

見えない微生物を見る －微生物共生系事始め－

別府 輝彦

近代微生物学は寒天固体培地上にコロニーとして生えてきた菌を、純粋培養として「見る」ところから出発した。地球生物圏の圧倒的部分を占めている微生物は、この惑星上で種を越えた微生物同士の共生によるネットワークを張り巡らしているに違いないが、その大部分は固体培地の上でばらばらにされると互いに助け合うことができないためにコロニーを作らず、したがって「見る」ことができない。PCR法の登場によって、微生物群集まるごとをゲノム情報として認識し、利用する道は開かれたが、構成メンバーの共生関係を物質的に解明して、純粋培養によって彼らを生物として「見る」のはまだ容易ではないのが現状である。ここでは、トリプトファナーゼを生産するある共生細菌に取り組んだ初期の実験者の苦労話を中心に、この種の微生物を取り扱う難しさの一端でも伝えられたらと思う。

今から四半世紀以上も前に、寒天培地で分離できるはずの菌が分離できないというだけ根拠にして始めたその仕事を、筆者は長い間 professor's hobby research と称していた。それは、普通の研究ではあり得ない、アライバイから出発しているということ意識していたからであるが、もしかしたらそう言い続けることで、夢あるいは志らしきものが、駅伝のように長期にわたって引き継がれる結果をもたらしたのかも知れない。21世紀の新しい微生物学の焦点の一つである、微生物群集の問題を多少は先取りしたことになったこの仕事を、何を考へて始めたのか、途中何について迷ったか、そして今何を考へているのかについては最後に少しだけ、述べてみたい。

発端 好熱菌トリプトファナーゼのスクリーニング

1980年、東京大学農芸化学科発酵学研究室で、それまで好熱性細菌 *Thermus flavus* (現 *Thermus thermophilus*) の生産する耐熱性リンゴ酸脱水素酵素 (tMDH) の構造と機能について着実に研究を進めていた飯島信司君 (現・名古屋大学工学部) は、突然トリプトファナーゼを生産する好熱菌のスクリーニングを始めた。博士課程2年という、そろそろ学位論文のとりまとめに専念しなくてはならない大事な時期に、なぜまったく別な仕事を

ゼロから始めるようなことをしたのかについて、彼の説明は以下の通りである。

「博士2年在学の頃、tMDHの耐熱性、好熱性の研究、さらに遺伝子のクローン化をはじめておりましたが、別府先生より農芸化学の研究は基礎と応用の両方を考える必要があるとおしかりを受け、好熱菌酵素の応用について考えるよう御教示を受けました。先生とご相談ののち、好熱菌から有用酵素をスクリーニングすることとしました。さてそれではどんな酵素をスクリーニングするかと考へていた折に思い出したのが、山田秀明先生のβ-チロシナーゼ、トリプトファナーゼ、システインデスルフトラターゼでした」。

まったく穴があったら入りたいと思うけれど、この証言は真実である。ただし急いで弁解すれば、彼がそれまでに積み重ねていた酵素科学の成果はどれも大変新鮮で新しく、学位取得にまったく危なげがなかったからこそ、そんな無茶な議論をふっかけることができたのだと言いたい。その証拠に彼は、GC含量69.4%で、当時の技術ではDNAを切り出すことさえ困難だったtMDH遺伝子のクローン化まで、その後の1年でやってのけたのであった¹⁾。

とにかくこうしたいきさつで、飯島君はL-トリプトファン²⁾の逆合成に利用できる、耐熱性トリプトファナーゼを生産する好熱菌のスクリーニングを始めた。あちこちから集めた土壌や温泉水などの試料を、ペプトンを含む液体培地に加えて60°Cで集積培養を行い、ペプトン中のトリプトファンから生成するインドールをKovacs試薬による呈色反応で検出するのである。調べ出すとすぐに、土壌試料からかなりの頻度でインドール陽性反応を示す好熱菌の混合培養が得られることが分かったが、次は目的の菌を寒天平板でコロニーとして分離すればよいという段階になって、仕事ははたと行き詰まってしまった。トリプトファナーゼ活性を示すコロニーがどうしても見つからないのである。

栄養素や塩類から寒天以外のゲル化剤まで、培地成分をいろいろと検討したがどうしてもうまくいかない。一方、得られた好熱菌の集積培養について限界希釈法で調

べて見ると、 10^{-7} 程度に希釈してもインドール陽性の液体培養が得られるから、目的の菌はかなりの濃度で存在しているのは確かなようである。そこにいるのが分かっているながらコロニーとして捉まえないという欲求不満が募る中で、1981年飯島君は本来の学位論文を見事に完成させ、やがて留学先のロックフェラー大学に向けて旅立っていった。

趣味の研究の始まり

一見失敗に終わったこのささやかなスクリーニングを、なぜ趣味の研究と称しながら細々と続ける気になったのか、その時の動機を我が事ながらここで少し考えてみたい。

その一つは、おかしな言い方だが、手も足も出ない「失敗」の仕方自体にあった。何度やってもコロニーが出てこないという「失敗」がこれほど再現性よく繰り返されるからには、それは実験者のせいではあり得なくて、何かこれまでの手段では見つからない新しい微生物がいるのではないかと思われたのである。考えてみれば実験による確実な不在証明は、観測手段の不備のために見つかっていない未知の存在を予言しているかも知れない訳で、実際にやがてわれわれは、自らの難培養性微生物に出会うことになったのである。しかし、研究は何か新しいモノがあるという存在証明を手掛かりに始めるのが常識で、あると思ったものが見つからないというアリバイから研究を開始するには相当の勇気が要る。その勇気がなかなか湧いてこなかった妥協の産物が、「趣味の研究」であった。

一方で、確率的に取り扱う必要のある微生物集団の挙動について個人的に興味を持っていたことは、もう一つの動機になったと思う。はるか昔に、大腸菌にDNA分解を引き起こす致死性タンパクであるコリシンE₂の作用機構を調べていて、その致死作用が液体培地に比べて寒天固体培地では大幅に抑えられることに気がついた²⁾。その仕事で、液体培養の生菌数を希釈法によって求めようとした際に、希釈試料を接種する試験管の本数を十分増やせばMost Probable Numberを非常に正確に計算できるのがとても新鮮に感じられたものである。古くから一部では知られていたこのような手法が新鮮だったというのは当時の自分の不勉強のせいではあるが、コロニー数=生菌数で済ませていた一般微生物学では、この種の取り扱いがずいぶん後になっても手薄だったのは事実である。

個人的な興味と言え、やはりはるか昔に目を引かれたBryantらの論文³⁾に触れない訳には行かない。エタ

ノールからメタンを生成する特殊なメタン生成菌とされていた*Methanobacillus omelianskii*が、エタノールを嫌氣的に酢酸に酸化する菌と、炭酸ガスをメタンに還元する菌からなる共生系だと明らかにしたこの論文は、その時まで20年以上も安定に保存されていた純粋培養が実は混合培養だったというだけでも十分に面白いニュースだった。しかし、種間電子伝達を介する微生物間共生という重要な領域を切り開いた最初の論文に興味を持っていたからとって、現に自分達が困っているコロニーを作らない菌がまさか共生系を作っているとは、思いもよらなかった。知れども識らずの一例である。

新しい微生物間共生系の発見

予感と迷いの中で揺れていたトリプトファナーゼのスクリーニングに改めて正面から取り組んだのが、1983年に池田糖化工業から研究生として来室した鈴木清文君だった。最終的に彼は、目的のトリプトファナーゼ生産菌が、同時にチロシンフェノールリアーゼも生産する、単独では生育できない新しい好熱性細菌*Symbiobacterium thermophilum* (本節ではT菌)であり、その生育を支持する胞子形成細菌*Geobacillus* S株(S菌)との間に片利共生系を作っているという予想もしなかった事実を明らかにしたのである。この結論にたどり着くまでに彼が繰り返した、限界希釈法を中心にした濃縮純化の過程を要約したのが図1であるが、実際の道筋はこれよりはるかに紆余曲折した複雑なものであった。

まず限界希釈法について考えると、最初に堆肥試料などから得られるトリプトファナーゼ陽性の集殖培養の中にはT、S両菌がさまざまな比率で存在するはずで、もしT菌に比べてS菌が少ない場合には、段階希釈の過程でS菌が先に除去されるために、残存するT菌は増殖できなくなって(図1はその状態を示している)、結果としてT菌の菌数は少なく見積もられてしまう。もともと実験者は二種の菌が関わっているとは知らず、一種類の菌を濃縮しているつもりなので、結果の「定量的」解釈は混乱し、筋道を立てた濃縮を進めるのを難しくすることになる。

濃縮の最終段階では、抗生物質のバシトラシン添加が雑菌を減らすのに大きな効果を発揮しているが、それはこの時、この段階で存在した雑菌に対して偶然選択的に働いたのであって、別な時、別な試料から出発した場合にはそうならなかったかも知れない。バシトラシンはうまくいった例だが、鈴木君はこの仕事の全体を通じて、微生物間共生系に付きものの不安定な挙動が原因で起こる、「再現性」がない事象に振り回された。

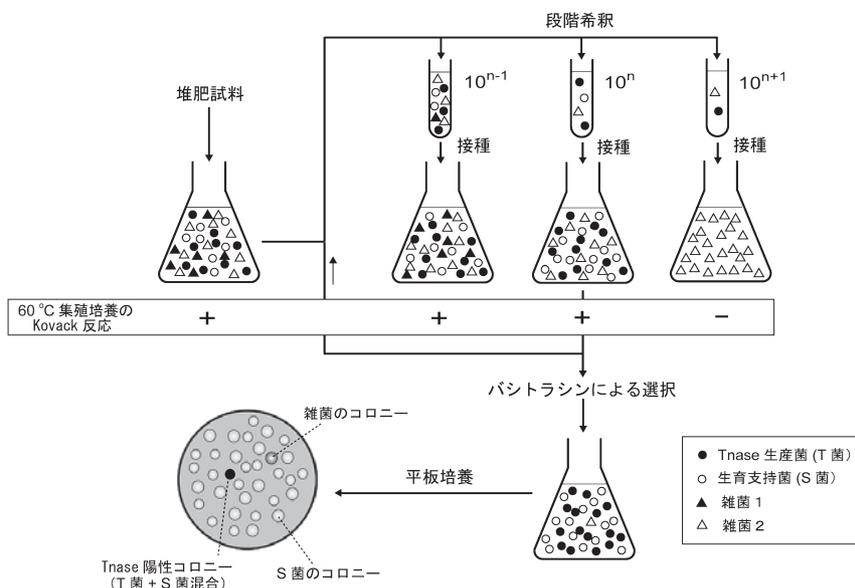


図1. 耐熱性トリプトファナーゼ (Tnase) 生産菌の段階希釈による確率的濃縮

もっと重大な問題は、ついに平板培養でトリプトファナーゼ活性を示すコロニーが得られた最終段階で起きている。その陽性コロニーを植え継いでも、初めのうちはどうしてもトリプトファナーゼ活性を示す菌が生育しなかったのである。この危機は、並行してチロシンフェノールリアーゼ生産菌の濃縮を進める中に、チロシン添加培地上でチロシンを溶解して透明斑を作るコロニーが見つかって、それからは生きて酵素活性を示す菌を植え継ぐことができやっとなり乗り越えられた。この不思議な現象は、おそらくT, S両菌の混合コロニーの中で、孢子形成菌であるS菌が早いうちに溶菌を起こして死んでしまうことがあり、チロシン添加培地ではたまたまその溶菌が抑えられたためだろうと考えられる。

このような試行錯誤の中で、酵素活性を示すコロニーを顕微鏡で見ると、細くてコントラストの低いT菌と、太くて孢子を形成するS菌の二種類が識別されたことから、ようやく相手にしているのが共生系だと気がついたのであった。1988年にこの成果をまとめた論文⁴⁾を投稿した際には、査読者から錯綜した実験手順の記述が「定量的」でなく「再現性」が担保できていないという、まるで研究対象を批判するような意見を受けて大変難渋した。こちらの英語の問題もあっただろうが、結局論文の細かい記述をかなり削って掲載に漕ぎつけたのは今でも苦い思い出である。

共生菌の「単独培養」の実現

こうして好熱性トリプトファナーゼ生産菌の謎に最

初の突破口が開かれると同時に、純化された *Symbiobacterium* と *Geobacillus* の共生培養系は、当時の微生物学ではまだほとんど注目されていなかった微生物同士の共生系を解明する新しいモデルになると思われた。しかし、秘かな期待を持って次に始めた *Symbiobacterium* の生育因子を決めようとする努力は、容易なことでは実を結ばなかった。結局、その第一歩となるこの菌の単独培養を曲がりなりに実現するまでには、筆者が1994年に日本大学生物資源科学部に移動したのをきっかけに、最初のただ一人の大学院生としてこの課題に取り組んだ大野（稲葉）道代さんの、修士2年、博士3年の全期間をかけた努力が必要だったのである。

研究の再出発に当たって彼女がまず目指したのは、これまで顕微鏡による計数しか方法がなかった、*Geobacillus* との混合培養で生育している *Symbiobacterium* の菌数（量）を測定するのに、PCR法を使うことだった。細胞が小型でコントラストも低いこの菌を顕微鏡で見分けながら計数するのはなかなか大変で、それまでの研究の大きな足枷になっていたからである。まだ高価なりアルタイムPCRが登場する前で、アガロース電気泳動によるPCRで定量を行うにはそれなりの苦労があったが、それでも二種の菌を明確に区別して定量できることには大きな意義があった。

もう一つの工夫は、メンブランフィルターを隔てて二種類の菌を液体培養できる透析培養フラスコを独自に製作して使ったことである。この種の培養装置はそれまでも何人かの研究者によって試作されていたようだが、

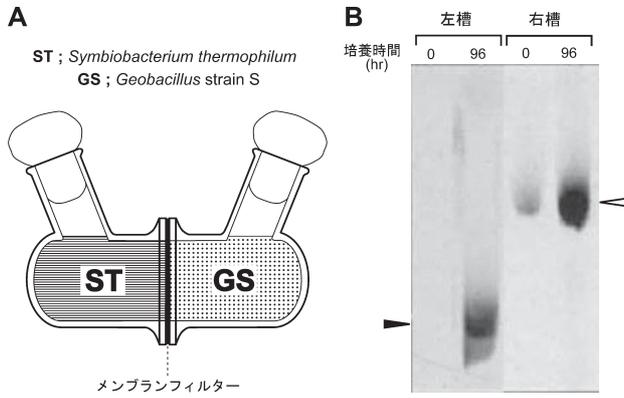


図2. 透析培養フラスコ (A) *Symbiobacterium*と透析培養 (B) *Geobacillus*. 透析培養 (B) の黒矢印：*Symbiobacterium*固有の *tnaT* DNA増幅バンド，白矢印：*Geobacillus*固有の *ptsI* DNA増幅バンド。

研究に実用された例は寡聞にして聞かない。長年にわたって東大農芸化学科の名誉教員ともいべき存在だったガラス細工の名人で、学生時代の筆者をスプレー程度なら自作するまでに仕込んでくれた、すでに80才を過ぎていた大内清海氏に手作りしてもらったこのフラスコは、サイズもバランスも手頃で、この研究になくてはならない道具になった。

これらの準備の上に行われた大野さんの実験の核心である、透析培養の結果を示したのが図2である⁵⁾。膜で隔てられた右槽には*Geobacillus*を接種する一方、左槽への接種は、*Symbiobacterium*の菌数が優占している混合培養を注意深く限界希釈した上で行う。その後96時間培養すると、それぞれの槽で接種した菌の特異的な遺伝子配列のPCRによるシグナルが顕著に増加していて、おたがいがコンタミネーションなしに独立に生育していることが分かる。この実験は、膜を通過するなんらかの生育因子の存在をはっきり示したことによって、その化学的本体を探索する以後の研究の出発点になったが、それと同時に、*Geobacillus*との透析培養という特殊な形ではあるが*Symbiobacterium*の単独培養が実現したことは、微生物学的にも重要な意味を持つものとなった。この成功によって、この菌は培養可能な細菌の新属、新種として分類学的に正式に認知され⁶⁾、さらにGC含量68.7%の特異な*Clostridia*として細菌の系統進化に新しい課題を提供するものとなった⁷⁾。

共生系の化学的解明を目指して

実現した単独培養を手にとりてはじめて気が付いたことの一つは、*Symbiobacterium*がほとんど濁度を示さない(同じ菌数の大腸菌液体培養の1/10程度)という意

外な事実だった。この菌は固体培養でコロニーを作らないという意味で見えないばかりでなく、液体培養の濁度でもほとんど見えなかったのである。PCRはこの「見えない微生物」を、DNAを通して見ることを可能にしたが、特にその後登場したリアルタイムPCRは、リアルタイムに結果が得られるだけでなく、きわめて高感度で定量範囲が広いところが*Symbiobacterium*のわずかな単独生育を測定するのにうってつけで(装置が高価なのは玉に瑕だったが)、生育因子の探索に大きな威力を発揮して行くことになる。

しかし、この菌の主要な生育因子であるCO₂は、ある一つの培養実験をきっかけに思いがけず見つかることになった。この頃になると、日大の研究室は大学院生や毎年20人を越す卒論学生であふれ返り、彼らの力を借りて透析培養も可能な1リットルのジャーファーマンターまで動き出していたが⁸⁾、その通気に使っていたN₂, H₂, CO₂の混合ガスが間に合わないので純N₂を使ったら生育しないという報告を受けた。そこでH₂を追加したが生育しない。半信半疑でCO₂を追加したら生育した(!)。くわだしいが、それほど従属栄養微生物にCO₂要求性のものがあるとは思いつかなかったのである。再び言えば、これは筆者の不勉強であると同時に、多くの教科書が書き落としていたことではある。

実はCO₂要求性は病原菌やルーメン細菌にはかなり広く認められるもので、それは生育に必要な生成経路に関与している炭酸固定酵素のいくつかがHCO₃⁻イオンを基質としており、その基質を効率的に補給する役割を担っているカーボニックアンヒドラーゼ(CA)が欠損しているためと説明されている。*Symbiobacterium*のゲノム⁹⁾にもこの酵素遺伝子のホモログは見つからないからこの説明は当てはまるが、その生育に及ぼすCO₂量の影響をCA欠損大腸菌のそれと比べると桁違いに差があるという結果(図3)は、さらになにか重要な事実を

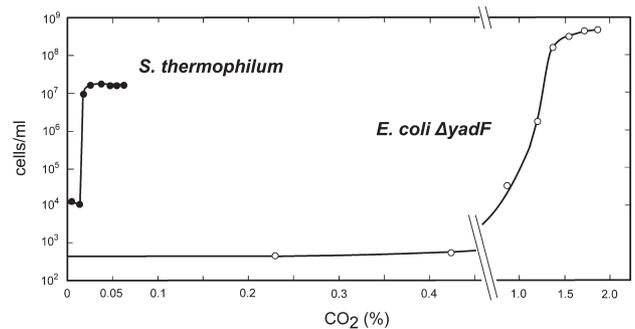


図3. *Symbiobacterium*とカーボニックアンヒドラーゼ欠損大腸菌(*Escherichia coli* $\Delta yadF$)の生育に及ぼすCO₂の影響

示唆しているように見える¹⁰⁾。一つの可能性は、*Symbiobacterium*が低濃度のCO₂を取り込む能率的な輸送機構を持っていることだが、もう一つの可能性として、微量のCO₂がもっと積極的かつ特異的にこの菌の代謝を制御していることが考えられる。CO₂が単なる一次代謝の基質としてだけでなく、制御因子として働いていることが確かめられれば、微生物集団の挙動を制御する普遍的な化学信号としての新しい役割が浮かび上がることになるだろう。

環境における微生物同士の共生は、エネルギー・必須栄養因子の相互補給に基礎をおく「栄養共生」と、化学信号を介して相互の挙動を調節する「信号共生」の二つに分けられると思うが、CO₂とNH₃、さらには水素イオン濃度が信号共生に関わる基本的な因子として、微生物群集の挙動を鋭敏に検知し、特異的に制御するために働いているのではないか。これは今の筆者の無責任な夢想である。

おわりに

この「よもやま話」は、多分あまりに長く続き過ぎた、ある微生物共生系の研究についてのまったく個人的な回顧である。この研究に意味があるとすれば、見えないものを見るのにこだわったところにあるかも知れないと考

えて、話の中にその言葉を意識して繰り返した。今まで見えなかったものを見るためには、新しい観測手段が必要であると同時に、対象をイメージするための概念が不可欠だということを、何度か痛感させられたのである。

それを実行するのがどれほど大変かを、実験を通じて示してくれた人達の努力に最大の敬意を捧げると同時に、ここでは名を挙げるができなかった多数の学生諸君を含む共同研究者の協力を深く感謝したい。

文 献

- 1) Iijima, S. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 589 (1986).
- 2) Beppu, T. and Arima, K.: *J. Bacteriol.*, **93**, 80 (1967).
- 3) Bryanat, M. P. *et al.*: *Arch. Microbiol.*, **59**, 20 (1967).
- 4) Suzuki, S. *et al.*: *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 2353 (1988).
- 5) Ohno, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1083 (1999).
- 6) Ueda, K. and Beppu, T.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol.3, p.1188, Springer (2009).
- 7) Nishida, H. *et al.*: *J. Mol. Evol.*, **68**, 90 (2009).
- 8) Ueda, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 300 (2002).
- 9) Ueda, K. *et al.*: *Nucl. Acids Res.*, **32**, 4937 (2004).
- 10) Watsuji, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 753 (2006).