

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 27 年度 博士課程進学
氏名：納庄 一樹
指導教員名：日高 真誠

論文題目

細菌の寒天培地でのコロニー形成への脂肪酸の関与とその応用

研究の背景

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

本研究の目的

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

筆者の研究開始前に、当研究室の前任者が、上記の表現型を示す *E. coli* 変異株を温度感受性 (Temperature-sensitive, ts) 変異株ライブラリーから複数分離していた。なかでも、長鎖不飽和脂肪酸合成に必須の β -ketoacyl-ACP synthase I をコードする *fabB* 遺伝子に異なる点変異を持つ 2 株 (*fabB*^{ts}-1 株および *fabB*^{ts}-2 株) が最も再現性よく目的の表現型を示した。また、*E. coli* MG1655 野生株ベースの *fabB* 遺伝子の破壊株も作製されていた。

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

E. coli fabB 変異株の解析

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

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

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

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

様々な細菌における脂肪酸合成阻害時のコロニー形成能

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

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

飢餓状態の細菌のコロニー形成における脂肪酸の重要性

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

実験室の富栄養条件では旺盛なコロニー形成能を有する *E. coli* も、長期の飢餓状態を経験すると、生理活性は保っているにもかかわらず、富栄養条件に戻してもコロニー形成しなくなることが知られており、このような状態の *E. coli* は自然界のコロニー形成しない（培養できない）細菌の性質を反映していると考えられている。そこで低温飢餓に長期間曝した *E. coli* に対する脂肪酸の供給効果を検証した結果、oleic acid を供給するだけで、供給しない場合の 10 倍以上にまでコロニー形成数が増大することがわかった。上に記した $\Delta fabB$ 株での観察のとおり、固体培地での増殖開始には一定量以上の脂肪酸が必要であったことと考え合わせると、飢餓状態に陥った *E. coli* の細胞では、脂肪酸合成機能が極端に低下しており、脂肪酸以外の栄養素が供給されても十分な脂肪酸量を合成できないがゆえに、増殖も開始することができないのではないかと推察した。ここに脂肪酸が外部から供給されることで、細胞の基本的機能の回復をもたらす初期代謝（増殖）が可能となり、それにとまって脂肪酸合成機能も十分に上昇して、コロニー形成の初期に存在する障壁を乗り越えられるようになるのだろう。

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

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

脂肪酸の不足がコロニー形成を阻害するメカニズム

最近、当研究室では、cAMP-CRP の機能を欠損させた *E. coli* は、長期の飢餓条件に曝してもコロニー形成能を失わないことを明らかにした。cAMP-CRP のようなグローバルレギュレーターが、コロニー形成の障壁を高めるのか、あるいは障壁を乗り越えるための機能を低下させるのかはわからないが、これらが脂肪酸不足時のコロニー形成阻害にも関わっており、これが固体培養と液体培養における生育差を生むのではないかと予想した。cAMP-CRP や類似の因子の欠失株または発現増強株を用いた遺伝学的アプローチを試みたが、今のところ問題解決の糸口はつかめていない。しかし、この過程で、Triton X-100 をはじめとする界面活性剤を供給すると、脂肪酸不足時でもコロニー形成能が大きく回復し、固体培養と液体培養との生育差がほとんどなくなることを見出した。これについて、界面活性剤添加時の細胞サイズや培地表層の物性の違いなどの点から解析したが、現象の要因解明には至っていない。現在、TritonX-100 添加時の細胞の生理状態の違いを明らかにするため、RNA-Seq 解析を試みている。

本研究の総括

本研究では、細菌が固体培地で増殖を開始する際にはなんらかの障壁が存在し、それを乗り越えてコロニー形成に至るためには特定の遺伝子機能が必要であるとの仮説のもと、そのような遺伝子の特定を目指した。第一の候補は、*E. coli* の *fabB* 遺伝子であった。その変異株の解析を進めた結果、固体培地で増殖を開始するためには液体培養時よりも多量の脂肪酸合成が必要であることが示された。したがって、*E. coli* では、脂肪酸を必要とする何らかの生理機能がコロニー形成に必要で、それが不足すると固体培地での初期増殖が大きく阻害されると考えられる。また脂肪酸合成の阻害剤を用いることで、*E. coli* を含む系統的に離れた 3 種の細菌で同様の現象を確認した。したがって、上記の結論は、バクテリア一般にも拡張されると期待される。さらに、飢餓状態に陥った *E. coli* や土壌細菌でも、脂肪酸を供給するとコロニー形成に至ることを確認した。これらを通して、脂肪酸に関わる生理機能の不足がコロニー形成の制限要因となっている可能性を示し、自然界の細菌のほとんどが培養できない理由の一端を明らかにした。

以上とは別の現象として、界面活性剤の添加によって固体培養での増殖の障壁が解消し、脂肪酸が不足しても液体培養時に匹敵する増殖頻度に達することを示した。

脂肪酸が不足するとなぜコロニー形成が特異的に阻害されるのか、その障壁となっている要因の全容解明には至ることはできなかった。ただし今後、界面活性剤添加による細菌の生理状態の変化を解析の足場にするすることで、脂肪酸に関わるバクテリアのコロニー形成に必要な生理機能が解明できると期待される。