

## シンビオバクテリウムにみる微生物共生の深淵

上田 賢志\*・和辻 智郎・高野（白鳥）初美  
高野 英晃・西田 洋巳・別府 輝彦

## 共生細菌シンビオバクテリウム

シンビオバクテリウム・サーモフィラム (*Symbio-bacterium thermophilum*, 以降 *St*) (図1) は、東京大学農学部醗酵学講座において派遣研究生として仕事にあたった池田糖化工業の鈴木によって1980年代に分離された好熱性細菌である<sup>1)</sup>。当時、アミノ酸分解酵素の逆反応を利用した立体選択的な酵素合成法の実用化が脚光を浴び始めており、*St*はトリプトファン分解酵素であるトリプトファンナーゼを探索する計画においてその生産菌として取得された。*St*は、LB培地などの通常用いられる完全培地を用いた高温静置培養において $10^8$  cells/mlを超える菌数にまで増殖する自由生活性の (free-living) 細菌であるが、その顕著な増殖は、*St*と一緒に堆肥から分離されてきたバチルスS株 (*Geobacillus stearothermophilus* strain S, 以降 *Gs*) との混合状態で培養 (共培養) した場合においてのみ観察された。この菌の分離は定法のコロニー分離では行うことができず、きわめて低い頻度で出現した微弱なトリプトファンナーゼ活性を示すコロニーを希釈継代培養する試行錯誤によってようやく達成できた経緯は他の記述<sup>2,3)</sup>にあるとおりである。

*St*と*Gs*の共培養における典型的な増殖曲線を図2に模式的に示す。*Gs*は単独で培養できるいわゆる一般的な好熱性の細菌であるが、*St*との共培養では、通常増殖を開始した後、*St*の増殖開始に伴って増殖を停止、溶菌する。一方、遅れて増殖を開始する*St*は顕著な対数増殖を行い、*Gs*の菌数を上回るレベルにまで到達する。

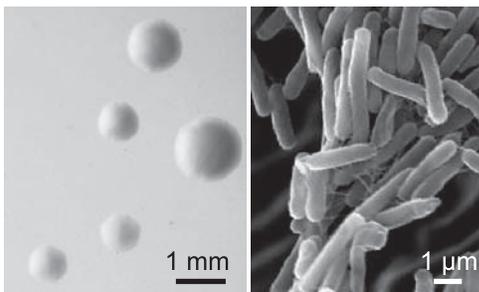


図1. ゲランガム培地上に生育した*St*のコロニー (左, 実体顕微鏡像; 右, 走査型電子顕微鏡像)。後述する条件を取り入れることによって純粋分離・培養できるようになった*St*は、透明で微小なコロニーを形成する。

しかし、同じ条件で*St*を単独で培養しても増殖は認められない (実際は、形態の異常を伴った部分的な増殖が、濁度で判定できない程度におこることが後に明らかになっている)。複数の自由生活性の微生物が共生して増殖する現象は、メタン発酵群集をはじめとする特に嫌気性の菌群において古くから知られていたが、*St*のように増殖を支持する菌との一対一の関係に頼るタイプの共生関係は他に例がなく、微生物どうしの相互作用様式を研究するための新しい材料となった。

## 共生に介在する炭酸ガス

この一対一の細菌の間における片利共生的な現象について、最大の関心事は*St*が何を要求しているかであった。共生因子の同定についての経緯は他の総説<sup>3,4)</sup>にすでに記述しているのでここでは省略するが、明らかになった主要な因子は、当初予想したような特殊な栄養や補因子ではなく、炭酸ガスというきわめて普遍的な化学因子であった。先行して増殖を開始する*Gs*がエネルギー代謝を通して炭酸ガスを放出すると、それを利用することで*St*も増殖を開始できるものと考えられる。

この意外な発見にさらに踏み込んで、筆者らはこれまでに、①高濃度 (数%程度) の炭酸ガスを要求する性質

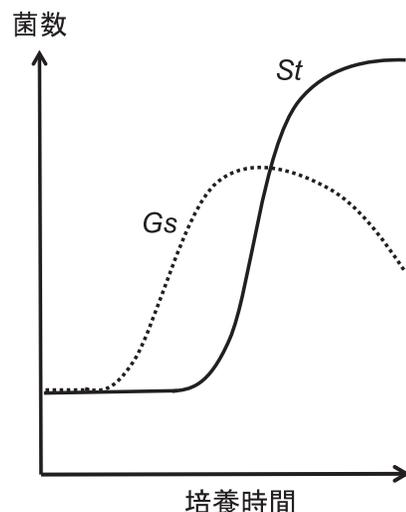


図2. *Gs*と*St*の共培養における増殖模式図。*Gs* (点線) は先に増殖を開始するが、*St* (実線) が増殖を始めると増殖を停止し溶菌する。最終的に*St*の菌数は*Gs*を上回る。

\* 著者紹介 日本大学生物資源科学部生命科学研究センター (准教授) E-mail: ueda.kenji@nihon-u.ac.jp

は、一部の病原性微生物の生理的性質を中心に古くから知られていること、②逆に、高濃度炭酸ガス要求性のために通常的手法では分離できないが本質的には培養可能な微生物が潜在していること、③高濃度炭酸ガス要求性をもたらす遺伝的背景のひとつに、炭酸ガスと重炭酸イオンの変換を触媒する普遍酵素カルボニックアンヒドラーゼ（炭酸脱水酵素）の欠損が知られていることなどについて記述してきた<sup>5)</sup>。カルボニックアンヒドラーゼが欠損すると、通常大気中に含まれる炭酸ガスを重炭酸に変換することができず、重炭酸依存性の必須代謝酵素（アセチルCoAカルボキシラーゼやカルバモイルリン酸シンターゼなど）に重炭酸を十分供給することができない。そのため通常大気下では増殖を開始できないが、高濃度の炭酸ガスを含む雰囲気中では、自然平衡で生じる重炭酸を取り込むことで増殖することができる。Stのゲノムには同酵素をコードする遺伝子が存在しないことから、それが炭酸ガス要求性の一つの原因になっている可能性がある。

このような理由から、高濃度の炭酸ガスを要求する菌群は従来の微生物分離の手法では取得されにくく、その多様性はいまだベールに覆われた状態にあるといえる。一方、高濃度の炭酸ガスが存在する場所は土壌や腸内をはじめ自然環境中に広く分布しており、高濃度炭酸ガス要求性の菌群はそうした環境を棲息域として選ぶことで生きることができる。同じことは、複数の菌が共存する伝統的な醸造発酵液にもあてはまり、たとえば*Lactobacillus plantarum*をはじめとする乳酸菌群では、高濃度炭酸ガス要求性の自然分離株が高い頻度で得られることが知られている<sup>6)</sup>。これらの株は同時にアルギニンやウラシル要求性を示すことから、重炭酸の供給に依存する代謝物の中でも、カルバモイルリン酸の細胞内プールが重要な鍵になっていると推測されている。Bringelらは最近の総説<sup>7)</sup>において、乳酸菌の中でも特にホモ発酵性の種が高濃度炭酸ガス要求性を示す傾向にあり、それらはヘテロ発酵性の乳酸菌種ならびに酵母などの他の微生物との相互作用の下で増殖しているとの見方を記している。

重炭酸の供給が律速になるケースにおいては、環境のpHも重要な要因になる。なぜなら、炭酸の溶解度は大きくpHに依存するため、pH 6.0とpH 8.0ではその存在量には約30倍の差が生じる。したがって重炭酸の要求性は高いpH依存性を伴うことになる。StとGsの共培養では、Gsの増殖によって培養液のpHは8付近の値を示すが、緩衝液を使ってそれを低く抑えると、Gsは影響を受けないがStの増殖は顕著に抑制される（未発表）。つまり、Gsの増殖によって培養液のpHがアルカリ側に維持されていることも実質的にStの増殖を支持する正の要因となっているということが出来る。

上述した高濃度炭酸ガス要求性は、いくつかの炭酸固定反応が律速になるためにおこる一次代謝面への影響に基づくものであるが、筆者らは最近、高濃度炭酸ガスによって菌の増殖ではなく形質に顕著な変化が認められるケースを見いだしている。このことから、炭酸ガスはエネルギー代謝における必須因子としてだけでなく微生物群集の挙動を制御する信号としても機能している可能性が考えられる。炭酸ガス濃度は生物活性の有効な指標あることから、微生物細胞にとって、それを検知して環境への適応様式を変化させることは理にかなっているといえる。

### 複合的に支えられる共生

炭酸ガスの供給という特異性の低い相互作用が介在するStの増殖特性には、もう一つ重要な側面がある。それは、炭酸ガス以外にも増殖を支持する要因が複数存在し、それらが複合的に関わっている点である<sup>3)</sup>。炭酸ガスの添加によって得られるStの最大細胞収量は、Gsとの共培養によって得られるその10分の1程度にとどまり、共培養によって成立している炭酸ガスの供給以外の条件もStの良好な増殖にとって重要であると考えられた。そうした観点から行ったこれまでの観察から、①おそらくペプチド性の物質などが増殖に促進的に作用すること、また、逆に②増殖に抑制的に作用する負の要因が取り除かれることもStの増殖を支持していると考えられている（図3）。

Stの増殖に影響する負の要因の一つに、Stの増殖に伴って培地中に蓄積する2種の化合物1,1-bis(3'-indolyl)ethane (BIE) および2,2-bis(3'-indolyl)indoxyl (BII)（図4）による増殖阻害がある<sup>8)</sup>。BIEとBIIは、Stが生産するトリプトファンナーゼの活性によってトリプトファンが分解されてインドールが生成すると、それが未知の反応によって重合することで合成されると考えられる。特に

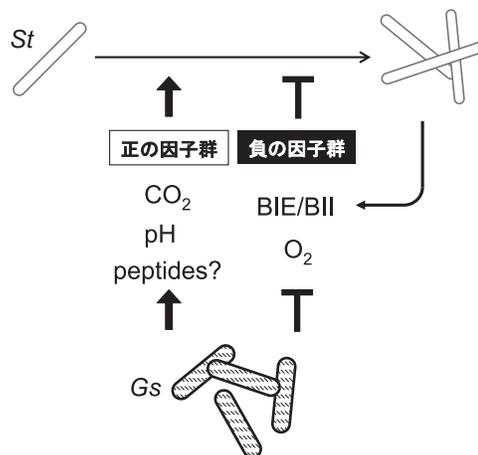


図3. Gsの増殖によって成立しStの生育を支持する多様な要因。複数の正の因子の供給と負の因子の除去が複合的に介在する。

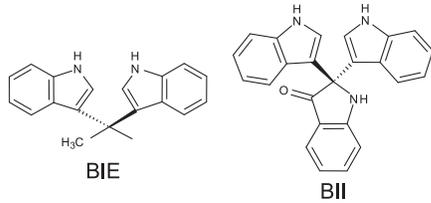


図4. *St*の自己増殖阻害物質BIEとBIIの構造

BIEは低濃度（7  $\mu\text{g/ml}$ ）で*St*の単独増殖を完全阻害するが、不思議なことに*Gs*と*St*の共培養液中にはそれと同程度の濃度が蓄積している。つまり、*Gs*と共存している状態では、これらの化合物の*St*に対する増殖阻害効果は抑制されているものと推測される。そのメカニズムには、たとえば*Gs*によって生産される界面活性物質がBIEを包摂するなどが考えられるが、詳細は明らかになっていない。

こうした特異的な化合物による阻害の解除に加え、低い溶存酸素環境も*St*の増殖を支持する要因になっている。後述のように、*St*はクロストリジウムに系統的に近縁な通性嫌気性の菌であり、その単独培養には炭酸ガスを添加した嫌気条件が必要である。一方、*Gs*と共培養する場合は通常大気下でも良好に生育する。これは、静置した培養液の深部が嫌気的な環境になっているためであり、それはすなわち、*Gs*による負の要因（酸素）の除去によっているといえる。共培養液を振盪すると*Gs*は良好に増殖するが*St*のそれは顕著に抑制される。

このように、*St*の増殖は、*Gs*が増殖することで成立する複数かつ多面的な要因の組み合わせによって支えられている。単一の増殖因子の添加では部分的にしか補えないこうしたケースの場合、菌の分離と培養に従来の培養法を適用するのには限界がある。そうした問題への対処という点では、筆者らが当初*St*の増殖因子が透析性であるかどうかを調べるために設計した透析培養器（図5）のような直感的な道具の利用性を見直す余地があるかもしれない。

### 高次に広がる共生体系

筆者らは、いわゆる難培養性の細菌である*St*とその類縁菌がどの程度環境中に分布しているのかという疑問から、この菌群に特異的なDNA配列を検出する方法を用いてサーベイを行った。その結果、*St*の分離源である堆肥をはじめ、土壌、家畜糞便、家畜飼料などから高い頻度で陽性を示す高温培養液が得られることを見いだした<sup>9)</sup>。さらに、家畜飼料の中でもボレー（ぼれい＝牡蛎；カキの別称）粉と呼ばれる鳥の餌が非常に高い頻度で陽性を示したことから、その原料になっているカキ殻について調査した。その結果、我が国のいくつかの沿岸地域



図5. 二槽式透析培養器のプラスチック製品。  
(<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~seimei/BF>)

から採取した直後のカキの殻からいずれも高い頻度で陽性の培養液が得られた<sup>10)</sup>。そこで、滅菌したカキ殻を静岡県・下田沖の海底に沈め定期的に回収するという計画的な調査を実施したところ、2-3ヶ月以降に採取したカキ殻のすべてが陽性を示すという結果を得た<sup>10)</sup>。これらの観察から、*St*と類縁菌は海水中にも存在し、カキ殻などの貝殻の表面に付着する性質をもっていることが明らかになったが、好熱性でかつ高い塩濃度を好まないような菌がなぜ海から分離されるのか、などの疑問は残されたままである。

昨今、固体表面における微生物の動態が浮遊状態におけるそれとは大きく異なっているということが、バイオフィームに関する研究を中心として認識されはじめている。*St*の生育は、筆者らが実施した実験室での培養条件では*Gs*との二者混合培養によって支持されたが、自然環境中での支持基盤がそれと同じとは限らない。むしろ異なっていると考えの方が自然であり、たとえばカキ殻の物性がそれに置き換わる役割を果たしている可能性も考えられる。これまでの知見をそのまま当てはめると、カキ殻の表面は炭酸が豊富なことや種々の物質を吸着する性質があることなどから*St*の生育に適した環境になっていると考えることができるが、本当の理由は不明である。いずれにしろ、微生物の動態と相互関係を考える上で、上述のような複雑な物質のやりとりに加えて、固体への吸着をはじめとする生育環境の物理的な側面も考慮に入れる必要があることは間違いない。

*St*が築く共生体系に関する考察は、さらに時間軸方向にも広がりを見せている。シンビオバクテリウム属の分類学的な位置は新奇で、そのために長年にわたってその系統進化に関する明確な説明がなされていなかった。しかし、最近、全ゲノム情報に基づいた系統解析によってクロストリジア科に属するという結論が出された<sup>11)</sup>。GC含量が高い（68.7%）*St*は、一時グラム陽性の高GC群であるアクチノバクテリアに属するとされたが、この菌が保有するタンパク質はその多くがクロストリジア

のそれに近縁であった。最近、シンビオバクテリウム属に由来する16S RNA 遺伝子配列が汚泥や水田土壌などにおける嫌気性の群集構造の中に見いだされるとする報告<sup>12,13)</sup>が相次いでいることも、この菌のクロストリジアとしての性状を暗示している。

このクロストリジアとしての進化の過程において、*St*はそのゲノムから上述のカルボニックアンヒドラーゼ遺伝子を脱落させたと推測されている<sup>11)</sup>。なぜなら、近縁のクロストリジアに属する細菌はいずれも同じ型のカルボニックアンヒドラーゼを有しており、共通祖先もそれを持っていたと考えられるからである。*St*は独自の進化の過程でこの酵素遺伝子を保持する必要がなくなり、結果としてそれを失った可能性が高い。このように、*St*のゲノム情報には独自の環境適応を通して他のクロストリジアとは異なる進化を遂げた歴史が反映されているはずであり、そこからこの菌が示す共生菌としての特質をさらに明らかにできる可能性がある。

### おわりに～広がる共生の概念

実用生産における微生物相互作用をおもな課題とした本シリーズに、生産には直接関係しない微生物の話を取り上げて頂いた理由は、特定の菌のユニークな特性にこだわり続け、そこから微生物間の相互作用に関する洞察を深めようとするような研究も、生産に利用される微生物群集の理解に多少は役に立つ部分があるかもしれない、というお考えからであると推察している。

DNAを手がかりとする研究手法がまだなかった発見当初、*Gs*との共培養でしか生育できないように見えた*St*は、動物細胞内に共生する菌などと同様に、その生育を宿主(支持菌)に100%依存する絶対共生菌であると考えられた。しかし、PCR法の発達によって増殖度をDNA量として定量できるようになると、低いレベルの増殖も観測できるようになり、そこから徐々に本稿に概説したような性質が解き明かされていった。

このようにして、細胞収量は低いながらも純粋培養でできるようになったことを学会で報告すると、一時よく「それではこの菌は共生菌ではなくなった(なかった)のですね」というコメントを頂戴したことがあった。ここであえて強調する必要はないと思われるが、それは狭い視野での解釈であり、*St*は特異性の低い相互作用を含む広い意味での共生に依存する菌であると考えべきである。そうした意味では、実験室で単独増殖する「普通の菌」も、環境中では皆なんらかの相互関係の中で生育している点でやはり「共生菌」である(英語ではこうした広い意味での共生にcommensalismなどの単語を充て、symbiosisやsyntrophismと区別している;日本語でも的確な用語設定が必要である)。しかし、高い細胞濃度にまで純粋

培養できてしまう菌は、そうした相互作用を解明するための材料にはなりにくい。それに対し、共培養に明確な依存性を示した*St*は、相互作用の一つ一つを追求するに当たっての格好の題材であったということが出来る。

*St*の研究を通じて筆者らは、それぞれの相互作用に介入する具体的な要因が明らかになると、それが生態学と系統進化学そしてゲノム科学を巻き込みながら巨大な共生体系の理解へと発展する可能性を実感した。今日、個別のゲノムに加え、多様な環境試料のメタゲノム情報をさまざまな角度から分析する手段が革新的な進歩を遂げている<sup>14)</sup>。微生物相互作用に関する分子生物学と生態学ならびにゲノム科学の融合は、これまでにない勢いで微生物群集のあり様を解き明かすと期待される。

本稿を、岩手県上閉伊郡大槌町の有限会社・遠藤水産ならびに関係の皆様が捧げます。原稿執筆中に突如おそった大震災による津波は、皆様からあらゆるものを奪いました。今なお行方不明の社主・遠藤栄喜さん美智子さんご夫妻は、研究室の卒業生・遠藤幸喜君のご両親であり、豊かで厳しい三陸の自然に向き合うことで長年にわたり我が国の食卓を支えてこられました。本文記載の探索のために新鮮なカキ殻が欲しいとお願いしたところ、巨大な発泡スチロールに溢れんばかりの生きたカキと魚介類が送られてきて、皆で大騒ぎしたことがありました。ただで頂戴するわけにはいかないと申し上げたところ、「そんなん、いんらねェよ」と実にあたたかな三陸なまりが返ってきたことをよく覚えています。私たちは、皆様を思い続けながら研究に一層邁進いたします。

### 文 献

- 1) Suzuki, S. *et al.*: *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 2353 (1988).
- 2) 別府輝彦: 微生物増殖学の現在・未来(福井作蔵・秦野琢之編), p. 223, 地人書館(2008).
- 3) Ueda, K. and Beppu, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1115 (2007).
- 4) 上田賢志ら: 生物工学, **84**, 484 (2006).
- 5) 上田賢志ら: バイオインダストリー, **25**, 47 (2008).
- 6) Bringel, F. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2674 (2003).
- 7) Bringel, F. *et al.*: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 22 (2008).
- 8) Watsuji, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6159 (2007).
- 9) Ueda, K. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3779 (2001).
- 10) Sugihara, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 204 (2008).
- 11) Nishida, H. *et al.*: *J. Mol. Evol.*, **68**, 90 (2009).
- 12) Wrighton, K. C. *et al.*: *ISME J.*, **2**, 1146 (2008).
- 13) Ishii, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7070 (2009).
- 14) 服部正平: 現代生物科学入門(浅島 誠・黒岩常祥・小原雄治編), 第2巻 ゲノム科学の展開, p. 61, 岩波書店(2011).