

博士論文（要約）

論文題目

哺乳類腸内におけるバクテリアの窒素固定能に関する実験的研究
(An experimental study of bacterial nitrogen fixation in the mammalian gut)

氏名 岩瀬 忠行

酸素や炭素、水素と同様に、窒素は生物の成長と維持に重要な元素である。窒素自体は地球上に豊富に存在するものの、その多くは生物の利用できない不活性な分子状窒素である。それゆえ、他の元素に比べて利用可能な窒素はしばしば不足する。またこの不足は生物の成長を制限する要因となりうる。

窒素固定細菌は、生物学的に不活性な分子状窒素をアンモニウムへと変換し、さらにはアミノ酸へと変換することで、窒素の枯渇した環境においても生育できることが知られている。ダイズやレンゲ、クローバー等のマメ科植物は、窒素固定細菌と共生することで、窒素源の乏しい荒地でも旺盛に生育することができる。近年、マメ科植物以外の植物、例えばサトウキビを含むイネ科植物やサツマイモなども、窒素固定細菌と共生関係にあることが報告されている。また窒素固定細菌は、植物だけではなく昆虫の腸内にも生息しており、その宿主と共生関係にあることが知られている。具体的には、シロアリやエルサレム甲虫(木材を主食)、フナクイムシ(木材を主食とする海産性の二枚貝)、そしてハキリアリ(葉・菌類を主食)が宿主となりうる。さらに、貧栄養な海洋に生息するサンゴ内部に生息する窒素固定細菌の存在も報告されている。窒素固定細菌との共生は、宿主の新たなニッチの形成や獲得につながるものと考えられる。

これまでの窒素固定細菌に関する数多くの研究により、根粒菌やシアノバクテリアに加え、腸内細菌科に属する細菌においても窒素固定遺伝子を有する種が存在することが確認されている。腸内細菌科の細菌は一般的に生育範囲が広く、土壌や植物、昆虫に加えて、ヒトを含む哺乳類の腸内からも分離される。近年の報告において、これらの細菌が植物の根や昆虫の腸内において、窒素固定を行うことが実験的に示されている。これらの知見は、窒素固定遺伝子を有する細菌が哺乳類の腸内においても窒素固定を行う可能性を示唆するように思われるが、哺乳類の腸内における細菌の窒素固定能については、未だその詳細は明らかではない。

そこで、ヒト由来の窒素固定遺伝子を有する腸内細菌科の細菌について窒素固定を行うかどうか、またその窒素固定が窒素固定酵素を介した窒素固定であるかどうかについて検討を行った。第一に、窒素固定酵素をコードする窒素固定遺伝子を破壊した株(変異株)を遺伝子破壊法の一つである Wanner 法を用いて作成した。本法を用いた変異株の作成では、破壊する窒素固定酵素遺伝子の塩基配列を明らかにする必要があるため、

標的遺伝子の塩基配列について PCR を用いたダイレクトシーケンス法により明らかにした。また、窒素固定酵素をコードする遺伝子の他に、窒素固定酵素の発現や制御に関連すると考えられる多数の遺伝子がクラスターを形成してゲノムに存在していることが知られているため、供試菌株 JKp の窒素固定遺伝子クラスター (*nif*cluster) を形成する窒素固定関連遺伝子群の全塩基配列の決定も併せて行った。

その結果、本菌株の *nif* cluster の全長は 21,731 bp、20 の遺伝子から構成されていることが判明した。これらの遺伝子の機能については不明なものも多いが、その多くは窒素固定酵素の成熟や発現調節に関与しているとされる。中でも、*nifH* 遺伝子、*nifD* 遺伝子ならびに *nifK* 遺伝子は、窒素固定酵素を構成する重要な遺伝子であり、窒素固定に必須である。そこで、本菌株のこれらの窒素固定遺伝子において、偽遺伝子化しているものがあるかどうかを検討した。その結果、点変異等による終始コドンの出現は見られず、また遺伝子の断片化も見られなかった。

得られた遺伝子配列を基に変異株 (*nifHD*破壊株) の作成を行った。変異株は、標的遺伝子の欠損を PCR ならびにシーケンスにより確認した。RT-PCR を行ったところ、野生株は窒素固定遺伝子 *nifH* を発現していることが確認された。また、窒素固定によって発生する水素ガスを検出することで、野生株の窒素固定能について検討を行った。変異株を用いた処理区では水素ガスの発生は見られなかったが、野生株では時間の経過とともに水素ガスの発生量は増大した。次に、本菌株における窒素固定の役割を検討するため、野生株と変異株を無窒素培地で培養し、その生存率を算出した。野生株と変異株を無窒素培地に 10^9 個となるよう接種し、 37°C で 4 日間嫌気条件にて培養したのち、LB 寒天培地に播種し生菌数を計測したところ、野生株の無窒素培地中における生存率は変異株に比べて約 100 倍であった。これらの結果から、本菌株が窒素固定能を有していることが確認された。

次に、マウス腸内での窒素固定細菌の働きについて検討を行った。第一に、本菌株がマウス腸内に定着するかどうか、またマウス腸内で窒素固定遺伝子を発現するかどうかを検討した。ゾンデを用いて菌 (10^5 CFU/mouse) をマウスに経口投与したのち、経口的に糞便を回収し、コロニーカウンティング法により菌が定着できているかどうかについて検討した。その結果、安定して糞便から窒素固定細菌を回収することができた。

このことから、本菌株は、マウス腸内に安定的に定着できる菌であると判断した。次に、腸内での窒素固定遺伝子の発現を解析した。回収した腸内容物から total RNA を抽出精製し、RT-PCR を行ったところ、マウス腸内における窒素固定遺伝子の発現が確認された。また、嫌気環境下で回収した腸内容物をクロラムフェニコール含有無窒素培地に置き、新規のタンパク質が産生されない条件かつ嫌気条件下で $^{15}\text{N}_2$ に 16 時間暴露させたところ、腸内容物に ^{15}N が取り込まれていることが、安定同位体比質量分析計 (EA-IRMS) を用いた分析により明らかになった。

最後に、窒素固定細菌を有するマウスを $^{15}\text{N}_2$ を満たしたチャンバーで飼育し、窒素固定細菌によって腸内で固定された窒素が、マウスの体組織に取り込まれるかどうかを検討した。窒素固定細菌を投与したマウスを $^{15}\text{N}_2$ を満たした特型チャンバーで 3 日間飼育した後、腸内容物と臓器をサンプリングし、EA-IRMS を用いて $^{15}\text{N}_2$ の取り込みについて検討したところ、腸内容物、肝臓および腸管サンプルの ^{15}N の値が対照群に比べて有意に高いことが判明した。

以上の結果から、マウス腸内において窒素固定細菌によって固定された窒素が、宿主によって取り込まれることが実験的に示唆された。