M1-4 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株) も同様に TSB 寒天培地で 50°C、約 16 時間前培養して得たコロニーを Inoculation buffer に約 28% 透過率に懸濁し、その懸濁液を microplate GP2 の各ウェルに 150  $\mu$ l ずつ添加し、インキュベートに供した。嫌気条件下でも生育した好気性分離株 (*Bacillus* sp. M1-1 株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株) に関しては、VLG 寒天培地で 50°C、Anaeropack を使用した嫌気条件下、約 24 時間前培養して得たコロニーを Inoculation buffer に約 63% 透過率に懸濁し、その懸濁液を microplate AN2 の各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ添加し、インキュベートに供した。マイクロプレートは 50°C で 24 時間インキュベートし (microplate AN2 は Anaeropack を使用した嫌気条件下で)、Biolog MicroStation™ で解析した。

## 10. 嫌気性分離株の糖利用性試験

### (a) *Clostridium* sp. FG4 株の糖利用性

*Clostridium* sp. FG4 株の糖利用性は試験する炭素源を 5 g/L 添加した DSM502 培地で調べた。糖利用の有無は 5 日間培養後の培養液 pH の低下で判断した。試験した炭素源は以下のとおり ; glucose、fructose、xylose、cellobiose、稲わら、濾紙、セルロースパウダー、xylan (from beechwood, Sigma)、inulin。

### (b) *C. straminisolvens* CSK1 株の糖利用性

*C. straminisolvens* CSK1 株の糖利用性は試験する炭素源を 5 g/L 添加した DSM122 培地で調べた。糖利用の有無は 5 日間培養後の培養液 pH の低下で判断した。試験した炭素源は以下の

とおり ; glucose、fructose、ribose、mannose、mannitol、melibiose、saccharose、xylose、cellobiose、sucrose、lactose、cellulose powder、濾紙、稲わら、xylan、starch (from potato, Kanto Chemical)、laminarin (from *laminaria digitata*, Sigma)、pachyman (from *Poria cocos*, ICN Biomedicals)、chitin、chitosan (from crab shells, Sigma)、 $\beta$ 1-3 glucan。

## 11. *C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解代謝産物の検出

### (a) 培養

*C. straminisolvens* CSK1 株の培養は、DSM122-cellulose 培地で 50°C、窒素ガス置換による嫌気条件下、静置条件で 7 日間おこなった。

### (b) HPLC による培養液中低分子化合物の検出

培養液中の低分子化合物は HPLC L6300 (Hitachi, Japan) を使用して、Tanaka らの方法[116] にもとづき検出した。カラムは TSKgel OApak-A (7.8mm×30cm) (Tosoh, Japan) を使用した。溶離液には 0.75mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を使用し、流速は 0.6 ml/min とし、室温で実験をおこなった。検出は SPD-7a (Shimadzu, Japan) により 210 nm の吸光度をモニターすることでおこなった。

### (c) GC による気相成分の分析

気相中の H<sub>2</sub>、CH<sub>4</sub>、CO<sub>2</sub> の検出を GC-14A (Shimadzu) を使用して、Küsel らの方法[66] にもとづきおこなった。分析条件は以下の通り。

Column	molecular sieve 5A (Shimadzu) (for H <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> ) porapak Q (Shimadzu) (for CO <sub>2</sub> )
Injection temperature	60°C
Column temperature	40°C
Detection temperature	60°C
Detector	TCD 60 mA
Carrier gas	Ar (for H <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> ) He (for CO <sub>2</sub> )
Flow rate of carrier gas	20 ml/min

## 12. 酸素耐性試験

*C. straminisolvens* CSK1 株と *C. thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> 株に関して、気相に 0、1、2、4、8% の酸素が存在する条件での生育の有無を調べた。培地には DSM122-cellulose、および DSM122-cellobiose 培地を使用した。培養器には 10 ml 容バイアル (for 4 ml scale) を使用した。嫌気チャンバー内で還元化された培地に菌を接種後、バイアルをブチルゴム栓、アルミキャップで密封し、無酸素ガス注入加圧装置 (Sanshin Industrial, Japan) を使用していったん気相を 100% N<sub>2</sub> に置換し、その後 GAS BLENDER GB-4C (Kofloc, Japan) により各割合の窒素-酸素混合ガスをバイアルに通気、置換した。*C. straminisolvens* CSK1 株は 50°C、*C. thermocellum*

IAM 13660<sup>T</sup>株は 60°C で培養した。5 日間培養後、生育の有無を酸生成による培養液 pH の低下から判断した。

### 13. *C. straminisolvans* CSK1 株の生理学的試験

*C. straminisolvans* CSK1 株に対する上記以外の生理学的試験は、Holdeman らの方法[51]にもとづき、以下に示す方法でおこなった。

#### (a) motility

*C. straminisolvans* CSK1 株の運動性 (motility) の有無は、顕微鏡 (AX80, Olympus) による直接観察で判定した。検鏡には DSM122-cellobiose 培地で 3 日間培養した菌体を使用した。

#### (b) aesculin hydrolysis

エスクリン加水分解活性の有無は、*C. straminisolvans* CSK1 株を 0.5% (w/v) aesculin を添加した DSM122 培地で 5 日間培養後、0.1% (w/v) クエン酸鉄アンモウム水溶液を数滴滴下し、暗褐色沈殿生成の有無で判断した (エスクリン加水分解物 (エスクレチン) が存在すれば沈殿生成: 陽性)。

#### (c) nitrate reduction

硝酸還元能の有無は、*C. straminisolvans* CSK1 株を 0.3% (w/v) KNO<sub>3</sub> を添加した DSM122-cellobiose 培地 (5 ml) で 5 日間培養後、硝酸塩試薬 A (0.8% (w/v) sulfanilic acid in 5N acetic acid) 1 ml と硝酸塩試薬 B (1.2% (v/v) dimethyl- $\alpha$ -naphthylamine in 5N acetic acid) 0.5 ml を添加し、赤色の呈色の有無で判断した (亜硝酸が存在すれば呈色: 陽性)。また陰性の場合の確認のため、微量の亜鉛粉末を培養液に添加し、硝酸の培養液中の残存を確認した (亜鉛の還元作用により、硝酸から亜硝酸が生成し、呈色: 陰性)。

#### (d) casein digestion

カゼイン加水分解能の有無は、*C. straminisolvans* CSK1 株を 2 g/L カゼインを添加した DSM122-cellobiose 寒天培地で 7 日間培養後、コロニー周辺のクリアゾーンの有無で判断した。

#### (e) lectinase activity and lipase activity

レクチナーゼ活性、およびリパーゼ活性の有無は、*C. straminisolvans* CSK1 株を 10% (w/v) egg yolk 添加 DSM122-cellobiose 寒天培地で 7 日間培養後、コロニー周辺の乳白色不透明帯の有無 (卵白レシチンの分解により生じる不溶性のジグリセリドによる不透明帯の出現: 陽性)、および油滴状光沢の有無 (脂質の分解により生じる不溶性の遊離脂肪酸による油滴状光沢: 陽性) で判断した。

#### (f) indole production

インドール生成 (トリプトファン分解酵素活性) の有無は、*C. straminisolvans* CSK1 株を 5 g/L peptone 添加 DSM122-cellobiose 培地で 5 日間培養後、2 ml の培養液に対して xylene 1 ml を添



加し、よく混合し、2 分間放置し、その後 Ehrlich's 試薬 (para-dimethyl-amino-benzaldehyde 2 g, 95% ethanol 190 ml, concentrated HCl 40 ml) 0.5 ml を添加し、赤色の呈色の有無で判断した (インドールが存在すれば呈色：陽性)。

#### 14. 特異的プライマーの設計

特異的 PCR、定量的 real-time PCR に使用した、各分離株に対する特異的プライマーは、各分離株の 16S rRNA 遺伝子配列をもとに、PRIMROSE [10] を使用して設計した。各プライマーの特異性は、WEB 上のデータベース、Ribosomal Database Project II の PROBE\_MATCH により確認した。本研究で設計した特異的プライマーを Table 0-10 に示す。

Table 0-10. Specific primers used in this study.

Primer	Sequence (5' - 3')	Position <sup>a</sup>	Targeted isolate
CSK198f	ACATAACGAGGCGGCATCGCT	181-198	<i>C. straminisolvens</i> CSK1
CSK439r	CACTTTCTTCGTCCTCCCAATC	463-439	<i>C. straminisolvens</i> CSK1
FG199f	ATCACGGGGAGGCATCTTCC	183-199	<i>Clostridium</i> sp. FG4
FG442r	CGTCACTTCCTTCGTCCTCC	461-442	<i>Clostridium</i> sp. FG4
M3-459f	GTTGGGGAAGAAATCCTGCT	440-459	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3
M3-743r	TGCCTCAGTGTCAGTGTTGG	762-743	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3
M5-225f	TGGCTTTTCGCTATCACTGG	207-225	<i>Brevibacillus</i> sp. M1-5
M5-489r	TAGCCGTGGCTTTCTCGTCA	508-489	<i>Brevibacillus</i> sp. M1-5
M6-456f	TTTGCCAGGAAAGAAATAGG	437-456	<i>Bordetella</i> sp. M1-6
M6-742r	GCATGAGCGTCAGTGTTATC	761-742	<i>Bordetella</i> sp. M1-6

<sup>a</sup> Positions according to *E. coli* numbering

#### 15. 特異的 PCR

混合培養系からの各分離株の検出には、特異的プライマー (Table 0-10) を使用した特異的 PCR 法によりおこなった。PCR 反応は以下に示す温度条件でおこなった。アニーリング温度は、*C. straminisolvens* CSK1、*Clostridium* sp. FG4、*Brevibacillus* sp. M1-5 の検出には 65°C、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3、*Bordetella* sp. M1-6 の検出には 55°C でおこなった。PCR 産物は 1% agarose gel を使用した電気泳動法により確認した。それ以外は材料と方法 5(a) と同様の条件でおこなった。ターゲット以外の分離株の DNA サンプルをテンプレートとしたときに増幅が起こらないことを確認し、特異性を確かめた。

95°C 10min

(95°C 30sec, 65°C or 55°C 30sec, 72°C 2min) × 30 cycle

93°C 1min, 65°C or 55°C 1min, 72°C 5min

## 16. 定量的 real-time PCR

本研究では、培養系に固体基質（セルロース）が含まれ、またその固体基質へ微生物が吸着するため、通常の方法では菌数の正確な測定ができない。そこで本研究では菌数の測定の代わりに、定量的 real-time PCR により微生物群集中の各菌株の存在量、および存在比率を DNA 量ベースで算出した。定量的 real-time PCR は PCR 産物の増幅をサイクル毎にオンラインでモニターすることでサンプル中の DNA 濃度を測定できる、という手法である。プライマーとして特定の微生物に対する特異的プライマーを使用することで、微生物群集から調整した DNA サンプルにおけるその微生物の DNA 量を算出できる。PCR 産物の定量法にはいくつかの種類があるが、本研究では 2 本鎖 DNA に特異的に結合する SYBR Green I を使用する方式を採用した。

実験は Light Cycler quick system 330 (Roche Diagnostics, Germany)、LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を使用して、そのプロトコールに従っておこなった。反応液の組成を Table 0-11 に、温度条件を Table 0-12 にそれぞれ示した。サンプルには滅菌蒸留水で 2-5 ng/ $\mu$ l に希釈した DNA サンプルを使用した。蛍光強度の測定は伸長反応（72°C、20 sec）終了後におこなった。また全サイクル終了後に、2 本鎖 DNA を melting させていき、その反応中（70°C→95°C、0.1°C/sec）の蛍光強度をモニタリングし、PCR 産物の  $T_m$  のピークが single であることを確認して、非特異的増幅が起こっていないことを確認した。各分離株の検量線は、各分離株の精製 DNA を 10、1、0.1、0.01、0.001 ng/ $\mu$ l に希釈したものを使用し、作成した。その検量線をもとに混合培養サンプル中の各分離株の DNA 量を算出した。各分離株の存在比率は、全分離株の DNA 量の和を 100% とした百分率であらわした。

Table 0-11. Composition of reaction mixture for quantitative real-time PCR.

	$\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	2.4
Forward primer (10 $\mu$ M)	1.0
Reverse primer (10 $\mu$ M)	1.0
SGI mix soln.*	2.0
Sample	2.0
H <sub>2</sub> O	11.6
Total volume	20.0

\* Buffer containing 10mM MgCl<sub>2</sub>、Faststart Taq DNA polymerase、dNTP mix and SYBR Green I

Table 0-12. Conditions of thermal cycle for quantitative real-time PCR.

	Cycle No.	Target Temperature (°C)	Incubation time	Transition temperature rate (°C/sec)
Denature	1	95	10 min.	20
		95	15 sec.	20
PCR	45	68 or 61*	6 or 10* sec.	20
		72	20 sec.	2
Melting	1	95	0	20
		70	0	1
		95	0	0.1
Cooling	1	40	30 min.	20

\* Annealing step for 6 sec at 68°C (for *C. straminisolvans* CSK1, *Clostridium* sp. FG4, *Brevibacillus* sp. M1-5), or 10 sec at 61°C (for *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3, *Bordetella* sp. M1-6)

## 17. セルロース分解過程の解析

### (a) 培養

混合培養系のセルロース分解過程の解析では PCS-FP 培地を使用し、70 ml scale で培養をおこなった。*C. straminisolvans* CSK1 株の純粋培養には、PCS-FP 培地（還元剤として glutathione 0.25 g/L 添加）、もしくは DSM122-FP 培地を使用し、Anaeropack を使用した嫌気条件下、70 ml scale で培養をおこなった。

### (b) 濾紙、稲わら分解量測定

濾紙、稲わらの分解量は、Taillisz らの方法[114]にもとづき測定した。培養後の培養液をガラス繊維濾紙 GF/D (Whatman, Japan) で濾過し、ドラフト内のホットプレート (60°C) 上で 1 日以上乾燥させたものの重量を測定し、濾紙、稲わらの残存量を算出した。菌未接種の培養液に対して同様の操作をおこなったものをコントロールとして、分解率を算出した。

### (c) ORP、pH の測定

培養液の酸化還元電位 (oxidative reductive potential, ORP) は ACT pH meter D24 と ORP electrode 9300-10D (Horiba, Japan) を使用して測定した。培養液の pH は Twin pH B-212 (Horiba) を使用して測定した。

### (d) 水溶性糖の定量

培養液中の水溶性糖はアンスロン法 [122] により定量した。cellobiose を検量線作成の際のコントロール物質として使用した。

- (i) サンプル（糖濃度が 50 mg/L 以下になるよう希釈）1 ml を試験管に入れ氷上で冷やす
- (ii) Anthron reagent (anthron 0.2 g in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ml) 2 ml を添加、混合して氷上で冷やす
- (iii) 100°C、16 分間加熱し、氷上で 2-3 分冷やす、その後室温で 5-10 分静置
- (iv) 620 nm の吸光度を測定

### (e) 酢酸、エタノールの定量

酢酸、エタノールの定量には F-kit (Boehringer Mannheim, Germany) を使用した。測定するサンプルには、培養液を遠心し菌体を除いた上清を 80°C で 10 分間処理し、培養液中に残存している酵素を失活させたものの遠心上清を使用した。

## 18. 顕微鏡観察による全菌数測定

培養液中の全菌数は Haruta らの方法[46]にもとづき、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色法により測定した。DAPI 染色は、培養液を適当な濃度 (1 視野に 20-200 cells) に希釈し、Isopore™ 0.2 µm membrane filter (Millipore) 上に菌体を集め、DAPI 溶液 (1 µg/ml) で 5 分間、暗所で菌体 DNA を染色することでおこない、それを蛍光顕微鏡 (AX80, Olympus) で U 励起 (励起波長 330-385 nm) 下で観察した。

## 19. *C. straminisolvens* CSK1 株培養濾液での非セルロース分解分離株の培養実験

### (a) 培養濾液の調製

*C. straminisolvens* CSK1 株は PCS-FP 培地で、Anaeropack を使用した嫌気条件下、8 日間培養した。培養液を遠心 (8,000×g, 4°C, 10 min) し、濾紙と菌体を除き、1N NaOH で pH 7.2 に調整した。その培養上清を 0.2 µm-pore filter で濾過滅菌したものを、培養濾液として実験に使用した。

### (b) 培養濾液での非セルロース分解性分離株の培養

ここでは(a)で得られた *C. straminisolvens* CSK1 株の培養濾液をそのまま培地として使用した。ただし、*Clostridium* sp. FG4 株の培養時には、還元剤 (0.5 g/L L-cysteine·HCl·H<sub>2</sub>O) を添加した。40 µl の前培養液を 4 ml の濾液培地に接種し、好気性分離株は好気静置条件で 2 日間、*Clostridium* sp. FG4 株は窒素ガス置換による嫌気条件下で 5 日間培養した。培養後に、培養液中の糖、酢酸、エタノールの濃度を材料と方法 17 の方法で測定した。菌を接種しない濾液培地も同様にインキュベートし、それを陰性コントロールとした。

## 20. 培養濾液添加培地での培養実験

### (a) 培養濾液の調整

*C. straminisolvens* CSK1 株は PCS-FP 培地で、Anaeropack を使用した嫌気条件下、8 日間培養した。*Clostridium* sp. FG4 株は PY-fructose 培地で、窒素ガス置換による嫌気条件下、5 日間培養した。その他の好気性分離株は PCS-basal 培地で、好気振盪条件、18 時間培養した。*E. coli* と *Bacillus subtilis* は PCS-basal 培地で、好気振盪条件、37°C で 18 時間培養した。培養液を遠心 (8,000×g, 4°C, 10 min) し、菌体を除き、1N HCl、または 1N NaOH で pH 7.2 に調製した。その培養上清を 0.2 µm-pore filter で濾過滅菌したものを、培養濾液として実験に使用した。

## (b) 培養

(a)で調製した培養濾液を PCS-basal 培地と 1:1 で混合したものを培養濾液添加培地として使用した。ただし、*C. straminisolvans* CSK1 株の培養時には濾紙 (1% v/v)、CaCO<sub>3</sub> (2 g/L)、還元剤 (0.25 g/L glutathione) を、*Clostridium* sp. FG4 株培養時には cellobiose (5 g/L)、還元剤 (0.5 g/L L-cysteine-HCl·H<sub>2</sub>O) を添加した。40 µl の前培養液を 4 ml の濾液添加培地に接種し、*C. straminisolvans* CSK1 株は Anaeropack を使用した嫌気条件下で 8 日間、*Clostridium* sp. FG4 株は窒素ガス置換による嫌気条件下、4 日間、好気性細菌は好気静置条件で 1 日間、培養した。*E. coli* と *B. subtilis* は 37°C で、その他の細菌は 50°C で培養した。培養終了後、*C. straminisolvans* CSK1 株に関してはその濾紙分解量を測定し (材料と方法 16(b))、その他の細菌に関しては波長 600 nm の吸光度 (OD<sub>600</sub>) を測定した。コントロールとしては、*C. straminisolvans* CSK1 株は PCS-FP 培地、*Clostridium* sp. FG4 株は PCS 培地と PY 培地を 1:1 で混合した培地 (炭素源として 5 g/L fructose、還元剤として 0.5 g/L L-cysteine-HCl·H<sub>2</sub>O を含む)、その他の菌株は PCS-basal 培地を使用した。

## 21. 培養上清タンパク質の解析 (SDS-PAGE)

### (a) 培養上清タンパク質の調製

培養後、培養液を遠心 (8,000×g, 4°C, 10 min) し、菌体、濾紙分解残渣を除去し、得られた培養上清を 0.2 µm-pore filter で濾過滅菌した。そこに (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 80% 飽和となるように加え、4°C、30 分間攪拌してタンパク質を沈殿させた。遠心 (30,000×g, 4°C, 10 min) によりタンパク質を沈殿させ、100mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁して SDS-PAGE に供した。タンパク質濃度は BSA を標準物質として BCA Protein Assay Reagent (Pierce) により測定した。

### (b) SDS-PAGE

培養上清タンパク質の解析は、Laemmli らの方法[68]にもとづく SDS-PAGE 法によりおこなった。(a)で調整した 10 µg のタンパク質を含むサンプルを等量の SDS-sample buffer (100mM Tris HCl (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 12% (v/v) mercaptoethanol, 20% (v/v) glycerol, 2 mg/L bromophenol blue (BPB)) と混合し、100°C、3 分間処理した。試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル (10% (w/v)) に供し、室温にて定電流 20 mA で約 15 分間、30 mA で 20-30 分間電気泳動した。電気泳動後のゲルは Neuhoff らの方法[85]にもとづき Coomassie Brilliant Blue (CBB) により染色し、観察をおこなった。

## 22. 2次元電気泳動 (2D-GE) 解析

### (a) 混合培養系からの *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の回収

*C. straminisolvans* CSK1 株のセルロース吸着能を利用して *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の *C. straminisolvans* CSK1 株との 2 種混合培養系からの回収をおこなった。2 種混合培養系を PCS-FP 培地で培養後、培養液をガラス繊維濾紙 GF/D (Whatman) で濾過し、分解残渣を除

去した。その培養濾液に、2% (v/w) となるようセルロースパウダーを加え、室温で10分間攪拌して *C. straminisolvens* CSK1 株をセルロースパウダーに吸着させた。その後ガラス繊維濾紙 GF/C (Whatman) で濾過してセルロースパウダーを除去し、濾液から遠心 ( $> 8,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min) により菌体を回収した。回収した菌体を定量的 real-time PCR 法 (材料と方法 10) による純度の確認、および 2G-DE 解析に供した。

#### (b) 菌体タンパク質の調製

回収した菌体 (50-100 mg wet weight) は PBS で洗浄し、lysis buffer 100  $\mu\text{l}$  (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 50 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% (v/v) IPG buffer (pH range 4-7, Amersham Bioscience)) に懸濁した。この細胞懸濁液を Bioruptor (Cosmo Bio) により氷水中で超音波処理した (10 秒の超音波処理と 5 秒の冷却時間のサイクルを計 2 分間)。その後サンプルに終濃度それぞれ 1 mg/ml、5 mg/ml の DNase、RNase を添加、混合し、再度同様の超音波処理をおこない、lysis buffer 100  $\mu\text{l}$  を添加、混合し、室温で 1 時間静置した。遠心 ( $15,000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min) により細胞片を除去し、上清を 2G-DE 解析に供した。タンパク質濃度は BSA を標準物質として Plus One™ 2-D Quant Kit (Amersham Bioscience) により測定した。

#### (c) 1 次元目等電点電気泳動

40  $\mu\text{g}$  のタンパク質を含むサンプルに lysis buffer (少量の BPB を含む) を終量 250  $\mu\text{l}$  になるよう加え、13 cm long IPG strip gel (pH 4-7, Amersham Bioscience) をセットしたストリップホルダーに添加し、 $20^{\circ}\text{C}$ 、12 時間静置し、strip gel の膨潤化をおこなった。IPGphor IEF system (Amersham Bioscience) を使用し等電点電気泳動をおこなった (100 V for 2 hours, 500 V for 2 hours, 1000 V for 2 hours, 2000 V for 2 hours, 4000 V for 6 hours, approximately 30 kWh)。泳動後の strip gel は、SDS equilibration buffer (50 mM Tris-Cl (pH 8.8), 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.002% (v/w) BPB) により平衡化した。1 回目の平衡化は 16 mM DTT を添加した SDS equilibration buffer で 15 分間、2 回目の平衡化は 25 mg/ml iodoacetamide を添加した SDS equilibration buffer で 15 分間振とうすることでおこなった。

#### (d) 2 次元目 SDS-PAGE

2 次元目 SDS-PAGE は PROTEAN® II Xi Cell (Bio Rad) を使用し、16 cm  $\times$  16 cm、厚さ 1mm の 12% ポリアクリルアミドゲルによりおこなった。strip gel をアクリルアミドゲルの上端に設置し、定電流 10 mA で 1 時間、40 mA で約 3 時間 (BPB マーカーがゲル下端にくるまで) 泳動した。泳動後のゲルは Swain らの方法[113]にもとづき、銀染色法によりタンパク質を染色した。スポットの検出、定量、および因子分析による比較解析は、Image Master 2-D Platinum (Amersham Bioscience) を使用しておこなった。

## Abbreviation list

2D-GE: two-dimensional gel electrophoresis  
APS: ammonium persulfate  
BPB: bromophenol blue  
BSA: bovine serum albumin  
CBB: coomassie brilliant blue  
CMC: ) carboxymethyl-cellulose  
DAPI: 4', 6'-diamidino-2-phenylindole  
DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis  
DTT: dithiothreitol  
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid  
FP: filter paper  
GC: gas chromatography  
HPLC: high performance liquid chromatography  
MW: molecular weight  
nt: nucleotides  
OD: optical density  
ORP: oxidative reductive potential  
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis  
PBS: phosphate-buffered saline  
PCR: polymerase chain reaction  
PEG: polyethylene glycol  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
SSU rRNA: small subunit ribosomal RNA  
TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine

## 第 1 章

# original microflora からの細菌の分離と 系統分類学的、生理学的解析



## 第1節 緒言

本研究では、複数種の微生物による効率的な機能の発揮、および複数種の微生物の安定な共存のメカニズムを解明するための材料として、高効率セルロース分解能を有する安定な微生物群集、original microflora (序論2参照)の構成メンバーである微生物の純粋分離をおこない、その分離株の組み合わせによる混合培養系により original microflora が有する特性、すなわち高効率セルロース分解能と安定性を再現した人工生態系を構築することを第一の目的としている。本章ではまず original microflora からの微生物の純粋分離について報告する。

PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) により、original microflora からは3種の好気性細菌と2種の嫌気性細菌が優占種として検出されていた。そこでこれらの優占種を全て純粋分離することを目指し、好気および嫌気条件下での微生物の分離を試みた。分離された菌株に関してはその系統分類学的、および生理学的解析をおこない、その諸性質を明らかとし、群集内における機能、役割を考察した。

## 第2節 好気性細菌の分離と諸性質の検討

### 第1項 分離

original microflora の稲わら分解過程における培養液を分離源として、TSB 寒天培地を使用し、50°C、大気相下で培養をおこない、好気性細菌の分離を試みた。出現したコロニーのうち形状の異なるものを選択し再度 TSB 寒天培地に接種した。この操作を3回以上繰り返して純粋分離した。これにより、8株の細菌 (M1-1~M1-8 株) の分離に成功した。

### 第2項 系統分類学的解析 (材料と方法6)

8株の好気性分離株からゲノム DNA を抽出し、bacterial universal primers を使用して 16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅し、その塩基配列 (約 1500 nt) を決定した。これらの配列は GenBank/EMBL/DDBJ database に登録した (accession nos. AB039328-AB039331、AB039334-AB039336)。決定した塩基配列を基に BLAST 解析をおこない、最も近縁な既知の細菌を検索した (Table 1-1)。M1-1、M1-8 株の塩基配列は完全に一致し、*Bacillus licheniformis* (accession no. X68416) と 100% の相同性を示した。M1-2、M1-3、M1-8 株の塩基配列は互いに 99.9% 以上の相同性を示し、*Pseudoxanthomonas taiwanensis* (accession no. AF427039) と 99.9% の相同性を示した。またこれらの配列は original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) で検出された Band A と同一の配列であった。M1-4 株の配列は *Virgibacillus pantothenicus* (accession no. D16275) と 99.8% の相同性を示した。M1-5 株、M1-6 株の配列は、それぞれ original microflora の PCR-DGGE 解析で検出された Band B、Band E と同一の配列であり、それぞれ *Brevibacillus agri* (accession no. AF378233) と 99.6%、*Bordetella petrii* (accession no. AJ249861) と 97.2% の相同性を示した。各グループのうち、1株の細菌 (*Bacillus* sp. M1-1 株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Virgibacillus* sp. M1-4 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株、*Bordetella* sp. M1-6 株) のみを以下の実験に使用した。

## 第3項 生理学的解析

## (i) 嫌気条件下での生育試験

上記5株の分離株について、嫌気条件下での生育の有無を、glucoseを炭素源としたPCS寒天培地、VLG寒天培地を使用して調べた。

その結果、*Bacillus* sp. M1-1株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株ではVLG寒天培地でのみ嫌気条件下での生育が確認された。その他の3株は、いずれの培地でも嫌気条件下での生育はみられなかった。

## (ii) セルロース利用性試験

好気性分離株のセルロース利用性を、PCS-FP培地における濾紙分解の有無を見ることで調べた。好気、嫌気の両条件で培養をおこなったが、いずれの分離株の培養でも濾紙の分解はみられなかった。

またcarboxymethyl-cellulose agar法(材料と方法9(a))により、セルロース分解酵素の1つである $\beta$ -1,4 endoglucanase活性を調べたが、いずれの分離株にも活性は認められなかった。

## (iii) セルロース分解産物の利用性試験(材料と方法9(b))

original microfloraにおいてセルロース分解に伴って培養液中に産生される主要な代謝産物(糖[cellobiose、glucose]、乳酸、酢酸、エタノール)の好気性細菌による利用性を調べた。cellobiose、glucose、乳酸、酢酸に関してはBiOLOG systemを使用して、エタノールに関してはPCS-ethanol培地での培養後のエタノールの減少をみることで調べた。

結果をTable 1-2、1-3に示す。*Bacillus* sp. M1-1株はcellobiose、glucose、乳酸を好気、嫌気両条件で利用可能で、酢酸を好気で利用可能と、幅広い利用性がみられた。その他の分離株では、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株が嫌気条件でglucoseを、*Virgibacillus* sp. M1-4株が好気条件で酢酸を、*Brevibacillus* sp. M1-5株が好気条件でglucose、エタノールを利用可能であった。*Bordetella* sp. M1-6株は今回調べた基質の利用性はみられなかった。

Table 1-1. Aerobic bacteria isolated from the original microflora.

Strain	Closest relative (Accession number)	Similar- ity (%)	Aerobic growth	Anaerobic growth	DGGE detection*
M1-1, 8	<i>Bacillus licheniformis</i> (X68416)	100	+	+	-
M1-2, 3, 7	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> (AF427039)	99.9	+	+	+
M1-4	<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (D16275)	99.8	+	-	-
M1-5	<i>Brevibacillus agri</i> (AF378233)	99.6	+	-	+
M1-6	<i>Bordetella petrii</i> (AJ249861)	97.2	+	-	+

\* detected from the original microflora by PCR-DGGE analysis (Fig. 0-5) or not

Table 1-2. Utilization profiles of the aerobic isolates (under the aerobic conditions)

Strain	Cellulose	Cellobiose	Glucose	Lactate	Acetate	Ethanol
M1-1	-	+	+	+	+	N.T.*
M1-3	-	-	-	-	-	-
M1-4	-	-	-	-	+	N.T.
M1-5	-	-	+	-	-	+
M1-6	-	-	-	-	-	-

\* N.T., not tested.

Table 1-3. Utilization profiles of the aerobic isolates (under the anaerobic conditions)

Strain	Cellulose	Cellobiose	Glucose	Lactate	Acetate	Ethanol
M1-1	-	+	+	+	-	N.T.*
M1-3	-	-	+	-	-	N.T.

\* N.T., not tested.

### 第3節 *Clostridium* sp. FG4 株の分離と諸性質の検討

original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) で検出されたバンドのうち、Band F (*Clostridium thermosuccinogenes* (accession no. Y18180) と相同性 100%) に対応する細菌が純粋分離されていなかったため、この細菌をターゲットとしたスクリーニングをおこなった。

#### 第1項 分離

##### (i) 集積培養

*C. thermosuccinogenes* は嫌気性の inulin (植物の根に多く含まれる多糖、主として fructose の  $\beta$ -2 $\rightarrow$ 1 結合から構成される) 分解細菌として分離されている[27]。そこで inulin を唯一の炭素源とした DSM502 培地を使用して嫌気条件下で集積培養をおこなった。分離源には original microflora を PCS 培地 (炭素源は稲わら) で 5 日間培養し、その分解途中の稲わら (数百 mg 程度) を嫌気チャンバー内で取り出し、50ml の嫌気バッファー (PBS with 0.1% L-cystein-HCl-H<sub>2</sub>O) で 4 回洗ったものを使用した。

分離源である稲わらの小片を集積培地に接種し、窒素ガス置換による嫌気条件下、50°C で 3~4 日培養したところ、菌の増殖による培養液の白濁がみられた。継代培養を数回繰り返して、培養液から DNA を抽出し PCR-DGGE 解析をおこなったところ、ターゲットである *C. thermosuccinogenes* 近縁細菌と *Bacillus* 属細菌の 2 本のバンドに集積されていた (data not shown)。

##### (ii) single colony isolation

inulin、glucose、もしくは fructose を炭素源とした DSM502 寒天培地でのコロニー形成を試みたところ、通性嫌気性の *Bacillus* 属細菌しか分離されなかった。そこで、inulin、glucose、もしくは fructose を炭素源として、DSM502 培地に加えて、*Clostridium* 属細菌の培養に一般的に使用されるいくつかの培地 (PY 培地、IAM B-46 培地) を使用して、コロニー形成を試みた。固体培地表面にサンプルを塗布する方法の他に、サンプルを混釈して固体培地内でコロニーを形成させる方法も試した。またゲル化剤がコロニー形成に及ぼす影響[22, 60, 115]を考慮し、agar の代わりに gellan gum (材料と方法 1(h)) を使用した系も試みた。さらに *C. thermosuccinogenes* の生育至適温度が 60°C であることを考慮し、培養温度は 50°C と 60°C の両方を試した。

形成したコロニーを同じ組成の培液体地に接種し、その生育を確認後に DNA を抽出し、original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) の Band F の配列をもとに設計した特異的 primer (材料と方法 14) を使用した特異的 PCR (材料と方法 15) をおこない、増幅がみられたものに関して再度コロニー形成をおこない、純化していった。

その結果、ゲル化剤として gellan gum を使用し、fructose を炭素源とした PY 培地を使用した培養温度 60°C の系で、特異的 PCR ポジティブな株を 2 株純粋分離することに成功した。この 2 株をそれぞれ FG4 株、FG6 株と名づけた。

## 第2項 系統分類学的解析 (材料と方法 6)

FG4 株、および FG6 株からゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (1621 nt) を決定した。FG4 株と FG6 株の配列は完全に同一であった。この配列は GenBank/EMBL/DDBJ database に登録した (accession no. AB207248)。決定した塩基配列をもとに BLAST 解析をおこなった。その結果、FG4 株、FG6 株の配列は original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) の Band F と完全に同一であり、最近縁種の *C. thermosuccinogenes* (accession no. Y18180) と 99.8% の相同性を示した。以下の実験にはこの 2 株のうち FG4 株のみを使用した。

## 第3項 生理学的解析 (材料と方法 10(a))

各種糖 (0.5% w/v) を炭素源とした DSM502 培地で *Clostridium* sp. FG4 株の糖利用性を調べた。培養は 50°C でおこなった。糖利用の有無は 5 日間培養後の培養液 pH の低下で判断した。糖を添加しない DSM502 培地では *Clostridium* sp. FG4 株の生育はみられず、pH も変化しなかった。

結果を Table 1-4 に示す。*Clostridium* sp. FG4 株はリグノセルロース (rice straw) とその主要な構成成分である多糖 (cellulose、xylan) を唯一の炭素源として生育できなかったが、その分解産物である cellobiose、glucose、xylose の利用性を有していた。

Table 1-4. Saccharides utilization profile of *Clostridium* sp. strain FG4

Rice straw	Polysaccharides			Disaccharide	Monosaccharides		
	Cellulose <sup>a</sup>	Xylan	Inulin <sup>b</sup>	Cellobiose	Glucose	Xylose	Fructose
-	-	-	+	+	+	+	+

Utilization of a substrate was judged from pH drop of the culture solution after 5-day cultivation.

<sup>a</sup> cellulose powder or filter paper

<sup>b</sup> one of the storage polysaccharides in plant roots, mainly composed of fructose  $\beta$ 2→1 linkages

#### 第4節 *Clostridium straminisolvens* CSK1 株の分離と諸性質の検討

好気条件下で分離された細菌、および *Clostridium* sp. FG4 株は、いずれもセルロース分解能を有していなかった。そこで嫌気条件下でセルロース分解能を有する細菌の original microflora からの分離をおこなった。

##### 第1項 分離 (Fig. 1-1)

###### (i) 集積培養

セルロース分解細菌の集積培養には、セルロースパウダーを炭素源とした DSM502 培地を使用した。分離源には FG4 株の分離の際 (本章第3節第1項) と同様に、original microflora の培養過程における分解途中の稲わらを使用した。

分離源である稲わらの小片を集積培地に接種し、Anaeropack を使用した嫌気条件下、50°C で 3-4 日培養したところ、培養液中のセルロースパウダーの黄変がみられた。濾紙を炭素源として original microflora を培養すると同様に濾紙が黄変すること、またセルロース分解性 *Clostridium* 属細菌などのセルロソーム (cellulose binding domain や数種類の cellulase で構成されている酵素複合体) を持つ細菌で同様の黄変がみられること [20] が知られており、この黄変がセルロース分解菌の生育によるものと判断した。

そのまま通常の継代培養を続けたのでは、セルロース分解産物を消費している細菌まで集積されてしまうと考えられた。そこでセルロース分解性 *Clostridium* 属細菌などのセルロソームを持つ細菌はセルロースに吸着した状態で存在しているといわれている [20] ことから、軽い遠心 (約 300 × g, 1 分間) によりセルロース (および吸着している細菌) のみを回収し、それを継代培養することを 3 回繰り返し、セルロース分解能、吸着能を持つ細菌のみを集積した。

###### (ii) single colony isolation

cellobiose を炭素源とした DSM502 寒天培地上でのコロニー形成を試みたところ、通性嫌気性の *Bacillus* 属細菌しか検出されなかったため、寒天培地重層法を試みた。集積培養後の菌を、濾紙を炭素源とした DSM502 液体培地に接種し、Anaeropack を使用した嫌気条件下、50°C で 4 日間ほど培養したところ、濾紙の黄変および分解が観察された。黄変、分解が観察された後、濾紙を取り出し、嫌気バッファーで洗ったものから、嫌気バッファーに浸した濾紙に画線接種し、60°C にした DSM502 寒天培地 (炭素源なし) を注ぎ込み、嫌気条件下、50°C で培養をおこなった。培養開始 4~5 日後に濾紙上に黄色コロニーがみられた (Fig. 1-1B)。同様のコロニー形成を 3 回おこない、再度 DSM502 液体培地 (炭素源はセルロースパウダー) で生育させた菌体から DNA を抽出し、PCR-DGGE 解析 (材料と方法 5) をおこなった結果、シングルバンドが得られ、純粋培養であることが示された (Fig. 1-2)。またそのバンドの位置は original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) で検出された Band G と同一であった (Fig. 1-2)。さらに顕微鏡による観察によっても、純粋培養であることを確認した。ここで得られた分離株を CSK1 株と名づけた。

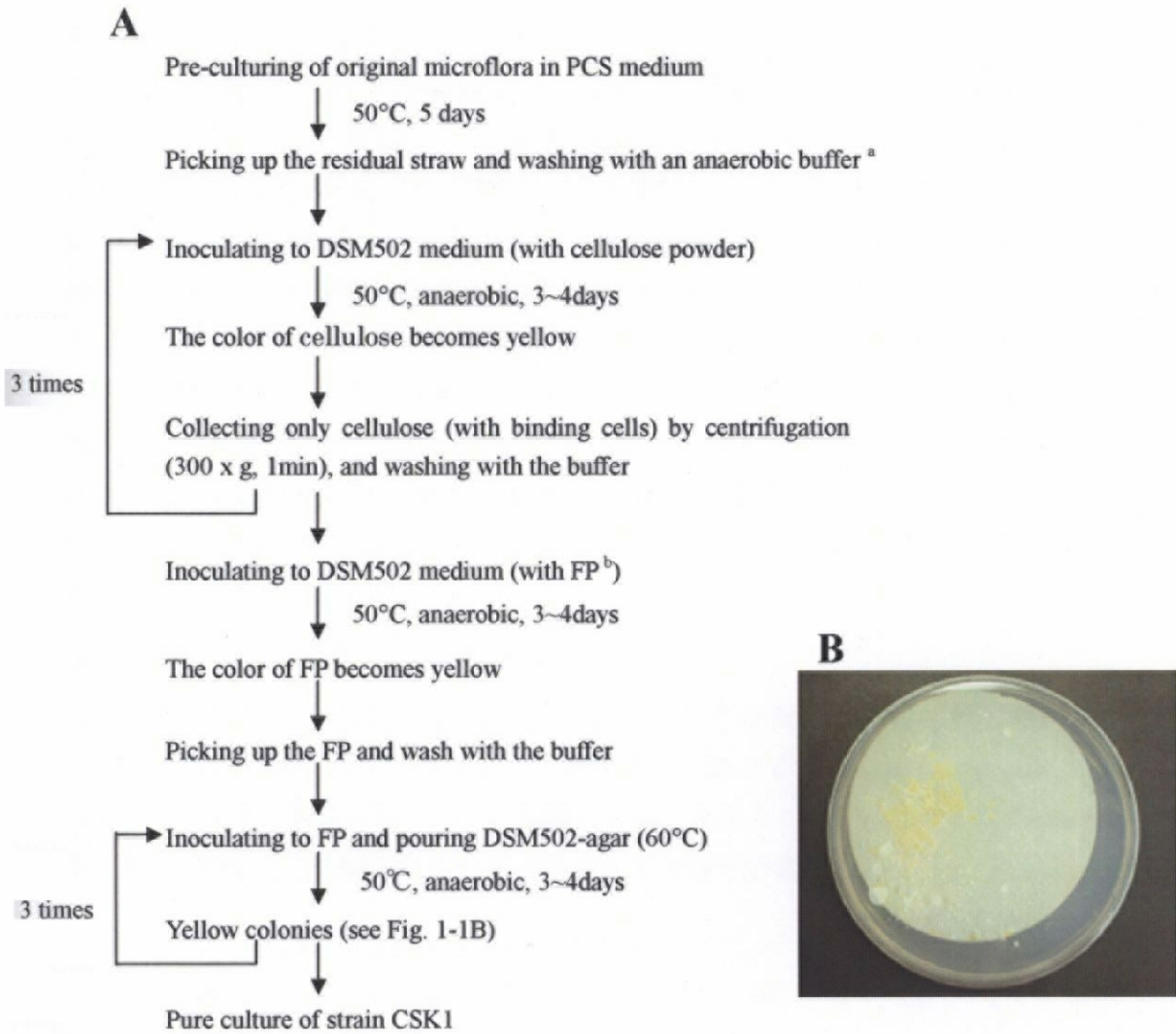


Fig. 1-1. Isolation of strain CSK1. (A) An outline of isolation of strain CSK1. a, PBS with 0.1% L-cystein-HCl-H<sub>2</sub>O; b, filter paper. (B) Photo image of colony of strain CSK1.

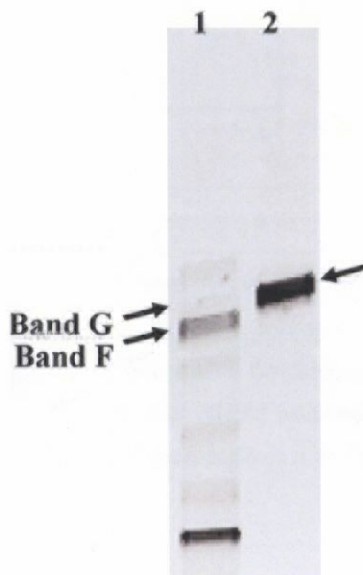


Fig. 1-2. PCR-DGGE analysis of the original microflora (lane 1) and strain CSK1 (lane 2). Band F and Band G in lane 1 are same bands as those in Fig. 0-5.

## 第2項 系統分類学的解析

## (i) 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析 (材料と方法 6)

CSK1 株の培養液からゲノム DNA を抽出し、bacterial universal primers を使用して 16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅し、その塩基配列 (1451 nt) を決定した。この配列は GenBank/EMBL/DDBJ database に登録した (accession no. AB125279)。

BLAST による相同性検索の結果、CSK1 株の近縁種は高温性 (生育至適温度 60~64°C) の嫌気性セルロース分解細菌 *Clostridium thermocellum* (accession no. L09173)、中温性 (生育至適温度 35°C) の嫌気性セルロース分解細菌 *Clostridium aldrichii* (accession no. X71846) であった。しかしその相同性はそれぞれ約 96.2%、95.1% と低く、CSK1 株は *Clostridium* 属に属する新種の細菌として分類されることが示唆された。

neighbor-joining 法により、16S rRNA 遺伝子塩基配列をもとに作成した系統樹を Fig. 1-3 に示す。CSK1 株はセルロースなどの多糖分解性の嫌気性細菌を含む、*Clostridium* 属の cluster III に分類されることが示された。

## (ii) DNA-DNA 相同性試験 (材料と方法 7)

CSK1 株と、16S rRNA 遺伝子配列解析で最近縁種とされた *C. thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> との DNA-DNA 相同性試験をおこなった。その結果 CSK1 株と *C. thermocellum* の genome sequence similarity は約 23% と算出された。この結果は CSK1 株とその最近縁種である *C. thermocellum* とは、異なる種として分類されるべきであることを強く示唆する。

## (iii) ゲノム DNA の GC 含量測定 (材料と方法 8)

HPLC を使用した方法により CSK1 株のゲノム DNA の GC 含量を測定した。その結果、CSK1 株のゲノム DNA の GC 含量は 41.3 mol% であった。

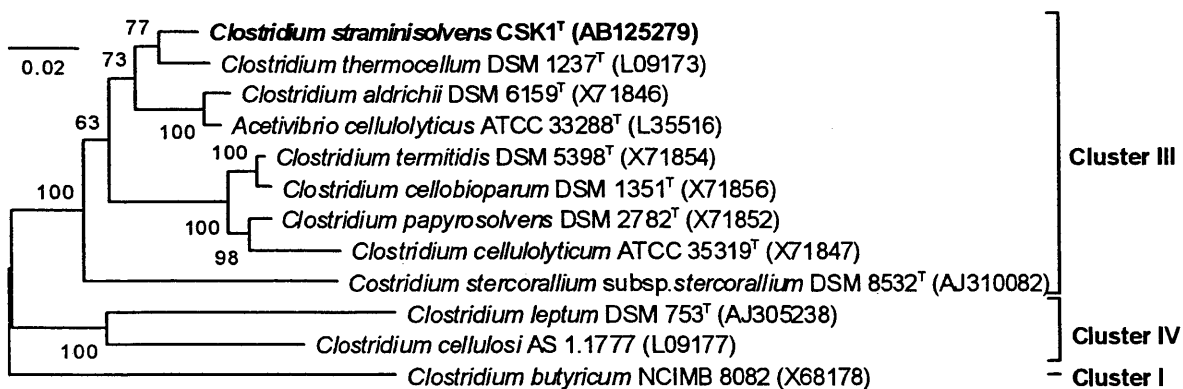


Fig. 1-3. Phylogenetic dendrogram, indicating the position of strain CSK1 amongst cluster III of the order *Clostridiales* and related bacteria based on 16S rRNA gene sequence data. Bar, 2 % sequence divergence. Bootstrap values are given at the branching points. Accession numbers are shown in parentheses.



## 第3項 生理学的解析

## (i) 培養条件の至適化

CSK1 株をセルロースパウダー、または cellobiose を炭素源とした、*Clostridium* 属細菌の培養によく使用されるいくつかの培地 (PCS 培地、DSM502 培地、DSM122 培地、IAM B-46 培地) で培養をおこなった。その結果、DSM122 培地において最も良好な生育が確認された。そこで CSK1 株の以下の生理学的解析には、DSM122 培地を使用した。

CSK1 株を濾紙または cellobiose を炭素源とした DSM122 培地 (pH 7.0) で 37-70°C の範囲で培養し、その生育可能 (至適) 温度を調べた。その結果を Fig. 1-4(a) に示す。CSK1 株の生育可能温度は 50-60°C で、至適温度は 50-55°C であった。

CSK1 株を濾紙または cellobiose を炭素源とした DSM122 培地で pH 5.0-9.0 の範囲、50°C で培養し、その生育可能 (至適) 初期 pH を調べた。その結果を Fig. 1-4(b) に示す。CSK1 株の生育可能初期 pH は 6.0-8.5 で、至適 pH は 7.5 であった。

以下の実験では、特に明記しない限り CSK1 株の培養は 50°C、初期 pH 7.0 でおこなった。

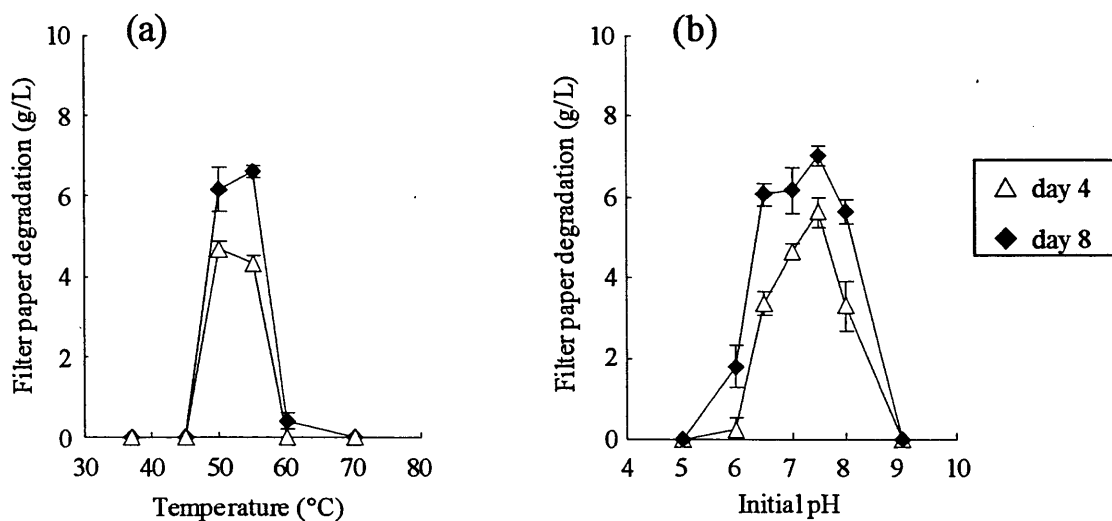


Fig. 1-4. Optimum temperature and optimum initial pH of strain CSK1. (a) Filter paper degradation efficiency of strain CSK1 under various temperature (initial pH 7.0). (b) Filter paper degradation efficiency of strain CSK1 under various initial pH (at 50°C). Values are expressed as means of two replications. Error bars indicate the standard deviation.

## (ii) 形態学的特徴

cellobiose を炭素源とした DSM122 培地で CSK1 株を 10 日間培養し、その菌体を位相差顕微鏡 (Axioplan II imaging、 Carl Zeiss) により観察した (Fig. 1-5)。CSK1 株の細胞は straight rods もしくは slightly curved rods で、幅 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ 、長さ 3.0-8.0  $\mu\text{m}$  であった。胞子は楕円形で、細胞の端に位置し、その大きさは 0.5-1.0  $\times$  1.0-1.5  $\mu\text{m}$  であった。

## (iii) 糖利用性 (材料と方法 10(b))

各種糖 (0.5% w/v) を炭素源とした DSM122 培地で CSK1 株の糖利用性を調べた。糖利用性の有無は 5 日間培養後の培養液 pH の低下で判断した。糖類を添加しない DSM122 培地では CSK1 株の生育はみられず、pH も変化しなかった。

実験に使用した糖のうち CSK1 株が利用したのは、cellbiose、laminarin (polysaccharide of glucose with  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6 linkages)、セルロース基質 (セルロースパウダー、濾紙、稲わら) のみであった。

## (iv) セルロース分解効率 (材料と方法 17(b))

濾紙、または稲わらを炭素源とした DSM122 培地、PCS 培地を使用して、CSK1 株、および近縁種の *C. thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> のセルロース分解効率を測定し、original microflora と比較した (Fig. 1-6)。CSK1 株は 50°C、*C. thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> は 60°C で培養した。

使用したセルロース基質に関わらず、最も分解効率が悪かったのは original microflora で、CSK1 株は最も分解効率が悪かった。特にその差は稲わらを基質としたときに顕著であった。

## (v) 醗酵代謝産物の検出 (材料と方法 11)

セルロースパウダー、または cellobiose を炭素源とした DSM122 培地を使用して、CSK1 株の醗酵代謝産物の検出をおこなった。培養液中の有機酸、アルコールは HPLC により検出した。気相中のガス成分は GC により検出した。

CSK1 株の主要な醗酵代謝産物は使用した炭素源に関わらず酢酸、エタノール、 $\text{H}_2$ 、 $\text{CO}_2$  であった。また、微量ながら乳酸も検出された。

## (vi) 酸素耐性能 (材料と方法 12)

original microflora の培養条件が好気静置条件であること、また CSK1 株の分離過程およびその後の培養において、それほど厳密な嫌気条件を必要としなかったことから、CSK1 株は一般的な偏性嫌気性細菌よりも強い酸素耐性能を有しているのではないかと考えられた。そこで CSK1 株、および *C. thermocellum* IAM 13660<sup>T</sup> について、気相に 0、1、2、4、8% の酸素が存在する条件での生育の有無を調べた。培養はセルロースパウダー、もしくは cellobiose を炭素源とした DSM122 培地を使用した。

結果を Table 1-5 に示す。2 種類の炭素源で結果に違いはみられなかった。*C. thermocellum* は気相酸素濃度 2% 以上では生育がみられなかったが、CSK1 株は気相酸素濃度 4% においても生育がみられた。



Fig. 1-5. Phase contrast micrograph of cells of strain CSK1, showing subterminal oval spores. Bar, 5  $\mu$ m.

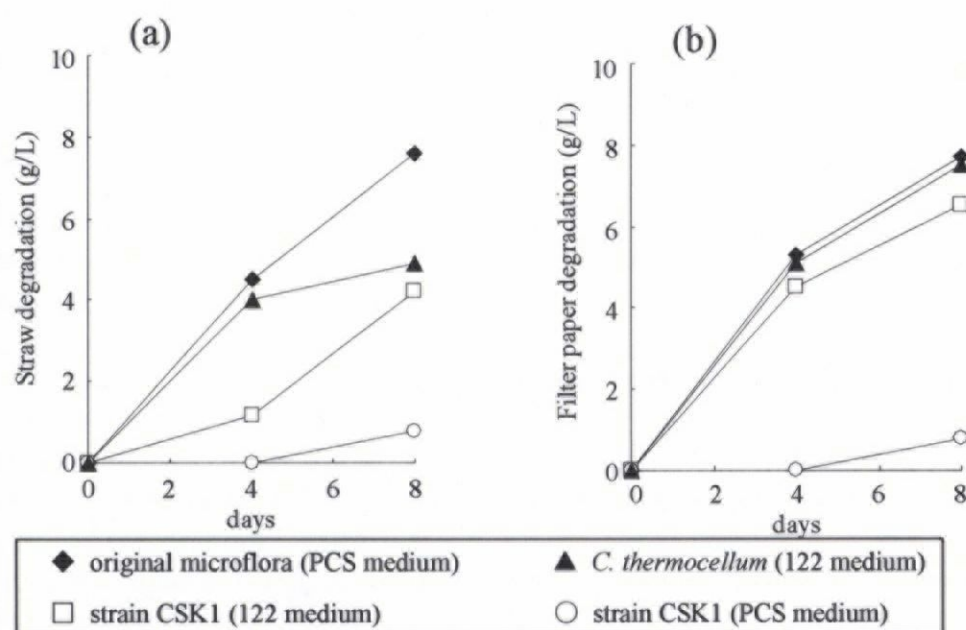


Fig. 1-6. Dried straw (a) or filter paper (b) degradation efficiency of the original microflora, *C. thermocellum* and strain CSK1. The original microflora was cultivated under the aerobic static conditions at 50°C. Strain CSK1 was cultivated under the anaerobic conditions at 50°C. *C. thermocellum* was cultivated under the anaerobic conditions at 60°C. Values are expressed as means of two replications.

Table 1-5. Growth of strain CSK1 and *C. thermocellum* under the atmospheres containing various oxygen concentrations

strain	Head space O <sub>2</sub> concentrations (%)				
	0	1	2	4	8
CSK1	+	+	+	+	-
<i>C. thermocellum</i>	+	+	-	-	-

Growth was judged from pH decrease of culture solution after 5 days cultivation. Initial pH of the culture solution was 7.0. +; the value of pH decrease >1.0, -; the value of pH decrease <0.3.

## (vii) その他の生理学的試験 (材料と方法 13)

*Clostridium* 属細菌の分類学的解析の際に調べられる生理学的試験 (tests for; motility, aesculin hydrolysis, nitrate reduction, casein digestion, lectinase activity, lipase activity, indole production) をおこなった。

上記の試験のうち、aesculin hydrolysis のみが陽性で、その他の試験は全て陰性であった。

第4項 *Clostridium straminisolvens* sp. nov. の提唱

以上の CSK1 株の解析結果と、報告されている *C. thermocellum* と *C. aldrichii* の性質との比較を Table 1-6 にまとめた。系統分類学的、および生理学的解析から、CSK1 株は現在までに報告のある *Clostridium* 属の種とは異なる結果 (生育至適温度、酸素耐性能など) が得られたため、CSK1 株を type strain とした *Clostridium* 属の新種として、*Clostridium straminisolvens* sp. nov. を提唱した。

**Description of *Clostridium straminisolvens* sp. nov.**

*Clostridium straminisolvens* (stra.mi.ni.sol'vens. L. neut. n. *stramen* straw; L. v. *solvere* to dissolve; N.L. part. adj. *straminisolvens* straw-dissolving).

Cells are anaerobic, non-motile, spore-forming, straight or slightly curved rods, 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  wide and 3.0-8.0  $\mu\text{m}$  long, occurring singly or in pairs. The optimum temperature for growth is 50-55°C, and no growth occurs at or below 45°C or at 65°C and above. The optimum initial pH for growth is 7.5, and growth occurs between pH 6.0 and 8.5. Growth occurs under a gas phase containing up to 4% O<sub>2</sub>. Cellulose and cellobiose are utilized as sole carbon and energy sources; the fermentation products are acetate, lactate, ethanol, hydrogen, and carbon dioxide. Glucose, fructose, ribose, mannose, mannitol, melibiose, saccharose, xylose, sucrose, lactose, xylan, and starch were not utilized as sole carbon and energy sources. The G+C content in the DNA of the type strain is 41.3 mol% (HPLC).

The type strain, strain CSK1<sup>T</sup> (=DSM 16021<sup>T</sup>=IAM 15070<sup>T</sup>), was isolated from a cellulose-degrading bacterial community.

Table 1-6. -continued

		<i>C. straminisolvens</i> CSK1	<i>C. thermocellum</i> <sup>a</sup>	<i>C. aldrichii</i> <sup>b</sup>
Physiological tests	Motility	-	-	+
	Aesculin hydrolysis	+	+	+
	Nitrate reduction	-	-	-
	Casein digestion	-	-	-
	Lectinase activity	-	-	-
	Lipase activity	-	-	N.D.
	Indole production	-	-	-

Symbols: +, positive reaction; -, negative reaction; w, weak reaction

<sup>a</sup> Data from ref. [64, 87]

<sup>b</sup> Data from ref. [133]

<sup>c</sup> N.T.; not tested

<sup>d</sup> N.D.; no data available

<sup>e</sup> These substrates are not utilized as a sole carbon source, but utilized when cellulose or cellobiose exist in the culture medium

<sup>f</sup> Products: a, acetic acid; b, butyric acid; ib, isobutyric acid; e, ethanol; l, lactic acid; p, propionic acid. Capital letters indicate major products, and small letters indicates minor products.

## 第5節 考察

Table 1-7 に original microflora から分離した細菌とその特徴をまとめた。

original microflora から、好気条件下で 8 株 (5 グループ) の細菌を分離した。通性嫌気性の M1-2、M1-3、M1-7 株は 16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、 $\gamma$ -proteobacteria、*Pseudoxanthomonas* 属に分類された。近縁種である *Pseudoxanthomonas taiwanensis* は温泉から分離された高熱性通性嫌気性細菌である[19]。また相同な配列は高温 (55°C) の廃水処理バイオリアクターからも検出されている[70]。偏性好気性の M1-5 株は Firmicutes、*Brevibacillus* 属に分類された。近縁種の *Brevibacillus agri* は偏性好気性の土壌細菌として分離、同定されている[84]。偏性好気性の M1-6 株は  $\beta$ -proteobacteria、*Bordetella* 属に分類された。*Bordetella* 属の細菌はほとんどが中温性偏性好気性であり、一部の種は 50°C 以上でも生育可能である、と報告されている[64]。以上の 3 グループに関しては、同一の配列が original microflora の PCR-DGGE 解析によって検出されていた (Fig. 0-5、Band A、B、E)。M1-1 と M1-8 株、また M1-4 株は Firmicutes のそれぞれ *Bacillus* 属、*Virgibacillus* 属に分類された。これら分離株に対応するバンドは original microflora の PCR-DGGE 解析では検出されていない。

original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) によって検出されていた Band F に対応する嫌気性細菌、FG4 株の分離に成功した。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果 FG4 株は Firmicutes、*Clostridium* 属の cluster III に分類され、最近縁種は *C. thermosuccinogenes* (相同性約 99.8%) であった。FG4 株は近縁種の *C. thermosuccinogenes*[27]と同様に、セルロース分解能はみられなかったものの、嫌気条件下での様々な糖 (e.g., cellobiose, glucose) の利用性を有しており、群集中でセルロース分解に伴って産生される糖の消費に関わっていると推測された。

嫌気条件下でセルロース分解能を有する CSK1 株は 16S rRNA 遺伝子配列解析により original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) の Band G に対応する細菌であった。また CSK1 株は *Clostridium* 属の cluster III に分類され、*C. thermocellum*、*C. aldrichii* と近縁であったが、その相同性は同種の細菌か否かを判定する際の目安となる 97% [111]よりも低かった。また CSK1 株と *C. thermocellum* との DNA-DNA 相同性試験の結果も、同種の細菌か否かを判定する際の目安となる 70% [126]よりも低かった。また生理学的解析においても、生育至適温度、酸素耐性能といった、近縁種とは異なる性質が認められた。CSK1 株の近縁種である *C. thermocellum*、*C. aldrichii* の生育至適温度は、それぞれ 60-64°C、35°C と報告されている[64, 133]。一方で CSK1 株の生育可能温度は 50-60°C、生育至適温度は 50-55°C (Fig. 1-4(a)) と、近縁種のものとは異なっていた。また *C. thermocellum* が気相酸素濃度 2%以上で生育がみられないのに対し、CSK1 株は気相酸素濃度 4%においても生育がみられた (Table 1-5)。*Clostridium* 属細菌の中には、気相酸素濃度 6%で生育可能な種がいくつか報告されている (*Clostridium glycolicum* [67]、*Clostridium magnum* [61])。しかしセルロース分解能を持つ *Clostridium* 属細菌では酸素耐性能を有する種の報告はなされていない。original microflora の培養条件 (好気静置培養) において、酸素耐性能、酸素存在下での生育能は生き残りに非常に有利な性質であると考えられる。以上の系統分類学的、および生理学的解析から、CSK1 株は現在までに報告

のある *Clostridium* 属の種とは異なる結果が多く得られたため、CSK1 株を type strain とした *Clostridium* 属の新種として、*Clostridium straminisolvans* sp. nov. を提唱した。

original microflora には、酸素に対する要求性、感受性の異なる様々な細菌が共存していた。これは original microflora の培養条件、すなわち好気静置条件が原因であろう。培養液の表面付近では気相から酸素が供給されるが、好気性細菌の働きにより酸素は速やかに消費され、培養液の大部分は嫌氣的、還元的になっていると考えられる。実際に original microflora のセルロース分解過程における培養液中の ORP 値は-400 mV 以下であることが報告されている [45]。

偏性嫌気性セルロース分解分離株、CSK1 株は original microflora の培養条件、すなわち好気静置条件では生育することができなかった。また嫌気条件下においてもそのセルロース分解効率は original microflora よりも顕著に低かった (Fig. 1-6)。このことから、群集中では好気性細菌による酸素消費に加えて、非セルロース分解細菌の何らかの働きが高効率リグノセルロース分解に寄与していると考えられる。この点に関しては、以下の章で詳しく解析をおこなった。

Table 1-7. Bacterial strains isolated from the original microflora

	Growth		Utilization					
	aerobic	anaerobic	Cellulose	Cellobiose	Glucose	Ace <sup>b</sup>	Lac <sup>c</sup>	Ethanol
Dominant strains <sup>a</sup>								
<i>C. straminisolvans</i> CSK1	-	+	+	+	-	N.T. <sup>d</sup>	N.T.	N.T.
<i>Clostridium</i> sp. FG4	-	+	-	+	+	N.T.	N.T.	N.T.
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3	+	+	-	-	-(+) <sup>e</sup>	-	-	-
<i>Brevibacillus</i> sp. M1-5	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>Bordetella</i> sp. M1-6	+	-	-	-	-	-	-	-
Minor strains <sup>a</sup>								
<i>Bacillus</i> sp. M1-1	+	+	-	+	+	+	+	N.T.
<i>Virgibacillus</i> sp. M1-4	+	-	-	-	-	+	-	N.T.

<sup>a</sup> Dominant strains were detected from the original microflora by PCR-DGGE method, and Minor strains were not.

<sup>b</sup> Ace, acetic acid.

<sup>c</sup> Lac, lactic acid.

<sup>d</sup> N.T., not tested.

<sup>e</sup> *Pseudoxanthomonas* sp. strain M1-3 showed glucose utilizing capability under the anaerobic conditions, but did not under the aerobic conditions.

## 第2章

### *C. straminisolvens* CSK1 株と好気性細菌との 混合培養による高効率セルロース分解過程の解析



## 第1節 緒言

自然界において、ある種の微生物が単独で存在していることはほとんど無く、複数種の微生物が互いに影響を及ぼしあいながら共存している。多くの微生物はそのような他種の生物との共存下においてはじめて効果的に機能を発揮するものと考えられる[4]。このような協奏的に機能を発揮している微生物群の例としては、メタン生成古細菌とその共生細菌（有機酸化細菌など）による種間水素伝達[e.g., 52, 105]や、塩素化有機化合物などの xenobiotics の協奏的分解[e.g., 17, 129]などがよく知られている。

本研究で対象としているリグノセルロースの分解に関しても同様に、自然界では複数種の微生物の共同作用によって効率的に分解が進行していると考えられる。リグノセルロースは地球上で最も豊富に存在する再生可能な資源であり、その分解、有効利用は非常に重要な問題として捉えられている[20]。リグノセルロースを分解する微生物、およびその酵素群（cellulase、xylanase、peroxidase など）については、古くから多くの研究がなされている[e.g., 13, 37, 48, 78]。しかし単独の微生物や酵素で自然界由来のセルロース物質を処理するには、物理化学的処理や滅菌といった前処理無しには非常に困難であるというのが現状である。一方で、セルロース分解微生物と、余剰なセルロース分解産物を除去するような非セルロース分解細菌（e.g., 水素消費微生物[88, 128]、糖消費微生物[72, 86, 94, 123]）との混合培養により、セルロース分解効率が高められる、という報告もなされている。

本研究で解析をおこなっている original microflora は、上記のような微生物の共同作用による高効率セルロース分解を理解するうえで、良いモデルであると考えられるが、構成微生物種の全てを同定、解析することができないという、実験的な困難さが残されている。そこで original microflora から分離した微生物の混合培養によって高効率セルロース分解を再現し、その人工生態系を解析することで複数種の微生物による効率的なセルロース分解のメカニズムを解明することを目的とした。

本論文の第1章で original microflora からの細菌の分離をおこなった (Table 1-7)。分離された細菌のうち、セルロース分解能を有していたのは嫌気性細菌 *Clostridium straminisolvens* CSK1 株のみであった。*C. straminisolvens* CSK1 株は original microflora の培養条件、すなわち好気静置条件では生育できなかった。このことから、群集中においては非セルロース分解好気性細菌が培養液中の酸素を消費し、培養液を嫌気化することで *C. straminisolvens* CSK1 株によるセルロース分解がはじめて可能になる、と考えられる。さらに、嫌気条件下においても *C. straminisolvens* CSK1 株の PCS 培地におけるセルロース分解効率は、original microflora と比較して非常に低いものであった (Fig. 1-7)。このことから、群集における高効率セルロース分解には、培養液の嫌気化以外にも重要な要因があると予想される。

そこで本章では、*C. straminisolvens* CSK1 株と非セルロース分解細菌とを様々な組み合わせで混合培養し、分解効率のよい混合培養系に関してその分解過程を解析し、*C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養時と比較することで、細菌群集による高効率セルロース分解のメカニズムを探った。またその混合培養系が original microflora と同様に継代培養に対して機能的、構造

的な安定性を有しているか検討した。

## 第2節 *C. straminisolvens* CSK1 株と非セルロース分解分離株との混合培養

### 第1項 混合培養による好気静置条件でのセルロース分解 (材料と方法3)

まず第1章で分離したセルロース分解細菌 *C. straminisolvens* CSK1 株と、全ての好気性分離株との混合培養をおこなった (Fig. 2-1)。その結果、*C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養 (Fig. 2-1B)、好気性分離株のみの混合培養 (Fig. 2-1C) ではセルロース分解が起こらないのに対し、*C. straminisolvens* CSK1 株と好気性分離株との混合培養 (Fig. 2-1D) では、好気静置条件でのセルロース分解がみられた。またこの混合培養中で *C. straminisolvens* CSK1 株が増殖していることが PCR-DGGE 解析などにより示された (data not shown)。この結果から、好気性分離株の働きによって好気静置条件でも *C. straminisolvens* CSK1 株が生育可能になり、セルロース分解が進行することが示された。

### 第2項 2種混合培養系の解析

どの好気性分離株が *C. straminisolvens* CSK1 株の好気静置条件での増殖を可能にする能力を有しているのかを明らかにするために、*C. straminisolvens* CSK1 株と各分離株との2種混合培養系を構築し、そのセルロース分解効率を調べた (Fig. 2-2)。その結果、*C. straminisolvens* CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株、または *Bordetella* sp. M1-6 株との2種混合培養系でセルロース分解がみられた。特に *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株との混合培養系では original microflora (7.77 g/L, for 8 days) に匹敵するほどの高い分解活性 (7.31 g/L, for 8 days) がみられた。

### 第3項 4種混合培養系 (CSK+M356) による高効率セルロース分解

*C. straminisolvens* CSK1 株との2種混合培養でセルロース分解がみられた3種の好気性分離株 (*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3、*Brevibacillus* sp. M1-5、*Bordetella* sp. M1-6 株) と、*C. straminisolvens* CSK1 株との4種混合培養系 (CSK+M356) は、original microflora を上回るほどの高いセルロース分解活性を有していた (Fig. 2-2、8.30 g/L, for 8 days)。一方で嫌気条件下では CSK+M356 のセルロース分解効率は顕著に低いものであった (Fig. 2-2、1.93 g/L, for 8 days)。このことから、これらの好気性分離株は嫌気的な環境を作り出す、ということに加えて、その好気条件下での代謝活動が高効率分解に寄与していると考えられる。

一方、CSK+M356 にもう一株の分離株 (*Bacillus* sp. M1-1 株、*Virgibacillus* sp. M1-4 株、*Clostridium* sp. FG4 株) を加えた5種混合培養系は、いずれも CSK+M356 よりセルロース分解活性が低かった (Fig. 2-2)。このことから、これら3種の分離株は群集内でセルロース分解の効率化にポジティブな効果を有していないと考えられる。

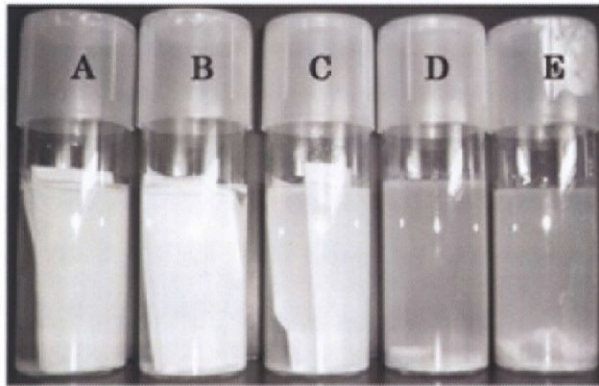


Fig. 2-1. Photo image of filter paper degradation by *C. straminisolvens* CSK1 together with non-cellulolytic bacteria. Incubation was conducted for 4 days under aerobic static conditions at 50°C. (A) Uninoculated culture, (B) *C. straminisolvens* CSK1 pure culture, (C) mixed culture of aerobic isolates only, (D) mixed culture of *C. straminisolvens* CSK1 with aerobic isolates, (E) the original microflora.

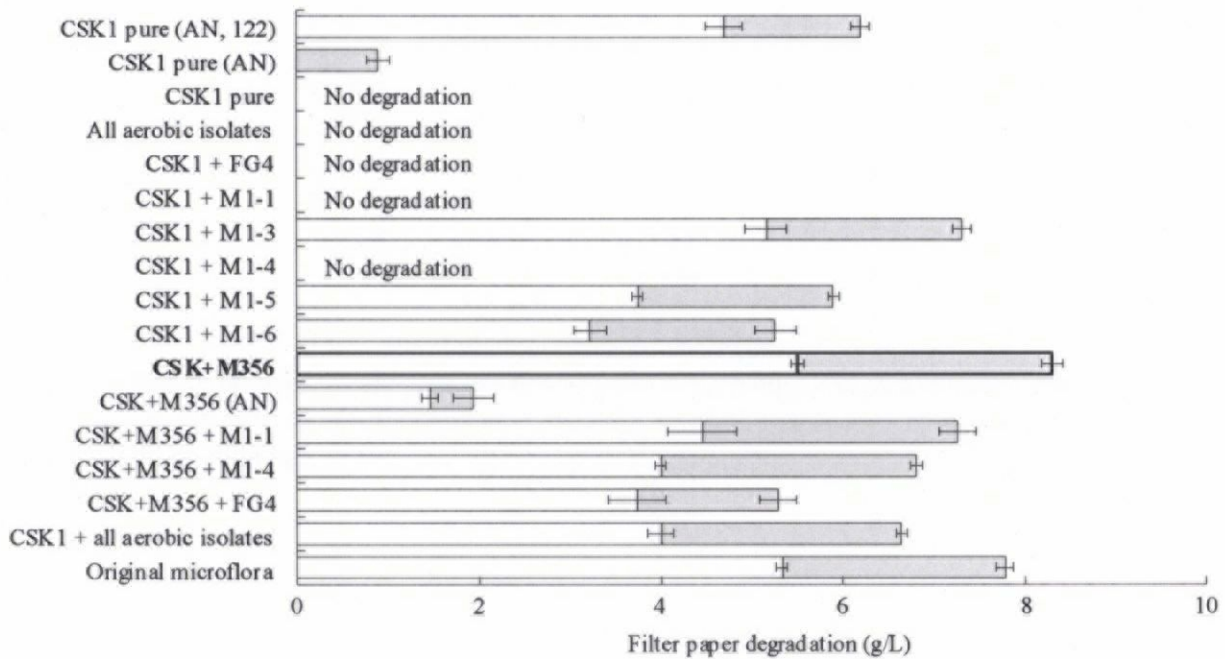


Fig. 2-2. Filter paper degradation of pure or mixed cultures. Open bars, filter paper degradation during day 0-4; gray bars, filter paper degradation during day 4-8. Cultivation was conducted in 70.0 ml of PCS medium with 700 mg of filter paper under static aerobic conditions, except for; AN, cultivated under anaerobic conditions instead of aerobic conditions; 122, cultivated in 122 medium instead PCS medium. Values are expressed as means of two replications. Error bars indicate the standard deviation.

第3節 CSK+M356 と *C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養系の比較(材料と方法 17)

好気性分離株のどのような働きが高効率分解に寄与しているのかを明らかにするために、Fig. 2-2 の解析において最もセルロース分解効率が高かった混合培養系、CSK+M356 と、*C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養系のセルロース分解過程を解析し、比較した。CSK+M356 の解析には混合培養構築後に 2 回継代培養をおこなった、3rd generation を使用した。*C. straminisolvens* CSK1 株は純粋培養条件では PCS-FP 培地において、嫌気条件下においてもそのセルロース分解活性は非常に低いため (Fig. 2-3)、*C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養の解析には、DSM122-FP 培地を使用した。

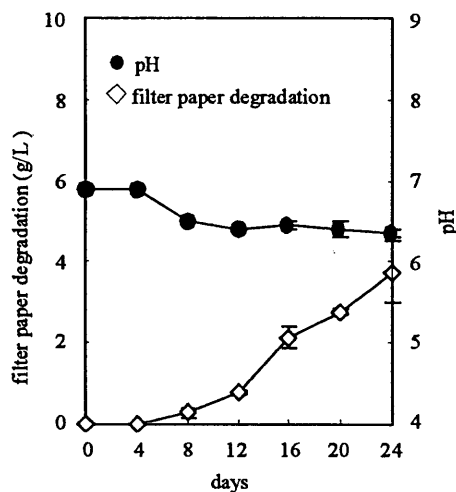


Fig. 2-3. Filter paper degradation and pH profile of *C. straminisolvens* CSK1 pure culture in 70.0 ml of PCS medium with 700 mg of filter paper under anaerobic conditions. Values are expressed as means of two replications. Error bars indicate the standard deviation.

### 第1項 セルロース分解効率

*C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養系と CSK+M356 の濾紙分解量の推移を Fig. 2-4(a)に示す。培養初期には純粋培養と混合培養で濾紙分解速度に大きな違いはみられなかったが (e.g., day 2-3, 3.76 and 3.44 g/L/day, respectively)、培養後期には明白な違いがみられた (e.g., day 4-8, 0.47 and 0.82 g/L/day, respectively)。10 日間の培養での濾紙分解量は、*C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養では 6.50 g/L、CSK+M356 では 8.91 g/L であった。

### 第2項 培養液の ORP、pH 推移

CSK+M356 の培養過程における培養液の酸化還元電位 (oxidative-reductive potential、ORP) 値は、培養開始後 1 日以内に -300 mV 以下にまで低下し、その後も -300 mV 以下に保たれていた。*C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養、CSK+M356 の培養過程における培養液の pH 推移を Fig. 2-4(b)に示す。活発な濾紙分解が起こっている day 3 までに、両培養系ともに pH は 6 以下にまで低下した。しかし培養後期には、純粋培養系では酸性環境 (c.a., pH 5.6) が保たれていたのに対し、CSK+M356 では pH は中性付近 (c.a., pH 7.2) に戻っていった。

### 第3項 培養液中のセルロース分解代謝産物

培養液中の水溶性糖濃度をアンスロン法により定量した (Fig. 2-4(c))。培養初期 (~ day 4) では水溶性糖の蓄積は各培養系で大きな差はみられなかった。しかし濾紙分解量は CSK+M356 の方が多いにもかかわらず、培養後期の水溶性糖の蓄積は CSK+M356 の方が明らかに少なかった。培養 10 日後の濾紙分解量あたりの oligosaccharides 濃度増加は、CSK+M356 は 162.0 mg-saccharides/g-(cellulose degradation)、*C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養は 333.4 mg-saccharides/g-(cellulose degradation) であった。

培養液中の酢酸濃度を F-kit により定量した (Fig. 2-4(d))。*C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養では酢酸濃度は day 2-4 で約 1200 mg/L まで急激に増加し、その後も徐々に増加を続けた。一方で CSK+M356 では、day 3 までに約 670 mg/L まで増加した後、徐々に減少していった。培養 10 日後の濾紙分解量あたりの酢酸濃度増加は、CSK+M356 は 54.2 mg-acetate/g-(cellulose degradation)、*C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養は 227.1 mg-acetate/g-(cellulose degradation) であった。

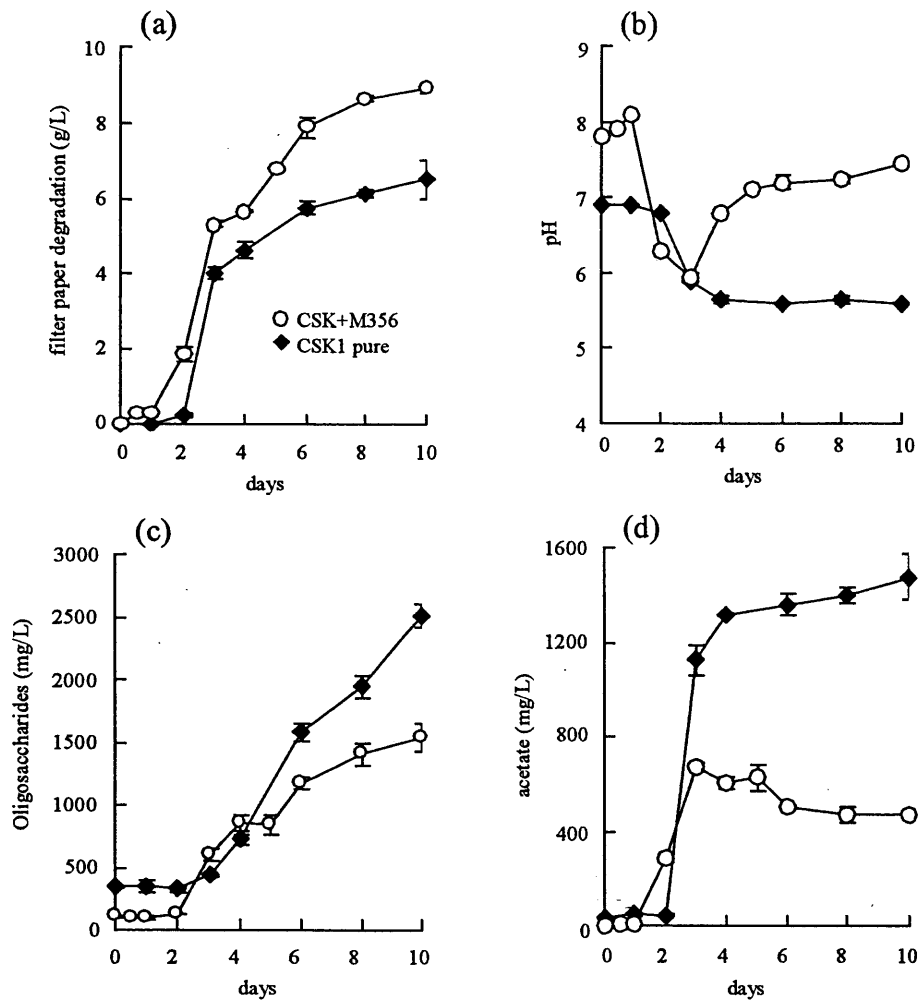


Fig. 2-4. Comparison of filter paper degradation processes of pure culture of *C. straminisolvens* CSK1 and the mixed-culture (CSK+M356). Cultivation was conducted in 70.0 ml of liquid medium with 700 mg of filter paper. Pure culture of *C. straminisolvens* CSK1 (filled diamond) was cultivated in medium 122 under anaerobic static conditions; CSK+M356 (open circle) was cultivated in PCS medium under aerobic static conditions. (a) filter paper degradation, (b) pH value, (c) oligosaccharides concentration, and (d) acetate concentration. Values are expressed as means of two replications for two culture solution samples. Error bars indicate the standard deviation

## 第4節 CSK+M356 の群集構造ダイナミクスの解析

### 第1項 培養液中の総菌数

CSK+M356 の濾紙分解過程における培養液中の総菌数の推移を DAPI 染色法（材料と方法 18）により測定した（Fig. 2-5）。day 0 から day 2 において総菌数は約 100 倍に増加しており、その後 day 6 までは大きな変化はみられなかった。

### 第2項 各分離株の存在比率の推移

CSK+M356 の濾紙分解過程における各分離株の存在比率の経時的変化を定量的 real-time PCR 法（材料と方法 16）により測定した（Fig. 2-6(a)）。

*C. straminisolvens* CSK1 株は濾紙分解が始まる前の day 1 ではその存在比率は非常に低く（1%以下）、その後濾紙分解の進行と付随して day 2 には約 20%にまで増加した。通性嫌気性の *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株は測定期間を通して非常に高い存在比率（73%以上）であった。偏性好気性の *Brevibacillus* sp. M1-5 株は day 1 には 10%以上の存在比率であったが、その後減少していった（c.a., 1-7%, during day 2-6）。同じく偏性好気性の *Bordetella* sp. M1-6 株は day 1 には 1%以下の存在比率であったが、その後増加していった（c.a., 1-8%, during day 2-6）。

## 第5節 CSK+M356 の構造と機能の安定性の検討

CSK+M356 の構造と機能の安定性をみるために、継代培養を繰り返した後の濾紙分解量と群集構造を解析した。

11 回の継代培養後の 12th generation の day 4、day 8 での濾紙分解量はそれぞれ 5.02、8.70 g/L、40 回の継代培養後の 41st generation の day 4、day 8 での濾紙分解量はそれぞれ 5.18、8.42 g/L と、継代培養前の濾紙分解量（5.51、8.30 g/L、Fig. 2-4(a)）とほぼ同様であった。また pH 推移のパターン（day 3 までに 6 以下に低下、その後 7 以上にまで回復）も、継代培養前後ではほぼ同一であった（data not shown）。

一方で CSK+M356 の群集構造は継代培養に対して不安定であった。12th generation、37th generation の定量的 real-time PCR 法（材料と方法 16）による各分離株の存在比率解析結果を Fig. 2-6(b, c)に示す。37th generation において CSK+M356 の構成メンバーのうち、*Brevibacillus* sp. M1-5 株が検出限界（約 0.01%）以下であった。またその *Brevibacillus* sp. M1-5 株の存在比率は、3rd generation と 12th generation の間でも、明らかな減少がみられた。

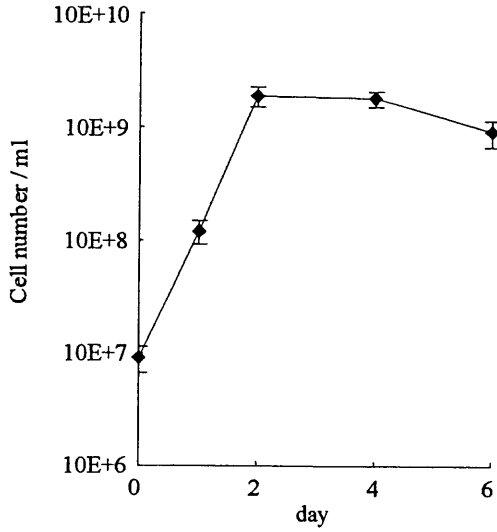


Fig. 2-5. Quantification of cell number in the culture solution of CSK+M356 during filter paper degradation process determined by direct counting of DAPI-stained cells. Values are expressed as means of eight fields of view. Error bars indicate the standard deviation.

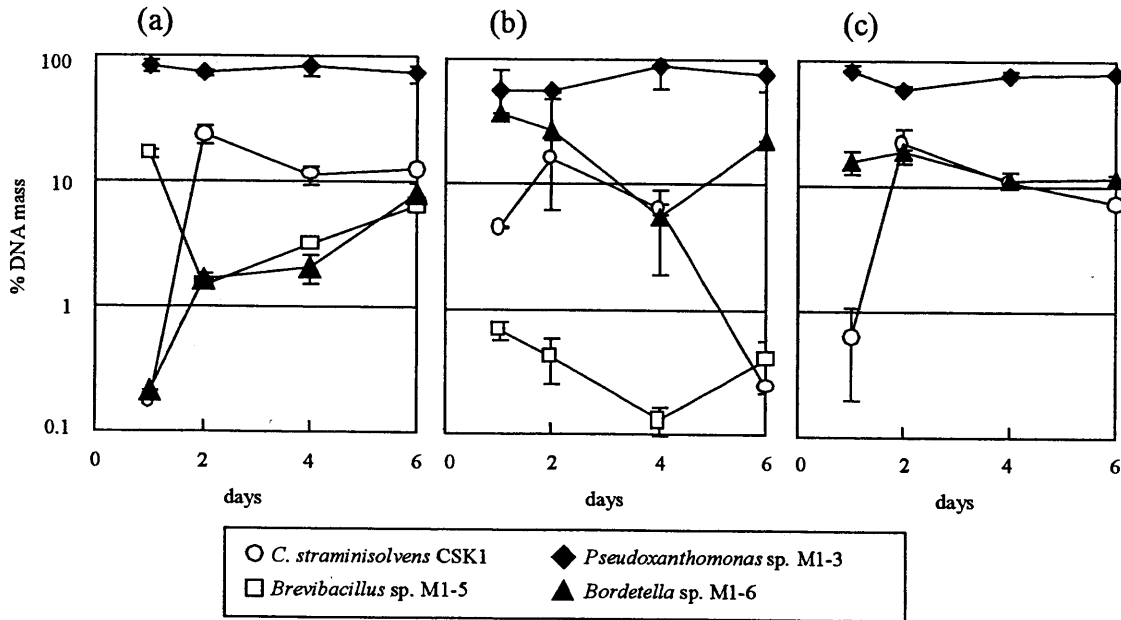


Fig. 2-6. Quantification of each bacterium in CSK+M356. (a) 3rd generation, (b) 12th generation, (c) 37th generation. Open circle, *C. straminisolvens* CSK1; filled diamond, *Pseudoxanthomonas* sp. strain M1-3; open square, *Brevibacillus* sp. strain M1-5; filled triangle, *Bordetella* sp. strain M1-6. Values are expressed as means of two replications for two DNA samples. Error bars indicate the standard deviation.



## 第6節 考察

*C. straminisolvens* CSK1 株は original microflora の培養条件である好気静置条件では生育しなかったが、好気性分離株との混合培養によって、その条件でも生育、セルロース分解が可能となった (Fig. 2-1)。この結果から、嫌気性セルロース分解細菌と好気性の非セルロース分解細菌の共存が群集によるセルロース分解に必須であることが示された。しかし全ての好気性分離株がセルロース分解にポジティブな効果を示すわけではなかった。

*C. straminisolvens* CSK1 株との2種混合培養でセルロース分解がみられた3種の好気性分離株 (*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3、*Brevibacillus* sp. M1-5、*Bordetella* sp. M1-6 株) と、*C. straminisolvens* CSK1 株との4種混合培養系 (CSK+M356) は、original microflora を上回るほどの高いセルロース分解活性を有していた (Fig. 2-2)。これら3種の好気性分離株は混合培養系のセルロース分解を促進する効果が有ると考えられる。セルロース分解 *Clostridium* 属細菌と、セルロース分解産物 (e.g., 糖、水素) を消費するような非セルロース分解菌との共培養により、純粋培養時よりもセルロース分解効率が改善されるという報告はこれまでもいくつかなされている[72, 86, 88, 94, 128]。しかしこれらの系はいずれも2種だけの混合培養系であり、またどちらの微生物も嫌気性で、培養も嫌気条件下でおこなわれている。また好気性セルロース分解 fungus の *Trichoderma harzianum* と嫌気性非セルロース分解細菌 *Clostridium butyricum* との共培養によるセルロース分解効率の改善の報告もある[123]。一方、本研究で構築した CSK+M356 は、セルロース分解 *Clostridium* 属細菌と3株の好気性細菌というこれまでに報告されていないタイプの組み合わせによる好気条件下でのセルロース分解の効率化、という点で新規な混合培養系であるといえよう。また水田土壌のようなセルロース分解が起こる場所において、セルロース分解 *Clostridium* 属細菌と好気性細菌はしばしば同時に検出されている[e.g., 73]。CSK+M356 はセルロース分解 *Clostridium* 属細菌と好気性細菌との相互作用を理解するうえで、非常によいモデルであると考えられる。

*C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養と CSK+M356 のセルロース分解過程を比較した実験 (Fig. 2-4) から、以下に述べる3点が、群集による高効率セルロース分解の要因であると考えられる。

第1点目は、好気性細菌が酸素を消費し、*C. straminisolvens* CSK1 株が生育可能な嫌氣的、還元的環境を作り出すことである。好気性細菌は培養開始とともに PCS 培地に含まれる peptone や yeast extract に含まれる成分であるペプチドやアミノ酸を利用して生育、および酸素消費をされると考えられる。実際、これらの好気性分離株には、BiOLOG 解析によって、様々なアミノ酸の利用性があることが示されている[140]。しかし CSK+M356 のセルロース分解効率が嫌気条件で著しく低下する (Fig. 2-2) ことを考えると、培養液の嫌気化以外にも重要な要因があると考えられる。

第2点目は、好気性細菌による余剰なセルロース分解産物の消費である。水溶性糖、特に cellobiose は cellulase 発現の抑制[57, 134]、cellulase 活性の阻害[58, 69]などにより、セルロース分解 *Clostridium* 属細菌のセルロース分解効率を下げる働きがあると報告されている[75]。

CSK+M356では*C. straminisolvens* CSK1株純粋培養時よりも、濾紙分解量は多いのにもかかわらず培養液中の水溶性糖の蓄積は低く抑えられていた (Fig. 2-4(c))。いずれかの好気性細菌による水溶性糖の消費がCSK+M356による高効率セルロース分解の要因のひとつであると推察できる。

第3点目は、好気性細菌による培養液pHの中性化である。*C. straminisolvens* CSK1株のセルロース分解の至適初期pHは7.5であり、pH 6.0以下では分解がほとんど起こらない (Fig. 1-4(b))。CSK+M356の培養過程においては、pHはいったん6以下にまで低下するものの、その後中性付近まで上昇していった (Fig. 2-4(b))。好気性細菌がpHを中性化する機構は明らかにはなっていないが、酢酸の消費 (Fig. 2-4(d)) はその一因であると考えられる。また original microflora を初期pH 5や6で培養すると、一時的にpHが7-8にまで上昇する、という知見 (Fig. 0-6) や、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3、*Brevibacillus* sp. M1-5、*Bordetella* sp. M1-6株をPCS培地 (初期pH 7.2) で純粋培養すると、培養液のpHが8-9にまで上昇する、という知見 (data not shown) が得られている。これは好氣的なアミノ酸の資化によるアンモニアの生成によると推察される。

CSK+M356は original microflora と同様に、継代培養に対して機能的な安定性を有しており、継代培養後もそのセルロース分解効率やpH推移のパターンに変化はみられなかった。しかし構造的には継代培養に対して不安定であり、継代の過程でメンバーのうちの1種、*Brevibacillus* sp. M1-5株が消失してしまった (Fig. 2-6)。一方、original microflora では *Brevibacillus* sp. M1-5株は40回以上の継代培養後にも残存していた [45]。*Brevibacillus* sp. M1-5株がCSK+M356において残存できない理由は明らかではないが、original microflora に存在し、*Brevibacillus* sp. M1-5株の生育にポジティブな効果を持つメンバーをCSK+M356が欠いている、という可能性が考えられる。そのような細菌の候補としては、original microflora からPCR-DGGE解析によって優占種として検出されている *Clostridium* sp. FG4株が考えられる。この点をふまえ、第3章では継代培養に対して機能的、構造的に安定な混合培養系の構築を試みた。

## 第3章

# 5種の分離株の混合培養による 安定な人工生態系の構築

## 第1節 緒言

自然界、ならびに様々な人工的環境において、ある種の微生物が単独で存在することはほとんど無く、他の微生物と様々な相互作用を及ぼしあいながら共存していると考えられている。有機性廃棄物や廃水の微生物学的処理などの人工的環境においては特に、長期間の運転や様々な攪乱などに対する微生物群集の機能、構造の安定性を維持することは非常に重要な問題と捉えられている[14, 34, 35, 47, 109, 125]。しかし複数種の微生物が安定に共存するメカニズムは未だ明確にはなっていない。そのメカニズムの理解を困難にしている要因のひとつは、複雑な微生物群集における全ての構成微生物種の特が困難である、ということである。さらにそれら構成微生物種の群集中での機能や相互作用を明らかにすることはより困難である。そこで本研究では、ひとつの微生物群集から分離した微生物の混合培養により、その微生物群集の機能と安定性を再現し、その人工生態系を解析することで上記のメカニズムを解明することを目指した。このようなアプローチは、微生物群集による難分解性物質の分解に関する研究[11, 17, 23, 28, 117]や、口腔内微生物群集の研究[36, 92]などの分野でよく用いられている。このような研究では、2種の微生物間の関係性を解析し、相利共生的関係にある2種の微生物の安定な共存に関して議論されている。しかしその一方で、第3の微生物種の存在が2種の微生物の関係性に影響を与える、という報告もなされている[e.g., 26, 62]。それゆえ、自然界の複雑な微生物群集のより深い理解のためには、多数種(3種以上)の微生物間の相互作用ネットワークを調べていく必要があると考えられる。

メンバーが規定された混合培養によって安定な機能性微生物群集が構築できた場合、全てのメンバーの純培養時での特徴を試験することが可能であり、また全ての構成メンバーの群集中での挙動をモニタリングすることも比較的容易になる。さらに、構成メンバーのうちのひとつだけを除いたような混合培養系(ノックアウト群集)を構築することが可能であり、このノックアウト群集を解析することで除かれたメンバーの群集内での機能、役割や、他のメンバーに及ぼしている影響について評価できると考えた。このノックアウト群集の解析というアプローチは、ある遺伝子の機能をその遺伝子の発現を抑えることで評価しようという、遺伝子破壊実験と同じ考え方をもとにしている。微生物生態学の分野においても、2-bromoethanesulfonate 添加によるメタン生成古細菌の阻害[e.g., 38]や、モリブデン酸塩添加による硫酸還元細菌の阻害[e.g., 90]などのように、特定の微生物グループの機能のみを阻害することで、その機能、役割を調べる手法としてこのアプローチはよく用いられている。

本論文の第2章では original microflora から分離した嫌気性セルロース分解分離株の *C. straminisolvans* CSK1 株と、3株の好気性非セルロース分解分離株 (*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株、*Bordetella* sp. M1-6 株) とを混ぜ合わせることで、高効率セルロース分解能を有する微生物群集 (CSK+M356) を構築した。CSK+M356 は original microflora と同様に、継代培養に対して機能的な安定性は有していたが、構造的には不安定であり、継代の過程でメンバーのうちの1種、*Brevibacillus* sp. M1-5 株が失われてしまった (Fig. 2-6)。 *Brevibacillus* sp. M1-5 株が CSK+M356 において残存できない理由は明らかではないが、

original microflora に存在し、*Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育にポジティブな効果を持つメンバーを CSK+M356 が欠いている、という可能性が考えられた。そのような細菌の候補としては、original microflora から PCR-DGGE 解析 (fig. 0-5) によって優占種として検出されている *Clostridium* sp. FG4 株が考えられた。

本章では、CSK+M356 に *Clostridium* sp. FG4 株を加えることにより安定な微生物群集を構築したこと、およびそのノックアウト群集を構築、解析した結果を報告する。

## 第2節 セルロース分解能を有する安定な人工生態系 (SF356)

第2章で解析した4種混合培養系、CSK+M356 に *Clostridium* sp. FG4 株を加えた5種混合培養系 (以下 SF356 と記載) を構築した。SF356 は好気静置条件下で濾紙を分解するものの、その効率は original microflora や CSK+M356 より有意に低かった ( $5.29 \pm 0.20$  g/L for 8 days, Fig. 2-2)。しかしその一方で、SF356 は継代培養に対する機能的、構造的安定性を有していた。まず機能的には、20回の継代培養後にも SF356 のセルロース分解効率に大きな変化はみられなかった ( $5.12 \pm 0.12$  g/L for 8 days)。SF356 の継代培養前後 (2nd、22nd generation) の day 6 における各分離株の存在割合を定量的 real-time PCR 法 (材料と方法 16) により解析した結果を Fig. 3-1 に示す。20回の継代培養後にも5種の菌株全てが検出され、SF356 は構造的にも安定であることが示された。そこでこの5種混合培養系を安定な群集のモデルとして、さらなる解析をおこなった。

## 第3節 ノックアウト群集の構築とその安定性の検討

SF356 における各メンバー間の関係性、相互作用を理解するために、SF356 のメンバーのうちのひとつを除いた4種混合培養系、ノックアウト群集を構築した (Fig. 3-2)。以下、各ノックアウト群集を  $\Delta X$  と表記する。ここで X は除かれたメンバーの株名である。例えば  $\Delta$ CSK1 は *C. straminisolvans* CSK1 株が除かれた群集、すなわち *Clostridium* sp. FG4、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株、*Bordetella* sp. M1-6 株からなる4種混合培養系である。同様に、 $\Delta$ FG4、 $\Delta$ M1-3、 $\Delta$ M1-5、 $\Delta$ M1-6 を構築し、それらの継代培養に対する安定性を調べた。

ノックアウト群集の継代培養前後 (2nd、22nd generation) の day 6 における各分離株の存在割合を定量的 real-time PCR 法 (材料と方法 16) により解析した結果を Fig. 3-1 に示す。またその結果を簡略に Table 3-1 にまとめた。 $\Delta$ M1-3 と  $\Delta$ M1-6 では SF356 と同様に、全てのメンバーは継代培養後にも残存しており、またそのセルロース分解効率にも変化はみられなかった。一方で他のノックアウト群集では一部のメンバーの消失がおこった。メンバーの消失が見られた系に関しては、特異的 PCR 法 (材料と方法 15) により消失の時期、順序を確認した。

唯一のセルロース分解細菌 *C. straminisolvans* CSK1 株を除いた  $\Delta$ CSK1 では、1st generation からセルロース分解は見られず、また継代培養に対して構造的に不安定であった。継代培養の過程で、*Clostridium* sp. FG4 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の

順に消失し、最終的には *Bordetella* sp. M1-6 株のみが残った。

ΔFG4 (第2章の CSK+M356 と同じもの) では、第2章でも確認されたように、継代の過程でセルロース分解能は失われなかったものの、*Brevibacillus* sp. M1-5 株が消失した。

ΔM1-5 では、ΔCSK1 でみられたのと同様に 2nd generation における *Bordetella* sp. M1-6 株の存在比率が他の系と比較して非常に大きかった。また継代の過程で *C. straminisolvans* CSK1 株、*Clostridium* sp. FG4 株の順に消失が見られた。セルロース分解は *C. straminisolvans* CSK1 株の消失とほぼ同時期 (10th、12th generation) におこらなくなった。

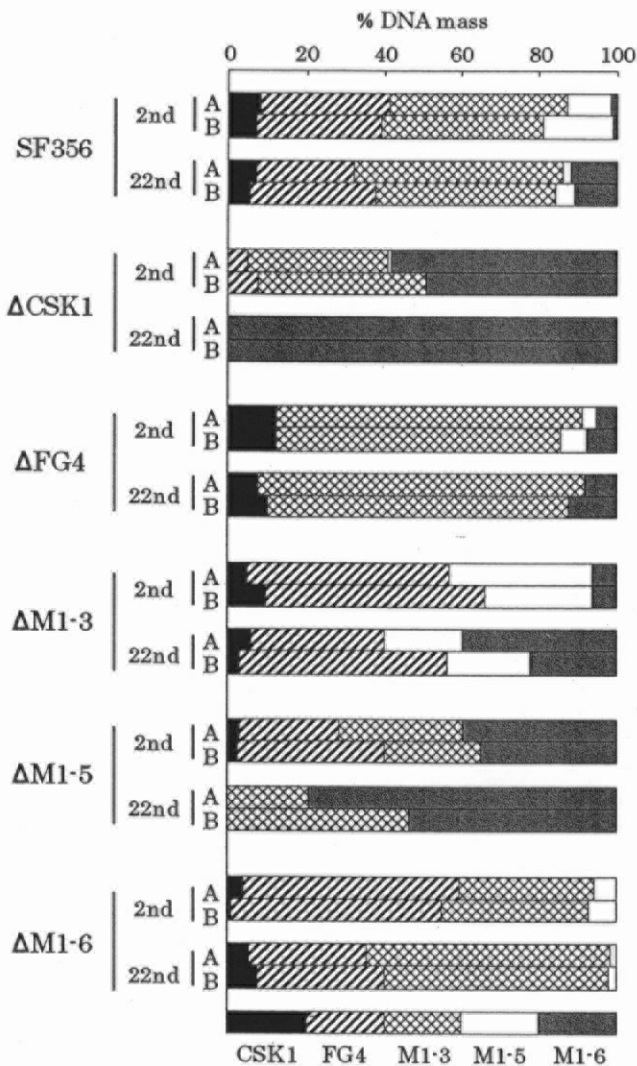


Fig. 3-1. Relative abundance of each bacterium in SF356 and the knockout communities at day 6 of the 2nd and 22nd generations. The data show the results obtained from two independent subcultured communities (designated as A and B). The values are expressed as the means of two replications of real-time PCR experiments. The variation between the real-time PCR experiments for the same DNA sample was less than 20%.

Table 3-1. Stability of SF356 and the knockout communities.

Mixed culture	2nd generation					22nd generation				
	CSK1	FG4	M1-3	M1-5	M1-6	CSK1	FG4	M1-3	M1-5	M1-6
SF356	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\Delta$ CSK1	N.I.	+	+	+	+	N.I.	-	-	-	+
$\Delta$ FG4	+	N.I.	+	+	+	+	N.I.	+	-	+
$\Delta$ M1-3	+	+	N.I.	+	+	+	+	N.I.	+	+
$\Delta$ M1-5	+	+	+	N.I.	+	-	-	+	N.I.	+
$\Delta$ M1-6	+	+	+	+	N.I.	+	+	+	+	N.I.

+, detected; -, not detected; N.I., not inoculated in the mixed culture.

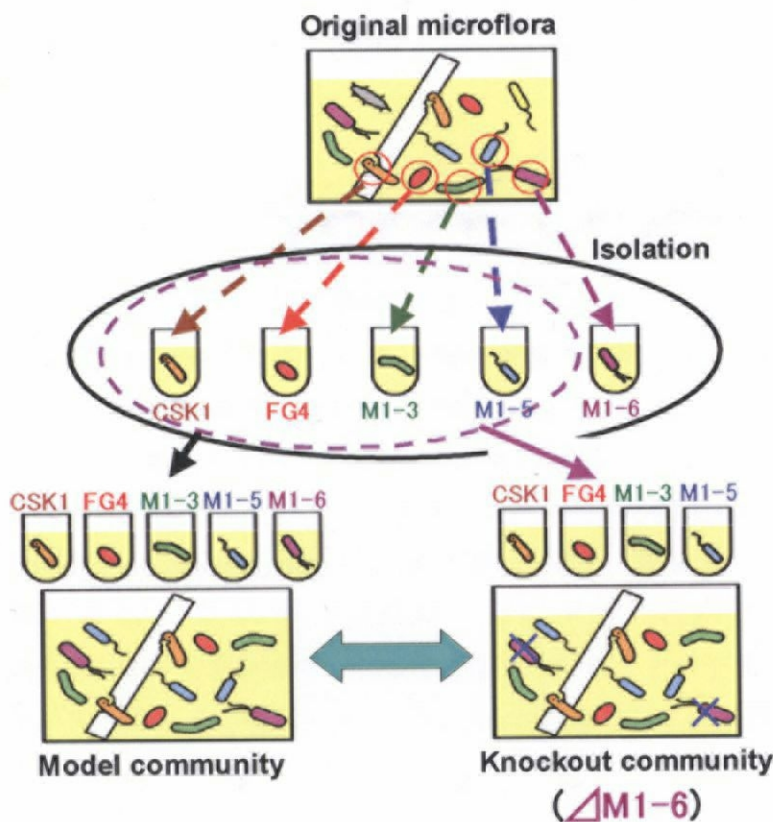


Fig. 3-2. The outline for construction of the knockout communities. This figure shows the one of the knockout communities,  $\Delta$ M1-6, in which *Bordetella* sp. strain M1-6 is eliminated. In the same way,  $\Delta$ CSK1,  $\Delta$ FG4,  $\Delta$ M1-3 and  $\Delta$ M1-5 were constructed.

#### 第4節 SF356 とノックアウト群集のセルロース分解過程の解析 (材料と方法 17)

SF356 における各メンバーの役割を理解するために、SF356 と各ノックアウト群集のセルロース分解過程を解析、比較した。解析には各群集の 2nd generation を使用した。

##### 第1項 セルロース分解効率

各群集の day 4、day8 における濾紙分解量の定量結果を Fig. 3-3(a)に示す。ΔCSK1 では濾紙分解はおこらなかった。ΔFG4 は調べた群集のうちで最も高い濾紙分解効率が観察された。また ΔM1-5 でも SF356 よりも高い濾紙分解効率が観察された。このことから *Clostridium* sp. FG4、*Brevibacillus* sp. M1-5 株はセルロースの効率的分解に対してはネガティブな効果を持つことが示唆された。

##### 第2項 培養液 pH の推移

各群集の培養液 pH の推移を Fig. 3-3(b)に示す。SF356、ΔM1-3、ΔM1-5、ΔM1-6 の pH 推移のパターンはよく似ており、day 3-4 で pH 6 付近にまで低下し、その後 7 以上にまで回復することは無かった。一方で ΔFG4 では day 3 までにいったん pH 6 以下にまで低下したものの、その後 pH 7.0-7.3 にまで回復した。ΔCSK1 では pH の低下はおこらず、序々に約 9.0 にまで上昇していった。

##### 第3項 培養液中のセルロース分解代謝産物

各群集の培養液中のセルロース分解代謝産物 (水溶性糖、酢酸、エタノール) の濃度を定量した。各群集におけるセルロース分解効率の違いによる影響を無くすために、8 日間の培養での各代謝産物の増加量 (mg) を同じく 8 日間の培養で分解された濾紙の重量 (g) で割った相対値をもって、各代謝産物の蓄積とした (Fig. 3-3(c, d, e))。

ΔCSK1 では濾紙分解が起こらないため、各代謝産物の増加もみられなかった。ΔFG4 では水溶性糖の蓄積が調べた群集中で最も多く、酢酸とエタノールの蓄積が調べた群集中で最も少なかった。この結果から *Clostridium* sp. FG4 株が糖を醗酵して酢酸、エタノールを生成していることが予想できる。ΔM1-3 では酢酸の蓄積が調べた群集中で最も多く、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株が群集中で酢酸を消費していることが予想された。ΔM1-5 では水溶性糖の蓄積が SF356 よりも有意に多く、*Brevibacillus* sp. M1-5 株が群集中で糖を消費していることが予想された。



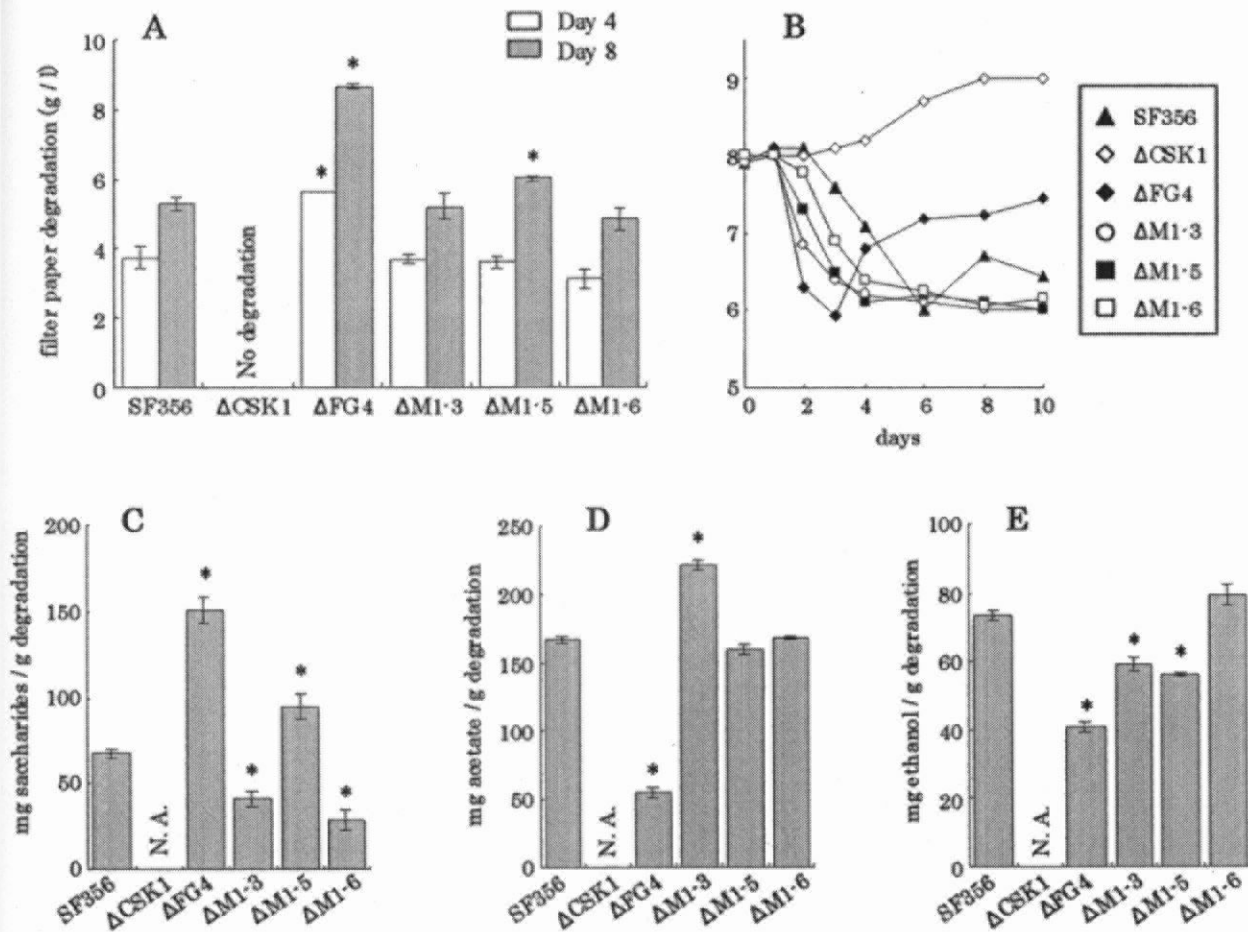


Fig. 3-3. Comparisons of the filter paper degradation processes of SF356 and the knockout communities. (A) filter paper degradation over a period of 4days (open bars) or 8 days (gray bars), (B) pH value, (C) accumulation of oligosaccharides, (D) accumulation of acetate, (E) accumulation of ethanol. Accumulation of the metabolites is represented as an increase in the metabolites during an 8-day period of cultivation (mg) per amount of filter paper degraded over a period of 8 days (g). Values are expressed as the means of two culture solution samples. The error bars indicate SD. Asterisks represent significantly different ( $P < 0.05$ ) from SF356. N. A., not applicable, because filter paper degradation did not occur.

## 第5節 非セルロース分解分離株の機能の再検討

第4節の解析で、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株の酢酸の利用といったような、第1章での各分離株の生理学的解析の結果 (Table 1-7) とは異なる予想が得られた。そこで *C. straminisolvans* CSK1株を純粋培養した後の培養濾液で非セルロース分解分離株を培養し (材料と方法 19)、培養後の水溶性糖、酢酸、エタノールの増減を調べた (Table 3-2)。水やエタノールの蒸散の影響を考慮して、negative control としては菌を接種しない培養濾液を他と同様に incubate したものを使用した (Uninoculated (after incubation) in Table 3-1)。

*C. straminisolvans* CSK1株の培養濾液では、いずれの分離株も PCS-basal 培地よりもよく生育した。*C. straminisolvans* CSK1株の培養濾液で *Clostridium* sp. FG4株を培養したところ、糖の減少がみられ、また酢酸の大幅な増加がみられた。エタノールもわずかではあるが増加していた。この結果は第1章 (Table 1-7)、本章第4節の結果と一致し、*Clostridium* sp. FG4株が糖を醗酵し、酢酸、エタノールを生成するという予想を裏付けた。*C. straminisolvans* CSK1株の培養濾液での *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株の培養では、酢酸が検出限界以下にまで減少し、また水溶性糖の濃度も有意に減少した。この結果は本章第4節で得られた予想 (*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株の酢酸利用) を支持するものである。第1章の解析で glucose の利用性がみられ、また本章第4節でも糖の消費が示唆されていた *Brevibacillus* sp. M1-5株であったが *C. straminisolvans* CSK1株の培養濾液での培養では水溶性糖の減少はみられなかった。その一方で、エタノールの減少と酢酸の増加が観察された。*C. straminisolvans* CSK1株の培養濾液での *Bordetella* sp. M1-6株の培養では、特筆すべき変化はみられなかった。

Table 3-2. Pure culture of non-cellulolytic isolates in PCS-basal medium and in the cell-free culture filtrate of *C. straminisolvans* CSK1

Strains	PCS medium	Cell-free culture filtrate of <i>C. straminisolvans</i> CSK1			
	OD <sub>600</sub> <sup>a</sup> (SD)	OD <sub>600</sub> (SD)	Saccharides (mg/L) (SD)	Acetate (mg/L) (SD)	Ethanol (mg/L) (SD)
Uninoculated (before incubation)	0.006 (0.001) <sup>b</sup>	0.005 (0.002)	506.5 (39.9)	254.1 (2.0)	200.2 (14.5)
Uninoculated (after incubation)	0.009 (0.002)	0.007 (0.002)	520.5 (1.9)	275.6 (1.0)	158.5 (6.9)
<i>Clostridium</i> sp. FG4 <sup>c</sup>	0.048 (0.010)	0.110 (0.006)	241.0 (10.2)	461.3 (6.6)	205.0 (4.9)
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3	0.676 (0.161)	0.917 (0.038)	454.3 (0.9)	ND <sup>d</sup>	180.1 (2.1)
<i>Brevibacillus</i> sp. M1-5	0.733 (0.133)	0.940 (0.014)	536.0 (9.9)	609.0 (8.0)	2.4 (0.7)
<i>Bordetella</i> sp. M1-6	0.420 (0.040)	0.511 (0.006)	548.9 (14.4)	206.8 (13.2)	141.2 (4.9)

<sup>a</sup> OD<sub>600</sub>, optical density at 600 nm.

<sup>b</sup> The values in parentheses are the standard deviations of two independent experiments.

<sup>c</sup> *Clostridium* sp. FG4 was incubated under anaerobic conditions for 5 days, while the others were incubated under aerobic static conditions for 2 days.

<sup>d</sup> ND, not detected.

## 第6節 考察

*C. straminisolvans* CSK1、*Clostridium* sp. FG4、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3、*Brevibacillus* sp. M1-5、*Bordetella* sp. M1-6 株という original microflora から PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) によって優占種として検出されていた全ての細菌の組み合わせによる 5 種混合培養系 (SF356) は、セルロース分解効率こそやや低いものの、継代培養に対して機能的、構造的な安定性を有していた (Fig. 3-1)。環境微生物学、微生物生態学の分野、特に微生物群集による難分解性物質の分解といった研究において、本研究で用いたような手法はよく見受けられる。すなわち、(1)ある物質 (難分解性物質など) を唯一の炭素 (もしくは窒素、エネルギー) 源とした培地で集積培養をおこない、微生物コミュニティを得る、(2)群集構造解析 (PCR-DGGE 解析など)、優先種の分離をおこなう、(3)分離株を混合培養し、それら分離株の機能や関係性を調べる、という手法である。いくつかの文献では相利、または片利共生関係にある 2 種の微生物の安定的共存に注目している [e.g., 28, 117]。またいくつかのグループは 3 種以上からなる混合培養系を構築し、そのメンバー間での代謝物のフローの解析、共生的関係の解明などを報告している [11, 17, 23] が、しかしこれらの系では全メンバーの安定的共存は報告されていない。本章で構築した 5 種混合系、SF356 は 5 種の全メンバーが長期間安定に共存するという点で全く新規な系であるといえる。

SF356 のメンバーのうちのひとつを除いた 4 種混合培養系、ノックアウト群集を構築し、各細菌の *in situ* での役割の推定を試みた (Fig. 3-3)。またそこで推定された各分離株の機能 (特に基質利用能) に関して、*C. straminisolvans* CSK1 株の純粋培養濾液における培養によって、確認をおこなった (Table 3-1)。第 1 章、第 2 章の結果も考慮して、以下のように各分離株の群集における役割を推定し、Fig. 3-4 にそれをまとめた。

### (i) *C. straminisolvans* CSK1 株

*C. straminisolvans* CSK1 株はセルロース分解能を有する唯一の分離株であり、*C. straminisolvans* CSK1 株を除いた  $\Delta$ CSK1 ではセルロース分解が起こらず (Fig. 3-3(a))、群集によるセルロース分解に必須の細菌であるといえる。しかし第 2 章で明らかになったように、*C. straminisolvans* CSK1 株が生育し、効率よくセルロースを分解するためには、好気性分離株による酸素の消費、pH の中性化などの作用が必要である。さらに *C. straminisolvans* CSK1 株の培養濾液が好気性非セルロース分解分離株の生育を促進するという結果 (Table 3-2) も得られたことから、この両者は相利共生的な関係にあると考えられる。

### (ii) *Clostridium* sp. FG4 株

*Clostridium* sp. FG4 株は *C. straminisolvans* CSK1 株によるセルロース分解により生じた水溶性糖を利用し、多量の酢酸と少量のエタノールを生成していることがノックアウト群集の解析から示唆された。またこのことは純粋培養の結果 (Table 1-7, 3-1) と一致している。水溶性糖、特に cellobiose は cellulase 発現の抑制 [57, 134]、cellulase 活性の阻害 [58, 69] などにより、セルロース分解 *Clostridium* 属細菌のセルロース分解効率を下げる働きがあると報告されてい

る[75]。そのため *Clostridium* sp. FG4 株による水溶性糖の消費は高効率セルロース分解にポジティブな効果があると考えられる。しかし  $\Delta$ FG4 における水溶性糖の蓄積は SF356 よりも多い (Fig. 3-3(c)) のにもかかわらず、 $\Delta$ FG4 では SF356 よりも高い濾紙分解効率が観察された (Fig. 3-3(a))。このことから、*Clostridium* sp. FG4 株はなんらかのセルロース分解に対してネガティブな効果を有しており、それが糖の消費というポジティブな効果を上回っていると考えられる。培養液 pH 推移パターンの結果 (Fig. 3-2(b)) から、その要因が推察できる。 $\Delta$ FG4 において培養液 pH はいったん 6 以下にまで低下するが、その後中性付近にまで回復した。一方で、SF356 では培養期間を通して 6 前後の低 pH が保たれていた。この低 pH は *Clostridium* sp. FG4 株の過剰な酢酸生成によって引き起こされると考えられる。この低 pH が、*C. straminisolvans* CSK1 株 (6 以下の低 pH でセルロース分解効率が低い、Fig. 1-4(b)) によるセルロース分解に阻害的に働いていると考えられる。

### (iii) *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株

第2章の結果から、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株は酸素の消費、pH 中性化によるセルロース分解の促進に大きく貢献していると考えられる。ノックアウト群集の解析 (Fig. 3-3(d)) により *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株は酢酸を消費していると予想された。BiOLOG による解析 (Table 1-2, 1-3) では酢酸の利用性はみられなかったが、CSK1 株の培養濾液での培養実験 (Table 3-2) により、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株が酢酸の利用能を有していることが確認された。これは *C. straminisolvans* CSK1 株の培養濾液が実際の環境 (PCS-FP 培地での濾紙分解) をよりよく反映しているためと考えられる。*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株による酢酸の消費は、pH の低下によるセルロース分解阻害という酢酸のネガティブな効果を軽減していると推察される。

また *C. straminisolvans* CSK1 株の培養濾液での培養実験において、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株による水溶性糖の消費がみられた (Table 3-2)。このことは、BiOLOG による解析で *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株に嫌気条件下での glucose 利用性がみられたという結果 (Table 1-2, 1-3)、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の培養上清、および cell free extract にそれぞれ exoglucanase 活性、および cellobiase 活性がみられたという結果[142]と一致する。しかし  $\Delta$ M1-3 で水溶性糖の蓄積がそれほどみられない (Fig. 3-3(c)) ことなどから、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株による糖の消費は全体としての寄与は小さいと推測される。

### (iv) *Brevibacillus* sp. M1-5 株

第2章の結果から、*Brevibacillus* sp. M1-5 株は酸素の消費、pH 中性化によるセルロース分解の促進に貢献していると考えられる。 $\Delta$ M1-5 において水溶性糖の蓄積が SF356 よりも有意に多かったこと (Fig. 3-3(c)) から、*Brevibacillus* sp. M1-5 株が糖を消費していることが予想された。BiOLOG による解析 (Table 1-2) でも *Brevibacillus* sp. M1-5 株には glucose 利用性が認められている (cellobiose 利用性は無し)。しかし *C. straminisolvans* CSK1 株の培養濾液での培養実験では、*Brevibacillus* sp. M1-5 株による糖の消費はみられなかった (Table 3-2)。この原因

としては *C. straminisolvens* CSK1 株の培養濾液に含まれている糖が、glucose としてではなく、cellobiose やオリゴ糖として存在しているためと考えられる。実際、original microflora の稲わら分解過程において、水溶性糖は約 600 mg/L の濃度で検出されれのににもかかわらず、glucose としては 10 mg/L 以下しか検出されないと報告されている[45]。

CSK1 株の培養濾液での培養実験で、*Brevibacillus* sp. M1-5 株によるエタノールの減少と酢酸の増加が観察された (Table 3-2)。また *Brevibacillus* sp. M1-5 株のエタノール利用に関しては、エタノールを添加した PCS 培地での培養実験でも確認されている (Table 1-2)。しかし  $\Delta$  M1-5 において、酢酸やエタノールの蓄積が SF356 と大きく変わらないことから (Fig. 3-3(d, e))、この *Brevibacillus* sp. M1-5 株によるエタノールの消費と酢酸の生成は、群集中における寄与はそれほど大きくは無いと考えられる。

#### (v) *Bordetella* sp. M1-6 株

第2章の結果から、*Bordetella* sp. M1-6 株は酸素の消費、pH 中性化によるセルロース分解の促進に貢献していると考えられる。第1章の結果 (Table 1-7)、および本章のノックアウト群集実験、CSK1 株の培養濾液での培養実験から、*Bordetella* sp. M1-6 株はセルロース分解に伴う代謝産物 (水溶性糖、エタノール、酢酸) には依存していないと考えられる。*Bordetella* sp. M1-6 株は PCS 培地に含まれている peptone、yeast extract の成分に完全に依存していると推察される。

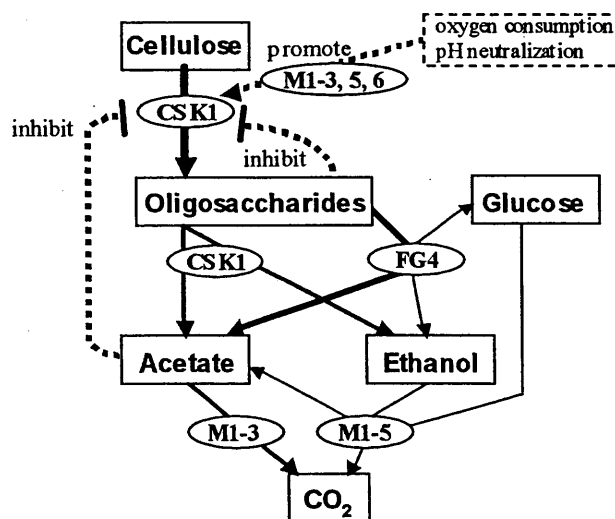


Fig. 3-4. Network model of substrate flow and the putative roles of each member in SF356. The solid lines indicate the flow of the substrates. The thickness of each line represents the relative contribution of a particular pathway in SF356. The dotted lines indicate promoting or inhibiting factors with respect to the efficiency of cellulose degradation. The names of the substrates are presented in boxes. The designations of the bacterial strains are presented in ovals.

SF356 は継代培養に対する機能的、構造的安定性を有していた。上記のような各メンバーの機能を理解するのに加えて、各メンバー間の関係性、相互作用を理解することで、その安定性のメカニズムに対する理解が深まると考えられる。本章では20回の継代培養過程におけるSF356、およびそのノックアウト群集の構造を解析することで、除かれたメンバーの他のメンバーに対する影響を評価した (Fig. 3-1)。

ΔCSK1 では継代培養の過程で *Clostridium* sp. FG4、*Brevibacillus* sp. M1-5、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の順に消失が起こった。この結果から、これら3株、特に *Clostridium* sp. FG4 株が *C. straminisolvans* CSK1 株に強く依存していることが予想される。この依存は上記の各分離株の役割 (Fig. 3-4)、すなわち、これら3株は *C. straminisolvans* CSK1 株によるセルロース分解産物 (糖、酢酸、エタノール) を利用している、という知見からも推測できる。とくに *Clostridium* sp. FG4 株は嫌気条件下の純粋培養条件で、糖を添加しない PCS 培地では生育できない (data not shown) ことから、セルロース分解産物に完全に依存していると考えられる。

ΔFG4 では *Brevibacillus* sp. M1-5 株が消失したが、これも *Brevibacillus* sp. M1-5 株が *Clostridium* sp. FG4 株の代謝産物に依存しているため、と予想される。*Brevibacillus* sp. M1-5 株は glucose を利用可能であるが cellobiose、およびおそらくオリゴ糖は利用できない。*Clostridium* sp. FG4 株の培養上清からオリゴ糖を分解する酵素活性が検出されたという報告 [142] もあり、*Clostridium* sp. FG4 株によるオリゴ糖の分解により生じた glucose を *Brevibacillus* sp. M1-5 株が利用している、と予想される。

ΔM1-5 では、*C. straminisolvans* CSK1 株の消失が観察された。この結果は上記のような代謝産物を介した関係性からは説明できない。ΔM1-5 の群集構造で特徴的なのが 2nd generation において *Bordetella* sp. M1-6 株の存在比率が他と比べて非常に高くなっている、という点である。このことから *Brevibacillus* sp. M1-5 株は *Bordetella* sp. M1-6 株の生育を抑制していることが推測される。同様に、ΔM1-3 ではメンバーの消失こそ起こらないものの、2種の好気性分離株 (*Brevibacillus* sp. M1-5 株、*Bordetella* sp. M1-6 株) の存在比率が高くなっており、これら3種の好気性分離株は互いに抑制的、もしくは競争的な関係にあると推察される。SF356 の安定性にはこのようなネガティブな関係性も必要なのかもしれない。

以上のように SF356 のメンバー間には、相利共生的関係 (e.g., *C. straminisolvans* CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株) や競合的關係 (e.g., 3種の好気性分離株) といったように、様々なタイプの関係性が存在することが示唆された。多数種の微生物の安定的共存にはこのような様々なタイプの相互作用のバランスがうまく取れていることが重要であると考えられる。そこで次の第4章では、SF356 におけるメンバー間の相互作用ネットワーク (微生物間ネットワーク) に関してさらに詳細な解析をおこなった。