

バクテリアとの混合培養による好熱性シアノバクテリアの細胞凝集に関する研究

石塚 結希乃 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

増殖の至適温度が 50°C の好熱性シアノバクテリア (*Thermosynechococcus* sp. BP-1) は、低温条件下 (30°C) で細胞凝集を引き起こすことが報告されている。当研究室で、大分県の花瀬温泉から取得した好熱性シアノバクテリア strain2 は、環境中のバクテリアが共存する条件 (共存株) では高温条件でも細胞凝集するが、無菌培養株では凝集しないことを見出した。本研究では好熱性シアノバクテリアがどのようなバクテリアと共存することで細胞凝集するのか、その機構について解明する。

【材料・方法】

▶ セルラーゼ添加処理

BP-1 株の低温条件で誘導される細胞凝集は、細胞外にセルロースが合成されるためであると報告されている。本研究で扱う好熱性シアノバクテリアの細胞凝集におけるセルロースの関与を調べるため、セルラーゼを添加し共存株について凝集解消の有無を確認した。2 µg Chl/mL の共存株に 13 U/mL のセルラーゼ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) を添加し混合した。50°C にて各時間インキュベートし、400 g × 1 min 遠心した。遠心後、上清のクロロフィル濃度を測定した。

▶ 共存株に含まれるバクテリアの同定

共存株を BG-11 プレートにて培養し、プレート上に現れたバクテリアコロニーを LB プレートに播種した。生じたバクテリアのコロニーを分離し、バクテリアの DNA を抽出した。バクテリアの rRNA 遺伝子領域を増幅するプライマー [1] で PCR を行い、塩基配列を決定した。

また、バクテリアが共存する好熱性シアノバクテリア培養液から全 DNA を抽出し、同様に PCR を行い、産物をクローニングした。得られたプラスミドの塩基配列を決定し、共存するバクテリアを同定した。

▶ 好熱性シアノバクテリアとバクテリアの混合培養

共存株から、BG-11 プレート培養及び LB プレート培養を経由しバクテリアコロニーを得た。シングルコロニーになるまで植え継いだ後、LB 液体培地に起こし、バクテリアの液体サンプルを作成した。作成したバクテリアの液体サンプルを好熱性シアノバクテリア無菌株に混合した。

3 種類のサンプル (混合培養中のサンプル、無菌株、共存株) 1 mL を 400 g × 1 min 遠心した後、沈殿を 100 µL 取り除いた上清のクロロフィル濃度を測定した。

【結果】

▶ セルラーゼ添加処理

共存株に対しては、セルラーゼ処理後のクロロフィル濃度が 2 µg Chl/mL まで回復しなかったものの、細胞凝集の解消が見られ、凝集にセルロースが関与することがわかった (図 1)。

▶ 共存株に含まれるバクテリアの同定

共存株を LB プレートに播種すると黄色と赤色の 2 種類のコ

ロニーが生じ、rRNA 遺伝子の配列からも、少なくとも 2 種類の耐熱性バクテリアの存在が示唆された。黄色のコロニーを形成するバクテリアは *Caldimonas manganoxidans* で、好気性のグラム陰性細菌であり、形態は桿状である [2]。温泉から採取され、至適温度は 45°C ~ 50°C である [2]。一方赤色のコロニーを形成するバクテリアは *Meiothermus* sp. で、好気性のグラム陰性細菌であり、短い糸状の形態が観察される [3]。至適温度は 50°C ~ 65°C である [3]。共存株に含まれる全 DNA のシーケンス結果からも新たにバクテリアは検出されなかった。黄色の培養液に含まれるバクテリアの顕微鏡写真を図 2 の左、赤色の培養液に含まれるバクテリアを右に示す。

▶ 好熱性シアノバクテリアとバクテリアの混合培養 現在、混合培養を行っている。

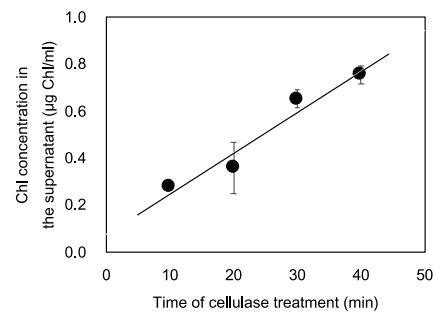


図 1 共存株の細胞凝集に対するセルラーゼの影響

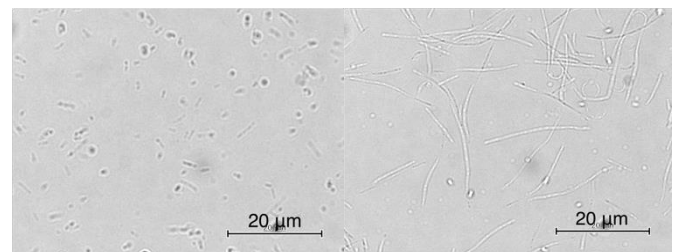


図 2 共存株に含まれる耐熱性バクテリアの顕微鏡写真 *Caldimonas manganoxidans* (左)、及び *Meiothermus* sp. (右)

【考察・展望】

本研究において、好熱性シアノバクテリアの共存培養株には 2 種類のバクテリアが存在していることが明らかになった。今後、好熱性シアノバクテリアとバクテリアの相互作用により、セルロース合成を介した細胞凝集を引き起こすメカニズムについて明らかにしたい。また好熱性シアノバクテリアとバクテリアにはどのような物質のやり取りがあるのか、解明していきたい。

【参考文献】

- [1]. 日本薬局方「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」
- [2]. Takeda, M. et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, (2002), **52**, 895-900
- [3]. Nobre, F.M. et al., *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, (1996), **46**, 604-606