

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

第1節 緒言

第3章では、様々な組み合わせの混合培養系における継代培養前後の群集構造解析をおこなうことで、各メンバー間の関係性、相互作用を調べた。その結果、SF356のメンバー間には、共生的関係や競合的关系といった、様々なタイプの関係性が存在することが示唆され、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た。ただ第3章でおこなった解析は長期間の継代培養における細菌群集のダイナミクス解析であり、おおまかな関係性、相互作用を観察したに過ぎない。また第3章で推察された関係性の中には、セルロース分解代謝産物を介した関係性として説明可能なものもあったが、その促進、あるいは抑制機構が不鮮明な関係性もみられた。本章では、各メンバー間の関係性、相互作用をさらに詳細に解析するとともに、その促進や抑制のメカニズムについても解析をおこなった。

一般的な生物とは異なり、微生物間相互作用の場合には、直接的な接触を介した関係性もいくつか報告されてはいるものの (*Bdellovibrio* による多種細菌の溶菌[98]、*E. coli* による接触を介した他菌の生育阻害[9]など)、その多くは環境の変化を介したものであると考えられる。環境の変化には、pHや溶存酸素濃度の変化など、物理的な環境条件も挙げられるが、特定の物質を介した関係性も、非常に重要であると考えられる。そのような相互作用に関わる物質は、炭素、窒素、エネルギー源などの中心代謝に関わる物質と、抗生物質やビタミン類などの二次代謝産物とに大きく分類することができる。中心代謝に関わる物質を介した相互作用の例としては、基質の競合による競争的关系[e.g., 18, 39]、難分解性物質の複数種微生物による共同的分解[e.g., 28, 117]、メタン発酵における異種微生物間水素伝達[e.g., 55, 52, 74, 105]などが挙げられる。一方で二次代謝産物を介した相互作用の例としては、抗生物質[e.g., 30, 95]、ビタミン類 (e.g., pantothenate [26], folate [40], hemin [41])、アミノ酸[e.g., 110]など、多様な種類の化合物が挙げられる。本章では、特に二次代謝産物を介した相互作用がSF356のメンバー間に存在しているのではないかと考え、各分離株の純粋培養の濾液が他の分離株の生育にどのような影響を与えるのかを調べた。その結果、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株の培養濾液に*C. straminisolvens* CSK1株に対する高い生育促進効果がみられたので、さらに詳細な解析をおこなった。

これまでの解析では、他菌の生育に影響を与えるような関係性、相互作用しかみてこなかった。しかし異種微生物の存在は、生育だけではなくその振る舞いにも影響を与えていると考えられる。微生物が実際の環境中では純粋培養時とは異なる性質を示すという報告[83]、異種微生物の存在により発現するタンパク質 (あるいは mRNA) が変化するという報告[29, 30, 77, 79, 127]もいくつかある。そこで本章では、特にそれまでの解析から強い相利共生関係にあると示唆された*C. straminisolvens* CSK1株と*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株の組み合わせに関して、純粋培養系と2種混合培養系における発現タンパク質の違いを解析した。

また最後に、これまでに解析してきた1対1の関係性が、生態系の中でどれほど寄与しているのか、第3の微生物の存在によりその1対1の関係性に変化が生じるのか、そして全体

としてどのようにバランスが取れているのか、を明らかにすべく、original microflora の分離株のうち4種を用いて、純粋培養系、および2-4種混合培養系における各菌株の生育をモニターし、各系における各菌株の生育を比較することで微生物間ネットワークの包括的理解を目指した。

第2節 培養濾液による他菌の生育の促進、抑制

本論文の第3章までに、original microflora のメンバー間の様々なタイプの相互作用が明らかとなった (e.g., セルロース分解産物を介した相互作用、pH や ORP の変化を介した相互作用)。本節では、それ以外のタイプの相互作用をみることを目的として、各分離株の純粋培養の濾液を調製し、その培養濾液が他の分離株の生育にどのような影響を与えるのかを調べた。

第1項 培養濾液添加培地での培養実験 (材料と方法 20)

original microflora からの分離株、および対照として *E. coli*、*B. subtilis* を使用して、各菌株を純粋培養した濾液を調製し、その培養濾液と PCS-basal 培地とを 1:1 で混合したものを培地として各菌株を培養し、その生育 (*C. straminisolvans* CSK1 株に関しては生育ではなく濾紙の分解量) をコントロール培地で培養したものと比較した。その結果を Table 4-1 に示す。

非セルロース分解細菌の培養濾液 (*Bacillus* sp. M1-1 株を除く) は *C. straminisolvans* CSK1 株の生育 (セルロース分解) に促進的に働いた。この結果から、これらの非セルロース分解細菌が *C. straminisolvans* CSK1 株の生育促進物質を産生し、培養液中に放出していることが予想された。特に *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の培養濾液が高い促進効果を示していたので、次項でさらに詳細な解析をおこなった。

C. straminisolvans CSK1 株の培養濾液は非セルロース分解細菌 (*Bordetella* sp. M1-6 株を除く) の生育に促進的な効果を有していた。ただし *C. straminisolvans* CSK1 株の培養濾液中にはセルロース分解産物が含まれているため、この生育促進効果はセルロース分解産物が利用可能になるため、と考えられる。

好気性分離株の培養濾液は、他の好気性分離株の生育に対して抑制的な効果を有していた。特に、*Bacillus* sp. M1-1 株の培養濾液を添加すると、*Brevibacillus* sp. M1-5 株や *B. subtilis* の生育は完全に阻害された。

Table 4-1. Promotion and inhibition of growth by addition of cell-free culture filtrate

| | Cell-free culture filtrate | | | | | | | | | Control | |
|---|----------------------------|------------------|------|------|------|------|------|----------------|--------------------|---------|-------|
| | CSK1 ^c | FG4 ^d | M1-1 | M1-3 | M1-4 | M1-5 | M1-6 | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> | PCS | PY |
| <i>C. straminisolvans</i> CSK1 ^a | 79 | 260 | 53 | 342 | 237 | 230 | 263 | 230 | 257 | 1.9 | 0.6 |
| <i>Clostridium</i> sp. FG4 ^b | 304 | 71 | 93 | 442 | 180 | 382 | 196 | 61 | 117 | 0.045 | 0.155 |
| <i>Bacillus</i> sp. M1-1 | 123 | 154 | 68 | 80 | 63 | 60 | 64 | 53 | 49 | 0.207 | 0.211 |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3 | 144 | 59 | 58 | 36 | 49 | 46 | 55 | 71 | 84 | 0.321 | 1.107 |
| <i>Virgibacillus</i> sp. M1-4 | 161 | 98 | 87 | 88 | 79 | 90 | 81 | 94 | 90 | 0.282 | 0.452 |
| <i>Brevibacillus</i> sp. M1-5 | 193 | 102 | 0 | 66 | 74 | 83 | 97 | 109 | 65 | 0.361 | 1.102 |
| <i>Bordetella</i> sp. M1-6 | 74 | 74 | 70 | 73 | 71 | 72 | 76 | 85 | 86 | 0.371 | 0.701 |
| <i>E. coli</i> | 164 | 92 | 51 | 50 | 60 | 66 | 60 | 55 | 57 | 0.376 | 0.592 |
| <i>B. subtilis</i> | 109 | 119 | 0 | 37 | 49 | 65 | 59 | 64 | 56 | 0.323 | 0.605 |

■ promote (> 110) ■ no significant effects (90-110) ■ inhibit (90 >) □ completely inhibit (0)

The numbers are relative values representing the growth (OD₆₀₀ or amounts of cellulose degradation) in PCS-basal medium supplemented with 50% (v/v) of each cell-free culture filtrate. The growth in control medium (PCS; PCS-basal medium, PY; mixture of PCS-basal medium and PY medium [1:1]) is settled as 100.

^a The growth of *C. straminisolvans* CSK1 was represented as the amounts of filter paper degradation (g/l) after 8-day cultivation under anaerobic conditions.

^b The growth of *Clostridium* sp. FG4 was represented as OD₆₀₀ value after 4-day cultivation under anaerobic conditions.

The growth of the aerobic strains was represented as OD₆₀₀ value after 1-day cultivation under aerobic static conditions.

^c The culture solution of *C. straminisolvans* CSK1 cultivated in PCS-FP medium for 8 days under anaerobic conditions was used for preparation of the cell-free culture filtrate.

^d The culture solution of *Clostridium* sp. FG4 cultivated in PY medium for 5 days under anaerobic conditions was used. Only this column is compared with PY as control rather than PCS.

For the other strains, the culture solution of them cultivated in PCS-basal medium overnight with shake is used for preparation of the cell-free culture filtrate.

第2項 *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株培養濾液中の *C. straminisolvens* CSK1 株セルロース分解促進物質

本節第1項の実験で、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の培養濾液に *C. straminisolvens* CSK1 株に対する高い生育（セルロース分解）促進効果がみられたので、その詳細な解析をおこなった。

(i) *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の培養条件、培養時間の影響

培養濾液中の生育促進物質の特性を調べるために、まず *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株を異なる培養条件（静置培養、振盪培養）、および様々な growth phase まで培養し、その培養濾液の *C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解に対する促進効果を調べた。その結果を Fig. 4-1 に示す。セルロース分解促進物質は培養条件に関わらず生産され、培養が進むにつれてその促進効果も増していった。

(ii) *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株培養濾液の添加比率の影響

Pseudoxanthomonas sp. M1-3 株の培養濾液と PCS-FP 培地を様々な割合で混合し、その場合の *C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解に対する促進効果を調べた。その結果を Fig. 4-2 に示す。培養濾液の添加割合を 10% から 50% に増やすと、セルロース分解促進効果も増加した。しかし 50% から 90% に増やしても、セルロース分解促進効果はほとんど増加しなかった。

(iii) *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株培養濾液の限外濾過による分画の影響

Pseudoxanthomonas sp. M1-3 株の培養濾液を、3 種類の限外濾過膜（molecular cut off, 50,000, 10,000 and 5,000）を用いて段階的に（分子量 50,000 以上、10,000-50,000、5,000-10,000、5,000 以下）分画し、それぞれの *C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解に対する促進効果を調べた。各画分は、分画後に PCS-basal 培地により分画前の液量にまで希釈したものを実験に供した。結果を Fig. 4-3 に示す。分子量 50,000 以上、および分子量 5,000 以下の 2 つの画分に、高い促進効果が観察された。さらにこの 2 つの画分に関して、熱処理による促進効果の減少の有無を調べた。その結果、分子量 50,000 以上の画分は熱処理により促進効果が大きく減少したが、分子量 5,000 以下の画分では、熱処理後もほとんど促進効果の減少はみられなかった。

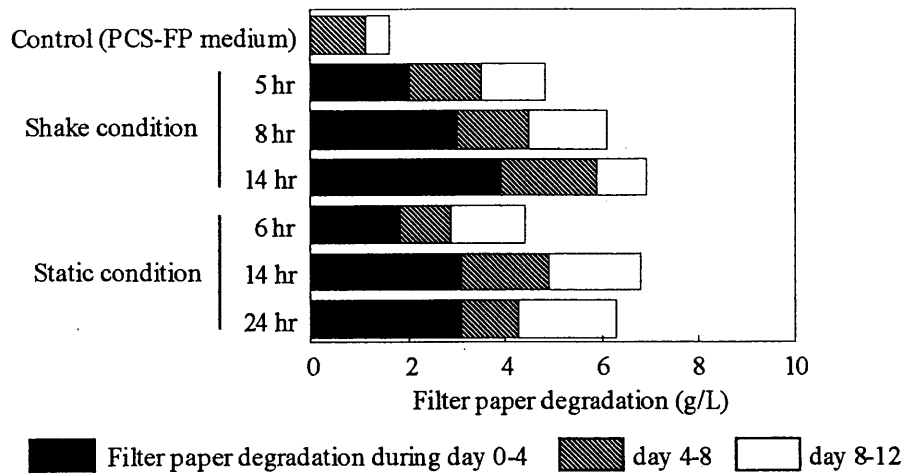


Fig. 4-1. Stimulation of filter paper degradation of *C. straminisolvens* CSK1 by amendment of cell-free culture filtrate of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 cultivated with various conditions (shake or static condition) and various growth phases (log phase [shake 5 hours, static 6 hours], early stationary phase [shake 8 hours, static 14 hours], late stationary phase [shake 14 hours, static 24 hours]). *C. straminisolvens* CSK1 was cultivated in PCS-FP medium supplemented with cell-free culture filtrate of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 (50% v/v). Values are expressed as the means of two independent cultivations.

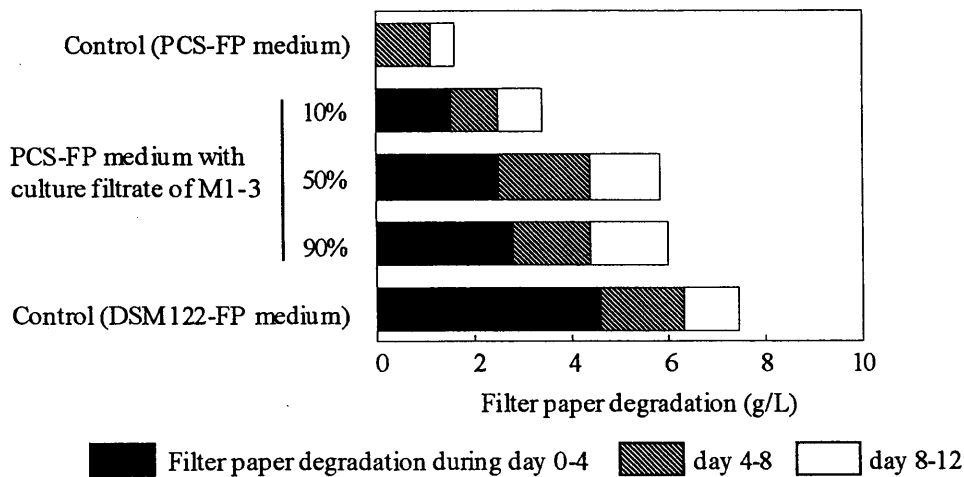


Fig. 4-2. Stimulation of filter paper degradation of *C. straminisolvens* CSK1 by amendment of cell-free culture filtrate of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 in the various ratios (10, 50 or 90%). Cell-free culture filtrate was collected from culture solution of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 cultivated with static conditions for 14 hours. Values are expressed as the means of two independent cultivations.

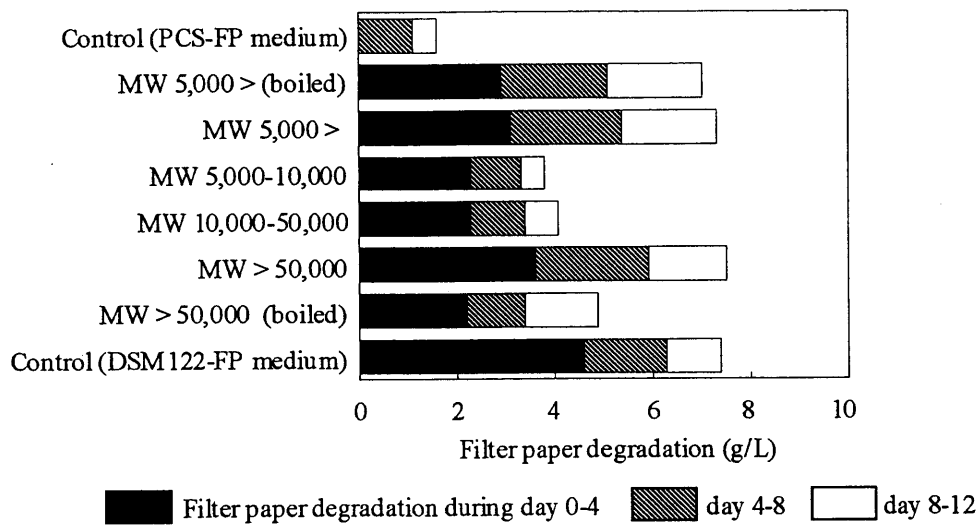


Fig. 4-3. Stimulation of filter paper degradation of *C. straminisolvens* CSK1 by amendment of cell-free culture filtrate of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 fractionated with ultrafiltration devices. Cell-free culture filtrate was collected from culture solution of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 cultivated with static conditions for 14 hours. Cell-free culture filtrate was treated with ultrafiltration devices (molecular cut off, 50,000, 10,000 and 5,000). Several samples were treated at 100°C for 10 min (designated as “boiled”). Values are expressed as the means of two independent cultivations.

第3節 2菌株間の関係性、相互作用の詳細な解析

これまでの解析により SF356 のメンバー間におけるおおまかな関係性が明らかとなった。本節では特に興味深いいくつかの2菌株間の組み合わせにおける関係性を詳細に解析した。

第1項 *C. straminisolvens* CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の関係性

C. straminisolvens CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株は Fig. 4-4 に示すような、相利共生関係にあると考えられた。本節ではこの2菌株の関係性を2種混合培養実験によりさらに詳細に解析した。また菌の生育に及ぼす影響だけではなく、菌の振る舞いに及ぼす影響を調べるために、混合培養条件での菌体外、および菌体内タンパク質の解析もおこなった。

(i) 2種混合培養実験 (材料と方法3、17)

C. straminisolvens CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の2種混合培養系は、比較的他の混合培養系よりも高いセルロース分解効率を有していた (Fig. 2-2)。本項ではこの2種混合培養系による濾紙分解過程の解析をおこない、各菌株の純粋培養時との比較をおこなった。2種混合培養系、および各菌株の純粋培養系の濾紙分解量、培養液 pH の推移、代謝産物 (水溶性糖、酢酸) の蓄積、および各菌株の生育曲線を Fig. 4-5 に示す。

C. straminisolvens CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の2種混合培養系は、*C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養系や SF356 よりも高いセルロース分解効率を有しており、また培養液 pH は培養後半で中性付近にまで回復し、培養液中の酢酸の蓄積も低く抑えられていた。これらの結果は、Fig. 4-4 に示したような *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の作用と一致している。また混合培養中でどちらの菌株もそれぞれの純粋培養時よりも生育が良好であり、この2菌株は相利共生関係にあるといえるだろう。しかしこの2種混合培養系と *C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養系とを比較すると、濾紙分解量は混合培養系で5倍以上増加しているのに対し、*C. straminisolvens* CSK1 株の生育は2培程度しか増加していなかった。



Fig. 4-4. Symbiotic relationships between *C. straminisolvens* CSK1 and *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3.

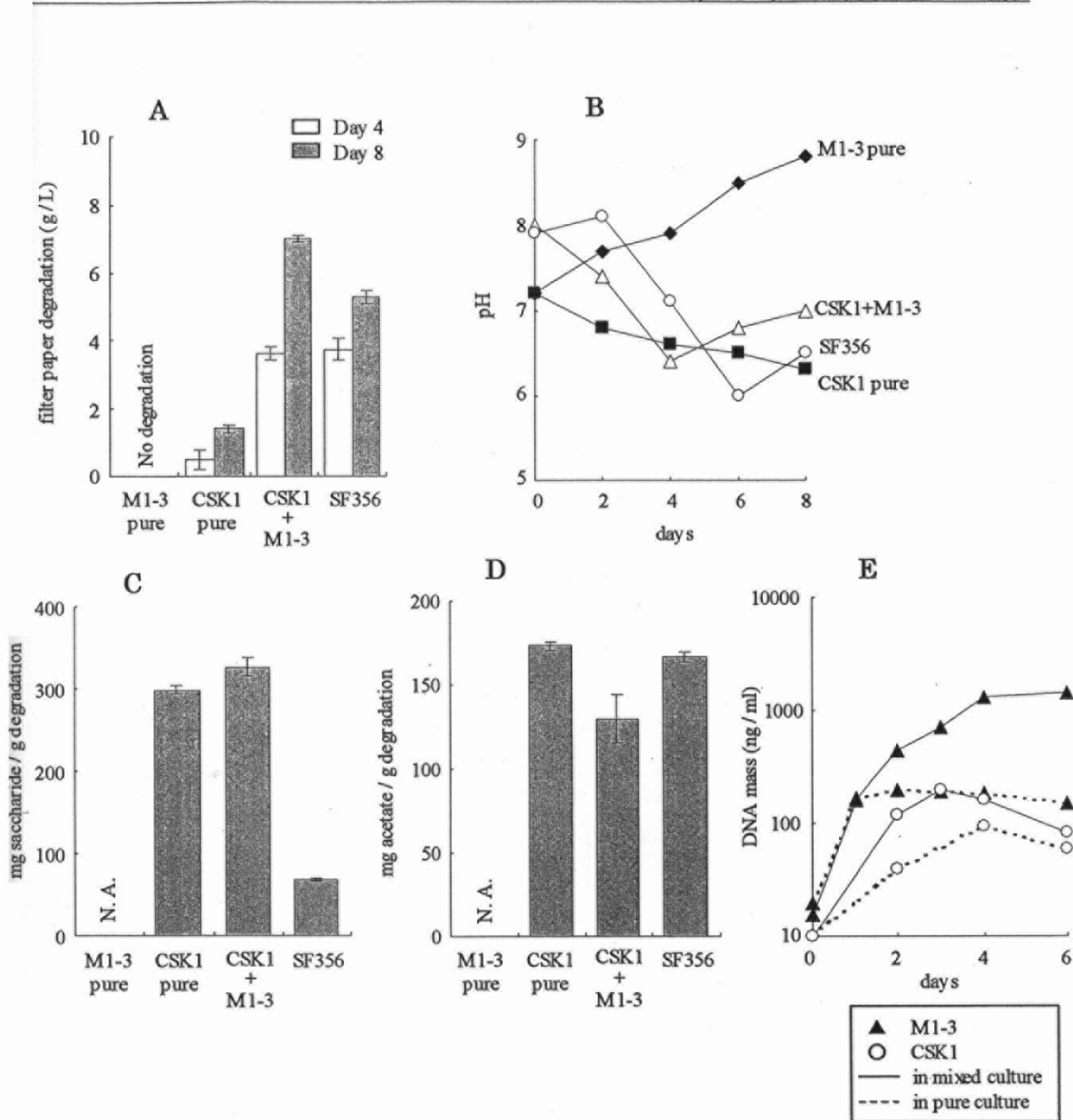


Fig. 4-5. Comparisons of the filter paper degradation processes of mixed culture of *C. straminisolvens* CSK1 with *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 (designated as CSK1+M1-3), and the respective pure culture (designated as CSK1 pure and M1-3 pure, respectively). (A) filter paper degradation over a period of 4 days (open bars) or 8 days (gray bars), (B) pH value, (C) accumulation of oligosaccharides, (D) accumulation of acetate. 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). (E) Growth curves of *C. straminisolvens* CSK1 (open circles) and *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 (closed triangles) in the mixed culture (solid lines) or in the pure culture (broken line) determined by quantitative real-time PCR. Values are expressed as the means of two independent cultivations. The error bars indicate SD. N. A., not applicable, because filter paper degradation did not occur.

(ii) 菌体外タンパク質の解析 (材料と方法 21)

C. straminisolvens CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の 2 種混合培養実験から、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の存在が *C. straminisolvens* CSK1 株の生育だけでなく、その振る舞いにも影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで 2 種混合培養系と純粋培養系で、それぞれで発現している菌体外タンパク質に違いがあるかどうかを調べた。

2 種混合培養系、および各分離株の純粋培養系の培養上清からタンパク質を調整し、SDS-PAGE により解析した結果を Fig. 4-6 に示す。純粋培養系ではみられないバンドが混合培養系でいくつか観察された (Fig. 4-6、白矢印)。しかしそれらのバンドと同じと思われるものが *C. straminisolvens* CSK1 株の DSM122-FP 培地での純粋培養系から検出された (Fig. 4-6、黒矢印)。*C. straminisolvens* CSK1 株は混合培養中で、PCS-FP 培地での純粋培養条件よりも、DSM122-FP 培地での純粋培養条件に近い生理状態にあると考えられる。

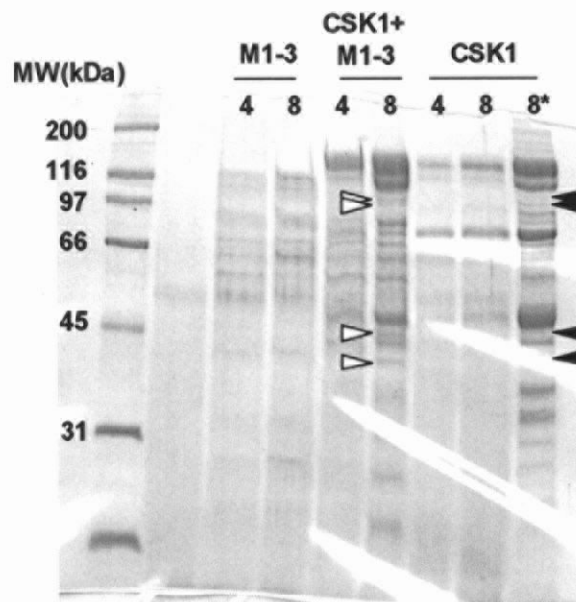


Fig. 4-6. Profiles of extracellular protein of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 pure culture (M1-3), of 2-strain mixed culture of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 and *C. straminisolvens* CSK1 (CSK1+M1-3), and of *C. straminisolvens* CSK1 pure culture (CSK1). The number on each lane represents cultivation days. PCS-FP medium was used for all of the cultivation, except for the lanes with asterisks (DSM122-FP medium was used). White arrowheads; bands specifically detected from the mixed cultures, black arrowheads; same bands with the specific bands detected from the mixed cultures.

(iii) *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の菌体タンパク質の2次元電気泳動解析 (材料と方法 22)

C. straminisolvens CSK1 株の存在が *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の振る舞いに及ぼす影響を調べるために、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の純粋培養、および混合培養条件で発現する菌体タンパク質の2次元電気泳動解析をおこなった。解析するサンプルには、

(1) PURE: *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の PCS-basal 培地での純粋培養

(2) SUP: *C. straminisolvens* CSK1 株の培養濾液で培養した *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の純粋培養

(3) MIX: *C. straminisolvens* CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の混合培養系から、それぞれのセルロースパウダーへの吸着性の違い (*C. straminisolvens* CSK1 株のみが吸着能を有する)を利用して *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株のみを回収したもの(回収後の *C. straminisolvens* CSK1 株の残存は全体の3%以下)

の3種類を用いた。それぞれの系の day 1, 2, 3, 4 から菌体タンパク質を調製し、2次元電気泳動解析をおこなった。

得られたスポットパターンの一例 (PURE day3 と MIX day3) を Fig. 4-7 に示す。図中赤丸で示したように、混合培養系 (MIX) に特異的なスポットがいくつか検出された。

また各サンプルから得られたスポットパターンから、ゲル間で同一であると考えられるスポットをマッチングし、それらの定量データを多変量解析のひとつである因子分析にかけ、各サンプルの比較をおこなった (Fig. 4-8)。混合培養系 (MIX) と PCS-basal 培地での純粋培養系 (PURE) は day 1 (混合培養系で濾紙分解が始まる前) では類似していたが、その後は全く異なる変遷がみられた。また混合培養系での状態に近いと予想された *C. straminisolvens* CSK1 株の培養濾液で培養したサンプル (SUP) も、MIX とは異なり、むしろ PURE のほうに近い挙動を示した。

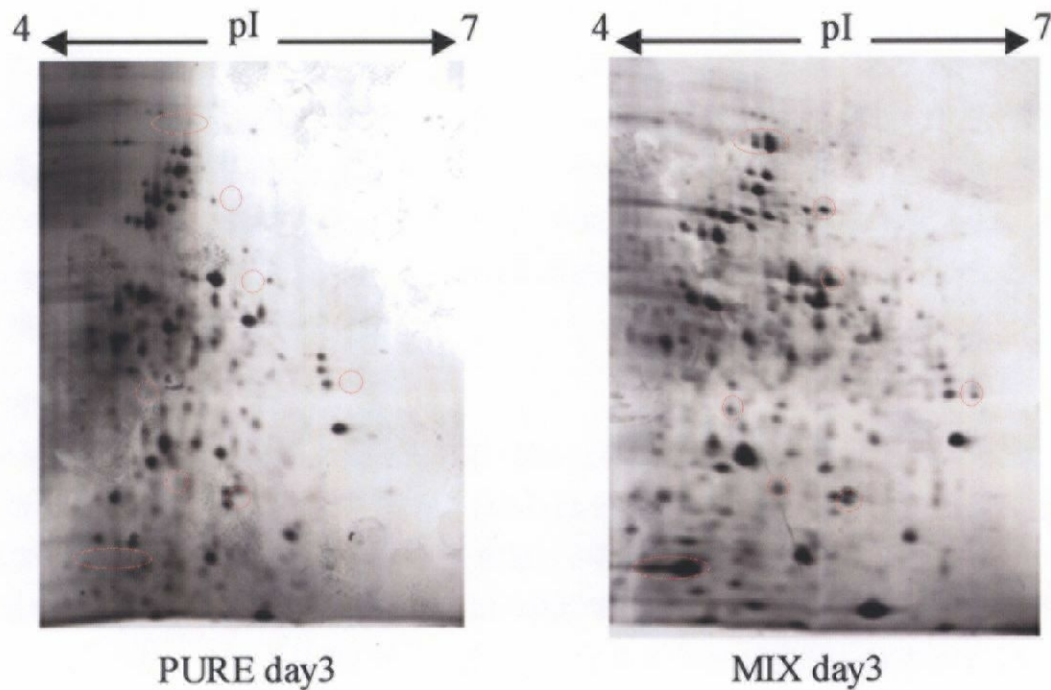


Fig. 4-7. 2D-GE analysis of proteins extracted from *Pseudoxanthomonas* sp. strain M1-3 cells cultivated for 3 days in pure culture (left) and in mixed culture with *C. straminisolvans* CSK1 (right). Gels were stained by silver staining method. Protein spots specifically detected from the mixed-culture sample are marked by red circles.

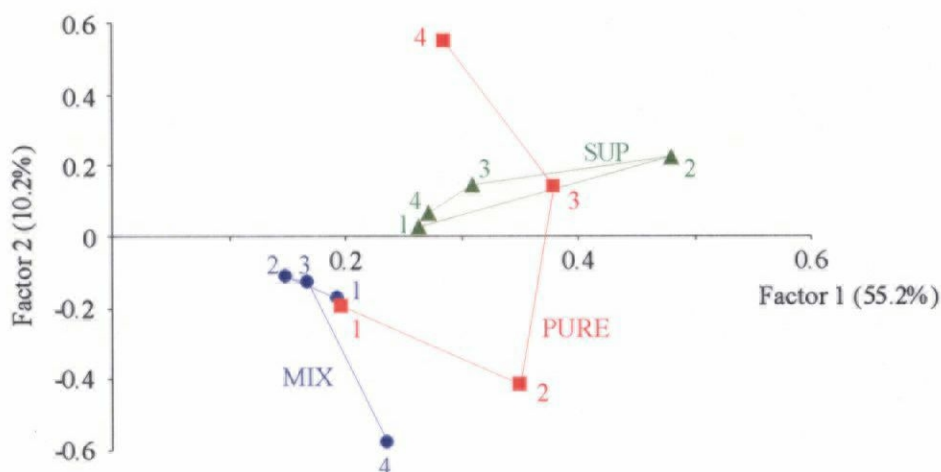


Fig. 4-8. Factor analysis of the 2D-GE analysis of cellular protein of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3. PURE, *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 cells from pure culture in PCS-basal medium; SUP, *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 cells from pure culture in cell-free culture filtrate of *C. straminisolvans* CSK1; MIX, *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 cells collected from mixed culture with *C. straminisolvans* CSK1 in PCS-FP medium. The numbers next to the plots indicate the sampling days.

第2項 *C. straminisolvens* CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株の関係性

これまでの解析で、*Clostridium* sp. FG4 株は *C. straminisolvens* CSK1 株によるセルロース分解産物（オリゴ糖）に完全に依存していると考えられた。また *Clostridium* sp. FG4 株によるオリゴ糖の消費は、*C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解に対して促進的に働くと考えられるが、その一方で糖の醗酵による酢酸の過剰生成による培養液 pH の低下は、*C. straminisolvens* CSK1 株の生育、セルロース分解に阻害的に働くと考えられる。本項では、この2菌株の関係性をさらに詳細に解析した。

(i) 2種混合培養実験（材料と方法3、17）

C. straminisolvens CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株の2種混合培養をおこない、その濾紙分解過程を解析した。培地には、PCS-FP 培地と DSM122-FP 培地の2種類を使用した。2種混合培養系の濾紙分解量、代謝産物（水溶性糖、酢酸）の蓄積を Fig. 4-9 に示す。

2種混合培養系では *C. straminisolvens* CSK1 株の純粋培養系と比較して、pH の低下が著しく（PCS-FP 培地でのみ）、糖の蓄積量が多く、酢酸の蓄積量が少ない、という結果となった。これらの結果は、第3章までに予測されていた *Clostridium* sp. FG4 株の作用と一致していた。一方で濾紙の分解量に及ぼす *Clostridium* sp. FG4 株の影響は、用いた培地によって違いが見られた。PCS-FP 培地では、*Clostridium* sp. FG4 株の存在により濾紙分解量は増加したが、DSM122-FP 培地では逆に濾紙分解量は顕著に減少した。

(ii) 代謝産物の蓄積が *C. straminisolvens* CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株の生育に及ぼす影響

醗酵による生成産物が自身の生育に阻害的に働く例は良く知られている。ここでは、セルロース分解の代謝産物であるオリゴ糖（cellobiose）、酢酸、エタノール、および培養液初期 pH が、*C. straminisolvens* CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株の生育に及ぼす影響を調べた。*C. straminisolvens* CSK1 株の培養には DSM122-FP 培地を使用し、濾紙分解量を生育の指標とした。*Clostridium* sp. FG4 株の培養には PY-cellobiose 培地を使用し、培養液の濁度を測定した。

C. straminisolvens CSK1 株の解析結果を Fig. 4-10 に示す。*C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解は過剰量の cellobiose で阻害された。酢酸やエタノールには高い阻害効果は見られなかった。一方で、6以下の低 pH、9以上の高 pH はセルロース分解を強く阻害した。

Clostridium sp. FG4 株の解析結果を Fig. 4-11 に示す。*Clostridium* sp. FG4 株の生育は酢酸による阻害はみられなかったが、エタノールにより阻害された。また6以下の低 pH、9以上の高 pH も生育を強く阻害した。

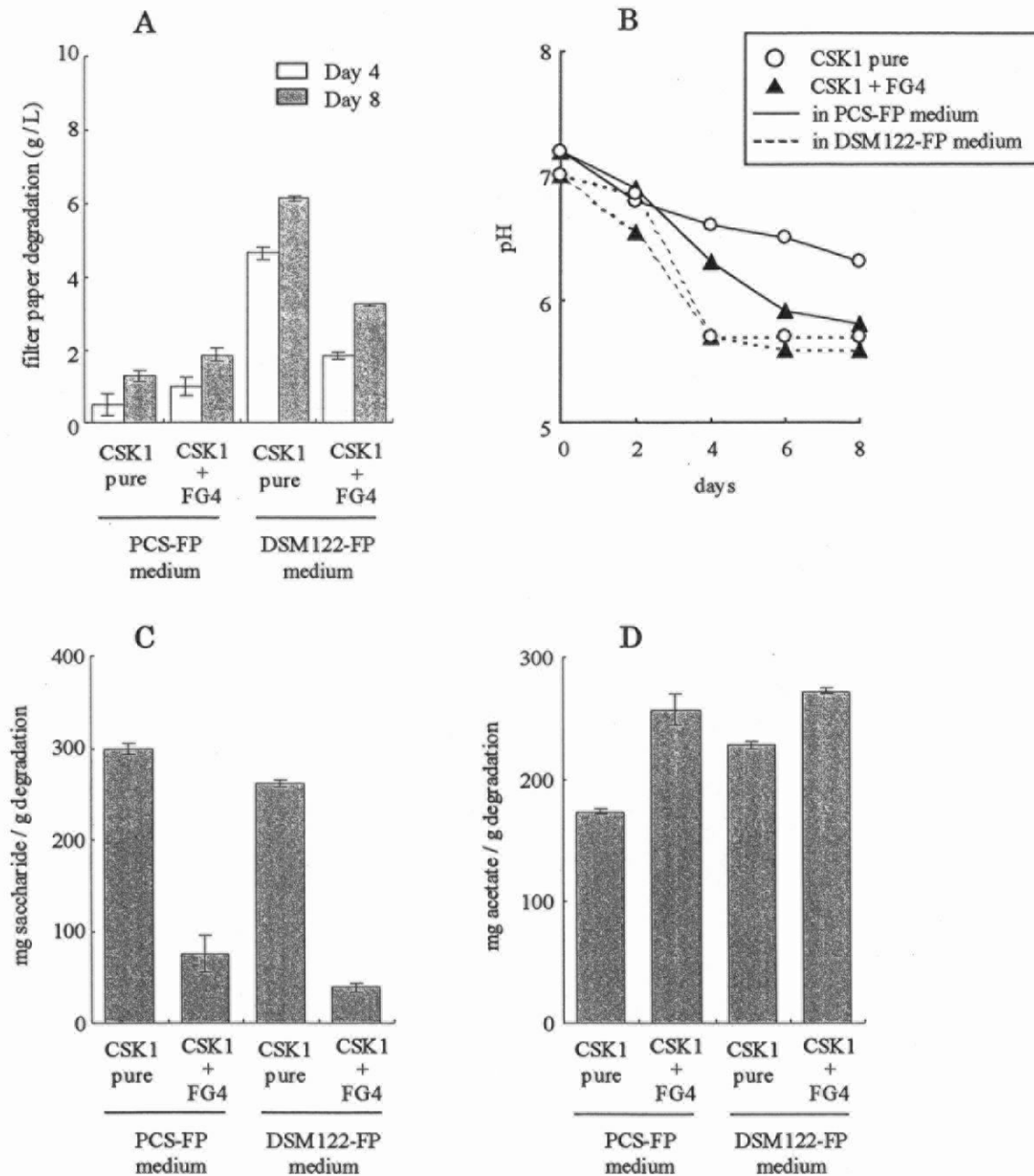


Fig. 4-9. Comparisons of the filter paper degradation processes of mixed culture of *C. straminisolvens* CSK1 with *Clostridium* sp. FG4 (designated as CSK1+FG4), and pure culture of *C. straminisolvens* CSK1 (designated as CSK1 pure). (A) filter paper degradation over a period of 4 days (open bars) or 8 days (gray bars), (B) pH value, (C) accumulation of oligosaccharides, (D) accumulation of acetate. 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 independent cultivations. The error bars indicate SD.

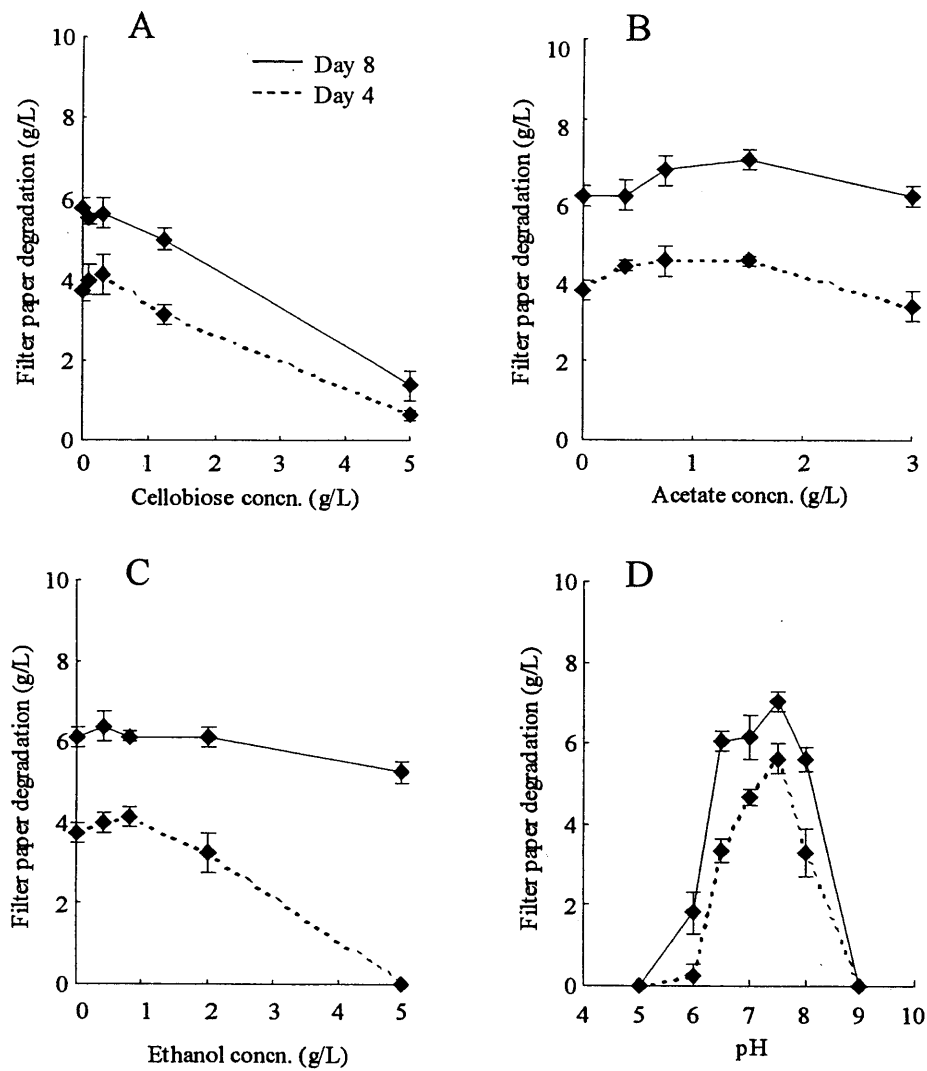


Fig. 4-10. Effects on cellulose degradation of *C. straminisolvens* CSK1. (A) Effects of addition of cellobiose, (B) effects of addition of acetate, (C) effects of addition of ethanol, (D) effects of initial pH values (data from Fig. 1-4). *C. straminisolvens* CSK1 was cultivated in DSM122-FP medium at 50°C under the anaerobic conditions. Values are expressed as the means of two independent cultivations. The error bars indicate SD.

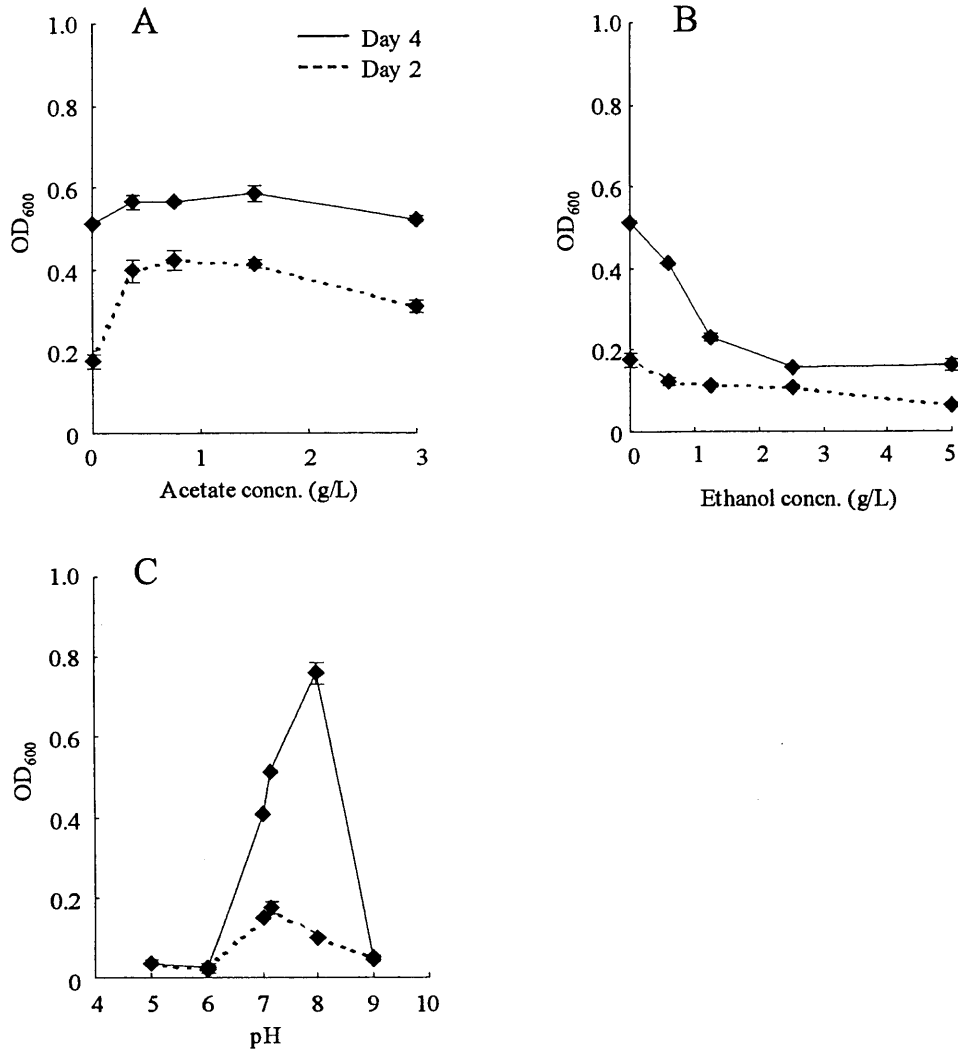


Fig. 4-11. Effects on growth of *Clostridium* sp. FG4. (A) Effects of addition of acetate, (B) effects of addition of ethanol, (C) effects of initial pH values. *Clostridium* sp. FG4 was cultivated in PY-cellobiose medium at 50°C under the anaerobic conditions. Values are expressed as the means of two independent cultivations. The error bars indicate SD.

第3項 *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株と *Brevibacillus* sp. M1-5 株の関係性

第3章のノックアウト群集の解析から、SF356において3株の好気性分離株が互いに競合的な関係にあることが示唆された。また本章第2節の培養濾液添加培地での培養実験 (Table 4-1) でも、好気性分離株同士が互いに阻害効果を有することが示唆された。本項では2株の好気性分離株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株と *Brevibacillus* sp. M1-5 株を対象として、その2菌株間の関係性を詳細に解析した。

(i) 2種混合培養実験

Pseudoxanthomonas sp. M1-3 株と *Brevibacillus* sp. M1-5 株を PCS-basal 培地で2種混合培養し、それぞれの生育を定量的 real-time PCR 法 (材料と方法 16) によりモニタリングした (Fig. 4-12)。その結果 *Brevibacillus* sp. M1-5 株は day 1 までは生育が確認されたものの、その後菌体量が減少していった。

(ii) 培養途中の他菌株の添加による生育阻害

本章第2節の培養濾液添加培地での培養実験 (Table 4-1) では、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の培養濾液は *Brevibacillus* sp. M1-5 株に対して比較的弱い阻害効果しかみられなかったため、培養上清に何らかの阻害物質を出しているとは考えにくく、それ以外のメカニズムがあると予想された。そこで *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株を1日間純粋培養しそこから回収した菌体を、同様に1日間純粋培養した *Brevibacillus* sp. M1-5 株の培養液に添加する (同様に逆のパターンも)、という実験をおこなった。

結果を Fig. 4-13 に示す。培養途中で *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の菌体のみを添加された場合 (●)、また逆の場合 (■) でも、*Brevibacillus* sp. M1-5 株の菌体量は2日目以降に大きく減少した。一方で、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株は、純粋培養時 (△) よりも、培養途中で *Brevibacillus* sp. M1-5 株の菌体を添加した場合 (■)、また逆の場合 (●) で、菌体量が多くなっていた。

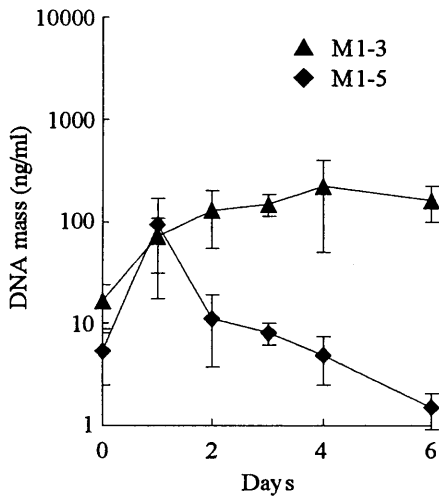


Fig. 4-12. Growth curves of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 (closed triangles) and *Brevibacillus* sp. M1-5 (closed diamonds) in the 2-strain mixed culture. The mixed culture was cultivated in PCS-basal medium at 50°C under the aerobic static conditions. Values are expressed as the means of three independent cultivations. The error bars indicate SD.

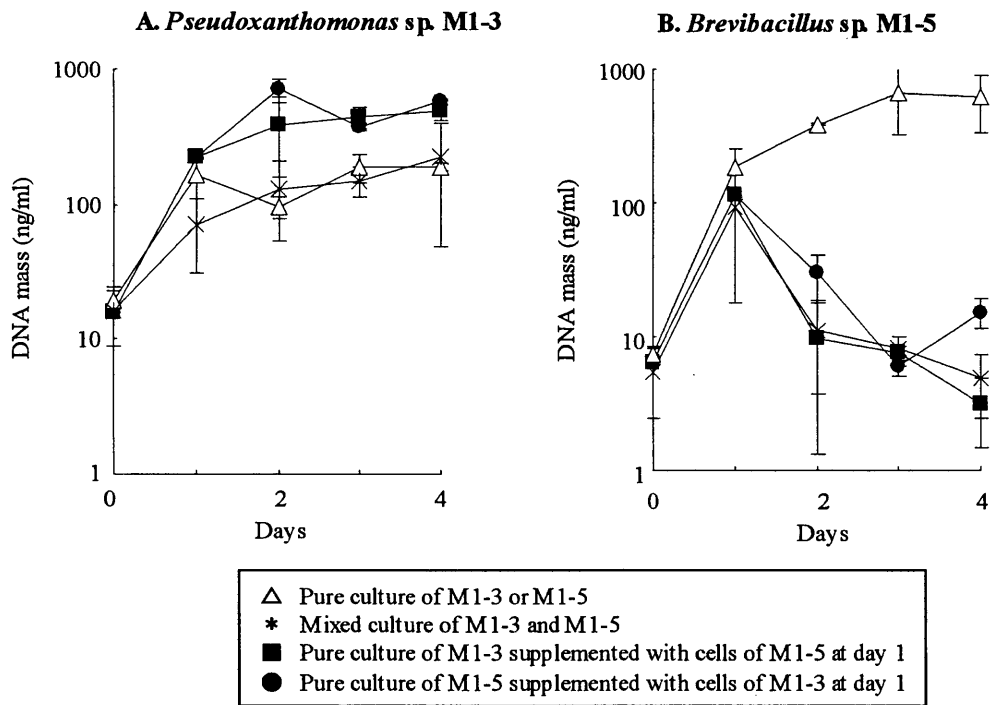


Fig. 4-13. Growth curves of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 (A) and *Brevibacillus* sp. M1-5 (B) in the respective pure culture (open triangles), in the 2-strain mixed culture (asterisks), in the pure culture of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 supplemented with the cells of *Brevibacillus* sp. M1-5 cultivated for 1 day (closed squares), and in the pure culture of *Brevibacillus* sp. M1-5 supplemented with the cells of *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 cultivated for 1 day (closed circles). These systems were cultivated in PCS-basal medium at 50°C under the aerobic static conditions. Values are expressed as the means of three independent cultivations. The error bars indicate SD.

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

本章第3節までに各菌株間の1対1での相互作用を解析してきたが、菌株間の相互作用はその周囲の状況、特に第3の菌株の存在によってその関係性は変化していくものと考えられる。そこで本節では original microflora の分離株のうち4種を用いて、純粋培養系、および2-4種混合培養系における各菌株の生育をモニターし、各系における各菌株の生育を比較することで様々な状況における菌株間の相互作用を解析した。

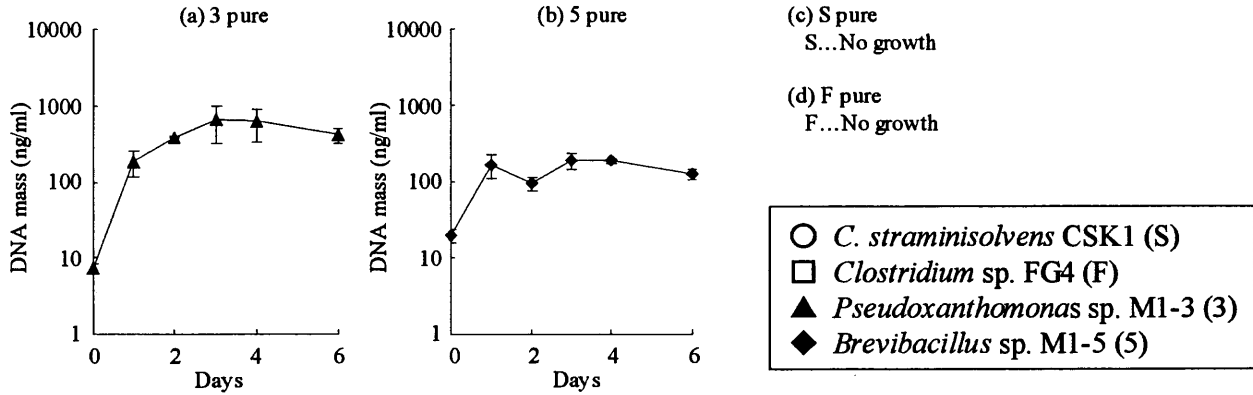
第3の菌株の存在によって関係性が変化するものであるかどうかを、CSK1株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株、*Brevibacillus* sp. M1-5株の3種の分離株をもちいて検討した。以下本節では、各混合培養系を各菌株の1文字表記 (S, *C. straminisolvens* CSK1株; F, *Clostridium* sp. FG4株; 3, *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株; 5, *Brevibacillus* sp. M1-5株) の組み合わせで表記する (例えば CSK1株純粋培養系は S pure、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株と *Brevibacillus* sp. M1-5株の2種混合培養系は 3+5)。上記3株の純粋培養系 (3 pure, 5 pure, S pure (Fig. 4-14a, b, c))、2種混合培養系 (3+5, S+3, S+5 (Fig. 4-14e, f, g))、3種混合培養系 (S+3+5 (Fig. 4-14k)) における各菌株の生育を定量的 real-time PCR 法 (材料と方法 16) により測定した。また共同研究者である有田正規博士が作成した生育のデータから各菌株間の関係性を数値化するプログラムにより、数理的な解析をおこなった (Fig. 4-15)。このプログラムにより、例えば 5 pure と 3+5 における *Brevibacillus* sp. M1-5株の生育、および 5+S と 3+5+S における *Brevibacillus* sp. M1-5株の生育を比較 (log をとった値での減少、増加率(%)を算出) することで、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株が *Brevibacillus* sp. M1-5株に及ぼす影響を数値化した。比較する生育のデータには、各菌株ともに定常状態にあると考えられる day 4 と day 6 のデータの平均値を使用した。

以上のようにして算出した数値をネットワークモデルとして簡略化したものを Fig. 4-16 に示す。ここでは、純粋培養系と2種混合系を比較した際のデータ (1種/2種、Fig. 4-16a)、2種混合系と3種混合系を比較した際のデータ (2種/3種、Fig. 4-16b)、および純粋培養系と3種混合系を比較した際のデータ (1種/3種、Fig. 4-16c) とを別々に図式化した。これらのデータから、第3の菌株の存在によって、各菌株間の関係性が変化している組み合わせがみられた。*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株は *C. straminisolvens* CSK1株に対して、1種/2種の比較データからは強い促進の効果があるという結果が得られたが、2種/3種の比較データからは弱い抑制効果があるという結果が得られた。また *C. straminisolvens* CSK1株は *Brevibacillus* sp. M1-5株に対して、1種/2種の比較データからは影響なしという結果が得られたが、2種/3種の比較データからは強い促進効果があるという結果が得られた。

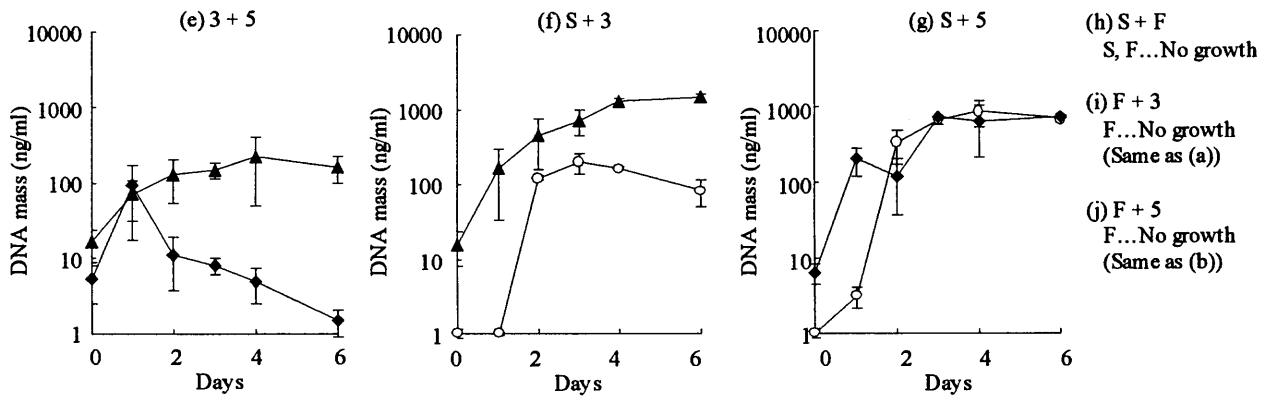
同様にして、上記の3種に *Clostridium* sp. FG4株を加えた4種の系で解析をおこなった (Fig. 4-17, 4-18)。この4種の組み合わせの混合培養系 (3+5+S+F、第3章の Δ M1-6 と同義) は第3章の解析で全てのメンバーが継代培養後も残存する、構造的に安定な群集であることが示されており、この系の解析により複数種微生物の安定的共存のメカニズムを探ることとした。FG4株は 3+F、5+F、S+F といった2種混合培養系、ならびに 3+5+F という3種混合培養系で

は生育がみられなかった。*Clostridium* sp. FG4 株は *C. straminisolvens* CSK1 株から強い促進効果を受けているにもかかわらず、*C. straminisolvens* CSK1 株の生育に対し阻害的に働いていることが示された。また *Clostridium* sp. FG4 株は 3 種/4 種の比較データ（すなわち *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の存在しているときのデータ）からは *Brevibacillus* sp. M1-5 株に対して促進的な効果を持つ、という結果が得られた。

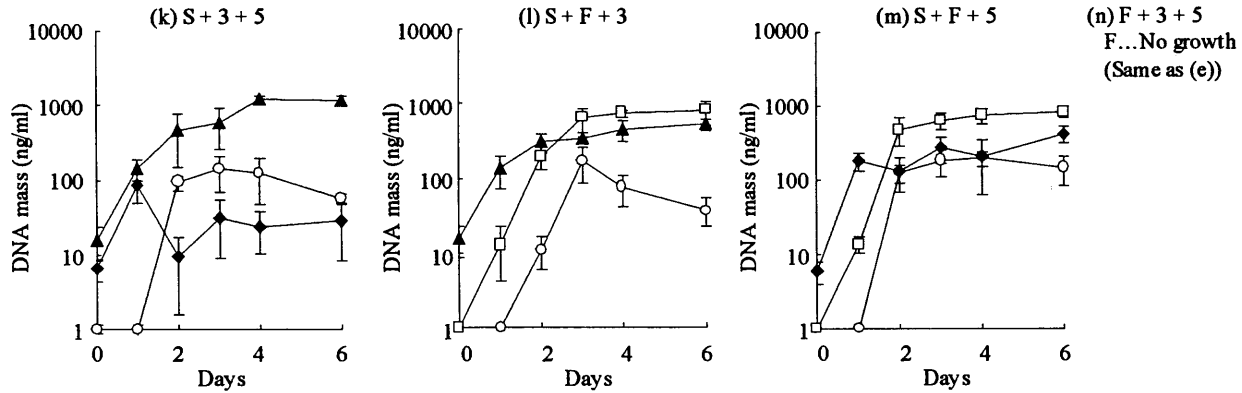
***Pure culture**



***2-strain**



***3-strain**



***4-strain**

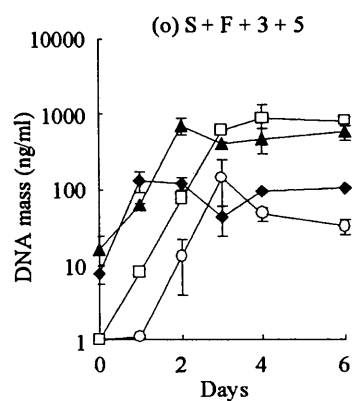


Fig. 4-14. Growth curve of *C. straminisolvens* CSK1 (S, open circles), *Clostridium* sp. FG4 (F, open squares), *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 (3, closed triangles), and *Brevibacillus* sp. M1-5 (5, closed diamonds) in the mixed-culture systems with various combinations of the isolates. These systems were cultivated in PCS-FP medium at 50°C under the aerobic static conditions. Values are expressed as the means of three independent cultivations. The error bars indicate SD.

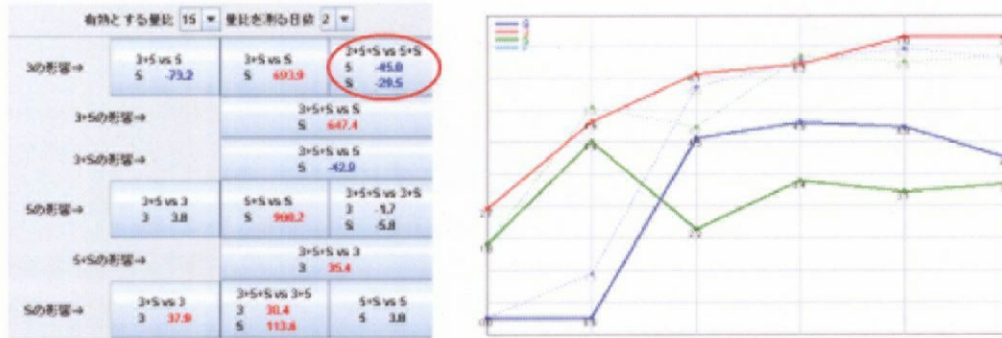


Fig. 4-15. 菌株間相互作用解析プログラムによる解析結果。図は *C. straminisolvens* CSK1 株 (S, 青線)、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株 (3, 赤線)、*Brevibacillus* sp. M1-5 株 (5, 黄緑線) の3株の解析結果。左図は Fig. 4-14 のデータのうち、day 4、day 6 の菌量の平均値をもとに、ある菌株が他の菌株に及ぼす影響を数値化 (log をとった値での減少、増加率(%)) したものの一覧表。例えば、赤丸で示した部分は 5+S (右図点線のデータ)、3+5+S (右図実線のデータ) における M1-5 株、CSK1 株の生育データ (それぞれ緑線、青線) をもとに M1-3 株の影響を数値化 (log をとった値での減少、増加率を算出) したものが表示されている。

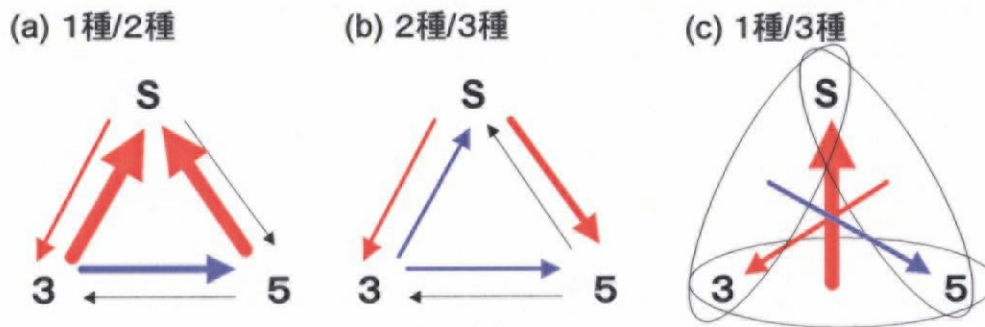


Fig. 4-16. 菌株間相互作用解析プログラムによる解析結果 (Fig. 4-15) をもとにした *C. straminisolvens* CSK1 株 (S)、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株 (3)、*Brevibacillus* sp. M1-5 株 (5) の3株の菌株間相互作用のネットワーク図。(a) 純粋培養系と2種混合培養系の比較データ、(b) 2種混合培養系と3種混合培養系の比較データ、(c) 純粋培養系と3種混合培養系の比較データ。赤矢印は促進を、青矢印は抑制を、黒矢印は影響無し (増加、減少率が log 値で 15%以下) を表す。矢印の線の太さは促進、抑制の強さを反映している。

| | | 有利とする菌比 15 | | 量比を割る日数 2 | | | |
|---------|---------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| 3の影響⇒ | 3+S vs S S -73.2 | 3+F vs F F 0.0 | 3+S+F vs S+F S 73.2 F 0.0 | 3+S vs S S -893.9 | 3+S+S vs S+S S -15.0 S -29.5 | 3+S vs F+S F 956.4 S 578.8 | 3+S+F+S vs S+F+S S -17.8 F 0.0 S 25.0 |
| 3+Sの影響⇒ | | 3+S+F vs F F 0.0 | | 3+S+S vs S S 647.4 | | 3+S+F+S vs F+S F 972.8 S 530.6 | |
| 3+Fの影響⇒ | | | 3+S+F vs S S -73.2 | 3+F+S vs S S 578.8 | | 3+S+F+S vs S+S S -20.5 S 40.5 | |
| 3+Sの影響⇒ | | | | 3+S+S vs S S 42.0 | 3+F+S vs F F 956.4 | 3+S+F+S vs S+F S -23.5 F 972.8 | |
| 5の影響⇒ | 3+S vs S S 5.8 | S+F vs F F 0.0 | 3+S+F vs 3+F S 3.8 F 0.0 | S+S vs S S 908.2 | 3+S+S vs 3+S S -1.7 S -5.0 | S+F+S vs F+S F 903.4 S 743.2 | 3+S+F+S vs 3+F+S S 1.8 F 1.5 S -7.2 |
| 5+Sの影響⇒ | | | 3+S+F vs S S 3.8 | S+S vs S S 743.2 | | 3+S+F+S vs 3+S S -12.1 S -20.5 | |
| 5+Sの影響⇒ | | | 3+S+S vs S S 35.4 | S+F+S vs F F 903.4 | | 3+S+F+S vs 3+F S 25.1 F 972.8 | |
| Fの影響⇒ | 3+F vs S S 0.0 | 3+S+F vs 3+S S 0.0 | S+F vs S S 0.0 | F+S vs S S 0.0 | 3+F+S vs 3+S S -13.8 S -14.3 | 3+S+F+S vs 3+S+S S -10.8 S 33.7 S -15.6 | S+F+S vs S+S S -10.7 S -20.8 |
| F+Sの影響⇒ | | | 3+F+S vs S S 19.8 | 3+S+F+S vs 3+S S 16.6 S 105.8 | | S+F+S vs S S 7.3 | |
| Sの影響⇒ | 3+S vs S S 37.8 | 3+S+S vs 3+S S 30.4 S 113.6 | S+S vs S S 3.8 | F+S vs F F 0.0 | 3+S+S vs 3+F S 0.0 F 956.4 | 3+S+F+S vs 3+S+F S 16.0 S 105.8 F 972.8 | S+F+S vs S+F S -7.3 F 903.4 |

Fig. 4-17. *C. straminisolvens* CSK1株 (S)、*Clostridium* sp. FG4株 (F)、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株 (3)、*Brevibacillus* sp. M1-5株 (5) の4株の解析結果。図は Fig. 4-14 のデータのうち、day 4、day 6の菌量の平均値をもとに、ある菌株が他の菌株に及ぼす影響を数値化 (logをとった値での減少、増加率(%)) したものの一覧表。表の見方は Fig. 4-15 と同様。

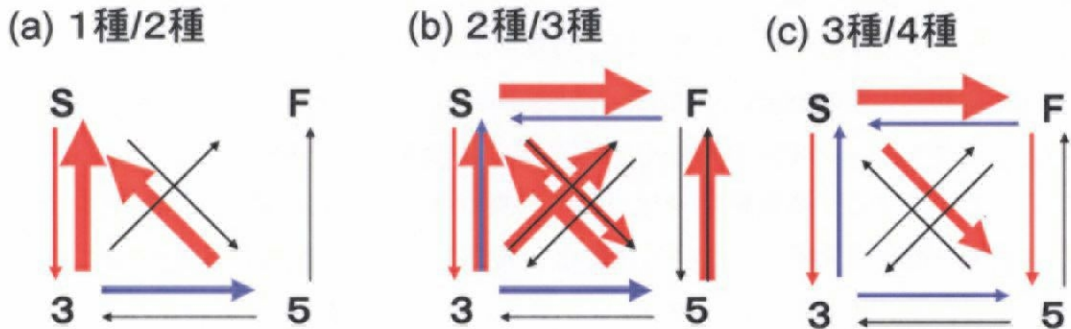


Fig. 4-18. 菌株間相互作用解析プログラムの解析データ (Fig. 4-17) をもとにした *C. straminisolvens* CSK1株 (S)、*Clostridium* sp. FG4株 (F)、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株 (3)、*Brevibacillus* sp. M1-5株 (5) の4株の菌株間相互作用のネットワーク図。(a)純粋培養系と2種混合培養系の比較データ、(b)2種混合培養系と3種混合培養系の比較データ、(c)3種混合培養系と4種混合培養系の比較データ。赤矢印は促進を、青矢印は抑制を、黒矢印は影響無し (増加、減少率が log 値で 15%以下) を表す。影響を与える株が生育できない場合は、矢印を表示していない。(b)では2通りの比較データがあるので、その影響が異なる場合は重ねて表示した。矢印の線の太さは促進、抑制の強さを反映している。

第5節 考察

本章ではまず人工生態系 SF356 の各メンバー間における 1 対 1 の関係性、相互作用を詳細に解析した。さらに、微生物間ネットワークの包括的理解を目指し、original microflora の分離株のうち 4 種 (*C. straminisolvans* CSK1 株、*Clostridium* sp. FG4 株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株) を用いて、純粋培養系、および 2-4 種混合培養系における各菌株の生育をモニターし、数理的な解析をおこない、これまでに解析してきた 1 対 1 の関係性が、生態系の中でどれほど寄与しているのか、第 3 の微生物の存在によりその 1 対 1 の関係性に変化が生じるのか、そして全体としてどのようにバランスが取れているのかを解析した。本章までの研究で明らかとなった上記 4 種の分離株の関係性、相互作用について以下に考察する。

(i) *C. straminisolvans* CSK1 株と好気性分離株

第 3 章までの解析により、*C. straminisolvans* CSK1 株は好気性分離株の酸素消費による培養液の嫌気化という作用があつて初めて生育可能であり、また好気性分離株による pH の中性化、余剰代謝産物 (水溶性糖、酢酸) の除去によって生育 (セルロース分解) が促進されることが示されていた。

本章第 2 節の好気性分離株の培養濾液添加培地での *C. straminisolvans* CSK1 株の培養実験 (Table 4-1) によって、上記のメカニズム以外に、好気性分離株が培養液中に *C. straminisolvans* CSK1 株の生育 (セルロース分解) 促進物質を放出していることが示唆された。その中でも特に高い促進効果を示していた *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の培養濾液を限外濾過膜により分画し解析をおこなった結果、熱処理に対して不安定な分子量 50,000 以上の物質、および熱処理に対して安定な分子量 5,000 以下の物質の少なくとも 2 種類が活性を有していることが示唆された (Fig. 4-3)。各画分で促進効果を有するのがどのような物質かは明らかとはなっていないが、おそらくは高分子のタンパク質と低分子の vitamin 類のようなものであると考えられる。ある条件で生育の遅い微生物が、他の微生物が放出する物質によって生育が改善する、という報告は多くなされている (e.g., ペプチド [132]、アミノ酸 [110]、ビタミン類 [26, 40, 41]、低分子情報伝達物質 [15, 16, 42])。しかし PCS-FP 培地に vitamin solution (Table 0-4) を添加した系でも *C. straminisolvans* CSK1 株の生育 (セルロース分解) の顕著な促進はみられなかったことから (data not shown)、促進物質はそれ以外の新規な物質、あるいは複数の物質が必要である、ということも考えられる。今後この促進物質をさらに解析、同定することで更なる理解が深まると考えられる。

C. straminisolvans CSK1 株純粋培養系と、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株との 2 種混合培養系の濾紙分解過程とを比較すると、濾紙分解量は混合培養系で 5 倍以上増加しているのに対し、*C. straminisolvans* CSK1 株の生育は 2 倍程度しか増加していなかった (Fig. 4-5)。この結果から、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の作用は *C. straminisolvans* CSK1 株の生育を促進するだけでなく、菌体あたりのセルロース分解効率を促進していることが示唆された。このよう

に異種微生物の存在が生育だけではなく振る舞いに影響を及ぼしていることを確認するため、純粋培養系と2種混合培養系において発現しているタンパク質の違いを解析した。まずは *C. straminisolvans* CSK1 株が発現する cellulase を解析するために、培養上清からタンパク質を調整し SDS-PAGE により解析した (Fig. 4-6)。その結果、*C. straminisolvans* CSK1 株の純粋培養系ではみられないバンドが混合培養系でいくつか観察され、混合培養系で特異的に cellulase が発現している可能性が示唆された。しかしそれらのバンドと同じと思われるものが *C. straminisolvans* CSK1 株の DSM122-FP 培地での純粋培養系からも検出され、これらのタンパク質は混合培養系で特異的に発現している、というよりは、*C. straminisolvans* CSK1 株が混合培養中で PCS-FP 培地での純粋培養条件よりも、よりよく生育可能な DSM122-FP 培地での純粋培養条件に近い生理状態にあるからだと考えられる。original microflora における *C. straminisolvans* CSK1 株菌体あたりの cellulase 活性は PCS-FP 培地での純粋培養条件時の 6-7 倍高いという報告[142]も考慮すると、*C. straminisolvans* CSK1 株は混合培養系において特異的な cellulase を発現するわけではないが、菌体あたりの発現量は増加しているものと考えられる。

数理的解析でも、これらの好気性分離株は *C. straminisolvans* CSK1 株の生育に対して強い促進効果を有することが示された (Fig. 4-15, 4-16)。しかし 5+S と 3+5+S における *C. straminisolvans* CSK1 株の生育を比較したときには、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の存在は *C. straminisolvans* CSK1 株に対して阻害的である、という結果となった。これは、*Brevibacillus* sp. M1-5 株が *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株よりも *C. straminisolvans* CSK1 株に対する強い促進効果を有しており、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株がその *Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育を抑えることで、*Brevibacillus* sp. M1-5 株による強い促進効果が失われてしまうためと考えられる。

一方逆に、好気性細菌は *C. straminisolvans* CSK1 株によるセルロース分解代謝産物 (*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株は酢酸、*Brevibacillus* sp. M1-5 株は糖) を利用可能であり、それにより生育が促進されていることが第3章までの解析で示唆されていた。実際に本章第2節の *C. straminisolvans* CSK1 株の培養濾液 (セルロース分解産物を含む) 添加培地での培養実験 (Table 4-1) でこれらの好気性分離株の生育は促進され、また2種混合培養系でもこれらの好気性分離株は純粋培養時よりもよく生育した (Fig. 4-5E, 4-15)。数理的解析 (Fig. 4-15, 4-16) でも、*C. straminisolvans* CSK1 株のこれら好気性分離株に対する促進効果が確認された。ただし *C. straminisolvans* CSK1 株による *Brevibacillus* sp. M1-5 株の促進効果の場合は、効果がみられるのは *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の存在時だけであった。これは *Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育が *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株によって阻害されているとき (Fig. 4-12 参照) にのみ促進効果が表面に現れる、いかえると *Brevibacillus* sp. M1-5 株は *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株による阻害効果が無ければ、単独でも (促進効果なしでも) 最大の生育量を得ることができる、と推測できる。

Pseudoxanthomonas sp. M1-3 株に関しては、その純粋培養、および *C. straminisolvans* CSK1

株との2種混合培養条件で発現する菌体タンパク質を2次元電気泳動により解析し、*C. straminisolvens* CSK1株の存在が*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3株の振る舞いに及ぼす影響を調べた。その結果、混合培養系に特異的なスポットがいくつか検出された (Fig. 4-7)。また混合培養系での状態に近いと予想された *C. straminisolvens* CSK1 株の培養濾液で培養した *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株サンプルも、混合培養系とは異なり、むしろ純粋培養系のほうに近い挙動を示した (Fig. 4-8)。この結果から、利用可能な基質である酢酸が存在する、というような単純な要因によってではなく、混合培養系において *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株はかなり異なった生理状態に置かれているものと推測される。今後さらに混合培養系に特異的なスポットのアミノ酸配列解析、同定を進めることで更なる知見が得られるものと期待される。

(ii) *C. straminisolvens* CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株

第3章までの解析により、*Clostridium* sp. FG4 株は *C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解産物 (オリゴ糖) に完全に依存していることが示唆されていた。このことは本章第4節の解析で *Clostridium* sp. FG4 株が *C. straminisolvens* CSK1 株の存在なしでは全く生育がみられない (Fig. 4-14) ことにより裏付けられた。

第3章までの解析で、*Clostridium* sp. FG4 株は群集内でオリゴ糖の醗酵により酢酸を生成していることが示された。オリゴ糖の蓄積は *C. straminisolvens* CSK1 株のセルロース分解に阻害的に働く (Fig. 4-10) ため、*Clostridium* sp. FG4 株によるオリゴ糖の消費はセルロース分解を促進する効果があると考えられる。しかしその一方で過剰量の酢酸の生成により引き起こされる pH の低下がセルロース分解に阻害的に作用するため、トータルとして *Clostridium* sp. FG4 株の作用はセルロース分解に阻害的に働いていることが示唆されていた。

また本章第4節の解析では、*Clostridium* sp. FG4 株の存在は *C. straminisolvens* CSK1 株の生育に阻害的に働くことが示された (Fig. 4-17、4-18)。この要因としては、上記の pH 低下という要因のほかにも、*C. straminisolvens* CSK1 株が実際に菌体内に取り込んで利用する基質である cellobiose に対する競合効果なども考えうる。しかし一方で、本章第2節の *Clostridium* sp. FG4 株の培養濾液添加培地での培養実験 (Table 4-1) では *C. straminisolvens* CSK1 株の生育 (セルロース分解) の促進効果がみられた。このことから *Clostridium* sp. FG4 株が *C. straminisolvens* CSK1 株に及ぼす影響は多種類あり、またその影響は周囲の状況によって変わりうるのではないかと予想した。*C. straminisolvens* CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株の2種混合培養を2種類の培地 (PCS-FP 培地、DSM122-FP 培地) でおこない、その濾紙分解過程を *C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養系と比較した (Fig. 4-9)。その結果、PCS-FP 培地では *Clostridium* sp. FG4 株の存在により濾紙分解量は増加したが、*C. straminisolvens* CSK1 株が良好に生育可能な DSM122-FP 培地では逆に濾紙分解量は顕著に減少した。この結果から、セルロース分解効率が低いときには *C. straminisolvens* CSK1 株の生育 (セルロース分解) 促進物質産生などの促進効果が優勢で、セルロース分解効率が低いときには、酢酸の過剰生成などの阻害的な効果が

優勢となる、と推測される。実際の群集内では *C. straminisolvens* CSK1 株が良好に生育可能であるため、*Clostridium* sp. FG4 株は *C. straminisolvens* CSK1 株に対して阻害的に作用していると考えられる。

(iii) *Clostridium* sp. FG4 株と好気性分離株

第3章までの解析により、*Clostridium* sp. FG4 株は培養液中のオリゴ糖を *Brevibacillus* sp. M1-5 株が利用可能なグルコースに変換することで、*Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育を促進していることが示唆された。実際に混合培養実験の結果 (Fig. 4-17、4-18) から *Clostridium* sp. FG4 株による *Brevibacillus* sp. M1-5 株の促進効果が確認された。ただし、*C. straminisolvens* CSK1 株による *Brevibacillus* sp. M1-5 株の促進効果の場合と同様に、効果がみられるのは *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の存在時 (すなわち *Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育が抑制されている時) だけであった。

Clostridium sp. FG4 株はオリゴ糖の醗酵により酢酸を生成するので、酢酸によって生育促進される *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の生育に対し促進効果を示すことも予想されたが、数理的解析の結果 (Fig. 4-17、4-18)、*Clostridium* sp. FG4 株の存在は *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の生育にほとんど影響は無かった。*C. straminisolvens* CSK1 株の生成する酢酸量だけで、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の生育促進効果は飽和状態にある、と考えられる。

好気性分離株の存在は、偏性嫌気性細菌である *Clostridium* sp. FG4 株にとって必要不可欠である。また培養液が嫌気化されるだけでは *Clostridium* sp. FG4 株は生育できず、本節(ii)で述べたように、培養液の嫌気化に伴う *C. straminisolvens* CSK1 株の生育、およびセルロース分解による分解産物 (オリゴ糖) の供給が必須である。ただ 3+S+F、5+S+F、3+5+S+F における *Clostridium* sp. FG4 株の生育にほとんど差がみられないことから、好気性分離株はどちらか片方が存在していれば *Clostridium* sp. FG4 株の生育を満たしうる、と考えられる。

(iv) 好気性分離株同士

第3章までの解析により、好気性分離株は互いに競争的、競合的關係にあることが示唆されていた。また本章第2節の培養濾液添加培地での培養実験 (Table 4-1) でも、好気性分離株の培養濾液は他の好気性分離株の生育に阻害的に作用することが示された。これは培養に用いた PCS-basal 培地に含まれる利用可能な基質 (おそらく peptone、yeast extract 中のペプチド、アミノ酸) の枯渇、および余剰代謝産物の蓄積によるものと推測される。さらに興味深いことに、*Bacillus* sp. M1-1 株の培養濾液を添加すると、*Brevibacillus* sp. M1-5 株や *B. subtilis* の生育は完全に阻害された。*Bacillus* sp. M1-1 株はグラム陽性細菌に阻害効果がある抗生物質 (bacitracin) を産生する *Bacillus licheniformis* [53, 99] に近縁であることから、類似の抗生物質の産生能を有していると推察される。*Bacillus* sp. M1-1 株と *Brevibacillus* sp. M1-5 株は original microflora において、長期間共存していたと考えられ、その共存のメカニズムは非常に興味深い。*Bacillus* sp. M1-1 株は培養法によっては original microflora から再現的に検出されるが、PCR-DGGE 解析ではほとんど検出されず、original microflora における存在比率は非常

に小さいと考えられる。おそらく original microflora においては *Bacillus* sp. M1-1 株の生育を抑えるような微生物間相互作用が存在し、そのため *Brevibacillus* sp. M1-5 株の残存が可能となっていたのであろう。

Pseudoxanthomonas sp. M1-3 株と *Brevibacillus* sp. M1-5 株の2種混合培養系では、*Brevibacillus* sp. M1-5 株は day 1 までは生育が確認されたものの、その後菌体量が減少していった (Fig. 4-12)。*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の培養濾液は *Brevibacillus* sp. M1-5 株に対して比較的弱い阻害効果しかみられなかったので、培養上清に何らかの阻害物質を出しているとは考えにくく、それ以外のメカニズムがあると予想された。実際に培養途中の菌体のみを添加した実験 (Fig. 4-13) でも *Brevibacillus* sp. M1-5 株の菌体量減少が観察され、またこの2種混合培養系の培養液を顕微鏡観察すると、両種の菌体が凝集体を形成していた (data not shown) ことから、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株が抗生物質などを培養液中に放出するのではなく、*Brevibacillus* sp. M1-5 株と接することで初めて阻害効果が現れるようなメカニズムがあるのかもしれない。また Fig. 4-13 の実験では、*Brevibacillus* sp. M1-5 株の菌体を添加した培養系において、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株が純粋培養時よりもよく生育していることから、*Brevibacillus* sp. M1-5 株の死菌体を *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株が栄養源として利用している、という可能性も示唆された。

以上の考察から推察される4種の分離株の相互作用ネットワークを Fig. 4-19 にまとめた。これら4種の分離株間には、共生関係だけでなく、阻害的、競合的な関係性も見受けられた。*Brevibacillus* sp. M1-5 株は第2章で解析した4種混合培養系、CSK+M356 (第3章の Δ FG4 と同義) において継代培養過程で消失してしまった分離株であるが、これは *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株による阻害効果の影響によるものと考えられる。この *Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育を *C. straminisolvens* CSK1 株、*Clostridium* sp. FG4 株が促進することで、継代培養後も残存可能になるのだろう。また逆に、ある1種の微生物が増えすぎないように、阻害や競合といった作用も、複数種の微生物の安定な共存には重要であると考えられる。

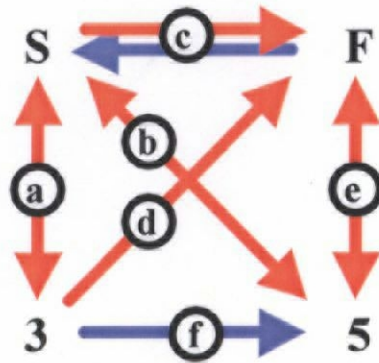


Fig. 4-19. *C. straminisolvens* CSK1 株 (S)、*Clostridium* sp. FG4 株 (F)、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株 (3)、*Brevibacillus* sp. M1-5 株 (5) の4種混合培養系 (3+5+S+F) において作用していると考えられる微生物間ネットワーク図。

- a; 相利共生関係。M1-3 株からは培養液の嫌気化、pH 中性化、酢酸除去、生育促進物質の産生。CSK1 株からは酢酸の供給。(ただし M1-3 株の促進効果は M1-5 株でも代替可能)
- b; 相利共生関係。M1-5 株からは培養液の嫌気化、pH 中性化、糖除去、生育促進物質の産生。CSK1 株からは糖の供給。(ただし M1-5 株の促進効果は M1-3 株でも(一部)代替可能)
- c; 寄生関係。CSK1 株からは糖の供給による促進。FG4 株からは pH 低下、cellobiose に対する競合効果などが考えられる。(FG4 株からは生育促進物質産生、オリゴ糖除去といった促進的効果もあるが、実環境では寄与が小さいと考えられる)
- d; 片利共生関係。M1-3 株からは培養液の嫌気化、およびその作用による CSK1 株の生育、セルロース分解を介した糖の供給による促進。(ただし M1-3 株の促進効果は M1-5 株でも代替可能)
- e; 相利共生関係。FG4 株からはグルコースの供給。M1-5 株からは培養液の嫌気化、およびその作用による CSK1 株の生育、セルロース分解を介した糖の供給による促進。(ただし M1-3 株の促進効果は M1-5 株でも代替可能)
- f; 片害作用 (もしくは寄生作用)。M1-3 株による M1-5 株の生育抑制。(M1-3 株による M1-5 株の溶菌、死菌体の利用、という可能性もある)

総括と展望

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、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の一般的なメカニズムを見出すことを最終的な目的とした。

解析する微生物群集として、堆肥を微生物源として集積培養を繰り返すことにより構築された、50°C、好気条件下、静置培養で稲わら、紙などの様々なセルロース物質を効率よく分解することができる安定な微生物群集 (original microflora) を実験に用いた。本研究では、この original microflora から分離した細菌をもとに、セルロース分解能を有する安定な混合培養系 (人工生態系) を構築し、そこでの各微生物の役割、および各微生物間の相互作用 (微生物間ネットワーク) を解析することで、微生物群集による高効率セルロース分解のメカニズム、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て実験をおこなった。

第1章では original microflora から好気、嫌気両条件下で微生物の分離を試み、original microflora の PCR-DGGE 解析 (Fig. 0-5) で優占種として検出されていた5種全ての細菌を含む、7種の細菌の分離に成功した (Table 1-7)。これらのうちセルロース分解能を示したのは偏性嫌気性細菌の CSK1 株のみであった。系統分類学試験の結果、CSK1 株は既知の嫌気性セルロース分解細菌 *Clostridium thermocellum* と近縁であったが、その相同性は低く、各種生理学的試験をおこなった結果、生育至適温度、酸素耐性などの点で相違がみられたため、*Clostridium* 属の新種として *Clostridium straminisolvens* と命名、提唱した。*C. straminisolvens* CSK1 株は original microflora の培養条件である好気静置培養では生育せず、また嫌気条件下においてもそのセルロース分解効率は非常に低く、高効率分解のためには他の非セルロース分解性細菌の寄与が必要であると考えられた。

第2章では *C. straminisolvens* CSK1 株と非セルロース分解分離株との混合培養による、高効率セルロース分解人工生態系の構築をおこなった。まず *C. straminisolvens* CSK1 株と非セルロース分解分離株を混合した2種混合培養系によるセルロース分解を検証したところ、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株、もしくは *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 (Fig. 2-2)。これら3株の好気性細菌が酸素を消費し培養液を嫌気化することで、*C. straminisolvens* CSK1 株の生育が可能になるのだと考えられる。さらにこの3株の好気性分離株と *C. straminisolvens* CSK1 株との4種混合培養系 (CSK+M356) は、original microflora と同等の高効率セルロース分解能を有していた (Fig. 2-2)。また CSK+M356 は嫌気条件下の培養ではその分解効率が顕著に落ちることから、培養液の嫌気化に加えて、好気性細菌の好気的な代謝も重要であることが示唆された。そこで *C. straminisolvens* CSK1 株純粋培養と CSK+M356 のセルロース分解過程を比較した (Fig. 2-4)。CSK+M356 では、純粋培養系よりもセルロースをよく分解しているにもかかわらず、培養液中の糖や酢酸の蓄積が低く抑えられていた。また培養液の pH は純粋培養時には6以下に低

く保たれていたが、CSK+M356 では一度 pH は 6 以下にまで低下したものの、その後上昇し中性付近にまで回復した。純粋培養時にみられるようなセルロース分解産物の過剰な蓄積や低 pH はセルロース分解を阻害することがよく知られており、非セルロース分解細菌による分解産物の消費、pH 中性化という作用が、セルロース分解の効率化に大きく寄与していると考えられた。しかし CSK+M356 は継代培養を繰り返すと *Brevibacillus* sp. M1-5 株が消失してしまい (Fig. 2-6)、群集構造の安定性を解析するためのモデルとしては適さなかった。

第 3 章では CSK+M356 に original microflora から優占種として検出されていた *Clostridium* sp. FG4 株を加えた 5 種混合培養系 (SF356) を構築した。SF356 は 20 回の継代培養後にも全ての構成メンバーが安定に共存可能であり (Fig. 3-1)、この SF356 を安定な群集のモデルとして解析した。SF356 における各メンバーの役割、および各メンバー間の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、ロックアウト群集を構築した (ロックアウト群集は ΔX と表記、X は除かれた菌株名)。まず各混合培養系におけるセルロース分解過程の解析、比較 (Fig. 3-3) により、除かれた菌株の群集内での役割を推定した (Fig. 3-4)。 $\Delta FG4$ (CSK+M356 と同義) では培養液中の糖の蓄積が多く酢酸の蓄積が少ないことから、*Clostridium* sp. FG4 株が糖を醗酵し酢酸を生成していると推察された。また $\Delta FG4$ でのみ培養後期の pH 中性化がみられることから、*Clostridium* sp. FG4 株による過剰な酢酸生成が pH 低下を引き起こし、セルロース分解に抑制的に働いていると予想された。 $\Delta M1-5$ でも同様に糖の蓄積が多く、*Brevibacillus* sp. M1-5 株の糖消費が示唆された。 $\Delta M1-3$ では酢酸の蓄積が多く、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の酢酸消費が示唆された。BiOLOG による解析 (Table 1-2) では *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株に酢酸利用能はみられなかったが、*C. straminisolvens* CSK1 株の培養上清での *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株純粋培養実験 (Table 3-2) により *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株が酢酸利用能を有することが示された。さらに各メンバー間の相互作用を理解するために、各混合培養系の継代培養前後における各分離株の残存、消失を調べた (Fig. 3-2)。SF356、 $\Delta M1-3$ 、 $\Delta M1-6$ では全メンバーが継代培養後も残存していた。 $\Delta CSK1$ では継代の過程で *Clostridium* sp. FG4 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の順に消失した。これはこの 3 株がセルロース分解産物に依存しているためであると推察された。 $\Delta FG4$ では *Brevibacillus* sp. M1-5 株が消失したが、これは *Brevibacillus* sp. M1-5 株が *Clostridium* sp. FG4 株の代謝産物 (グルコース) に依存しているためと考えられた。 $\Delta M1-5$ では *C. straminisolvens* CSK1、*Clostridium* sp. FG4 株が消失した。これは代謝フローからは説明できず、セルロース分解産物を介した相互作用以外の要因が働いていると推察された。

第 4 章では微生物間相互作用に関してさらに詳細な解析をおこなった。各分離株の培養濾液が他の分離株の生育に及ぼす影響を調べた結果 (Table 4-1)、好気性分離株の培養濾液は他の好気性分離株の生育を抑制し、また非セルロース分解分離株の培養濾液は *C. straminisolvens* CSK1 株の生育 (セルロース分解) を促進することが示された。特に *C. straminisolvens* CSK1 株の生育 (セルロース分解) に対する高い促進効果がみられた *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3

株の培養濾液に関してさらに詳細に解析したところ (Fig. 4-3)、促進効果を有するのは熱不安定性高分子物質、および熱安定性低分子物質の少なくとも 2 種類あることが示唆された。*C. straminisolvans* CSK1 株と *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株との関係性については、2 種混合培養実験 (Fig. 4-5)、およびタンパク質レベルでの実験 (Fig. 4-6、4-7、4-8) もおこなった。その結果、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株は *C. straminisolvans* CSK1 株に対する生育促進だけではなく菌体あたりのセルロース分解効率を促進していること、また *C. straminisolvans* CSK1 株の存在は *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株の発現タンパク質にも大きな影響を及ぼしていること、が唆された。*C. straminisolvans* CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株との 2 種混合培養実験 (Fig. 4-9) からは、*Clostridium* sp. FG4 株は *C. straminisolvans* CSK1 株のセルロース分解に対して促進的な作用、および阻害的な作用の両方を有しており、その大小が環境条件の違いによって変化するものであることが示唆された。*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株と *Brevibacillus* sp. M1-5 株との 2 種混合培養実験 (Fig. 4-12、4-13) からは、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株による *Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育抑制効果 (もしくは殺菌的効果) が示された。

最後に安定な 4 種混合培養系 3+5+S+F (Δ M1-6 と同義) のメンバー (*C. straminisolvans* CSK1 株、*Clostridium* sp. FG4 株、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株、*Brevibacillus* sp. M1-5 株) をもちいて、それぞれの純粋培養系および全ての組み合わせの混合培養系における各菌株の生育をモニタリングし、そのデータをもとに数理的解析をおこない、各菌株間の関係性を網羅的に解析した。その結果、これら 4 種の分離株間には、共生関係だけでなく、阻害的、競合的な関係性も見受けられ、これら様々な関係性が上手くバランスが取れ、ある 1 種の微生物が生育できなかつたり、また逆に生育し過ぎたりすることがないように保たれていることで、複数種の微生物の安定的共存が可能になっているのだと考えられた。

以上の結果から、微生物群集による高効率セルロース分解は、非セルロース分解細菌による培養液の嫌気化、pH 中性化、余剰代謝産物の除去、生育促進物質の産生などの作用によるセルロース分解細菌の成育、および菌体あたりのセルロース分解効率の促進が重要であることが示された。非セルロース分解分離株が産生する *C. straminisolvans* CSK1 株の生育 (セルロース分解) 促進物質の特定、また菌体あたりのセルロース分解効率促進に関する詳細な解析 (例えば mRNA、酵素レベルでの)、およびその促進のメカニズムの解明、などをおこなっていくことで、さらなる深い知見が得られるものと考えられる。微生物群集による廃棄物、廃水処理や、難分解性物質の分解などの効率化を考えた場合にも同様で、重要な機能を担っている微生物を特定し、その微生物が生育、残存しやすいような状況を作り出すことが重要であると考えられる。その場合には、物理化学的な条件だけではなく、どのような微生物が共存しているのか、という状況の考慮も必要であろう。そのためには重要な機能を有する微生物に関する解析に加えて、一見全体の機能には関与していないようにみられる微生物に関しても、微生物間相互作用の解析を含め、考慮していく必要があると考えられる。

微生物間相互作用の解析により、安定な人工生態系において共生的関係 (*C. straminisolvens* CSK1 株と好気性分離株など)、寄生的関係 (*C. straminisolvens* CSK1 株と *Clostridium* sp. FG4 株)、競合的、阻害的關係 (好気性分離株同士) といった、様々なタイプの関係性が見出された。*C. straminisolvens* CSK1 株と好気性分離株の *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株に関しては、発現タンパク質の2次元電気泳動による解析もおこない、*Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株が混合培養系において多数のタンパク質を特異的に発現していることが示唆された。今後そのタンパク質を同定することで更なる知見が得られるものと期待される。また *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 株による *Brevibacillus* sp. M1-5 株の生育抑制効果 (もしくは殺菌的効果) に関しては、培養上清に阻害物質 (抗生物質) を放出する、という良く知られたメカニズムではなく、菌体同士の接触が抑制に必要なのではないかと予想され、この抑制効果のメカニズムの解明も今後の研究課題であろう。

以上のように、安定な人工生態系において共生的関係、寄生的関係、競合的、阻害的關係といった、様々なタイプの関係性が見出され、これら様々な関係性が上手くバランスが取れていることで、複数種の微生物の安定的共存が可能になっているのだと考えられた。今後さらに解析にもちいる微生物種を増やしていくことで (例えば *Bordetella* sp. M1-6 株)、さらなる深い知見が得られるものと予想される。また現在は定常期の菌体量のみを解析に使用しているが、各菌株の経時的変化をうまく他菌株との相互作用により説明できるような、一步進んだ数理的解析、simulating などができるようになればおもしろい。ただそのためには現在以上に簡便で精度が高い菌体量のモニタリング手法 (例えば GFP (green fluorescent protein) 発現遺伝子の導入とフローサイトメーターによる計数) の適用が必要であろう。さらに微生物群集の安定性に関する一般的な議論をするためには、本研究で解析したセルロース分解系以外の系での実験が有効かもしれない。本研究で解析したセルロース分解系は確かに複数種の微生物が安定に共存しうる系ではあるが、実験系としていくつかの難点がある。難点の一つは系自体が空間的に不均一なことである。本研究で解析したセルロース分解系は好気静置条件で培養をおこなっているため、培養液表面と培養液中では、溶存酸素濃度、酸化還元電位という点で異なる環境となっていると考えられる。また基質として固体であるセルロースを使用しており、一部の菌 (特に *C. straminisolvens* CSK1 株) はセルロースに吸着した状態で存在している。このような特徴は、各菌株の増殖を簡単にモニタリングできない要因となっている。ただこの微生物の空間的な棲み分け、という特徴は、微生物生態学的に非常に興味深い事象であり (空間的な棲み分けが微生物の多様性の創出、維持に必要であるという報告[97, 100, 135]もある)、今後の詳細な解析が期待される。もう一つの難点は、使用している微生物に関する情報の不足である。本研究では堆肥から集積培養し自らが分離した微生物を使用しているため、当然それら微生物に関する情報、実験データがほとんど無い状態であった。遺伝子操作法が確立されておりゲノム情報も使用可能であるような微生物の組み合わせにより、安定な微生物群集のモデル系を構築することができれば、微生物間ネットワークの解析、お

よび安定性のメカニズムの解析が比較的容易におこなえるようになるのではないかと考えられる。

本研究を通して得られた微生物群集に関する知見は、セルロースの効率的分解過程のみならず、環境微生物学、および微生物生態学的見地からも非常に有用であると考えられる。今後は上述の課題を克服し、微生物生態に関する更なる知見が得られることを期待する。

参考文献

本論文に関する著者の発表論文

- [1] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Yokota A, Igarashi Y (2004) *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2043-2047 (第1章)
- [2] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Igarashi Y (2004) Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 133-142 (第1章、第2章)
- [3] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Igarashi Y (2005) Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7099-7106 (第1章、第3章)

引用文献

- [4] Alexander M (1997) Microbial communities and interactions: a prelude. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (eds). *Manual of Environmental Microbiology*. ASM press, Washington DC, pp 5-13
- [5] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- [6] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169
- [7] Amann R, Ludwig W (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 555-565
- [8] Andreason K, Nielsen PH (1997) Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3662-3668
- [9] Aoki SK, Pamma R, Hernday AD, Bickham JE, Braaten BA, Low DA (2005) Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science* 309: 1245-1248
- [10] Ashelfold KE, Weightman AJ, Fry JC (2002) PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic Acids Res.* 30: 3481-3489
- [11] Barreiros L, Nogales B, Manaia CM, Ferreira ACS, Pieper DH, Reis MA, Nunes OC (2003) A novel pathway for mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture. *Environ. Microbiol.* 5: 944-953
- [12] Beguin P, Aubert JP (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 25-58
- [13] Bok JD, Yemool DA, Eveleig DE (1998) Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4774-4781
- [14] Briones A, Raskin L (2003) Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 270-276

- [15] Bruns A, Cypionka H, Overmann J (2002) Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3978-3987.
- [16] Bruns A, Nubel U, Cypionka H, Overmann J (2003) Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1980-1989
- [17] Carvalho MF, Alves CCT, Ferreira MIM, De Marco P, Castro PML (2002) Isolation and initial characterization of a bacterial consortium able to mineralize fluorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 102-105
- [18] Chen J, Weimer P (2001) Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology* 147: 21-30
- [19] Chen MY, Tsay SS, Chen KY, Shi YC, Lin YT, Lin GH (2002) *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N(2)O-producing species isolated from hot springs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2155-2161
- [20] Coughlan MP, Mayer F (1992) The cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds). *The Prokaryotes*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 460-516
- [21] Cremonesi L, Firpo S, Ferrari M, Righetti PG, Gelfi C (1993) Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 22: 326-330
- [22] Davis KE, Joseph SJ, Janssen PH (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 826-834
- [23] Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, Boon N, Crul K, Maertens S, Höfte M, Vos PD, Verstraete W, Top EM (2003) Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1532-1541
- [24] DeLong EF, Pace NR (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50: 470-478
- [25] Devereux R, Wilkinson SS (2004) Amplification of ribosomal RNA sequences. In Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD (eds). *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 509-522
- [26] Dollhopf SL, Pariseau ML, Hashsham SA, Tiedje JM (2003) Competitive and cooperative interactions affecting a fermentative spirochete in anaerobic chemostats. *Microb. Ecol.* 46: 1-11
- [27] Drent WJ, Lahpor GA, Wiegant WM, Gottschal JC (1991) Fermentation of inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 455-462
- [28] Drzyzga O, Gerritse J, Dijk JA, Elissen H, Gottschal JC (2001) Coexistence of a sulphate-reducing *Desulfovibrio* species and the dehalorespiring *Desulfotobacterium frappieri* TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulphate and tetrachloroethene. *Environ. Microbiol.* 3: 92-99
- [29] Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG (2003) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol. Microbiol.* 50: 1477-1491

- [30] Dunn AK, Handelsman J (2002) Toward an understanding of microbial communities through analysis of communication networks. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 565-574
- [31] Dunn AK, Klimowicz AK, Handelsman J (2003) Use of a promoter trap to identify *Bacillus cereus* genes regulated by tomato seed exudate and a rhizosphere resident, *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1197-1205
- [32] Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 224-229
- [33] Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- [34] Fernández A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C, Tiedje J (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3697-3704
- [35] Fernández AS, Hashsham SA, Dollhope SL, Raskin L, Glagoleva O, Dazzo FB, Hickey RF, Criddle CS, Tiedje JM (2000) Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4058-4067
- [36] Foster JS, Kolenbrander PE (2004) Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4340-4348
- [37] Fukumori F, Kudo T, Sashihara N, Nagata Y, Ito K, Hokikoshi K (1989) The third cellulase of alkalophilic *Bacillus* sp. strain N-4: evolutionary relationships within the *cel* gene family. *Gene* 76: 289-298
- [38] Glissmann K, Conrad R (2000) Fermentation pattern of methanogenic degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 117-126
- [39] Gottschal JC (1993) Growth kinetics and competition--some contemporary comments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63: 299-313
- [40] Graber JR, Breznak JA (2005) Folate cross-feeding supports symbiotic homoacetogenic spirochetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1883-1889
- [41] Grenier D, Mayrand D (1986) Nutritional relationships between oral bacteria. *Infect. Immun.* 53: 616-620
- [42] Guan LL, Onuki H, Kamino K (2000) Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2797-2803
- [43] Han YW (1978) Microbial utilization of straw. *Adv. Appl. Microbiol.* 23: 119-153
- [44] Harding NE, Patel YN, Coleman RJ (2004) Organization of genes required for gellan polysaccharide biosynthesis in *Sphingomonas elodea* ATCC 31461. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 70-82
- [45] Haruta S, Cui Z, Huang Z, Li M, Ishii M, Igarashi Y, (2002) Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 529-534
- [46] Haruta S, Kondo M, Nakamura K, Aiba H, Ueno S, Ishii M, Igarashi Y (2002) Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing

- gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 224-231
- [47] Hashsham SA, Fernández AS, Dollhopf SL, Dazzo FB, Hickey RF, Tiedje JM, Criddle CS (2000) Parallel processing of substrate correlates with greater functional stability in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4050-4057
- [48] Hayashi H, Takehara M, Hattori T, Kimura T, Karita S, Sakka K, Ohmiya K (1999) Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes *xynA* and *xynB* and characterization of XynA from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 348-357
- [49] Heijthuijsen JHFG, Hansen TA (1986) Interspecies hydrogen transfer in co-cultures of methanol-utilizing acidogens and sulphate-reducing or methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 57-64
- [50] Hoffmeister M, Martin W (2003) Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environ Microbiol* 5: 641-649
- [51] Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC (1977) *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th edn. Blakusburg, VA: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- [52] Imachi H, Sekiguchi Y, Kamagata Y, Hanada S, Ohashi A, Harada H (2002) *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1729-35
- [53] Ishihara H, Shimura K (1988) Further evidence for the presence of a thiazoline ring in the isoleucylcysteine dipeptide intermediate in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett.* 226: 319-323
- [54] Ito T, Nielsen JL, Okabe S, Watanabe Y, Nielsen PH (2002) Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfate-reducing bacteria inhabiting an oxic-anoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 356-364
- [55] Jackson BE, McInerney MJ (2002) Anaerobic microbial metabolism can proceed close to thermodynamic limits. *Nature* 415: 454-456
- [56] Jin F, Yamasato K, Toda K (1988) *Clostridium thermocopriae* sp. nov., a cellulolytic thermophile from animal feces, compost, soil, and a hot spring in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 279-281
- [57] Johnson EA, Bouchot F, Demain AL (1985) Regulation of cellulase formation in *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2303-2308
- [58] Johnson EA, Reese ET, Demain AL (1982) Inhibition of *Clostridium thermocellum* cellulase by end products of cellulolysis. *J. Appl. Biochem.* 4: 64-71
- [59] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein SS (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129
- [60] Kamagata Y, Tamaki H (2005) Cultivation of uncultured fastidious microbes. *Microbes Environ.* 20: 85-91
- [61] Karnholz A, Küsel K, Gößner A, Schramm A, Drake H (2002) Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1005-1009
- [62] Kerr B, Riley MA, Feldman MW, Bohannan BJM (2002) Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature* 418: 171-174
- [63] Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA (2005) Isolation

- of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546
- [64] Krieg NR, Holt JG (Eds) (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol 1, Williams and Wilkins, Baltimore, London
- [65] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245
- [66] Kúsel K, Drake HL (1995). Effects of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3667-3675
- [67] Kúsel K, Karnholz A, Trinkwalter T, Devereux R, Acker G, Drake HL (2001) Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerant acetogen isolated from sea grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4734-4741.
- [68] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- [69] Lamed R, Kenig R, Setter E (1985) Major characteristics of the cellulolytic system of *Clostridium thermocellum* coincide with those of the purified cellulosome. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 37-41
- [70] LaPara TM, Konopka A, Nakatsu CH, Alleman JE (2001) Thermophilic aerobic treatment of a synthetic wastewater in a membrane-coupled bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26: 203-109
- [71] Leadbetter JR (2003) Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 274-281
- [72] Lewis SM, Montgomery L, Garleb KA, Berger LL, Fahey GC Jr (1988) Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment on in vitro degradation of cellulosic substrates by mixed ruminal microorganisms and *Bacteroides succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1163-1169
- [73] Liesack W, Schnell S, Revsbech NP (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 625-645
- [74] Liu Y, Balkwill DL, Aldrich HC, Drake GR, Boone DR (1999) Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 545-556
- [75] Ljungdahl LG, Erikson KE (1985) Ecology of microbial cellulose degradation. In: Marshall KC (eds). *Advances in Microbial Ecology*, vol. 8. Plenum Press, New York, pp 237-299
- [76] Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, Hooper DU, Huston MA, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle DA (2001) Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science* 294: 804-808
- [77] Luo HW, Zhang H, Suzuki T, Hattori S, Kamagata Y (2002) Differential expression of methanogenesis genes of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum*) in pure culture and in cocultures with fatty acid-oxidizing syntrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1173-1179
- [78] Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, Martinez MJ, Gutierrez A, del Rio JC (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8: 195-204
- [79] Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, Whiteley M (2005) *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J. Bacteriol.* 187: 554-566
- [80] McCann KS (2000) The diversity-stability debate. *Nature* 405: 228-233

- [81] Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 159-167
- [82] Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141
- [83] Nakamura K, Haruta S, Nguyen HL, Ishii M, Igarashi Y (2004) Enzyme production approach for determining the function of microorganisms within a community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3329-3337
- [84] Nakamura LK (1993) DNA relatedness of *Bacillus brevis* Migula 1900 strains and proposal of *Bacillus agri* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus centrosporus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 20-25
- [85] Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262
- [86] Ng TK, Ben-Bassat A, Zeikus JG (1981) Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1337-1343
- [87] Ng TK, Weimer PJ, Zeikus JG (1977) Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* 114: 1-7
- [88] Odom JM, Wall JD (1983) Photoreduction of H₂ from cellulose by an anaerobic bacterial coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1300-1395
- [89] Ohno M, Shiratori H, Park MJ, Saitoh Y, Kumon Y, Yamashita N, Hirata A, Nishida H, Ueda K, Beppu T (2000) *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1829-1832
- [90] Okabe S, Ito T, Satoh H (2003) Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 322-334
- [91] Paine RT (1966) Food web complexity and species diversity. *Am. Nat.* 100: 65-75
- [92] Palmer RJ Jr, Kazmerzak K, Hansen MC, Kolenbrander PE (2001) Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infect. Immun.* 69: 5794-5804
- [93] Pfennig N, Lippert KL (1966) Über das Vitamine B₁₂ bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.* 55: 245-256
- [94] Pohlschroeder M, Leschine SB, Canale-Parola E (1994) *Spirochaeta caldaria* sp. nov., a thermophilic bacterium that enhances cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* 161: 17-24
- [95] Rao D, Webb JS, Kjelleberg S (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1729-1736
- [96] Rappe MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418: 630-633

- [97] Rainey PB, Rainey K (2003) Evolution of cooperation and conflict in experimental bacterial populations. *Nature* 425: 72-74
- [98] Rendulic S, Jagtap P, Rosinus A, Eppinger M, Baar C, Lanz C, Keller H, Lambert C, Evans KJ, Goesmann A, Meyer F, Sockett RE, Schuster SC (2004) A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science* 303: 689-692
- [99] Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, Lopez de Leon A, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, Olsen PB, Rasmussen MD, Andersen JT, Jorgensen PL, Larsen TS, Sorokin A, Bolotin A, Lapidus A, Galleron N, Ehrlich SD, Berka RM (2004) Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5: R77
- [100] Rocop G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A, Coleman M, Hauser L, Hess WR, Johnson ZI, Land M, Lindell D, Post AF, Regala W, Shah M, Shaw SL, Steglich C, Sullivan MB, Ting CS, Tolonen A, Webb EA, Zinser ER, Chisholm SW (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424: 1001-1002
- [101] Sa-Correia I, Fialho AM, Videira P, Moreira LM, Marques AR, Albano H (2002) Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 170-176
- [102] Saddler JN, Chan MKH (1982). Optimization of *Clostridium thermocellum* growth on cellulose and pretreated wood substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16: 99-104.
- [103] Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425
- [104] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- [105] Schink B (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262-280
- [106] Schink B (2002) Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 257-261
- [107] Schloss PD, Handelsman J (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 303-310
- [108] Shiojiri K, Takabayashi J, Yano S, Takafuji A (2002) Oviposition preferences of herbivores are affected by tritrophic interaction webs. *Ecol. Lett.* 5: 186-192
- [109] Smith NR, Yu Z, Mohn WW (2003) Stability of the bacterial community in a pulp mill effluent treatment system during normal operation and a system shutdown. *Water Res.* 37: 4873-4884
- [110] Sorensen SR, Ronen Z, Aamand J (2002) Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3478-3485
- [111] Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849
- [112] Stahl DA (1997) Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (eds). *Manual of*

- Environmental Microbiology. ASM press, Washington DC, pp 102-114
- [113] Swain M, Ross NW (1995) A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 16: 948-951
- [114] Taillisz P, Girard H, Millet J, Beguin P (1989) Enhanced cellulose fermentation by an asporogenous and ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 207-211
- [115] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, Kamagata Y (2005) Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2162-2169
- [116] Tanaka K, Ding MY, Helaleh MIH, Taoda H, Takahashi H, Hu W, Hasebe K, Haddad PR, Fritz JS, Sarzanini C (2002). Vacancy ion-exclusion chromatography of carboxylic acids on a weakly acidic cation-exchange resin. *J. Chromatogr. A* 956: 209-214
- [117] Thomas S, Sarfaraz S, Mishra LC, Iyengar L (2002) Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 57-63
- [118] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882
- [119] Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, Ovreas L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64: 53-62
- [120] Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245
- [121] Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF (2004) Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428: 27-43
- [122] Updegraff DM (1969) Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* 32: 420-424
- [123] Veal DA, Lynch JM (1984) Associative cellulolysis and dinitrogen fixation by cocultures of *Trichoderma harzianum* and *Clostridium butylicum*. *Nature* 310: 695-696
- [124] Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74
- [125] von Canstein HF, Li Y, Felske A, Wagner-Döbler I (2001) Long-term stability of mercury reducing microbial biofilm communities analyzed by 16S-23S rDNA interspacer region polymorphism. *Microb. Ecol.* 42: 624-634
- [126] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PDA, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WBC, Murray RGW, Stackebrandt E, Starr EMP, Truper HG (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464
- [127] Weaver VB, Kolter R (2004) *Burkholderia* spp. alter *Pseudomonas aeruginosa* physiology through iron sequestration. *J. Bacteriol.* 186: 2376-2384

- [128] Weimer PJ, Zeikus JG (1977) Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Appl. Environ. Microbiol. 33: 289-297
- [129] Wolfaardt GM, Lawrence JR, Roberts RD, Caldwell DE (1994) The role of interactions, sessile growth and nutrient amendments on the degradative efficiency of a microbial consortium. Can. J. Microbiol. 40: 331-340
- [130] Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 5088-5090
- [131] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 4576-4579
- [132] Worm J, Jensen LE, Hansen TS, Sondergaard M, Nybroe O (2000) Interactions between proteolytic and non-proteolytic *Pseudomonas fluorescens* affect protein degradation in a model community. FEMS Microbiol. Ecol. 32: 103-109
- [133] Yang JC, Chynoweth DP, Williams DS, Li A (1990) *Clostridium aldrichii* sp. nov., a cellulolytic mesophile inhabiting a wood-fermenting anaerobic digester. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 268-272
- [134] Zhang YP, Lynd LR (2005) Regulation of cellulase synthesis in batch and continuous cultures of *Clostridium thermocellum*. J. Bacteriol. 187: 99-106
- [135] Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu LY, Marsh TL, O'Neill RV, Palumbo AV, Tiedje JM (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 326-34
- [136] Zhu H, Qu F, Zhu LH (1993) Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Nucleic Acids Res. 21: 5278-5280
- [137] Zwirgmaier K, Ludwig W, Schleifer KH (2004) Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization –RING-FISH. Mol. Microbiol. 51: 89-96
- [138] Editorial board of the IAM catalogue of strains (Eds.) (2004) IAM catalogue of strains, 3rd Edn. The Microbiology Research Foundation, Tokyo
- [139] 上木勝司、永井史郎 (編) (1993) 嫌気微生物学. 養賢堂, 東京
- [140] 加藤創一郎 (2003) リグノセルロース分解能を有する微生物群集の解析. 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文
- [141] 近藤 美絵 (2000) 有機性廃棄物処理における微生物群集の分子生物学的解析. 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文
- [142] 堺繁嗣 (2005) 高効率リグノセルロース分解能を示す微生物集団の解析. 東京大学大学院農学生命科学研究科修士論文
- [143] 染谷孝, 古坂澄石 (1981) 土と微生物. 23: 23-31
- [144] 佐藤宏明, 山本智子, 安田弘法 (編) (2001) 群集生態学の現在. 京都大学学術出版会, 京都
- [145] 宮下直, 野田隆史 (2003) 群集生態学. 東京大学出版会, 東京
- [146] List of media, in DSMZ Homepage; <http://www.dsmz.de/media/med122.htm>
- [147] List of media, in DSMZ Homepage; <http://www.dsmz.de/media/med502.htm>

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々からの御指導、御助言、御支援、激励の言葉を頂き、ここにその感謝の意を表します。

本論文を終えるにあたり、終始有益な御指導と御鞭撻を賜りました本学農学生命科学研究科教授、五十嵐泰夫先生に深く感謝いたします。

終始適切な御助言と御指導を頂きました本学農学生命科学研究科助教授、石井正治先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、実験の御指導から論文の考察まで終始お世話になりました本学農学生命科学研究科寄付講座教員、春田伸博士に深く感謝いたします。

適確な御助言と御指導を頂きました本学農学生命科学研究科助手、新井博之先生に深く感謝いたします。

共同研究者として数々の御助言と御指導を頂きました中国農業大学助教授、崔宗均先生に深く感謝いたします。

本論文第1章の *Clostridium straminisolvens* CSK1 株の系統分類学的解析に際し、多大なる御助言、実験の御指導を仰ぎました本学分子生物学研究所助教授、横田明先生、および本学分子生物学研究所バイオリソーシス研究室の皆様にご深く感謝いたします。

本論文第4章の群集構造ダイナミクスの数理的解析に際し、多大なる御助言を頂き、また優れた解析プログラムを構築して頂きました、本学新領域創成科学研究科助教授、有田正規先生に深く感謝いたします。

本研究に対し多くの御助言、御討論を頂きました諸先生方に深く感謝致します。

本研究に御助言、御討論を頂き、かつ円満な実験環境を提供して下さった研究室の諸氏に深く感謝いたします。

最後に本大学院博士課程での学生生活を支えて下さった家族、友人達に深く感謝いたします。

2006年 1月

加藤 創一郎

論文の内容の要旨

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成15年度博士課程 進学
氏 名 加藤 創一郎
指導教員名 五十嵐 泰夫

論文題目 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研究

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していることはほとんどなく、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。このように微生物が群集として存在することにより、しばしば単独の微生物よりも高い機能を発揮し、またその機能や構造が攪乱などの外部要因に対して非常に安定であるため、有機性廃棄物、廃水処理などの多くの分野で微生物群集の利用、制御に関する研究が近年重要視されている。様々な解析手法の発達により、実際の環境中における微生物の生態を解析することが徐々に可能になってきたとはいえ、微生物群集における各菌の果たす機能、さらにはそれら微生物間の相互作用を理解するのは非常に困難であるのが現状である。そこで本研究では、このように高い機能を有し、機能的、構造的に安定なモデル微生物群集（人工生態系）を構築し、その解析をおこなった。

本研究では、堆肥を微生物源として集積培養を繰り返すことにより構築された、50℃、好気条件下、静置培養で稲わら、紙などの様々なセルロース物質を効率よく分解することができる微生物群集（original microflora）を実験に用いた。original microflora は継代培養に対する安定性を有しており、20回以上に渡る継代培養後もその機能（高効率セルロース分解）と構造（検出される微生物種）に変化はみられなかった。original microflora の PCR-DGGE 解析では、好気性、嫌気性の細菌が安定に共存していることが示されていた。本研究では、この original microflora から分離した細菌をもとに、セルロース分解能を有する安定な混合培養系

(人工生態系)を構築し、そこでの各微生物の役割、および各微生物間の相互作用(微生物間ネットワーク)を解析することで、微生物群集による高効率セルロース分解のメカニズム、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て実験をおこなった。

(1) original microflora からの細菌の分離 original microflora から好気、嫌気両条件下で微生物の分離を試みた結果、PCR-DGGE 解析で優占種として検出されていた5種全ての細菌を含む、7種の細菌の分離に成功した(表1)。これらのうちセルロース分解能を示したのは偏性嫌気性細菌のCSK1株のみであった。CSK1株は既知セルロース分解細菌の*Clostridium thermocellum*に近縁であったが、各種系統分類学試験をおこなった結果、生育至適温度、酸素耐性などの点で相違がみられたため、*Clostridium* 属の新種として*Clostridium straminisolvens*と命名、提唱した。CSK1株はoriginal microfloraの培養条件、好気静置培養では生育せず、また嫌気条件下においてもそのセルロース分解効率は非常に低く、高効率分解のためには他の非セルロース分解性細菌の寄与が必要であると考えられた。

表1 original microflora から分離された細菌

| | Growth | | Utilization ^a | | | | |
|--|---------|-----------|--------------------------|------------|---------|-------------------|---------|
| | aerobic | anaerobic | Cellulose | Cellobiose | Glucose | Acetate | Ethanol |
| <i>Clostridium straminisolvens</i> CSK1 ^c | - | + | + | + | - | N.T. ^b | N.T. |
| <i>Clostridium</i> sp. FG4 ^c | - | + | - | + | + | N.T. | N.T. |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> sp. M1-3 ^c | + | + | - | - | - | - | - |
| <i>Brevibacillus</i> sp. M1-5 ^c | + | - | - | - | + | - | + |
| <i>Bordetella</i> sp. M1-6 ^c | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bacillus</i> sp. M1-1 | + | + | - | + | + | + | N.T. |
| <i>Virgibacillus</i> sp. M1-4 | + | - | - | - | - | + | N.T. |

^a CSK1株、FG4株は目的とする有機物を唯一の炭素源とした培地で嫌氣的に培養し、酸生成の有無により判定。その他の株はBiOLOGシステムを用いて好氣的に培養した結果。ただしエタノールの利用性は液体培養によるエタノールの減少を直接測定した。^b N.T., not tested ^c これら5種はoriginal microflora からPCR-DGGE法で検出されていた細菌

(2) 高効率セルロース分解混合培養系の解析 CSK1株と非セルロース分解性分離株とを混合した2種混合培養系によるセルロース分解を検証したところ、M1-3、M1-5、もしくはM1-6株との2種混合培養系でセルロース分解が確認された。これら3株の好気性細菌が酸素を消費し培養液を嫌気化することで、CSK1株の生育が可能になるのだと考えられる。さらにこの3株とCSK1株との4種混合培養系(CSK+M356)は、original microfloraと同等の高効率セルロース分解能を有していた。またCSK+M356は嫌気条件下ではその分解効率が顕著に落ちることから、培養液の嫌気化に加えて、好気性細菌の好氣的な代謝も重要であることが示唆された。そこでCSK1株純粋培養とCSK+M356のセルロース分解過程の解析、比較をお

こなつた。CSK+M356 では、純粋培養時よりもセルロースをよく分解しているのにもかかわらず、培養液中の糖や酢酸の蓄積が低く抑えられていた。また培養液の pH は、純粋培養時には 6 以下の低 pH が保たれていたが、CSK+M356 では一度 pH は 6 以下にまで低下したものの、その後上昇し中性付近にまで回復した。純粋培養時にみられるようなセルロース分解産物の過剰な蓄積や低 pH はセルロース分解を阻害することがよく知られており、非セルロース分解細菌による分解産物の消費、pH 中性化という作用が、セルロース分解の効率化に大きく寄与していると考えられる。

(3) 安定な 5 種混合培養系の解析 CSK+M356 は高いセルロース分解効率を示したが、継代培養を繰り返すと M1-5 株が検出されなくなり、群集構造の安定性をみるモデルとしては不十分であった。一方で、この CSK+M356 に PCR-DGGE 解析で優占種として検出されていた FG4 株を加えた 5 種混合培養系 (SF356) は、20 回の継代培養後にも全ての構成メンバーが安定に共存していた (表 2)。そこでこの SF356 を安定な群集のモデルとして、さらなる解析をおこなつた。SF356 における各メンバーの役割、および各メンバー間の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 (ノックアウト群集は ΔX と表記、X は除かれた菌株名)。まず各混合培養のセルロース分解過程を解析、比較することで、除かれた菌株の群集内での役割を推定した。 $\Delta FG4$ (CSK+M356 と同義) では、培養液中の糖の蓄積が多く、酢酸の蓄積が少ないことから、FG4 株が糖を醗酵し酢酸を生成していると推察された。また $\Delta FG4$ でのみ培養後期の pH 中性化がみられることから、FG4 株による過剰な酢酸生成が pH 低下を引き起こし、セルロース分解に抑制的に働いていると予想された。 $\Delta M1-5$ でも同様に糖の蓄積が多く、M1-5 株の糖消費が示唆された。 $\Delta M1-3$ では酢酸の蓄積が多く、M1-3 株の酢酸消費が示唆された。BiOLOG による解析では M1-3 株に酢酸利用能はみられなかったが、CSK1 株の培養上清での M1-3 株純粋培養実験により M1-3 株が酢酸利用能を有することが示された。以上の実験、および各分離株の純粋培養での特徴をもとに、各分離株の役割を図 1 のように推定した。

各メンバー間の相互作用を理解するために、各混合培養系の継代培養前後における各分離株の残存、消失を調べた (表 2)。SF356、 $\Delta M1-3$ 、 $\Delta M1-6$ では全メンバーが継代培養後 (22nd generation) も残存していた。 $\Delta CSK1$ では継代の過程で FG4、M1-5、M1-3 株の順に消失した。これはこの 3 株がセルロース分解産物に依存しているためであると推察される。 $\Delta FG4$ では M1-5 株が消失したが、これは M1-5 株が FG4 株の代謝産物 (グルコース) に依存しているためと考えられる。 $\Delta M1-5$ では CSK1、FG4 株が消失した。これは代謝フローからは説明できず、セルロース分解産物を介した相互作用以外の要因が働いていると推察される。

(4) 異種細菌間相互作用の解析 SF356 の構成メンバーの純粋培養系、および 2-5 種混合培養系の培養過程における各細菌の生育を定量的 real-time PCR 法によりモニタリングした。その結果、M1-3 株による M1-5 株の生育抑制といったような、これまでの解析からは見出されていなかった関係がいくつか明らかとなった。また各分離株を他の分離株の培養上清

を添加した培地を用いて培養することで、セルロース分解代謝産物や、pH 変化などを介さないような相互作用の検出を試みた。その結果、非セルロース分解性分離株の培養上清は CSK1 株の生育を促進し、また好気性分離株の培養上清は他の好気性分離株の生育を抑制することが示された。さらに異種細菌との相互作用は、生育だけではなくその性質、振る舞いにも影響を与えると予想し、純粋培養条件、および CSK1 株との混合培養条件における M1-3 株の発現タンパク質を 2 次元電気泳動法により解析した。その結果、混合培養条件で特異的に発現しているとみられるタンパク質のスポットがいくつか検出され、CSK1 株との相互作用が M1-3 株の生理状態にも影響を及ぼしていることが示された。

(5) まとめ 群集によるセルロースの高効率分解には、非セルロース分解細菌による培養液の嫌気化、pH 中性化、余剰代謝産物の消費、生育促進物質の産生といった働きが、CSK1 株のセルロース分解を促進することが重要であることが示された。またこの群集内には共生や競争、促進や阻害といった、様々なタイプの異種細菌間相互作用が存在していることが示された。このような微生物間ネットワークのバランスがうまく取れていることが複数種の微生物の安定な共存を可能にしているのだと考えられる。

表 2 各混合培養系における構成微生物種の残存と消失

| Mixed culture | 2nd generation | | | | | 22nd generation | | | | |
|---------------------------|----------------|------|------|------|------|-----------------|------|------|------|------|
| | CSK1 | FG4 | M1-3 | M1-5 | M1-6 | CSK1 | FG4 | M1-3 | M1-5 | M1-6 |
| SF356 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Δ CSK1 | N.I. | + | + | + | + | N.I. | - | - | - | + |
| Δ FG4 ^a | + | N.I. | + | + | + | + | N.I. | + | - | + |
| Δ M1-3 | + | + | N.I. | + | + | + | + | N.I. | + | + |
| Δ M1-5 | + | + | + | N.I. | + | - | - | + | N.I. | + |
| Δ M1-6 | + | + | + | + | N.I. | + | + | + | + | N.I. |

^a CSK+M356 と同義。 +, detected; -, not detected; N.I., not inoculated in the mixed culture

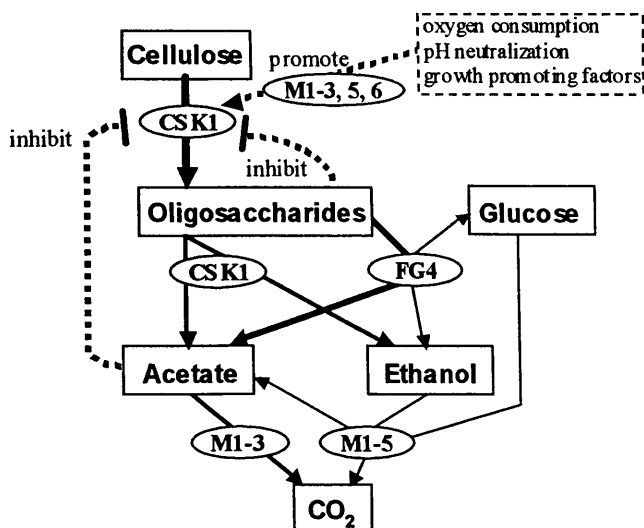


図 1 SF356 におけるセルロース分解の代謝フローと各菌株の役割のネットワークモデル