

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

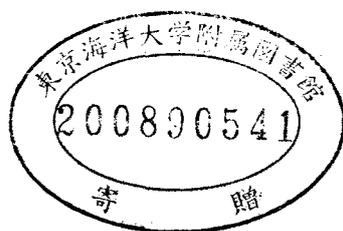
海洋性発光細菌と大腸菌間でのプロトプラスト融合法のモデル系の構築と応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2011-11-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 張, 恩実 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/903

博士学位論文

海洋性発光細菌と大腸菌間でのプロトプラスト
融合法のモデル系の構築と応用

平成 20 年度
(2008 年 9 月)



東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
応用生命科学専攻
張 恩実

平成 20 年 8 月 22 日

[課程博士]

博士学位論文内容要旨

論文題目

海洋性発光細菌と大腸菌間でのプロトプラスト融合法のモデル系の構築と応用

専 攻 応用生命科学

氏 名 張 恩実

【目的】 海洋細菌の多くは培養が困難な、いわゆる難培養性微生物（VBNC）であり、現在の培養技術では自然界の微生物は全体の僅か 1%しか培養できない。そのため、海洋に存在する微生物遺伝子を回収し、その機能を特定し、活用する技術は様々な分野で注目されている。このような未利用遺伝子資源を活用する方法の一つに、プロトプラスト融合法が挙げられるが、これまで海洋細菌や VBNC をターゲットにプロトプラスト融合を行った例は殆どない。本研究では、新規微生物の取得を目指した海洋性発光細菌と大腸菌間でのプロトプラスト融合法のモデル系を構築し、得られた融合株の性状を調べるとともにその応用を目的とした。

【方法】 指標となる各種抗生物質耐性や海水要求性のある海洋性発光細菌 *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株および、抗生物質耐性や海水要求性がなく汎用性が高い大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649¹ 株をモデル微生物として選択した。両菌間の融合条件を検討し、得られた融合株の生理・生化学的性状および遺伝学的特性を明らかにした。また、プロトプラスト融合率を向上させるために、脂肪酸の添加培養が細胞膜の脂肪酸組成を変化させ、さらにその安定性を制御することに注目し、両菌間の融合率の向上に有効な脂肪酸を選択した。それらの結果をもとに、VBNC 状態のモデル海洋細菌と、様々な遊離 DNA や微生物等を含む海洋環境 DNA サンプルに対するプロトプラスト融合法の有効性を検討した。

【結果および考察】

●海洋細菌と大腸菌間でのプロトプラスト融合法の確立 プロトプラスト化、融合および再生の 3 段階で条件検討した結果、プロトプラスト化では浸透圧調整剤としてのグリセリンの使用、融合では 20%ポリエチレングリコール 6000 を使用した条件などが最適であった。その結果、大腸菌に海洋細菌由来の抗生物質耐性や塩分要求性を有する融合株 13 株を取得し、海洋細菌と大腸菌間でプロ

トプラスト融合が可能であることが示唆された。さらに融合状況の確認のために、海洋細菌の未知なる全発光遺伝子 (*luxC*、*D*、*A*、*B* および *E* ; 5.5kbp) を特定し、155 株の融合候補株からこの発光遺伝子の断片を検出した。その結果、2 株に *luxA* の一部分および *luxB* の全塩基配列および 3 株に *luxA* の一部分の断片の挿入が確認された。本結果より、海洋細菌由来の遺伝子断片が融合で大腸菌に形質転換されることが明らかになった。

●脂肪酸添加培養によるプロトプラスト融合率の向上 種々の脂肪酸を添加して培養することにより、プロトプラストの安定性および融合率が変化した。プロトプラスト融合率を向上させるためには、海洋細菌には安定性を低下させるエイコサペンタエン酸の添加培養が、大腸菌には安定性を向上させるリノール酸およびリノレン酸の添加培養が適切であることが判明した。

●プロトプラスト融合法の応用 プロトプラスト融合法の VBNC 状態の微生物への適用に先立ち、モデルとなる海洋細菌の VBNC 状態への誘導条件を検討した。その結果、NaCl 濃度 1%、pH7.8 の条件下で本菌は培養 63 日後に VBNC 状態に陥った。その VBNC 状態の海洋細菌と大腸菌を融合した結果、抗生物質耐性を有する融合株が取得できたが、その融合率は栄養状態の海洋細菌を用いた場合よりも低下した。次に遊離 DNA への適用を検証するために、制限酵素で切断した海洋細菌のゲノム DNA をプロトプラスト状態の大腸菌に挿入した。その結果、指標としたカナマイシン (KM) 耐性遺伝子の挿入率はプロトプラスト化していない大腸菌よりも高いことが判明した。これらの結果に基づき、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子で標識したプロトプラスト化した大腸菌に、海洋環境 DNA サンプルの挿入を試みた結果、KM 耐性を持つ融合株が得られたことから、海洋環境 DNA が大腸菌へ形質転換されることが確認された。

【まとめ】 本研究では、モデルとなる海洋細菌と大腸菌間での融合条件を明らかにするとともに、生理・生化学的性状および遺伝学的特性から、大腸菌への海洋細菌由来の遺伝子の挿入を確認した。また、プロトプラストの安定性を制御することにより、プロトプラスト融合率を向上させることができた。そして、これらの方法を VBNC や遊離 DNA、さらには海洋環境 DNA サンプルに適用したところ、指標とした海洋の遺伝子資源の収集と大腸菌での発現に成功した。今後、本方法が海洋微生物由来の新規遺伝子の収集などに有効利用されることが期待される。

目次

第1章 序論	4
第2章 供試菌株の選択およびプロトプラスト融合法の確立	12
2.1 緒言	
2.2 実験方法	
2.2.1 供試菌株と保存法	
2.2.2 供試菌株の培養法	
2.2.3 発光光度および増殖の測定	
2.2.4 抗生物質存在下における海洋性発光細菌の発光光度の影響	
2.2.5 <i>S. sp.</i> 02HA-5-1 株の 16S rRNA と生理・生化学的性質および DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる同定	
2.2.6 供試菌株のプロトプラスト融合	
2.3 結果および考察	
第3章 海洋性発光細菌の発光遺伝子を標的とした融合株の検出	43
3.1 緒言	
3.2 実験方法	
3.2.1 発光遺伝子のクローニング	
3.2.2 融合株からの発光遺伝子の検出	
3.2.3 融合株の遺伝子工学的および生理・生化学的性状試験	
3.3 結果および考察	
第4章 細胞膜の脂肪酸組成に着目したプロトプラスト融合	67
4.1 緒言	
4.2 実験方法	
4.2.1 脂肪酸添加培地	
4.2.2 供試菌株のプロトプラストの形成およびその安定性の評価	
4.2.3 海洋性発光細菌および大腸菌の培養および発光光度の測定	
4.2.4 細胞膜構成脂肪酸の分析	
4.2.5 脂肪酸添加によるプロトプラスト融合	
4.3 結果および考察	

第 5 章 海洋性発光細菌 <i>Shewanella woodyi</i> 02HA-5-1 株の VBNC 状態への誘導と蘇生	86
5.1 緒言	
5.2 実験方法	
5.2.1 供試菌株の生育	
5.2.2 供試菌株の VBNC 状態への誘導	
5.2.3 供試菌株の VBNC 状態への各種誘導条件	
5.2.4 供試菌の VBNC 状態からの蘇生	
5.2.5 VBNC 状態に陥った <i>S. woodyi</i> 02HA-5-1 株および大腸菌のプロトプラスト融合	
5.3 結果および考察	
第 6 章 プロトプラスト融合法の応用	101
6.1 緒言	
6.2 実験方法	
6.2.1 モデル遊離 DNA の大腸菌への形質転換	
6.2.2 天然海水サンプル中の遊離 DNA の大腸菌への形質転換	
6.2.3 天然海水サンプル DNA の GFP 標識大腸菌への形質転換	
6.3 結果および考察	
第 7 章 総合討論	125
参考文献	132
謝辞	144

略語

	全称	試薬メーカー
Amp	: アンピシリン	和光純薬工業
CEX	: セファレキシン	和光純薬工業
CTX	: セフォタキシム	和光純薬工業
DHA	: ドコサヘキサエン酸	和光純薬工業
DMSO	: ジメチルスルホキシド	和光純薬工業
EM	: エリスロマイシン	和光純薬工業
EPA	: エイコサペンタエン酸	和光純薬工業
GFP	: 緑色蛍光タンパク質	タカラバイオ
GM	: ゲンタマイシン	和光純薬工業
IPTG	: イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド	タカラバイオ
KM	: カナマイシン	和光純薬工業
NB	: ノボビオシン	和光純薬工業
PEG	: ポリエチレングリコール	和光純薬工業
PIPES	: ピペラジン-1,4-ビス(2-エタスルキン酸)	和光純薬工業
RM	: リボスタマイシン	和光純薬工業
SDS	: ドテシル硫酸ナトリウム	和光純薬工業
SM	: ストレプトマイシン	和光純薬工業
TC	: テトラサイクリン	和光純薬工業
VBNC	: 難培養性微生物 (viable but nonculturable)	
VM	: バンコマイシン	和光純薬工業
X-Gal	: 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトース	タカラバイオ

第 1 章

序論

我々が生活している地球表面の約 70%は 3.3~3.7%の塩分を含有する海洋であり、これは他のすべての環境を合わせたよりも面積が大きい。生命誕生の起源の場所であると考えられる海洋には、動物や植物を始め、様々な微生物が生息している。¹⁾ この海洋環境は我々の生活する陸上よりも多様性のある環境であり、海底火山の火口付近の温度では 250℃にも達する一方で、極地付近や最深部では 2~3℃の冷温である。また、水圧は 10m 深くなるごとに約 1 気圧増加するため、水深 1,000m における水圧は 100 気圧に達する。さらに海洋は深さによって太陽光の到達と溶存酸素濃度が変わり、深い部分では太陽光も酸素も欠乏している。しかしながら、海水の pH は中性付近から弱アルカリの範囲で安定しているので、多くの微生物の増殖に適しており、表層付近では光合成生物に十分な二酸化炭素も存在している。

海洋における重要な微生物である従属栄養細菌 *Pseudomonas* 属、*Vibrio* 属、*Achromobacter* 属および *Flavobacterium* 属などは強い太陽光が降り注ぐ海洋の表層に棲息している。これらの海洋表層と海洋深層の間には比較的微生物の数は少なく、一方海洋深層には生物地球化学的循環に大変役立っており、アンモニウムイオンや硫化水素また窒素ガスを作り出している偏性嫌気性または通性嫌気性微生物が生息している。海洋環境に棲息する微生物は多様な条件に適応しなければならないため、陸上で生息している微生物と異なったものが多く存在していることが指

摘されている。²⁻³⁾ 現在のところ、海洋に生息している微生物の正確な数や特異的な環境に生息する種についてはあまり明らかにされていない。

このような多様性のある海洋微生物から我々の生活に役に立つ数多くの微生物が見出されている。例えば硫黄細菌、石油分解菌、抗生物質生産菌および酵素生産菌などが挙げられる。⁴⁻⁷⁾ これらの微生物は石油の分解、汚染水の処理、環境修復、食品・医薬品生産など様々な分野で応用されている。しかしながら、これまで海洋から分離された微生物が諸産業に応用されている例は陸上に比べてはるかに少ない。その理由の一つに海洋からの微生物の採集は陸上に比べて困難であり、特に深海などのサンプルの採集は極めて困難である。そのため、海洋微生物について未解明の点が多く存在している。海水環境に存在する微生物の99%以上は既知の培養条件では培養が困難な、いわゆる難培養性微生物(VBNC)である。⁸⁾ VBNCとは純粋培養が不可能もしくは極めて困難な微生物または生育培地中にコロニーは形成されるが成育状況が悪く、その単離が難しいものや共生でしか生存できない微生物などを示し、これらは全く新規な分類群に属する場合がある。⁹⁻¹⁰⁾ これらの微生物は既存の技術では培養ができないため、その性質がまだ明らかになっておらず、存在することがわかっていても応用研究に結びつくことはできない状況である。また、海洋由来の微生物は一般に塩分要求性があり、一般的なステンレスタンクなどを用いた大量培養には適しておらず、工業的な利用に対するコストパフォーマンスが良くないことも実用的な応用が進まない一つの理由に挙げられる。

現在、発見されている微生物から諸産業や学術的に有用な新しい物質を発見することは限界に近づいていると言われているが、我々がまだ入手できない未知の微生物やそのDNAなどの生物遺伝子資源は無数の可能

性を持っており、新しい機能を持った遺伝子を発見し、利用することは十分可能であると思われる。近年、これらの微生物や微生物機能を有効に活用し、目的に合った新しい物質を生産するための研究が世界的に行われている。中でも未知なる遺伝子源が多い海洋から微生物遺伝子を直接回収し、特定機能を有する遺伝子の存在を明らかにする研究は盛んに行われている。その方法として、PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE)、DNA マイクロアレイ法、メタジェノミクス法などが挙げられる。PCR-DGGE 法は、そのサンプル中に存在するすべての微生物の 16S rDNA を増幅し、二本鎖 DNA 分子の塩基配列の違いを安定性の差異として電気泳動の移動度に反映されるフィンガープリンティング手法である。

¹¹⁾ DGGE は環境中の微生物の群集組成の多様性を評価するのに大変有効な方法である。しかしながら、本方法では環境中に存在する VBNC 状態や通常の生育状態の微生物の存在を確認することはできるが、その微生物が持っている DNA のみを大量に入手することができず、有用遺伝子の回収には結びつかない。これに対して DNA マイクロアレイ法は細胞内の遺伝子発現量を測定するために、数万から数十万に区切られたスライドガラス、またはシリコン基盤の上に DNA の部分配列を高密度に配置し固定したものを利用する。¹²⁾ しかしながら、この方法でも既知の遺伝子を取得した上でその遺伝子が目的サンプルでの発現量は測定できるものの、全く未知の機能を有する遺伝子を取得することは難しい。一方、メタジェノミクス法は、ある環境に生育する生物（主に真正細菌）のゲノムを抽出し、DNA の断片をクローニングして大腸菌に取り込ませて解析するゲノミクスの新しい手法であり、ゲノムの比較を通じて生物多様性の解析などを行う際に役に立つ。¹³⁾ しかしながら、本方法では煩雑な遺伝子操作を行う必要がある上、クローニングする断片はプラスミドに結合で

きる短い DNA 断片に限られ、用いる装置も大変高価である。その他、新規微生物を単離する方法として飢餓状態からの回復の検討方法や、細菌相互作用を再現したゲル・マイクロドロップ法なども知られている。¹⁴⁻¹⁶⁾ 以上のように様々な方法が挙げられているが、これまでの手法では遺伝子情報の未解明の部分も多く、簡便でコストのかからない有効な未利用遺伝子資源の有効な回収利用法の開発が求められている。

そこで、著者は海洋微生物に存在する多くの未利用遺伝子資源を活用する方法の1つとしてプロトプラスト融合に注目した。遺伝子伝達には形質転換、形質導入および接合が知られているが、今回注目したプロトプラスト融合は形質転換に属する。プロトプラスト融合とは溶菌酵素等を用いて細胞壁を取り除いてプロトプラスト状態とした2つの微生物細胞を混合し、融合、再生させる技術のことである。これにより両親株の形質を有する新しい微生物の育種が可能となる。この細胞融合は、これまでの交雑育種では交配ができなかった系統的に遠い距離にある種間でも起こり、融合した細胞を再生させることができる。1972年には Carlson¹⁷⁾ によって2種類のタバコ属植物の体細胞雑種が世界で初めて作り出された。その後、融合率を向上させる方法としてポリエチレングリコール (PEG) 法が Kao *et al.*¹⁸⁾ によって開発され、プロトプラスト融合は応用の幅を広げた。そして1978年にドイツの Melchers *et al.*¹⁹⁾ によって通常の交配では雑種を作ることができないポテトとトマトの細胞融合により体細胞雑種「ポマト」が作り出された。このポマトの作出を期に世界中で細胞融合の研究が盛んに行われ、日本でもたくさんの体細胞雑種が作出され、中でも1985年に農林水産省とキッコーマン株式会社の共同研究により育成されたオレンジとカラタチの体細胞雑種である「オレタチ」は世界初の木本性植物の体細胞雑種として話題を集め、品

種登録までされた。²⁰⁾ さらに 1979 年には薬剤を使わず、電気刺激により細胞融合が起こることが発見され、²¹⁾ 1980 年代は細胞融合による雑种植物の作出は植物育種分野におけるバイオテクノロジー技術の主役であった。しかしながら、細胞融合により作り出された体細胞雑種は不稔になることが多いことや、両親株の好ましくない形質まで受け継いでしまうなどの問題点も指摘されており、主役の座は遺伝子組換えにとって代わった。その一方で、細胞融合法は放線菌や同属間の陸上由来の微生物にも応用され、親株とは大きく異なる性質の融合株が取得されてきた。²²⁻²⁴⁾ 例えば目的とする物質を大量に産生するが増殖の遅い株を、産生量は低いが増殖の速い株と融合させ、物質生産と増殖に優れた株を得ることができる。また、2 つの産生量の高い株を融合することで別に超産生型株を得ることも可能である。²⁵⁻²⁷⁾ このような性質を利用した酵母の発酵性や香気成分生産性の改良などは昔からよく用いてきた技術である。²⁸⁾ さらに既知の機能を有する微生物間同士で融合を行った場合に、その融合株が両親株の生産物とは全く異なる新しい機能性物質を生産する例も幾つか報告されている。例えば *Streptomyces fradiae* 261-27E および *S. fradiae* AM4900N3-4 間の交差により生じた原始栄養性融合株は両親株が生産しないマクロライド系抗生物質を生産し、マルチオマイシン生産放線菌 *S. antibioticus* およびネオマイシン生産菌 *S. fradiae* のプロトプラスト融合でも新規抗生物質生産菌が取得されている。²⁹⁻³⁰⁾ このような特異的な現象を生じる理由の一つに、プロトプラスト融合は個々の単位のゲノムではなく両者の全ゲノムが交雑していることが挙げられる。すなわち、適切なプロモーターを移し変えるような複雑な遺伝子工学的手法を用いなくても、新しい性状を示す微生物を比較的簡単に取得できる可能性がある。

本方法を用いて様々な機能性を有する海洋性細菌と既知の機能を有する微生物間で融合を行うことにより、海洋由来の遺伝子資源の有効活用が可能であるのみならず、新規遺伝子資源の取得も期待できる。現在、新規な生理活性物質を培養可能な微生物から取得することは次第に困難になりつつあるが、このプロトプラスト融合技術を応用することは、新規遺伝子資源を取得する方法として大変重要な役割を果たすものと思われる。しかしながら、培養可能で有用な機能を持つことが知られている海洋細菌については、プロトプラストを作成した報告が見られるのみで融合に関する報告例は全くない。さらに VBNC や海水中に大量に存在している遊離した DNA をプロトプラストに作用させた報告も見られない。

そこで本研究ではドナーモデルとして海洋性発光細菌 *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株を、レシピエントモデルとして大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649^T 株を選択し、培養可能な海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラストで融合を行い、VBNC 状態に誘導した海洋性発光細菌と大腸菌のプロトプラスト融合および遊離した DNA と大腸菌の形質転換を実証するとともに、本方法を用いた新規微生物の取得を試みた。

第 1 章では、本研究の背景や課題および本研究の目的や解決すべき問題点などについて述べ、本研究の全体的な構成を示した。

第 2 章では、モデル微生物として使用した海洋性発光細菌と大腸菌の抗生物質耐性や発光性などのマーカーの特徴について明らかにするとともに、この両株のプロトプラスト融合法の確立とその結果として得られた融合株の諸性状を明らかにした。なお、海洋性発光細菌の 16S rRNA および DNA-DNA ハイブリダイゼーションに基づく遺伝子学的同定を併せて行った。

第 3 章では、海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラスト融合から

得られた融合株の性状を遺伝子工学的手法を用いて明らかにするために、融合株から発光細菌由来の発光遺伝子(*lux* 遺伝子)の検出を行った。さらに、*lux* 遺伝子断片が挿入された融合株の生理・生化学的性質を親株と比較した。

第2章で実施した海洋性発光細菌と大腸菌のプロトプラスト融合の融合率は極めて低く、融合率を向上させる必要が示唆された。そこで第4章では、細胞膜の脂肪酸組成を改変することにより、海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラスト融合率を向上させる条件について検討し、種々の脂肪酸を添加して培養することにより、リゾチーム処理して得られるプロトプラストの安定性を変化させ、プロトプラスト融合率の向上を試みた。

第5章では、VBNC状態の微生物と大腸菌のプロトプラスト融合を検討した。海洋中には多くのVBNC状態の微生物が存在するが、これらの海洋中のVBNCの微生物を直接プロトプラスト融合に応用しても海洋環境中のVBNCの持つ形質などを明らかにすることはできないことから、プロトプラスト融合の成否を評価できない。そこで、VBNC状態の微生物のプロトプラスト融合法を検討するために、海洋性発光細菌 *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株をモデル微生物と選択し、海洋性発光細菌をVBNC状態に誘導する条件を種々検討し、大腸菌とプロトプラスト融合を行った。

第6章では、プロトプラスト融合法を海洋中の様々な遺伝子資源に応用するための各種検討を行った。まず、海洋中に大量に存在する各種遊離DNAをプロトプラスト状態の大腸菌に挿入することを試みるために、遊離DNAのモデルサンプルとしてカナマイシン(KM)耐性遺伝子を有する発光細菌のゲノムDNAを制限酵素で処理し、プロトプラスト状態の場合の大腸菌(KM耐性遺伝子の取り込み率)とプロトプラスト化していない

場合で比較した後、天然海水サンプル中の遊離 DNA の大腸菌への形質転換を試みた。さらに、生菌を含んだ天然海水サンプルと緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子で標識したモデル大腸菌の形質転換を行い、すべての現場の微生物および遊離 DNA を標的にした時の形質転換について検討した。

第 7 章では、本実験の全体的の結果を総括し、本研究で得られた結果を明らかにするとともに今後の研究課題などについてまとめた。

第 2 章

供試菌株の選択およびプロトプラスト融合法の確立

2.1 緒言

海洋の未利用遺伝子資源を有効に活用する方法の 1 つとしてプロトプラスト融合を利用することが考えられる。³¹⁾ プロトプラスト融合は、細胞壁を取り除いてプロトプラスト状態になった複数種の微生物を混合することによって、微生物間で遺伝子を水平伝播させる技術である。³²⁾ このプロトプラスト融合は複雑な遺伝子工学的手法を用いなくても、微生物の遺伝学的性質を大幅に変更することができる優れた手法である。プロトプラスト融合では環境に生育する微生物のゲノムを抽出することなく、プロトプラスト状態にしたもの同士を融合させ、未知のゲノムを有する微生物の遺伝子情報が既知の微生物と組換えることができる。さらに、融合操作は比較的簡単で、特別な装置などを用いなくても可能であり、融合により大きいサイズのゲノム断片が組換えることも可能である。本方法を用いて海洋中の微生物と培養が容易でかつ大量培養が可能な微生物との融合を行うことにより、今まで利用できなかった海洋微生物の有用遺伝子を培養が容易な微生物の側に移行し、有用機能を発現することができれば、諸産業への応用の道をさらに開くことができると考えられる。これまでに、プロトプラスト融合は同属間の陸上由来の微生物についてのみ報告が見られ、親株とは異なる性質を有する融合株が数多く取得されている。³³⁻³⁸⁾

しかしながら、海洋微生物についてはプロトプラストを作成した報告は見られるものの、融合例は全くない。³⁹⁻⁴¹⁾ 海洋微生物はその培養条件で塩分要求性を有するなど陸上の微生物と異なる性質であることからプロトプラスト融合を行う条件も海洋微生物に適した条件を使用する必要がある。微生物のプロトプラスト融合にはプロトプラスト化、プロトプラスト融合およびプロトプラスト再生の3つのステップが存在しているが、これらのどのステップでも海洋細菌に適した塩分などの条件が必要である。このため、陸上の微生物のプロトプラスト融合方法をそのまま海洋細菌に適応することは限界があると考えられ、新しく海洋微生物とのプロトプラスト融合法のモデル系を構築することが必要であると思われる。

そこで、本章では様々な海洋微生物の中から抗生物質耐性や海水要求性のある海洋性発光細菌 *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株を海洋微生物のモデルとして選択するとともに、汎用性が高く、抗生物質耐性や海水要求性のない大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649^T 株を培養が容易な微生物のモデルとして選択した。そして、それらの供試菌についてプロトプラスト融合法を検討するとともに、得られた融合株の生理・生化学的性状を明らかにすることを目的とした。

2.2 実験方法

2.2.1 供試菌株と保存法

本研究では海洋性発光細菌 *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株および大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649^T 株をモデル株として使用した。*S.* sp. 02HA-5-1 株は東京海洋大学大学院応用微生物学講座において2002年

10月10日に沖縄本島北部水深140mの海水中より分離した株で、分離後-80℃で保存していたものを本実験に用いた。また、大腸菌 *E. coli* JCM1649^T 株は理化学研究所から分譲されたもので、当講座の-80℃超低温保存庫中で保存されていたものを、解凍後37℃でよく増殖させた後、実験に供するまで4℃で保存した。*Vibrio fischeri* 010Q2-1-4 株、*Vibrio harveyi* 01AM-5-3-27 株および *Photobacterium leiognathi* 01K0-4-1 株はそれぞれ東京湾大井埠頭、奄美大島および高知県・入野市の海水サンプルから分離した発光細菌であり、*Photobacterium phosphoreum* IF013896 株は発酵研究所より入手した発光細菌である。海洋性発光細菌 *S. sp.* 02HA-5-1 株及び大腸菌の性質は Table 2.1 に示した。02HA-5-1 株は発光能をマーカーとして有する他にカナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、アンピシリン(Amp)、リボスタマイシン(RM)、ゲンタマイシン(GM)、バンコマイシン(VM)およびセフトキシム(CTX)に対する抗生物質耐性および海水要求性を有する好気性の低温性細菌である。一方、JCM1649^T 株は発光能や抗生物質耐性および塩分要求性のない通気嫌気性の中温性細菌である。このようにお互いに相反する性質を持っていることから特定の選択培地において融合株の選択が可能になり、これら2種類の細菌の組み合わせでプロトプラスト融合の実験が行えることが判明した。

2.2.2 供試菌株の培養法

海洋性発光細菌は HSB 培地 (Table 2.2) 20ml を添加したバツフル付きの 100ml 容三角フラスコに一白金耳接種後 (事前に -80℃ から解凍後 1.5% の寒天を添加した HSB 培地に接種し、肉眼的に発光が明瞭に確認できるコロニーを使用)、20℃ において一昼夜往復振盪培養 (40 回/分) した。培

養後、630nm における濁度 (OD_{630}) が 0.5~0.8 に達した前培養液 200 μ l を分取し、新しい 100ml 容三角フラスコ (HSB 培地 20ml を添加) に接種し、前培養と同様に 20 時間培養したものを本実験に使用した。

大腸菌は TSB 培地 (Table 2.3) 20ml を添加したバッフル付きの 100ml 容三角フラスコに一白金耳接種後、27°C において一昼夜振盪培養 (160rpm) した。培養後、 OD_{630} が 0.8 に達した前培養液 200 μ l を分取し、新しい 100ml 容三角フラスコ (TSB 培地 20ml を添加) に接種し、前培養と同様に培養したものを本実験に使用した。

2.2.3 発光光度および増殖の測定

海洋性発光細菌の発光光度の測定はデュアルルシフェラーゼアッセイ用ルミノメータ Gene-Light 55 (マイクロテック・ニチオン) を用い、液体培養した培養液の相対発光量 (Relative Light Unit, RLU) を測定した。一方、供試菌の増殖量は 96 ウェル測定用のマイクロプレートリーダー UV-2400PC (島津製作所) を用い、 OD_{630} における濁度を測定して求めた。

2.2.4 抗生物質存在下における海洋性発光細菌の発光光度の影響

(1) 02HA-5-1 株の Amp および CTX 存在下における発光光度の影響

0、1.5、3、6、12、25、50 および 100 μ g/ml の Amp ならび CTX を添加した HSB 培地を 24 穴の細胞培養用タイタープレート (住友ベークライト) に 1ml ずつ分注した。これに抗生物質無添加で培養した 02HA-5-1 株の培養液を 10 μ l 接種した後、20°C において一昼夜往復振盪培養 (20 回/分) した。その後、同じ滅菌 HSB 培地にて 100 倍希釈したものの発光光度および培養液の増殖量を測定した。

(2) 5 種類の発光細菌の各種濃度の Amp 存在下における発光光度の影響

Vibrio fischeri 010Q2-1-4 株、*V. harveyi* 01AM-5-3-27 株、*Photobacterium leiognathi* 01K0-4-1 株、*P. phosphoreum* IF013896 株および 02HA-5-1 株の合計 5 株を 0、1.5、3、6、12、25、50 および 100 μ g/ml の Amp を添加した HSB 培地に植菌し、20°C において一昼夜往復振盪培養 (20 回/分) し、その発光光度および増殖量を比較した。

2.2.5 *S. sp.* 02HA-5-1 株の 16S rRNA と生理・生化学的性質および DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる同定

02HA-5-1 株について Ezaki *et al.* の方法⁴²⁾ に従って全ゲノム DNA を抽出した。すなわち、対数増殖後期まで培養した菌体培養液 1ml を 1.5ml 容遠心管に分取し、9,200 \times g で 10 分間遠心分離して上清を除去した後に、0.2ml の 0.1M EDTA (pH8) 溶液に懸濁した。この菌体懸濁液に卵白由来リゾチーム (和光純薬工業) を終濃度 1mg/ml になるように加え、37°C に 15 分間インキュベートした後、0.2ml の 20% SDS 溶液を加え、60°C で 10 分間放置した。目視で粘度の増加を確認した後氷冷し、DNA のフェノール/クロロホルム抽出を行った。フェノール/クロロホルム抽出は次のように行った。溶菌懸濁液に等量の PCI (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 25:24:1) を添加し、15 分間強く攪拌した。その後、20,600 \times g で 20 分間遠心分離し、その上層を分取し、新しい 1.5ml 容遠心管に移した後、等量の PCI を添加して同一操作を 2 回繰り返した。このようにして得られた上層に 0.1 倍の 1M 塩化ナトリウム溶液および 2.5 倍量の冷エタノール (100%) を添加し、20,600 \times g で 20 分間遠心分離した。この上清を除去し、等量の冷エタノール (70%) を添加し、20,600 \times g で 5 分間遠心分離し、上清を完全に除去した後、沈殿した DNA を常温で 30 分間風乾させた。この DNA に 20 μ l の TE バッファ (Table 2.4) を添加して以後の実験に用いた。すなわち、抽出し

たDNAをTaKaRa rTaq™ (タカラバイオ) によりPCR増幅を行い、ユニバーサルプライマーを用いて16S rDNAを増幅した。使用したプライマーをTable 2.5に示した。なお、PCRの反応条件は、熱変性が94℃で5分間、続いて94℃で1分間、59℃で2.5分間、72℃で2.5分間のサイクルを30回繰り返した後、伸長反応を72℃で行った。得られたPCR産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって増幅断片を確認した後、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の解析を行った。なお、サーマルサイクラーの条件は熱変性が96℃で2分間、続いて96℃で10秒間、50℃で5秒間、60℃で4分間のサイクルを25回繰り返した後、伸長反応を60℃で5分間行った。得られたPCR産物の精製は以下のとおりに行った。サンプル20 μ lに3M酢酸ナトリウム2 μ lおよび95%エタノール50 μ lを添加し、常温で15分間放置した後、20,000 \times gで20分間遠心分離を行い、その残渣に70%エタノール250 μ lを添加して再び5分間遠心分離し、上清を除去した残渣に20 μ lのHi-Di Formamide (Applied Biosystems) を加え、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) の操作方法に従って塩基配列の解析を行い、CLC Free Workbench (CLC bio) ソフトを用いて系統図を作成した。

16S rRNAでの相同性が最も高かった *Shewanella woodyi* ATCC51908株との生理・生化学的性質の比較はSimbert *et al.* の方法⁴³⁾ を参考に行った。なお、*S. woodyi* ATCC51908株は水深200~300mのアルボラン海の海水およびイカ墨より分離された株で⁴⁴⁾、東京大学に保存されていたものを分譲された。

一方、両株のDNA-DNAハイブリダイゼーションはEzaki *et al.* の方法⁴⁵⁾ を参考にマイクロプレート法を用いて行った。すなわち、上記と同じ方法

で両株のDNAを精製し、 $100\ \mu\text{g/ml}$ になるようにTEバッファで調製し、 100°C で10分間保温後、氷冷して熱変性した。熱変性DNA溶液をPBS-Mg (Table 2.6)で $10\ \mu\text{g/ml}$ に希釈し、96ウェルのマイクロプレート(コーニング)の各ウェルに $100\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、 30°C で2時間保温後、溶液を除去し、 45°C に1時間保温して乾燥したものをDNAプレートとして用いた。次に、 0.5mg/ml に調整した両株の標識DNA $10\ \mu\text{l}$ を等量のフォトビオチン溶液(株式会社ベクター)と混合し、蓋を開けたまま氷上で300Wの水銀灯で上面から30分間光照射した後、 $180\ \mu\text{l}$ の 0.1M Tris-HCl (pH9.0)を加え、さらに等量の1-ブタノールを加えてよく混合し、余剰のフォトビオチンを1-ブタノール相に移して除き、1-ブタノール抽出を2回行ったものを標識DNAとした。ハイブリダイゼーションは次の方法で行った。すなわち、DNAを固定したプレートのウェルに、プレハイブリダイゼーション溶液 (Table 2.7)を $200\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、 37°C で30分間保った。その間にフォトビオチン標識DNA溶液を超音波破碎機(東京超音波技研株式会社)で20秒間処理し、 100°C 、10分間処理後急冷した。この標識DNA溶液 $50\ \mu\text{l}$ 当りにハイブリダイゼーション溶液 (Table 2.8) 1ml を加え、よく混合した。次に、プレートのプレハイブリダイゼーション溶液を除去した後、標識DNAを含むハイブリダイゼーション溶液をウェル当り $100\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、蒸発を防ぐためにウェルにシールし、 42.2°C で3時間保温し、ハイブリダイゼーション反応を行った。反応終了後、ハイブリダイゼーション溶液を除去し、ウェルを $1\times\text{SSC}$ (Table 2.9)で3回洗浄した。得られたハイブリッドDNAの定量は発色法を用いた。すなわち、使用直前に調製した $100\ \mu\text{l}$ のstreptavidin-酵素溶液 (Table 2.10)を各ウェルに分注し、 37°C で1時間放置した後、溶液を除去し、ウェルを $1\times\text{SSC}$ で3回洗浄した後、使用直前に調製した $100\ \mu\text{l}$ の発色基質TMB溶液 (Table 2.11)を各ウェルに分注して5分後の OD_{630} による吸光度を測定

した。次に、 $2\text{MH}_2\text{SO}_4$ を $50\ \mu\text{l}$ 加え、反応を停止させた後、 450nm による吸光度を測定し、相同性を求めた。

2.2.6 供試菌株のプロトプラスト融合

(1) 海洋性発光細菌のプロトプラストの形成

02HA-5-1 株をバツフル付きの 100ml 容三角フラスコ (HSB 培地 20ml を添加) に一白金耳接種後、 20°C において一昼夜往復振盪培養 (40 回/分) した。培養後、その全量を遠心分離 ($3,300\times g$ 、 10 分間) により集菌し、 20ml の海洋性発光細菌用高張溶液 (Table 2.12) に懸濁し、さらに同一条件で菌体を 2 回洗浄した。次に 10ml の海洋性発光細菌用高張溶液に菌体を再懸濁し、高張溶液中のリゾチームが最終濃度 $0\sim 12\text{mg/ml}$ になるように添加し、 20°C 、 27°C および 37°C にて往復振盪 (40 回/分) した。一定時間経過後、プロトプラストの形成を位相差顕微鏡 (オリンパス・BX51、 400 倍) で確認し、以後の回収操作に用いた。なお、海洋性発光細菌用高張溶液の組成として、 $0\sim 0.5\text{M}$ のスクロース、グリセリン、D-ソルビトールおよび D-マンニトール (和光純薬工業)、またプロトプラストの安定剤として $0\sim 0.4\text{M}$ の塩化カルシウム、塩化カリウムおよび塩化マグネシウム (和光純薬工業) ならびに EDTA $\cdot 2\text{Na}$ (和光純薬工業) を添加した時の効果を調べた。⁴⁶⁾

得られたプロトプラストの回収法として透析膜 (Spectra/Por2 分画分子量 $300,000$) (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた透析法と遠心分離法 ($3,300\times g$ 、 10 分間) の両方法を検討した。回収したプロトプラストは終濃度が $1\times 10^9/\text{ml}$ になるように海洋性発光細菌用高張溶液で希釈した。

(2) 大腸菌のプロトプラストの形成

グラム陰性細菌のプロトプラストの作成についてはこれまでいくつかの報告が見られる。⁴⁷⁻⁴⁹⁾ 本研究では JCM1649^T 株について過去の文献を参考にプロトプラストを作成した。⁵⁰⁾ 本株を 20ml の TSB 培地 (バッフルつき 100ml 容三角フラスコ) に植菌し、37℃ で一昼夜回転振盪培養 (160rpm) した。この培養液 1ml を新たな同培地 20ml に接種し、27℃ で一昼夜振盪培養した全量を遠心分離 (3,300×g、10 分間) で集菌した後、大腸菌用高張溶液 (Table 2.13) に再懸濁し、同様に遠心分離によって菌体を洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、10ml の大腸菌用高張溶液に再懸濁し、最終濃度 0.4mg/ml に蒸留水で溶解したリゾチーム溶液を加えた後、氷上にて 15 分間放置し、位相差顕微鏡でプロトプラストの形成を確認した。この反応液を遠心分離 (2,300×g、5 分間、4℃) し、生成したプロトプラストを大腸菌用高張溶液で 2 回遠心洗浄 (2,300×g、5 分間) し、終濃度 1×10^9 /ml になるまで大腸菌用高張溶液にて希釈した。

(3) プロトプラスト融合

上記の操作により得られた両株の純化プロトプラスト液 1ml ずつ (1×10^9 /ml) を等量混合し、遠心分離 (2,000~5,000×g、1~10 分間) により両プロトプラストを濃縮した。これに各種 PEG 溶液 1ml を速やかに加えてプロトプラストを懸濁させ、常温で 1 分間静置して融合処理した後、さらにプロトプラスト用高張溶液 (Table 2.14) 1ml を加えた。なお、PEG (和光純薬工業) は平均分子量の異なる #200、#1,000 および #6,000 の 3 種類を用い、その濃度は 10%~40% の範囲に調整した。

(4) 融合株の再生

得られたプロトプラスト混合液を海洋性発光細菌用高張溶液で適宜希釈し ($\times 1 \sim 10^{-7}$ 倍)、その 0.1ml を再生培地 (Table 2.15) に塗抹した後、20℃、27℃ および 37℃ において 2~5 日間静置培養した。なお、これと

同時に浸透圧調整剤無添加の再生培地でも同様に培養し、低浸透圧条件で供試菌プロトプラストがバーストすることにより、プロトプラストが再生されないことを確認した。

再生培地上に生じた再生コロニーを直接あるいはレプリカ法により選択培地に接種した後、培養を行った。なお、この選択培地は再生培地からグリセリンを除いたものを基本とし、これに塩化ナトリウム(0、1.5、3%)および抗生物質として $10 \mu\text{g/ml}$ の KM、SM および Amp をそれぞれ添加した。これらを 20°C 、 27°C および 37°C 下で培養し、生じたコロニーの発光性の有無を目視で観察した。なお、すべての融合候補株は同一条件下において寒天培地で数回継代培養を行い、安定な表現形質を保有する融合株のみを選択した後、プロトプラストの融合率、再生率および回収率を Table 2.16 に示した計算式に従って算出した。そして得られたすべての融合候補株は 15%グリセリンに懸濁した後、 -80°C 下で保存した。

(5) 融合株の取得およびその諸性状

融合株とその親株の発光性は HSB 培地または TSB 培地において 20°C 、 27°C および 37°C で一昼夜振盪培養した後、暗所において肉眼的に確認した。また融合株の抗生物質耐性試験には KM、SM および Amp をそれぞれ 0、6、12、25、 $50 \mu\text{g/ml}$ 添加した HSB 培地または TSB 培地を用い、同様に一昼夜培養を行った後、増殖の有無から抗生物質耐性能を判定した。また同時に、同一濃度の抗生物質および 1.5%の寒天を添加した HSB 寒天培地および TSB 寒天培地でのコロニーの生育の有無からも抗生物質耐性能を確認した。なお、融合株および親株のその他の生理・生化学的性状試験は Smibert *et al.* の方法⁴³⁾ に準じて行った。

2.3 結果および考察

2.3.1 抗生物質が海洋性発光細菌の発光光度に与える影響

Fig. 2.1 および Fig. 2.2 に示したように、02HA-5-1 株は Amp 濃度 0~40 μ g/ml まで、また CTX 濃度 0~10 μ g/ml まで添加した抗生物質濃度と発光光度の間に高い正の相関が得られ、その相関係数 (R^2) はそれぞれ 0.884 および 0.927 であった。このような性質の一般性を確認するため、02HA-5-1 株を含む 5 種類の発光細菌を各種濃度の Amp 存在下における発光光度を調べた。その結果、Fig. 2.3 に示したように、Amp の添加による発光光度の変化は供試菌株によって大きく変動した。このように、Amp の添加濃度に比例して発光光度が向上する現象は、すべての発光細菌共通の性質ではないことが判明した。本実験の供試菌株である 02HA-5-1 株は Amp および CTX の添加により発光光度が向上したことから、選択培地にこれらの抗生物質を添加することにより融合株の選択の際に発光が検出されやすく、融合株の選択のマーカーとして使用できる可能性が期待できた。

2.3.2 *S. sp.* 02HA-5-1 株の同定

02HA-5-1 株の 16S rRNA の塩基配列 (1454bp) を Fig. 2.4 に、またこの塩基配列に基づく系統図を Fig. 2.5 に示した。この図から明らかなように、本株は *Shewanella woodyi* と 98.85% の高い相同性を示した。また、Table 2.17-18 に示すように、生理・生化学的性質も *S. woodyi* ATCC 51908 株と類似しており、さらに DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果でも 77.7% および 79.9% の相同性を示している (Table 2.19) ことから、本株は *S. woodyi* ATCC51908 株と同一種であることが明らかとなったが、両菌は違う株であることから本菌を *S. woodyi* 02HA-5-1 株と命名した。この

S. woodyi はまだあまり研究例がない種であり、今後さらに系統分類される可能性も考えられるので、データベースの充実が待たれるところである。⁵¹⁾

2.3.3 プロトプラスト融合法の確立

海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラスト化とその融合および再生条件は以下の通りに決定した。すなわち、発光細菌のプロトプラスト化は 15mM トリス-塩酸 (pH8.0)、0.3M 塩化カルシウム、0.5M グリセリン、8mM EDTA を含む人工海水⁵²⁾ から構成される懸濁液に最終濃度 2.4mg/ml になるようにリゾチームを加え、30℃で2時間の往復振盪が適切であった。生じたプロトプラストの回収は 2,300×g での遠心処理 (5 分間) が最適であった。一方、大腸菌のプロトプラスト化は柳田ら⁵⁰⁾ に示した方法に従った。すなわち、15mM トリス-塩酸 (pH8.0)、0.45M スクロース、8mM EDTA を含む懸濁液に 0.4mg/ml のリゾチームを加え、氷冷で15分間の静置が適切であった。生成したプロトプラストの回収は 2,300×g 遠心処理 (5 分間) が最適であった。各種濃度の PEG の存在下におけるプロトプラストの融合状態の変化を Fig. 2.6 に示した。この図から明らかなように 20% PEG の存在下においてこれらのプロトプラストは複数繋がって融合が生じているように見えた。プロトプラスト融合を行うためにはまず膜の接触が必要であるので、この繋がっている細菌のプロトプラストの数を融合に関与したプロトプラストの数として融合率の計算に用いた。なお、0% PEG ではこのような現象は観察されなかった。一方、40% PEG ではプロトプラストは完全に溶菌してしまい、原形をとどめていなかった。また各種 PEG 濃度下におけるプロトプラストの再生率、融合率および回収率を算出した結果、これら両菌を用いてのプロトプラスト融合は

15mM トリス-塩酸 (pH8.0)、0.5M グリセリンを含む人工海水に 20% PEG#6,000 を添加した溶液が最適であった (Table 2.16)。また、再生培地の組成としてはバクトペプトン (Difco)2.5g、バクト酵母エキス (Difco)1.5g、グリセリン 0.2M および寒天 15g を人工海水 1000ml に溶解したもの (pH 未調整) が良好であった。

融合株を含むプロトプラストを再生し、その再生したコロニーを様々な選択培地で培養した。その結果、発光性を有する 3 株を含む合計 155 株の融合候補株が得られた。これらの融合候補株を同一培地にて数回継代培養した結果、その多くは死滅したり、不安定な性状を示したため、最終的に 13 株の安定した性質を持つ融合株を取得できたに留まった。これらの 13 株の融合株について生理・生化学的性質を調べた結果を Table 2.20 に示した。この表からわかるように融合株 2-32 株、3-16 株および 3-18 株はコロニーの形態、酸素感受性、オキシダーゼ試験やグルコースからのガス産生の有無などが海洋性発光細菌と非常に近い性質を示した。しかしながら、発光性は完全に消失し、塩化ナトリウム耐性および抗生物質耐性が極めて低く、さらに 2-32 株は SM 耐性を消失し、また 3-16 株および 3-18 株は KM 耐性も完全に消失していた。これはおそらくプロトプラスト融合により大腸菌の持つ表現性質が保存期間の経過とともに脱落する傾向がよく知られることから親株である発光細菌から発光遺伝子が脱落したか可能性もあると考えられる。その他の融合株はコロニーの形態などが大腸菌と非常に近い性質を示したが、塩化ナトリウム耐性および抗生物質耐性の有無が親株と明らかに異なっていた。融合直後には 155 株の融合候補株が得られたが 3 ヶ月間保存したところ 13 株のみが親株と異なる性質であったことから、3 ヶ月の継代培養により、残りの 142 株は融合で得られた親株の性質が脱落した可能性が高いと考えられ

る。

本研究は海洋性発光細菌と大腸菌間でプロトプラスト融合を行うことであり、13株の親株と性質の異なる融合株を新たに取得することができた。当初得られた155株の融合候補株のうち、安定した性質を持つものの数は継代培養により大幅に減少した。この事実からプロトプラスト融合により得られる融合株は一般的には非常に不安定であり、融合により挿入された遺伝子断片は継代培養によって自然淘汰されるか、または表現形質として発現されにくくなる可能性も大きいと推測された。得られた融合候補株155株の中には、発光性を有するものも含まれていたが、最終的に得られた13株の融合株には、発光性を保有しているものは全く存在しなかった。この原因として、上述の可能性に加え、発光遺伝子のような海洋性発光細菌由来の遺伝子を保持できる再生培地や選択培地が選択できなかったのではないだろうか？

今回の融合では、抗生物質耐性などが変化した融合株が確認され、本プロトプラスト融合法は海洋性発光細菌 *S. woodyi* 02HA-5-1株および大腸菌間でも可能であることが示唆された。さらに今回の融合率は過去に報告された値と比較するとかなり低い。²⁶⁻³⁰⁾ その理由として今回使用した供試菌株は異なる属の細菌であるため、その融合率が同属間の細菌同士の融合の時よりも低いことが考えられる。さらに、今回は浸透圧調整剤やPEGの種類、再生培地などについて検討したが、供試菌株については今回使用した検討指標以外にもプロトプラスト膜の安定性などで更なる検討を行い、融合率を向上させる必要があると思われた。

Table 2.1 供試菌株の遺伝子マーカ

	海洋性発光細菌 (<i>Shewanella</i> sp. 02HA-5-1)	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i> 1649 ^T)
抗生物質耐性		
KM	+*	—
SM	+	—
Amp	+	—
RM	+	—
GM	+	—
VM	+	—
CTX	+	—
発光性	+	—
塩分要求性	+	—
温度感受性	低温性	中温菌
酵素感受性	好気性	通気嫌気性

* + 陽性、— 陰性

Table 2.2 海洋性発光細菌生育培地 (HSB)

バクトペプトン (Difco)	2.5 g
バクト酵母エキス (Difco)	1.5 g
人工海水 ⁵¹⁾	1000 ml
pH	7.5

Table 2.3 大腸菌生育培地 (TSB)

バクトカゼイン (Difco)	17.0 g
バクトソイトン (Difco)	3.0 g
グルコース	14 mM
塩化ナトリウム	85 mM
リン酸カリウム	14 mM
蒸留水	1000 ml
pH	7.3

Table 2.4 TE 組成

トリス-塩酸 (pH8.0)	10 mM
EDTA	1 mM
超純水	1000 ml

Table 2.5 *Shewanella* sp. 02HA-5-1株の
16S rDNA増幅に使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
31F	GTCCCGCAACGAGCGCAAC
51F	CAGCMGCCGCGGTAATACG
3LR	TTGCGCTCGTTGCGGGACT
1154R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Table 2.6 PBS-Mg 組成

PBS (-) 組成	
塩化ナトリウム	0.2 M
塩化カリウム	3 mM
リン酸水素ナトリウム	8 mM
リン酸二水素カリウム	1 mM
塩化マグネシウム	0.1 M
超純水	1000 ml

Table 2.7 プレハイブリダイゼーション溶液

20×SSC	1 ml
50×Denhardt' 溶液	1 ml
Denatured salmon DNA	1 mg
ホルムアミド	5 ml
蒸留水	2.9 ml

Table 2.8 ハイブリダイゼーション溶液

20×SSC	1 ml
50×Denhardt' 溶液	1 ml
Denatured salmon DNA	1 mg
ホルムアミド	5 ml
蒸留水	2.9 ml
硫酸デキストラン	0.25 g

Table 2.9 20×SSC 組成

塩化ナトリウム	3 M
クエン酸ナトリウム	0.3 M
蒸留水	1000 ml

Table 2.10 Streptavidin-酵素溶液

Peroxidase-streptavidin溶液	1 μ l
0.5% BSA-PBS (-)溶液	1 ml

Table 2.11 発色基質溶液(TMB)組成

3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン	1 mg
ジメチルスルホキシド(DMSO)	1 ml
クエン酸	0.1 M
リン酸水素ナトリウム	0.2 M
30% 過酸化水素水溶液	2 μ l

Table 2.12 海洋細菌用高張溶液

トリス-塩酸(pH8.0)	15 mM
塩化カルシウム	0.3 M
グリセリン	0.5 M
EDTA	8 mM
人工海水	1000 ml

Table 2.13 大腸菌用高張溶液

トリス-塩酸 (pH8.0)	15 mM
スクロース	0.45 M
EDTA	8 mM
蒸留水	1000 ml

Table 2.14 プロトプラスト用高張溶液

トリス-塩酸 (pH8.0)	15 mM
グリセリン	0.5 M
人工海水	1000 ml

Table 2.15 プロトプラスト再生培地

バクトペプトン (Difco)	2.5 g
バクト酵母エキス (Difco)	1.5 g
グリセリン	0.2 M
寒天	15 g
人工海水	1000 ml
pH	無調整

Table 2.16 各種 PEG 濃度下におけるプロトプラストの融合率、再生率および回収率の変化

	PEG濃度		
	0%	20%	40%
顕微鏡下での融合率(*)	0	80	0
再生培地での再生率(**)	80	7	1
融合株の回収率(***)	0	2×10^{-7}	0

- * 顕微鏡下での融合率=

$$\frac{\text{(複数が繋がり重なっているプロトプラスト数)}}{\text{PEG添加前のプロトプラスト数}} \times 100(\%)$$
- ** 再生培地での再生率=

$$\frac{\text{(再生培地で増殖したコロニーの数)}}{\text{PEG添加前のプロトプラスト数}} \times 100(\%)$$
- *** 融合株の回収率=

$$\frac{\text{(再生後に親株と異なる性質を持つコロニーの数)}}{\text{PEG添加前のプロトプラス数}} \times 100(\%)$$

Table 2.17 供試菌株 *Shewanella* sp. 02HA-5-1株と *Shewanella woodyi* ATCC51908株の生理・生化学性状の比較

性質	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella woodyi</i>
	02HA-5-1株	ATCC51908株
グラム染色*	—	—
コロニー形態	透明	透明
発光性	+	+
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	+	+
O-Fテスト	非分解	非分解
増殖温度範囲	15-27°C	15-27°C
増殖 pH 範囲	3-12	3-12
NaCl耐性	1-6%	1-6%
ゲラチナーゼ活性	+	+
アミラーゼ活性	+	+
リパーゼ活性	—	—
硝酸塩還元活性	—	—
抗生物質耐性		
Amp (25 μg/ml)	+	+
KM (25 μg/ml)	+	+
SM (25 μg/ml)	+	+
VM (25 μg/ml)	+	+
EM (25 μg/ml)	+	+
FN (12 μg/ml)	+	+
PM (25 μg/ml)	+	+
GM (25 μg/ml)	+	+
OM (25 μg/ml)	+	+
CTX (25 μg/ml)	+	+
CEX (25 μg/ml)	+	+
TC (25 μg/ml)	+	+

* + 陽性、- 陰性

Table 2.18 供試菌株 *Shewanella* sp. 02HA-5-1株と *Shewanella woodyi* ATCC51908株の炭水化物の資化性の比較

性質	<i>Shewanella</i> sp. 02HA-5-1株	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC51908株
糖の資化性(1%)		
グルコース	+	+
スクロース	+	+
マルトース	+	+
マンニトール	+	+
ラクトース	+	+
アラビノール	-	-
ソルビトール	+	+
カラクトース	+	+
イノストール	+	+
キシロース	-	-
トレハロース	+	+
グリセリン	+	+
デンプン	+	+
有機酸の資化性(1%)		
乳酸	-	-
シュウ酸	-	-
クエン酸	-	-
コハク酸	-	-
酢酸	-	-
ギ酸	-	+
酒石酸	-	-
ホウ酸	-	-
プロピオン酸	-	-

* + 陽性、- 陰性

Table 2.19 供試菌株と *Shewanella woodyi* ATCC51908株のハイブリダイゼーション

株名	GC含量 (mol%)	フォトビオチン標識DNA株との相同性 (%)	
		<i>S. sp.</i> 02HA-5-1株	<i>S. woodyi</i> ATCC51908株
<i>S. sp.</i> 02HA-5-1株	47.7	100	79.9
<i>S. woodyi</i> ATCC51908株	43.7	77.7	100

Table 2.20 融合株および両親株の生理・生化学性状の比較

性質	親株	融合株													親株
	02HA-5-1	1-1	1-6	1-8	2-25	2-26	2-32	3-5	3-9	3-16	3-18	4-10	4-11	4-12	JCM1649 ^T
グラム染色*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
コロニー形態	T	W	W	W	W	W	T	W	W	T	T	W	W	W	W
カタラーゼテスト	A	F	F	F	F	F	A	F	F	A	A	F	F	F	F
オキシダーゼテスト	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—
発光性	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O-Fテスト	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+
NaCl耐性 (%)	6	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	3	1.5	1.5	3	3	3	3	1.5	1.5
抗生物質耐性 (μ g/ml)															
KM	50	0	25	25	25	25	25	0	25	0	0	12	12	12	0
SM	50	0	25	12	25	12	0	25	12	25	25	12	12	25	0
Amp	50	3	0	3	0	6	25	0	6	12	12	0	0	0	0

*: + 陽性 - 陰性 T 透明 W 白色、半透明 A 好気性 F 通性、嫌気性

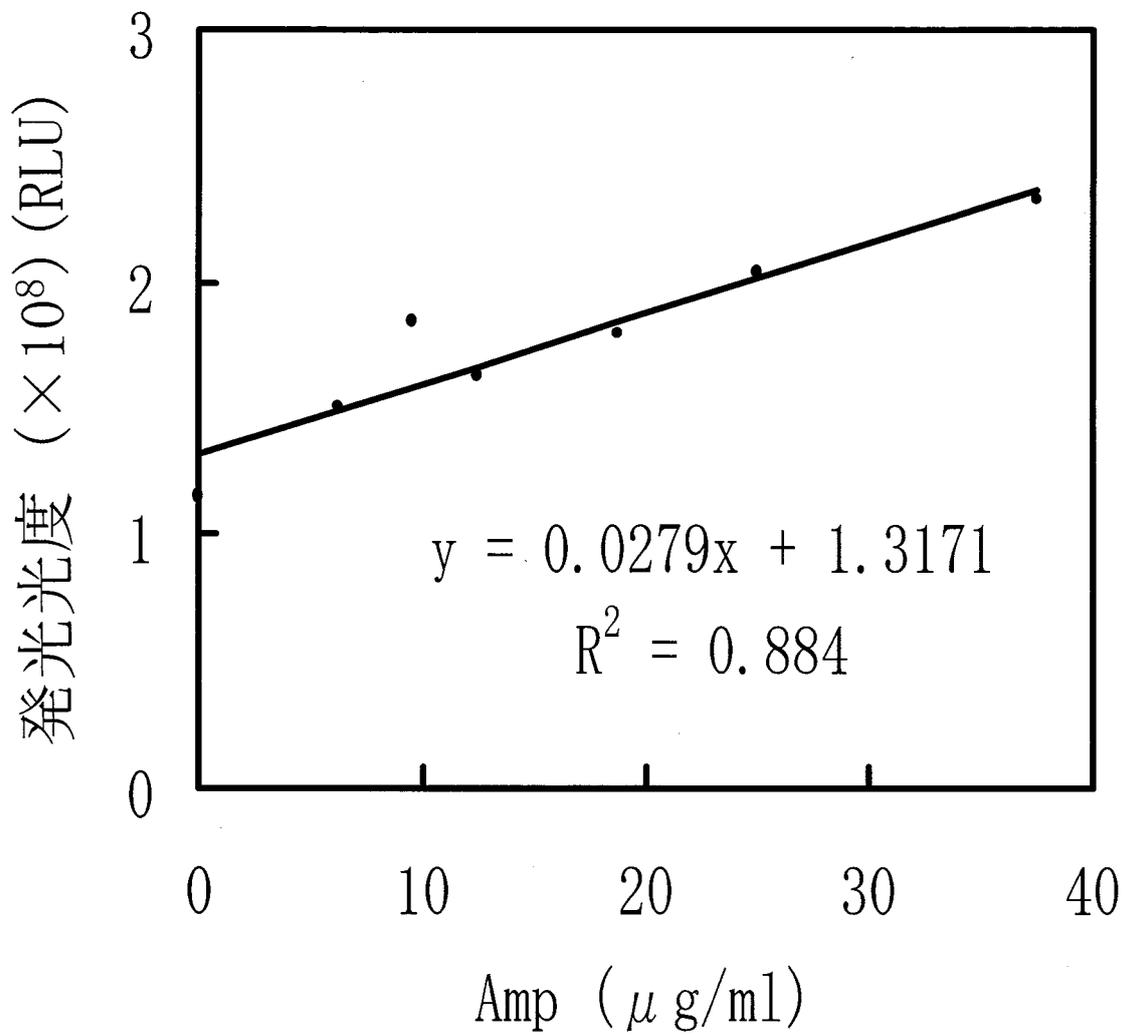


Fig. 2.1 Amp が *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株の発光光度に与える影響

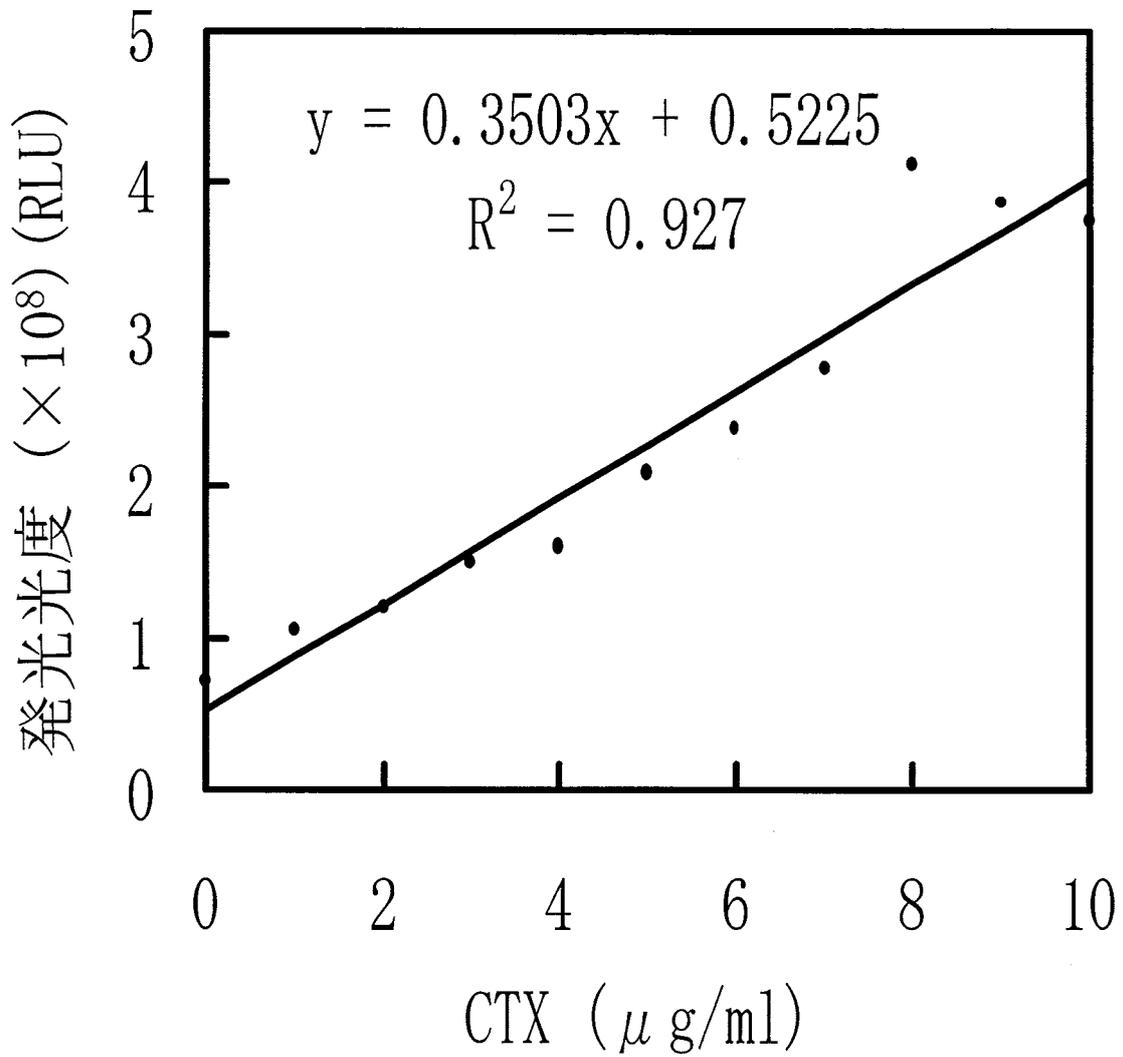


Fig. 2.2 CTX が *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株の発光光度に与える影響

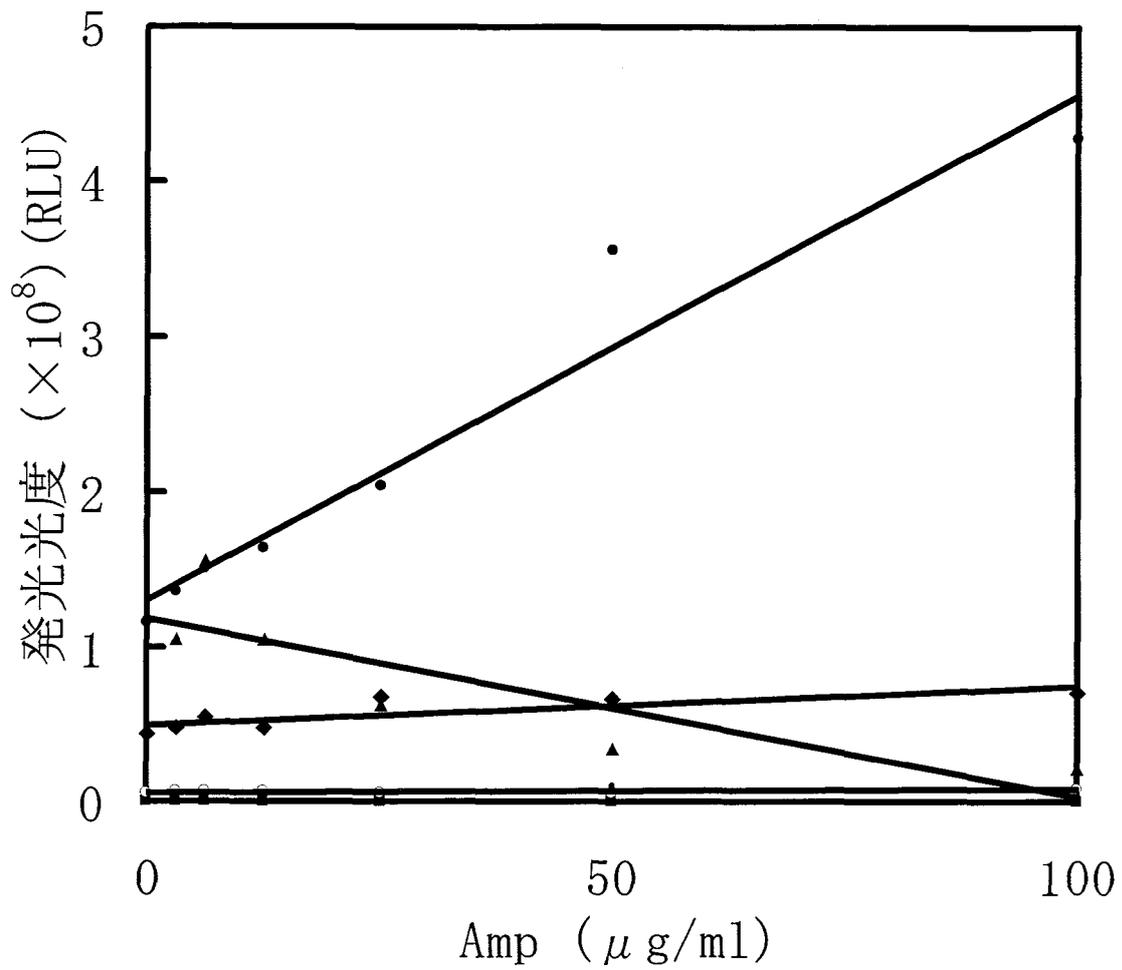


Fig. 2.3 Amp が各種発光細菌の発光光度に与える影響

● *S. sp.* 02HA-5-1 株 ◆ *V. fischeri* 010Q2-1-4 株

■ *V. harveyi* 01AM-5-3-27 株 ▲ *P. leiognathi* 01K0-4-1 株

○ *P. phosphoreum* IF013896 株

GCTGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGATATCTGCCTAGTCGTGGGGGATAACAGT
TGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGGACCTTCGGGCCTTTCG
CGATTAGATGAGTCTAGGTGGGATTAGTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCC
CTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTAACGGTTAATAACCGTTAGC
TGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCCAGAATG
TGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTGGAAGTGGCAAAGTACAGTCTTGTAGAGGG
GGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGC
GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTAACTTAGTTACTGGGCTCCCAA
GCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAC
TCCTTGACATCCCCAGACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGC
TGCATGGCTTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCACGCAACGAGCGCAACCCT
TATCCTTATTTGCCAGCACTTCGGGTGGGAACTTTAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGA
AGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGT
CGGTACAGAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAGAAAGCCGGTCGTAGTCCGGAT
TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCACCAGAAG
TAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCCTAGGGGAACCTGGGGCTGGATCACCTCCTTTCTA

Fig. 2.4 *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株の 16S rRNA 塩基配列

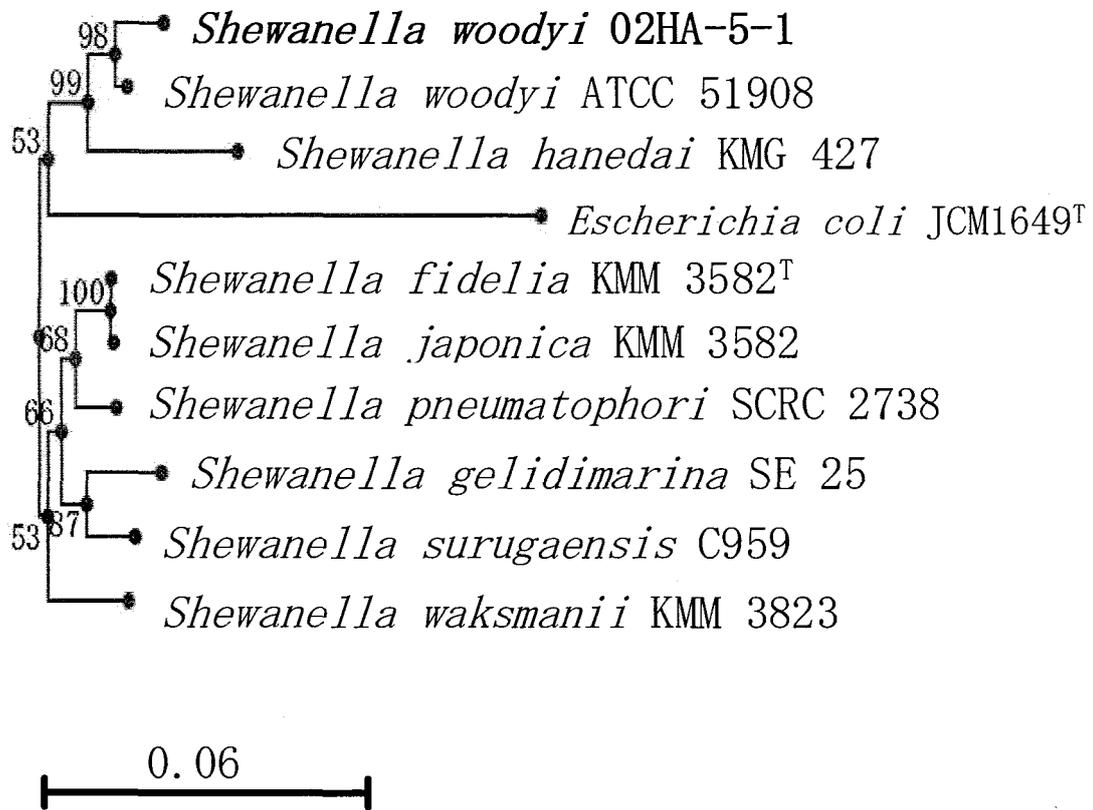


Fig. 2.5 16S rRNA による *Shewanella* sp. 02HA-5-1 株の同定

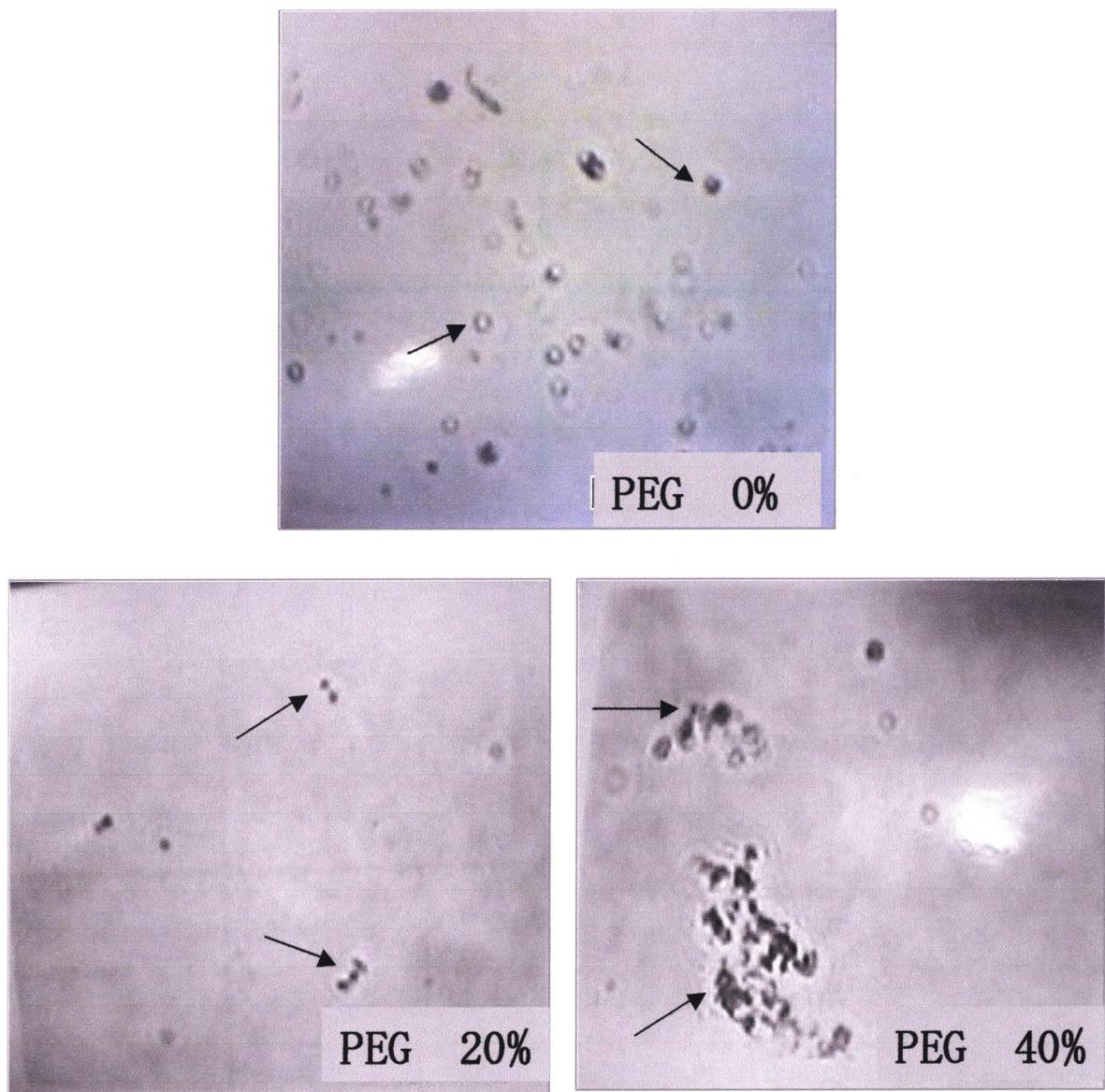


Fig. 2.6 各種 PEG 濃度下におけるプロトプラストの存在状態

第 3 章

海洋性発光細菌の発光遺伝子を標的とした融合株の検出

3.1 緒言

海洋細菌のプロトプラスト融合法を開発するために、第 2 章では海洋細菌のプロトプラスト融合のモデル系を構築した。すなわち、様々な微生物の中から遺伝子マーカーとなる遺伝形質を多数有する海洋性発光細菌 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株および汎用性の高い大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649^T 株をモデル微生物として選択し、これらについてプロトプラストを作成し、融合を行い、融合株の再生を行うための最適条件を検討した。その結果、155 株の融合候補株を取得することに成功した。これらの融合株の中には指標とした抗生物質耐性および塩分要求性などが親株と著しく異なる性質の融合株が数多く得られたが、もう一つの指標である発光能を有する融合株は取得できなかった。この原因としては以下のことが考えられる。一般的に薬剤耐性遺伝子は約 1kb の比較的短い遺伝子であるので遺伝子の組換えが起きやすい。一方、生物が発光するためには、ルシフェラーゼ遺伝子を初め、アルデヒド合成酵素遺伝子など複数の遺伝子を含む約 5.5kb の遺伝子が必要であるため、このサイズの発光遺伝子群が生体内で組換えられた融合株を取得するのは困難であったと考えられる。しかしながら、プロトプラスト融合では複雑に遺伝子が交雑することから、発光遺伝子が部分的に導入される可能性が考えられた。そこで、本章では海洋性発光細菌 *S. woodyi* 02HA-5-1

株の発光遺伝子の塩基配列を決定し、得られた 155 株の融合候補株の中から発光遺伝子断片を有する株を探索し、遺伝学性状の相違から海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラスト融合を確認することを目的とした。

3.2 実験方法

3.2.1 発光遺伝子のクローニング

(1) ユニバーサルプライマーを用いた *lux* 遺伝子のクローニング

Table 3.1に示すユニバーサルプライマー *luxA-F* および *luxA-R* は *Vibrio* sp.、*Photobacterium* sp. および *Shewanella hanedai* などに共通して存在する配列で *luxA* の一部分を増幅することができることが知られていることから、⁵³⁾ 本研究でもこのプライマーを用いてPCR増幅を行った。なお、PCRの反応条件は熱変性が94℃で2分間、続いて94℃で1.5分間、37℃で1.5分間、72℃で2分間のサイクルを5回繰り返した後、アニーリング温度を55℃に設定して25サイクル繰り返し、伸長反応を72℃で行った。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって増幅断片を検出した。

(2) *lux* 遺伝子の部分的クローニング

DDBJのデータベース (DQ322063) の *Shewanella woodyi* ATCC51908株の *luxA* 遺伝子の一部分 (576bp) を参考にプライマー S. w-*luxA-F*-262 および S. w-*luxA-R*-832 (Table 3.1) を構築し、PCR増幅を行い、増幅断片を確認した。なお、PCR増幅の熱変性は94℃で2分間、続いて94℃で1.5分間、55℃で1.5分間、72℃で2分間のサイクルを30回繰り返した後、伸長反応を72℃で行った。

このDNA増幅産物をアガロースゲルから切り出し、Wizard SV GelおよびPCR Clean-Up System(プロメガ)を用いてゲルから精製し、得られたDNAを以後の実験に供した。

精製したPCR産物は制限酵素*Hind* III (タカラバイオ)および*Bam* HI (タカラバイオ)処理を行った。すなわち、 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の精製PCR産物 $10 \mu\text{l}$ に $10\times\text{K}$ バッファ(タカラバイオ) $2 \mu\text{l}$ と*Hind* IIIおよび*Bam* HIをそれぞれ $1 \mu\text{l}$ ずつ添加し、滅菌蒸留水で合計 $20 \mu\text{l}$ に調製した後、 37°C で3時間静置した。なお、プラスミドpUC18/19(プロメガ)についても同一条件で制限酵素処理を行った。

PCR産物およびプラスミドをライゲーションした後、*Escherichia coli* JM109株(プロメガ)のコンピテントセルに形質転換した。なお、ライゲーション反応はTakara DNA Ligation Mixキット(タカラバイオ)を使用した。すなわち、制限酵素処理したプラスミドベクター 50ng およびPCR産物 100fmol を含むDNA溶液 $10 \mu\text{l}$ を混合し、これに $10 \mu\text{l}$ のLigation Mixを添加してよく混合し、 16°C で30分間保温したサンプルを形質転換サンプルとした。また、ケミカルコンピテントセルは塩化カルシウム法⁵⁴⁾を用いて作成した。すなわち、*E. coli* JM109株菌液約 10ml を 500ml 容三角フラスコ中に添加した 50ml のSOB培地 (Table 3.2) に接種し、 18°C で一昼夜激しく攪拌培養した。この大腸菌培養液の濁度(OD_{630})が 0.6 になった時点で培養を停止し、培養液を氷上で10分間冷却した後、低速遠心分離($3,300\times g$ 、10分間、 4°C)した。遠心分離後、上清を除去し、沈殿した大腸菌菌体をTable 3.3に示すTB培地 17ml (0°C)に懸濁し、氷上に10分間放置し、同様に低速遠心分離した。沈殿物中の大腸菌菌体を 0°C に冷却した 4ml のTB培地にかき混ぜながら懸濁した。さらに 0.3ml のDMSOを加え、氷上に10分間静置し、その 0.1ml を試験管に分注し、ドライアイスで冷却したエタノール中でクール

ショック処理した。10分間経過後、これを取り出し、 -80°C で保存した。形質転換は目的のDNA $10\ \mu\text{l}$ を $100\ \mu\text{l}$ のコンピテントセルに添加し、氷上で30分間静置した後、 42°C において45秒間加温処理し、さらに氷上で2分間冷却し、 0.9ml のSOC培地 (Table 3.4)を加え、 37°C で1時間放置し、 $50\ \mu\text{g/ml}$ のAmpと $30\ \mu\text{l}$ の4% X-Galおよび $30\ \mu\text{l}$ の 0.1M IPTGを添加したLB寒天培地 (Table 3.5)に 0.1ml ずつ塗抹後、 37°C で培養した。培養後、X-GalおよびIPTGを添加したプレートから白色のコロニーを釣菌し、プライマーP5およびP3 (Table 3.1)を用いてPCR反応を行った。なお、PCRの反応条件は熱変性が 94°C で2分間、続いて 94°C で1分間、 50°C で1分間、 72°C で2分間のサイクルを30回繰り返し、伸長反応を 72°C で行い、PCR産物はアガロース電気泳動を行いその増幅バンドのサイズから目的クローンのコロニーを確認した。なお、形質転換されていないプラスミドの長さは約 100bp であるのに対し、目的遺伝子断片が挿入されたゲノムサイズは約 700bp になるので、このサイズ付近でバンドが得られたものを目的コロニーとして選択した。

次に、形質転換したコロニーからプラスミドの抽出を行った。なお、目的コロニーをAmp $50\ \mu\text{g/ml}$ を含む 2ml の培地に接種後、 37°C で一晩振盪培養した。この培養液 1ml を遠心管に移し、遠心分離 ($20,600\times g$ 、1分間、 4°C)し、得られた沈殿物を 0.2ml の冷Sol I (Table 3.6)に攪拌しながら溶解し、氷上で15分間静置し、 0.4ml のSol II (Table 3.7)を加え、十分混合させた後、氷上で5分間静置した。その後、 0.3ml の冷Sol III (Table 3.8)を加え、遠心管を氷上で10分間静置し、遠心分離 ($20,600\times g$ 、15分間、 4°C)した。この上清を $2\ \mu\text{l}$ のRNaseA (和光純薬工業)を添加した後、遠心管を 37°C で20分間静置した。このRNaseA処理したプラスミドをフェノール/クロロホルムで2回抽出し、 0.6 倍量2-プロパノールを加え、DNAを沈殿させた後、等量の冷エタノール (70%)で沈殿を洗浄し、 $30\ \mu\text{l}$ の超純水に溶解したものを

P3およびP5プライマー (Table 3.1) を用いてABI PRISM 310 Genetic Analyzerの操作方法に従って塩基配列を解析した。

(3) Inverse PCR法を用いた発光遺伝子のクローニング

S. woodyi 02HA-5-1 株の発光遺伝子の一部分を参考にして増幅した571bpの配列に基づいて *Sac* I を制限酵素として選択し、この酵素の前半の部分から互いに反対側のプライマー *luxA*-F-573 および *luxA*-R-299 を、*Sac* I の後半の部分から互いに反対側のプライマー *luxA*-F-810 および *luxA*-F-740 を作成した (Table 3.1 および Fig. 3.1)。

次に02HA-5-1株のゲノムDNAを抽出し、制限酵素 *Sac* I で処理を行った。すなわち、0.5 μ g/ μ lに調製した02HA-5-1株のDNA 10 μ lに50U/ μ lの *Sac* I μ l、10 \times Lバッファ (タカラバイオ) 2 μ l および超純水を添加して合計20 μ lになるように調製した後、37 $^{\circ}$ Cで一昼夜静置して酵素反応させた。反応後、DNAを70 $^{\circ}$ Cで15分間静置することにより残存酵素活性を失活させた後、フェノール/クロロホルム抽出を2回行い、さらに風乾したDNAに20 μ lの滅菌蒸留水を添加した。

セルフライゲーションはDNA Ligation Kitを用いて行った。すなわち、制限酵素処理したDNA溶液 20 μ lに等量のLigation Mixを添加し、16 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、Wizard SV Gel およびPCR Clean-Up Systemを用いて精製し、最終濃度20 μ g/mlに調製した。なお、プライマー *luxA*-F-573 および *luxA*-R-299を用いて *luxA*より上流域の塩基配列の増幅を行い、*luxA*-F-810 および *luxA*-F-740を用いて *luxA*より下流域の塩基配列の増幅を行った。このPCR反応条件は増幅熱変性が94 $^{\circ}$ Cで2分間、続いて94 $^{\circ}$ Cで1.5分間、55 $^{\circ}$ Cで1.5分間、72 $^{\circ}$ Cで2分間のサイクルを30回繰り返した後、伸長反応を72 $^{\circ}$ Cで行い、さらに電気泳動で増幅断片の検出を行った。電気泳動で確認したDNAバンドをゲルから切り出し、Wizard SV Gel

および PCR Clean-Up System を用いてゲルから精製し、直接目的断片の塩基配列を決定した。この塩基配列に基づき新たなプライマーを構築し、プライマーウォーキング法⁵⁵⁾により全発光遺伝子(*lux*遺伝子)の塩基配列を決定した。なお、プライマーウォーキング法で使用したプライマーは Table 3.1 に示した。

3.2.2 融合株からの発光遺伝子の検出

得られた155株の融合候補株の中から親株の大腸菌の性質を有し、海洋性発光細菌の発光遺伝子断片を有する株を取得するためにNaCl無添加のTSB液体培地を作成し、これを24ウェルタイタープレートに1mlずつ無菌的に分注した。これに融合候補株を各ウェルに植菌し、37°Cにて一昼夜静置培養を行った。培養後、増殖が認められた菌株について、Ezaki *et al.*の方法⁴²⁾に従って全ゲノムDNAを抽出し、0.5 μ g/ μ lに調整した。

抽出した全ゲノムDNAから0.2 μ lを分取してTaKaRa rTaqTMを用いたPCR法により*luxA*遺伝子の増幅を行った。なお、使用したプライマーは*luxA*の一部を増幅することが確認されたプライマーS.w-*luxA*-F-262およびS.w-*luxA*-R-832を使用した。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動を行い、増幅断片を確認した。なお、海洋性発光細菌と大腸菌についても上記の操作を行い、同様に増幅断片を確認した。

プライマーS.w-*luxA*-F-262 および S.w-*luxA*-R-832から増幅した遺伝子断片についてABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kitを用い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerの操作方法に従って塩基配列を解析した。

発光遺伝子の配列を基に、*luxC*からプライマー*luxC*-F-822を、また*luxD*からプライマー*luxD*-F-355を、*luxA*から*luxA*-F-1を、*luxB*からプライマ

一 *luxB*-R-981 を作成した。Table 3.1 および Fig 3.2 に示すように、これら 155 株の融合候補株の中から *luxA* の断片配列が PCR 法によって確認された株について *luxA* の一部分と同一条件で再度 PCR 増幅を行い、発光遺伝子の挿入状況を確認した。

3.2.3 融合株の遺伝子工学的および生理・生化学的性状試験

塩基配列を確認した融合株の *luxA* 遺伝子の塩基配列および 02HA-5-1 株についてデータベース上に登録された塩基配列および発光遺伝子のアミノ酸配列を比較した。また、遺伝子断片が確認された融合株の発光性については TSB 培地を用い 37°C で一昼夜振盪培養した後、発光の有無を確認した。さらに融合株の薬剤耐性試験には KM、SM および Amp をそれぞれ 0~50 μ g/ml 添加した TSB 培地を調製して融合株を一昼夜培養し、その増殖の有無から薬剤耐性を判定した。なお、発光遺伝子の挿入が確認された融合株の 16S rRNA 解析は第 2 章に述べたのと同じ方法で行い、融合株およびその親株のその他の生理・生化学的性状試験は Smibert *et al.* の方法⁴³⁾ に準じて行った。

3.3 結果および考察

3.3.1 発光遺伝子のクローニング

ユニバーサルプライマーを用いた 02HA-5-1 株の発光遺伝子の PCR 増幅を行った結果、増幅バンドが全く確認されなかった。一方、*S. woodyi* ATCC 51908 株の *luxA* の部分の配列に基づき作成したプライマーを用いた PCR では約 600bp (制限酵素部位 20bp を含む) 付近に増幅バンドが検出された。この PCR バンドの塩基配列の解析を行い、ATCC 51908 株の 576bp の遺伝子断片

と配列を比較した。その結果、591bpの塩基配列が明らかになり、ATCC 51908株と7箇所に見られたが、塩基配列に基づくアミノ酸の配列は完全に一致し、本バンドが02HA-5-1株の*luxA* 遺伝子の一部分であることが明らかになった (Fig. 3.1)。さらに02HA-5-1株についてInverse PCR法を用いた未知領域のクローニングを行った結果、*luxA* 遺伝子の5'側の領域から約3kb、また3'側の領域からは約4kbのPCR増幅バンドを得ることができた。これらの増幅バンドの塩基配列およびアミノ酸配列をDDBJのデータベースに登録されている他の微生物の発光遺伝子の塩基配列と比較した結果、Fig. 3.3~7に示すように*luxC* の1440bp、*luxD* の918bp、*luxA* の1071bp、*luxB* の981bpおよび*luxE* の1146bpを含む合計5.7kbの完全長の発光遺伝子配列を含んでいることがわかった (登録番号: DDBJ AB368544)。この発光遺伝子の配列を他の生物の発光遺伝子の塩基配列と比較した結果、最も相同性が高かったのは*S. hanedai* であったが、その塩基配列の相同性はそれぞれ*luxC* で73.5%、*luxD* で65.8%、*luxA* で79.2%、*luxB* で72.4%および*luxE* で77.2%の相同性しか見られなかった。また、アミノ酸配列を比較した結果、それぞれ*luxC* で75.7%、*luxD* で77.7%、*luxA* で88.5%、*luxB* で73.0%および*luxE* で78.4%の相同性しか見られなかった。この結果から明らかのように塩基配列およびアミノ酸配列はいずれも*luxA* で最も高い相同性が見られた。なお、*S. woodyi* については*luxA* の一部分の配列である576bpの配列しか公表データがないことから、本クローニングは*S. woodyi* の初めての完全長発光遺伝子のクローニングデータとなる。

3.3.2 融合株からの *luxA* 断片の検出

融合候補株合計 155 株のうち、大腸菌の増殖培地である TSB 培地で増殖した菌株は 135 株であった。これらの 135 株を標的に全ゲノム DNA 抽

出を行い、アガロースゲル電気泳動でバンドの確認を行った結果、すべての株に DNA バンドが確認された。そしてデータベース上に掲載されている DQ322063 の *S. woodyi* ATCC 51908 株の *luxA* 遺伝子の一部分を参考に構築したプライマーを用い、抽出されたゲノム DNA について PCR 増幅を行った。その結果、供試 5 株に親株の 02HA-5-1 株と同様に 591bp 付近のバンドが増幅された。なお、もう片方の親株である大腸菌では同一位置付近には増幅バンドは確認されなかった (Fig. 3.8(A))。このバンドを抽出した後プラスミドベクターに連結し、塩基配列の解析を行った結果、02HA-5-1 株と同一配列であることが確認された。

3.3.3 融合株に挿入された発光遺伝子

クローニングした 5.5kb の発光遺伝子を参考に作成したプライマー (Fig. 3.2) を用いて *luxA* の断片が確認された 5 株の融合株のゲノムについて PCR 増幅を行った。その結果、6-12 株および 6-13 株ではプライマー S.w-*luxA*-F-262 および *luxB*-R-981 が 02HA-5-1 株と同様に 1978bp 付近に増幅バンドが見られた。しかしながら、その他の 3 株の融合株は本プライマーでは増幅バンドは見られなかった。さらに、その他のプライマーでは 02HA-5-1 株以外はいずれの融合株でも増幅バンドは見られなかった (Fig. 3.8(B-E))。この結果から融合候補株 6-12 株および 6-13 株はプロトプラスト融合により発光遺伝子の *luxA* の一部分および完全長の *luxB* 遺伝子の生体内の組換えが起こったことが明らかになった。しかしながら、その他の 3 株の融合株は *luxA* の一部分の配列しか生体内の組換えが起こらなかった。これは海洋性発光細菌と大腸菌のプロトプラスト融合により海洋性発光細菌の発光遺伝子の一部断片が大腸菌に形質転換されたことを示唆している。さらに 5 株に異なった部分の断片

が検出されたことはプロトプラスト融合により必ずしも同一箇所では遺伝子組換えが起こるのではなく、ランダムに融合が起こるためと考えられた。

3.3.4 16S rRNA 解析および生理・生化学的性状の比較

得られた5株の融合株について16S rRNA解析を行った結果、その配列は親株である大腸菌と全く同一であった。また、その生理・生化学的性状を両親株と比較した結果をTable 3.9に示した。この表から明らかのようにこれらの5株の融合株は生理・生化学的性状も大腸菌と非常に近いことがわかった。

本研究では海洋性発光細菌 *S. woodyi* 02HA-5-1株の全発光遺伝子配列を明らかにした。そして、海洋性発光細菌および大腸菌間のプロトプラスト融合により得られた155株の融合候補株の中から *luxA* 遺伝子を有する融合株を5株取得することができた。なお、この5株の融合株については発光遺伝子のすべてが完全に挿入されていなかったことが判明したが、生理・生化学的性状は大腸菌と全く同一であった。また、これらの5株の *luxA* の遺伝子断片は02HA-5-1株と完全に一致したことから、この遺伝子は親株である海洋性発光細菌由来であると推測された。また、発光遺伝子の断片が挿入された5株の融合株について詳しい挿入状況を調べた結果、いずれも *luxA* 遺伝子の一部分は共通に確認されたものの、その他の発光遺伝子の部分については2株でしか確認できなかった。この原因として *S. woodyi* 02HA-5-1株の *luxA* 遺伝子は *S. hanedai* の *luxA* 遺伝子部分と高い相同性を有することから安定した保存領域である可能性が高く、融合を通して形質転換した後でも細菌の自己溶菌酵素などの影響を受けることなく、融合後も保存されていた可能性が高いと考えられた。しかしながら、発光遺伝

子増幅バンドの塩基配列解析では元の発光細菌と変異が見られなかったため、遺伝子の水平伝播は起こっているものの、遺伝子配列での変異はなかったと思われた。

このように海洋細菌および大腸菌間でもプロトプラスト融合が起こることが遺伝子工学手法を用いて確認することができた。今後この融合方法を用いて海洋環境から新規微生物を取得することも可能であると思われた。

Table 3.1 本実験で使用したプライマーの塩基配列

プライマー	配列 (5'-3')
ユニバーサルプライマー ⁵³⁾	
<i>lux</i> -F	ACACAAGCTTCTACTGGATCAAATGTCAAAAGGACG
<i>lux</i> -R	AAAAGGATCCTCAGAACCGTTTGCTTCAAAACC
<i>Shewanella woodyi</i> プライマー	
S. w- <i>luxA</i> -F-262	ACACAAGCTTGAAGATCTCTTATTACTGGATCAGC
S. w- <i>luxA</i> -R-832	AAAAGGATCCCTCGCCATTGGCCTTTGTGGTAG
プラスミドpUC18/19のMCS増幅プライマー	
P5	CAGGAAACAGCTATGAC
P3	CCAGTCACGACGTTGTA
Inverse PCR プライマー	
<i>luxA</i> -F-573	CAGTTGGATCATCCCAAC
<i>luxA</i> -R-299	CGACCTTTAGAAAAGTTGATCC
<i>luxA</i> -F-810	CTACCACAAAAGGCCAATGGCGAG
<i>luxA</i> -F-740	GTATGCCGTGCCTTCCTAAC
プライマーウォーキング法で使用したプライマー	
<i>luxC</i> -R-431	GTAAGTGAACGCTTCTCC
<i>luxC</i> -R-997	GCACTCCTTGTCAGTAAG
<i>luxC</i> -F-1364	CAACCAAAGATGTCGCTGTC
<i>luxB</i> -F-164	GTGCACCAATCACTGCAG
<i>luxB</i> -F-497	GTGAGAATGGACCTGAAC
<i>luxB</i> -F-939	CATTGATATGGTTAACCA
<i>luxE</i> -F-300	GTACACAAGTAGCGGTAC
<i>luxE</i> -F-658	CGTATTGAGCTAAATGCAGG
<i>luxE</i> -F-1020	GGCACCTGATCTATATCC
発光遺伝子挿入状況確認プライマー	
<i>luxB</i> -R-981	AAAAGGATCCGATCGTCAATTTCTGAACTTGC
<i>luxA</i> -F-1	ACACAAGCTTCAGTCAGTAACAAAGGCCG
<i>luxD</i> -F-355	GCCAGAATAGCCTATGATGTCG
<i>luxC</i> -F-822	GGTCGCTCATGATATTTG

Table 3.2 SOB培地の組成

バクトトリペプトン(Difco)	20.0 g
バクト酵母エキス(Difco)	5.0 g
塩化ナトリウム	10 mM
塩化カリウム	2.5 mM
蒸留水	1000 ml
pH	無調整

Table 3.3 TB培地の組成

PIPES	3.0 g
塩化カルシウム	0.2 M
塩化カリウム	0.25 M
塩化マグネシウム	0.1 M
蒸留水	1000 ml
pH	6.7

Table 3.4 SOC培地の組成

バクト酵母エキス (Difco)	5.0 g
塩化ナトリウム	10 mM
塩化カリウム	2.5 mM
グルコース	20 mM
蒸留水	1000 ml
pH	7.5

Table 3.5 LB寒天培地の組成

バクト酵母エキス (Difco)	5.0 g
トリプトン(Difco)	10.0 g
塩化ナトリウム	85 mM
グルコース	20 mM
寒天	15.0 g
蒸留水	1000 ml
pH	7.0

Table 3.6 Sol I の組成

トリス/塩酸 (pH 8.0)	25 mM
EDTA	0.1 M
グルコース	50 mM
超純水	1000 ml

Table 3.7 Sol II の組成

水酸化ナトリウム	0.2 M
SDS	35 mM
超純水	1000 ml
pH	無調整

Table 3.8 Sol III の組成

酢酸カリウム	3 M
酢酸	2 M
超純水	1000 ml
pH	無調整

Table 3.9 *luxA* 断片を含む融合株と両親株の生理・生化学性質

性質	親株		融合株				親株
	02HA-5-1	2-47	5-18	6-12	6-13	6-24	JCM1649 ^T
グラム染色*	—	—	—	—	—	—	—
コロニー形	T	W	W	W	W	W	W
カタラーゼテスト	A	F	F	F	F	F	F
オキシダーゼテスト	+	—	—	—	—	—	—
発光性	+	—	—	—	—	—	—
O-Fテスト	—	+	+	+	+	+	+
NaCl耐性 (%)	6.0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
抗生物質耐性 (μ g/ml)							
KM	50	0	0	0	0	0	0
SM	50	0	0	0	0	0	0
Amp	50	0	0	0	0	0	0

* + 陽性、— 陰性； T 透明、W 白色、半透明； A 好気性、F 通性、嫌気性

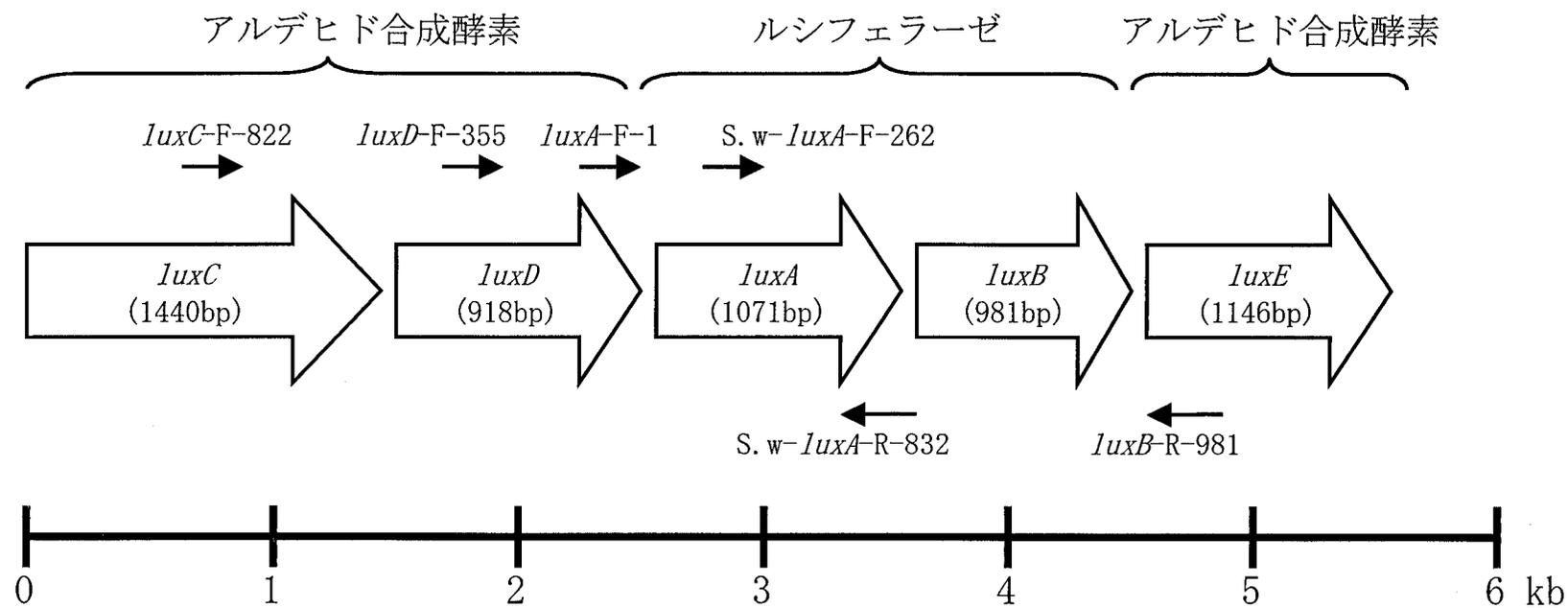


Fig. 3.2 クローニングした発光遺伝子およびプライマーの位置

ATGAAGAAATATATTCCTATGATAATTGGCGGTGTGATCCAAGAAGAGAAACTAGAAAAATAATAGAGAGCTGA
CGTTAAGCAGTGACAATAAGGTTTCGCTGCCTATTCTTGACAAGGTTCTTGCCGAAAAAGTCGTTGCACACAC
TATAGATAATAAATTAACCCTGAATAAAATTGTTAACTTCCTATATACCGTTGGGCAGCGCTGGAAAAGTGAG
GAGTACGCACGACGTCGCACTTATATCCGAGACTTACAAAACCTTTCTTGATACTCGAGTGAGATGGCTAAAT
TAGAAGCCAATTGGATTGCGATGTTGTTATGTTCCAAAAGTGCTCTATATGACATTGTAAGCAATGATTTAAG
CTCACAACATATTATTGACGAGTGGCTTCCACAAGGAGACTGCTATGTAAAAGCACTCCCCAAAGGGAGAAGC
GTTCACTTACTTGCTGGTAATGTTCCCTTTATCGGGTATCACCTCAATTCTTAGGGCAATTCTAACTAAGAATG
AATGCGTGATTA AACCTCTTCAACCGACCCCTTTACAGCAACAGCCTTAGTTTCAAGTTTTATTGATGTAGA
TTCAGAGCACACTATCACTCGATCAATGTCAGTGATGATTGGTCTCACAATGAAGAGATCTCATTGCCATTG
AAAATTATGAACAGTGCCGATGTTGTTATCGCTTGGGGAGGAGATGATGCCATTAAGTGGGCGATAAAACACA
CTCCGCCCCATGCAAATATCTTAAAGTTCCGGCCCTAAAAAAGCCTTACTGTTATCGACAACCCTAAAGATTT
GACTGCAGCTGCTATAGGGGTCGCTCATGATATTTGTTTTTATGATCAACAAGCCTGCTTCTCCACACAAAAGC
GTTTATTACATAGGTGAACAGCTAACTTCATTTATTCATGAACTCGAAAAACAGTTAACTATCTATTCAAAAA
TATTGCCTAAGGGAACCTCAGAATTTTGATGAAAAAGCAGCGTTCAGTCTTACTGACAAGGAGTGCTTATTTTC
TGGATTCCAAGTTAGTAAAGGAGAAAACCAAAGCTGGTTGATCATAAATTCTTCTCTAAATAACGTTGGCAAT
CAACCTCTCTCTCGCTCTGTATACATTCATCAAGCTATTGATATCAAAGAAGTACTTCCTTTTATCAATAAAG
GAGCAACACAGACAGTGTCAATATTCCCTTGAAAATCTTCATTTAAATACAGAGACCAACTCGCTGAGCATGG
TGCTGAACGTATTGTGCAATCAGGCATGAACAACATTTTTTCGCGTTGGAGGCTCCCATGACGGTATGCGACCT
CTTCAGCATTTAGTGA ACTACATATCCCAAGAGAGGCCCTCAAGTTATACAACCAAAGATGTCGCTGTCGAAA
TAGAACAAACCCGCTATTTAGAGAAGACAAGTTTCTCGTCTTCGTCCCTTAA

Fig. 3.3 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の *luxC* 遺
伝子配列

ATGACTAATGAAGATACTTTCTCAACCGTTGATCATGTTATCAAACCTAGAGAAAGGTAAAACGATTCGAGTTT
GGGAGACTTTCCAAAAGATAACTCCTTAGTGAAAAATAACACCATTCTGATTGCATCAGGCTTGCCAGAAG
AATGGATCACTTTGCAGGGCTAGCTGAGTACCTATCATCTAATGGCTTCCATGTAATTCGTTATGATTCTCTT
CATCACGTAGGCTTAAGCAGCGGTAATATAAATGAATTCTCAATGACAATCGGAAAAAAAAAGTTTACTCACTG
TTATTGAATGGCTTAAAGGTCGACACATAAATAAGTTAGGTCTAATCGCAGCAAGTTTATCGGCCAGAATAGC
CTATGATGTCGCCAACGAAATTGACCTCTCTTTCTTAGTTACTGCCGTTGGTGTAGTGAACCTACGTGACACC
TTAGAGAGAGCCCTTAAATATGATTACCTGCAACTCCCAATTGAAGACCTCCCCGAAGATCTTGACTTCGAAG
GGCATAATTTAGGCTCAGAGATATTTGTGACTGACTGCTTTAAACATCACTGGGATACCTTCAACTCAACCAA
GAATAAAATGAAAGACTTAAACATTCCCTTCATTGCCTTCACTGCCAATGATGACTCCTGGGTAAACAAAAT
GAAGTATTGGAATTAATAGAAAAGTTTGAACCCTGAGAAATGCAAACCTGTATTCATTAATTGGAAGTTCACATG
ACTTAGGTGAAAACCTGGTTGTTTTAAGAACTTTTATCAGTCAGTAACAAAGGCCGCAATCGCTTTAGACAA
AGGTAGCCTAAATCTTGACATTAATATTATCGAACCAAAATTTGAAGATATAACTAGCGTTACCGTTAAAGAA
CGAAGGTAAACATAATATTGAATCTCTTGAGTTGGCTTAA

Fig. 3.4 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の *luxD* 遺
伝子配列

ATGAAGTTCGGAAATATTTGTTTTTCATACCAGCCACCAGGTGAAACTCATAAACAGGTCATGGATCGTTTTA
TCAAATTAGGTGTTGCATCTGAGAAGCTTGGCTTTAATACCTATTGGACCCTTGAACACCATTTACTGAATT
TGGTCTAACAGGAAACCTTTTTGTGCTGCAGCAAACCTACTAGGTAGGACAAAAACCTTAAATATTGGAACC
ATGGGAGTTGTGCTCCCAACGGCCCACCAACACGTCAACTAGAAGATCTCTTATTACTGGATCAACTTTCTA
AAGGTCGTTTTAACTTTGGGGTTGTTTCGTGGCTTGTACCATAAAGACTTTAGAGTGTTCCGGTGTCAATATGGA
GGAGTCAAGGAGCATCACACAAAATTTCCATGAGATGATTATGGAAGGAACACAAACAGGGAGAATCGGCTCA
GATAGTGAACACATTGAGTTTCCAGAGGTCGAGGTTTATCCCCTGCTTATTCTAGTGAAATTGCAACCTGCA
TGACCGCTGAATCAGCAAGCACAACCGAATGGTTAGCCAAAAAGGGTCTGCCAATGGTACTCAGTTGGATCAT
CCCAACCAATGAGAAAAAAGCCCAGATGGAGCTCTACAATGAGATAGCACTCGAACATGGTCATGATATAAGC
AAAATTGATCACTGCATGACCTTTATATGCTCAGTCGATCACGATAAAACAAAAAGCACGGGAGGTATGCCGTG
CCTTCCTAACCAATTGGTATGACTCATATGTTAATGCCACCAATATATTTAATGACAGTAATCAAACCTCGTGG
CTACGACTACCACAAAGGCCAATGGCGAGACTTTGTTTTAAAAGGTCATACAAACACAAACAGACGTGTCGAT
TATAGCCATGAAATTAACCCTGTAGGCACACCTGAGGAGTGCATCGAAATTATTCAACGCGATATCGATGCCA
CAGGTATTACTAATATAACGTGTGGCTTTGAGGCAAATGGCAGTGAGGATGAAATTGTCGCCTCTATGGAACG
TTTTATGACACTCGTCGCTCCTTTTTTAAAAGAGCCTAATAACGGTTAA

Fig. 3.5 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の *luxA* 遺
伝子配列

ATGAAATTTGGATTGTTTTTCTCAATATTCAAGTTGATGAGTCTAGCGCAGAAGAAACCTTAGATAATATGG
TAAAACTGTAACACTTATTGATTCTGATGAATATTATTTTGATAAAGTCCTCATTAAATGAACATCACTTCTC
TAAAAACGGCATTATTGGTGCACCAATCACTGCAGCAGGCTTCCTACTAGGATTGACCAATAAATTACATATA
GGATCACTAAATCAGATAATTACGACTCATCACCCAGTACGTATAGCAGAGGAAGCTAGCTTACTCGATCAGA
TGTCTGAAGGGCGCTTCATTCTTGGTTTTAGCGACAGTGAAAAACAAGTTTGAGATGGCTTTCTTTAAACGCCA
ACTATCCTCTCAACAGCAGCAGTTTGAAGCCTGCTACGACATTATCAATGATGCGCTAACAAACAGGCTTTTGC
CATCCACAAAATGACTTTTACGACTTTCCTAAAGTTTCAATCAACCCACACTGCGTTAGTGAGAATGGACCTG
AACAGTATGTGCTAGCAAGCAGTAAAGAGGTTGTAACATGGGCAGCAAAAAGAGCGTTACCTTTAACCTTTAA
ATGGGAGGACTCTCTTGCAGACAAAAGAGCGCTACGCCAACCTATATAATGAAACAGCCAAGCTTTTCAATGTT
GATGTATCAAATGTTAACCACCAGCTCACACTTATCGCTAACTTAAACGACGATGGAGATATCGCTCGTCAAG
AGGTCAGACAGTACCTAAAGAGTTATATTACGGAAAGATACCCTGATATTGATCATGCTGAAAAAATTAATAC
GATCATAGAGGAAAATGCCATCGGCACTAATGATGATTACTATGAGTCGAGTATATTAGCTATTGACAAGACA
GGTGCAAAAACCATTTTGTCTCATTGGAATCAATGAGAGACCAAAAATAAGGTTAAAAATATCATTGATATGG
TTAACCAGAAAATCTTCAAGAACCTTAATTAA

Fig. 3.6 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の *luxB* 遺
伝子配列

ATGGCTATTCTAAAACCCATTGAAAAATGCGATATCATTGCAAGTTCAGAAATTGACGATCTTATTTAATGA
GTTCCCCACAAGAGTGGACATTTGAAGAACAAAATGAGATCCAAGATAGGCTTGTTAGAGAATCATTGATTA
CCATTACAATAGAAATGAAGATTATAGACAGTACTGTATCACTCAACATATTAACGAAAACATTCTTTCCATT
GATGATATCCCAGTATATCCAACATCGGTGTTTAAACACTTAAGACTACACACAGCTAATGAATCCGAAATTG
AAAATTGGTACACAAGTAGCGGTACTAGCGGTGTA AAAAGTCATATCGCCCGTGATAGGCTGAGTATCGAAAG
GTTACTTGGCTCAGTCAACTTTGGAATGAAGTATGTTGGTGATTGGTTCGATCATCAAATGGAGTTAGTCAAT
CTTGGACCAGATCGCTTCAACACAAAATAATGTTTGGTTTAAATATGTTATGAGTTTGGTTGAGTTGCTTTATC
CAACTGAATTTACAGTAGATGACGACCAAATTGACTTTAAAAAAACCGTACATAGTCTATTTTCGCATTCACAG
CACAACCAAAGATATTTGCTTAATTGGCCCCCTTATTTTCATCTTTCTTTTATGCCAATATATGAAAGAAAGT
CGTATTGAGCTAAATGCAGGAACTCGGCTACATATCATCACTGGCGGGGGCTGGAAATCCAATCAAAGTGAAT
CGTTAAACCGTCATGATTTCAATCAAATGCTAATGGGGACTTTTCACCTAGCAAATGAAAATCAAATACGTGA
CACTTTTAACCAAGTTGAATTA AACACCTGTTTTTTTTGAAGACAAATTTCAAAGAAAACATGTTCCCCCTGG
GTTTATGCCCGCGCTCTCGATCCCGTAACATTAAGCCCGTTCCAGAGGGAGAGCAAGGATTACTCAGCTATA
TGGATGCATCCTCTACTGGCTATCCAGCTTTCATTATCACTGACGATATCGGAACTGTTACCACATAAAGGC
ACCTGATCTATATCCAGGAACAACAATTGAAATAATACGAAGATTAAGCACTCGAGCACAAAAAGGGTGTGCA
CTCTCTATGTCCAATTCAATAAAAAGGCAAAGCGACATTAAGGATGGATGTA

Fig. 3.7 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の *luxE* 遺伝子配列

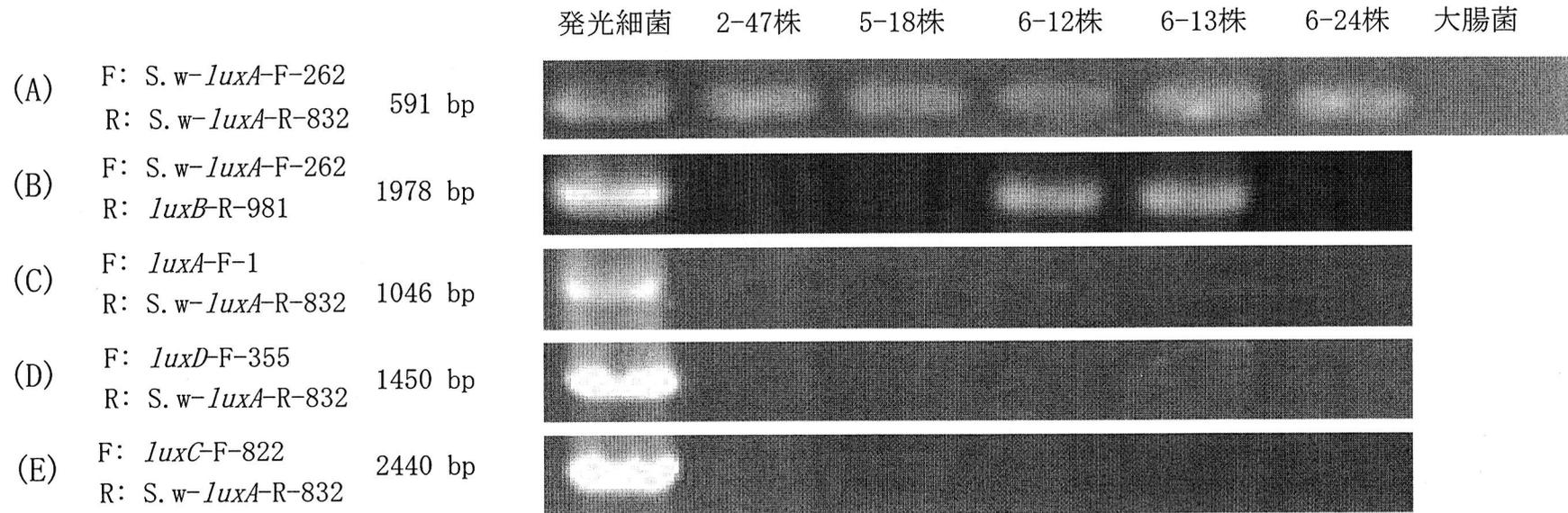


Fig. 3.8 融合株5株の発光遺伝子遺伝子の挿入状況

第 4 章

細胞膜の脂肪酸組成に着目したプロトプラスト融合

4.1 緒言

海洋細菌についてのプロトプラスト融合法を開発するために、これまで海洋性発光細菌 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株および大腸菌 *Escherichia coli* JCM1649^T 株についてプロトプラスト融合法のモデル系の構築を行い、融合株を取得してきた。その結果、155 株の融合候補株が得られ、それらの株は両親株の性質を共有することが確認された。しかしながら、従来報告されているプロトプラストの融合率を見ると、タバコ葉肉プロトプラスト融合⁵⁶⁾では 3%、放線菌 *Streptomyces antibioticus* および *S. fradiae* のプロトプラスト融合⁵⁷⁾では 2.7%、細菌 *Bacillus subtilis* および *B. megaterium* の間でも 0.012%の融合率を得ている⁵⁸⁾のに対し、今回得られた融合率は $2 \times 10^{-7}\%$ と従来の報告よりはるかに低い値であった。プロトプラスト融合の融合率が高い方が様々な融合株が取得できることから、この融合率をさらに向上させる必要があると考えられる。プロトプラスト融合にはプロトプラストの形成、融合、および再生の 3 段階の操作を詳細に検討することが必要であり、様々な条件検討がこれまで行われてきた。⁵⁹⁻⁶⁰⁾ プロトプラストを効率よく形成させるためには、溶菌処理に用いられるリゾチームの濃度や反応時間および融合の際に添加される各種 PEG と浸透圧調整剤の検討などが有効であることが知られている。しかしながら、プロトプラスト融合は供試

微生物によりプロトプラストの形成、融合および再生のための条件が大きく変動することがあり、汎用性のある方法というものは存在しない。その点においては他の多くの遺伝子工学的手法には劣るものの、プロトプラスト融合では、予測しなかった機能を発現する融合株の取得が期待できるという魅力がある。⁶¹⁾ これまで述べたように海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラストの調製、融合、およびその再生の諸条件を検討したが、プロトプラストがバーストしないようにすることはどの場合でも重要な課題であった。そこで本章ではプロトプラストの安定性に注目し、融合率の更なる上昇目的とした。

プロトプラストの安定性は微生物の細胞膜の組成と密接な関係があることが知られている。⁶²⁾ 微生物の細胞膜は主にリン脂質とタンパク質から構成されているが、この中のリン脂質を構成する脂肪酸の種類は細胞膜の強度や柔軟性に直接影響する。リン脂質はグリセロールに2つの脂肪酸とリン酸化合物がエステル結合している。脂肪酸には飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が存在するが、このうち、飽和脂肪酸は細胞膜の強度に、また不飽和脂肪酸は細胞膜の柔軟性に関係していることが知られていることから、⁶³⁾ 細胞膜の安定性は細胞膜の脂肪酸組成を変更することにより変化するものと思われる。これまでに、脂肪酸を添加して微生物を培養することにより細胞膜の脂肪酸組成が変化することが知られているが、⁶⁴⁻⁶⁶⁾ 細胞膜の脂肪酸組成と融合率の関係を明らかにした報告は現在のところみられない。

そこで本章では、供試菌の細胞膜の脂肪酸組成に着目し、融合率を向上させるために添加する脂肪酸を種々検討し、その最適融合率が得られる条件を見いだすことを目的とした。

4.2 実験方法

4.2.1 脂肪酸添加培地

飽和脂肪酸としてオクタン酸 (C8:0) (和光純薬工業)、デカン酸 (C10:0) (関東化学株式会社) およびパルミチン酸 (C16:0) (和光純薬工業)、また一価不飽和脂肪酸として、オレイン酸 (C18:1) (東京化成工業) を用いた。さらに、多価不飽和脂肪酸として、リノール酸 (C18:2) (和光純薬工業)、リノレン酸 (C18:3) (和光純薬工業)、エイコサペンタエン酸 (C20:5) (EPA) (和光純薬工業) およびドコサヘキサエン酸 (C22:6) (DHA) (和光純薬工業) をそれぞれ用いた。これらの脂肪酸を増殖培地にそれぞれ終濃度 1mg/ml になるように添加した培地を作成した。

4.2.2 供試菌株のプロトプラストの形成およびその安定性の評価

海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラストの作成は第2章で述べた方法に従って行った。プロトプラストの形成を位相差顕微鏡下で確認した後、海洋性発光細菌については海洋細菌用高張溶液 (Table 2.12) を用いて終濃度が 1×10^9 /ml になるように希釈し、その 1ml を 10 分間遠心分離 (0, 2, 200, 5, 000, 8, 900, 20, 100 \times g) を行った後、さらに海洋細菌用高張溶液でプロトプラストを段階希釈し、再生培地に塗抹し、20°C でプロトプラストをコロニーとして再生させ、その再生率を算出した。大腸菌についても同様に遠心分離を行い、大腸菌用高張溶液 (Table 2.13) で段階希釈し、再生培地に塗抹した後、27°C でプロトプラストの再生を行い、同様に再生率を算出した。

4.2.3 海洋性発光細菌および大腸菌の培養および発光光度の測定

海洋性発光細菌をバツフル付きの 100ml 容三角フラスコ(発光培地 20ml を添加)に一白金耳接種後(事前に -80°C のフリーザから HSB 培地に接種し、肉眼的に発光が明瞭に確認できるコロニーを使用)、 20°C において一昼夜往復振盪培養(40 回/分)し、その濁度(OD_{630})が 0.8 になるまで培養した後、その種菌 $100\ \mu\text{l}$ を新たに調製した HSB 培地(脂肪酸 $1\text{mg}/\text{ml}$ 添加)に接種し、同様に一昼夜往復振盪培養した。

大腸菌は同様に 20ml の TSB 培地に植菌し、 37°C で一昼夜回転振盪培養(160rpm)した。この前培養液 $100\ \mu\text{l}$ を各種脂肪酸 $1\text{mg}/\text{ml}$ を添加した TSB 培地に接種し、 27°C で約 12 時間培養し、対数増殖期に達したものを本実験に使用した。なお、海洋性発光細菌の発光光度および増殖量の測定は第 2 章に述べた方法に準じて行った。

なお、海洋性発光細菌のプロトプラストの安定性評価を行った結果、安定性が低下した脂肪酸については終濃度 $0\sim 16\text{mg}/\text{ml}$ になるように HSB 培地に添加し、一昼夜往復振盪培養した培養液の濁度(OD_{630})を測定し、脂肪酸が増殖に与える影響を調べた。

4.2.4 細胞膜構成脂肪酸の分析

脂肪酸を添加して培養した培養液 10ml について遠心分離($3,300\times g$ 、5 分間)したものに 1ml の人工海水⁵²⁾を加えて菌体を懸濁した。この菌体から Bligh-Dyer 法⁶⁷⁾により菌体脂質を抽出した。すなわち、5%の塩酸メタノール(東京化成工業株式会社) 2.0ml を加え、ブロックヒーターにて 100°C で 3 時間加熱し、メチルエステル化を行った。その後、10 分間静置し、室温まで冷ました。これにヘキサン 2.0ml を加え攪拌し、遠心分離($2,500\times g$ 、15 分間)して上層を回収した。このヘキサンによる抽出を 2 回繰り返す、上層を合わせた。ヘキサンを窒素気流下にて脱溶媒

を行い、これに脱水メタノール(和光純薬工業)100 μ l を加え、抽出物を溶解し、ガスクロマトグラフィー (GLC) 用試料とした。なお、GLC 分析⁶⁸⁾にはキャピラリーカラム(VARIAN WCOT FUSED SILICA 0.25mm i. d. \times 25m)を備えた GLC 装置(GC-1700、検出器 FID. (株式会社島津製作所))を用いた。GLC の昇温プログラムは 172°C で 1 分間、72°C から 196°C まで 4°C /分昇温し、196°C で 1 分間、196°C から 200°C まで 4°C /分昇温し、200°C で 1 分間、200°C から 232°C まで 3°C /分昇温し、232°C で 3 分間、232°C から 242°C まで 5°C /分昇温し、242°C で 8 分間保持した。検出された脂肪酸メチルエステルは既知の脂肪酸メチルエステルの GLC における保持時間と比較することにより同定した。

4.2.5 脂肪酸添加によるプロトプラスト融合

プロトプラストの融合は第 2 章の方法に準じて行った。なお、融合後再生したプロトプラストの選択培地は再生培地からグリセリンを除いたものを基本培地とし、これに大腸菌が増殖しないために抗生物質 KM、SM および Amp をそれぞれ終濃度 6~25 μ g/ml になるように添加した後、37°C 下(海洋性発光細菌増殖不能)で培養し、増殖が見られたコロニー数を肉眼的に計数した。なお、37°C および抗生物質を添加した培地では親株である海洋性発光細菌および大腸菌は増殖は不可能であるが、プロトプラスト融合により両方の性質を含む融合株はこの培地でも増殖可能である。このことからこの培地で増殖したコロニーを融合株と選択し、あらかじめ細菌計数盤による顕微鏡観察で計数した値との差からプロトプラスト再生率(%)を算出した(Table 2.16)。

4.3 結果および考察

4.3.1 プロトプラスト化およびプロトプラストの安定性の評価

海洋性発光細菌および大腸菌の培養液に種々の脂肪酸を添加して培養し、プロトプラストの形成の難易度をプロトプラストを形成するまでの時間で比較した。その結果、オレイン酸を添加した海洋性発光細菌は無添加に比べ、プロトプラストの形成が2時間程度遅くなる傾向を示した。次にこのプロトプラストに遠心力を加えた後、再生培地で再生し、その再生率からその安定性を評価した結果を Table 4.1 に示した。この表からわかるように、海洋性発光細菌はオクタン酸、リノレン酸、EPA および DHA を添加して培養すると無添加よりも再生培地で再生するコロニー数が少なかった。一方、デカン酸、パルミチン酸、オレイン酸およびリノール酸を添加したものでは $5,000\sim 20,000\times g$ 下でも細胞が破壊されず、再生培地に多くの再生コロニーが出現した。一方、大腸菌は海洋性発光細菌とは異なりリノール酸やリノレン酸を添加すると無添加よりプロトプラストの再生率が上昇したが、一方オクタン酸、デカン酸、オレイン酸および EPA を添加するとその再生率は低下した。このように脂肪酸の添加により海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラストは共に遠心力に対する安定性が大きく変化し、その再生率に大きな影響を与えることが明らかとなった。

4.3.2 海洋性発光細菌および大腸菌の増殖や発光光度に及ぼす影響

供試した8種類の脂肪酸を添加して培養した海洋性発光細菌の発光光度および増殖量を Fig. 4.1 に示した。この図から明らかのように、炭素数18のオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸については明らかな発光光度の上昇が観察された。また、炭素数が18よりも多い EPA および

DHA については無添加と比較してやや高い発光光度を示した。これに対し、炭素数が 18 よりも少ないオクタン酸、デカン酸およびパルミチン酸は発光光度が不変または低下した。しかしながら、海洋性発光細菌の相対増殖量は脂肪酸無添加と比較して大きな変化は見られなかった。このように、海洋性発光細菌に各種脂肪酸を添加しても増殖量はほとんど変化がみられないのに対し、発光光度には大きな変化が見られたことから、1mg/ml 濃度の脂肪酸の添加は海洋性発光細菌の増殖に対する作用は見られないが、発光現象を初めとする微生物の代謝に影響を与えることが示唆された。このように発光現象は物質が微生物に及ぼす刺激を表す一つの指標⁶⁹⁾となるため脂肪酸の添加により細菌の代謝に影響を与えることが示された。

種々の脂肪酸添加による大腸菌の相対増殖量を Fig. 4.2 に示した。この図からわかるように、大腸菌は無添加と比較して供試脂肪酸すべてにおいて相対増殖量が上昇し、リノレン酸添加時は 35% も高い値を示した。このように大腸菌には脂肪酸の添加により増殖促進作用があることがわかった。

4.3.3 海洋性発光細菌の増殖に及ぼす脂肪酸の影響

脂肪酸の添加による海洋性発光細菌のプロトプラスト安定性低下の原因を調べるために、培養時に添加する脂肪酸を最大 16mg/ml まで変更し、増殖量の変化を調べた (Fig. 4.3)。この図からわかるようにオクタン酸および EPA を添加しても 1~16mg/ml の範囲では海洋性発光細菌の増殖にはほとんど変化が見られなかった。一方、リノレン酸および DHA は 2mg/ml 以上の添加により増殖阻害が観察された。Fig 4.1 の結果では相対増殖量に脂肪酸の有無による大きな相違は見られなかったが、脂肪酸の添加

量の増加に伴い増殖量が低下した。また添加したリノレン酸および DHA の濃度 (1mg/ml) は増殖可能限界濃度以上であり、増殖には明らかな変化は見られていないものの、脂肪酸無添加のものより生存力が弱い状態であると推測される。これらの脂肪酸を添加して培養した細菌のプロトプラストの安定性も無添加より遠心力に弱いことがわかった。しかしながら、これらの脂肪酸の添加はプロトプラスト膜の安定性だけでなく、細胞自体が弱くなっていることから、本プロトプラスト融合には不適切と判断された。

4.3.4 脂肪酸を添加して培養した菌体の細胞膜組成

脂肪酸を添加して培養した海洋性発光細菌および大腸菌の細胞膜脂肪酸組成を脂肪酸無添加の状態のものと比較した結果をそれぞれ Fig. 4.4 および Fig. 4.5 に示した。これらより明らかなように海洋性発光細菌では脂肪酸の添加により菌体脂肪酸組成に大きな変化は見られなかったが、大腸菌では大きな変化が観察された。すなわち、リノール酸の添加によりパルミトイル酸 (C16:1) およびオレイン酸の割合が無添加よりも大きく低下し、添加したリノール酸も検出された。また、リノレン酸の添加により同じくパルミトイル酸およびオレイン酸の割合が無添加よりも低下し、リノール酸および添加した脂肪酸と同じリノレン酸の成分が新たに検出された。菌体細胞膜のリン脂質を構成する脂肪酸の種類 (鎖長や二重結合の数) により細胞膜の流動性が変化することが知られている。

⁷⁰⁾脂肪酸を添加して培養した細胞膜の組成を調べた結果、大腸菌では脂肪酸組成が明らかに変化していることからリノール酸およびリノレン酸は大腸菌の菌体内に取り込まれてそのままの形で細胞膜脂質の構築と代謝の両方の経路を通じて細胞膜に作用することにより、安定性が増加し

たと推測された。海洋性発光細菌では細胞膜組成にほとんど変化がみられなかった。培地に添加した脂肪酸は菌体内に入るかまたは細胞膜組成になるかの可能性しかないが、EPA は細胞膜で変化が見られなかったことから菌体内に取り込まれてから代謝に利用されて細胞膜の安定性が低下したと推測された。

4.3.5 脂肪酸を添加した海洋性発光細菌および大腸菌間でのプロトプラスト融合

脂肪酸の添加が海洋性発光細菌および大腸菌のプロトプラスト融合に対する影響を調べるために、脂肪酸を添加して培養した供試菌株についてその融合率を調べた結果を Table 4.2 に示した。その結果、海洋性発光細菌ではプロトプラストの安定性が低下する脂肪酸として EPA およびオクタン酸が選択され、大腸菌ではプロトプラストの安定性を向上する脂肪酸としてリノール酸およびリノレン酸が選択された。そこでこれら両菌体間においてプロトプラスト融合を行い、その融合率を比較した結果、Table 4.2 に示されるように、海洋性発光細菌は EPA を添加した場合に、また大腸菌についてはリノール酸またはリノレン酸を添加した場合に融合率が最大になった。そこで、この再現性を確認するため、合計 5 回の融合実験を行った結果、コントロール(脂肪酸無添加)の融合株取得数に対して海洋性発光細菌および大腸菌は融合株取得数が脂肪酸を添加した方が無添加より高くなることが明らかとなった。(P<0.05)(Fig 4.6-7)

本研究ではプロトプラストの安定性に着目し、プロトプラストの融合率を向上させることを目標に実験を実施した。その結果、海洋性発光細菌には EPA を、また大腸菌にはリノール酸またはリノレン酸を添加して

培養した後に融合することにより融合率が脂肪酸無添加より数倍上昇することが判明した。この理由として脂肪酸の添加によって微生物のプロトプラストの膜の安定性や流動性を変更することにより融合しやすくなったことが考えられる。しかしながら、この融合率は依然として 10^{-5} ~ 10^{-7} の範囲であり、他の微生物間での融合と比較してもまだ高いとはいえない。⁷¹⁾ これまで細胞融合に用いられる脂質誘導体の製剤として PEG やカルシウムイオンなどの他に高級脂肪酸を使用した報告があるが、⁷²⁾ 脂肪酸誘導体を用いた細胞融合では不飽和脂肪酸の方が飽和脂肪酸より高いことが知られている。⁷³⁾ 今回供試した二種類の菌株に対しても不飽和脂肪酸の方が最適脂肪酸に選択されたが、それぞれ異なる脂肪酸がプロトプラストの安定性に大きく影響した。このことから、供試株ごとに最適な脂肪酸を選択して使用する必要があると考えられた。

本章では脂肪酸の添加により海洋性発光細菌のプロトプラスト融合率を向上することができたことから、今後様々の海洋細菌間の融合に応用できる可能性が示唆された。

Table 4.1 各種遠心力に対する発光細菌と大腸菌のプロトプラストの安定性*

添加脂肪酸	発光細菌 (遠心力×g)					大腸菌 (遠心力×g)				
	0	2,200	5,000	8,900	20,100	0	2,200	5,000	8,900	20,100
無添加	+++	+	-	-	-	++	++	-	-	-
オクタン酸	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-
デカン酸	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
パルミチン酸	+++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
リノール酸	+++	+	+	-	-	+++	+++	+++	++	++
リノレン酸	+	-	-	-	-	+++	+++	++	++	++
オレイン酸	+++	++	++	++	++	++	-	-	-	-
EPA	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-
DHA	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-

*プロトプラスト再生コロニー数/遠心前の総プロトプラスト数×100%

+++、再生率70%以上； ++、再生率40～70%； +、再生率10～40%； -、再生率10%以下

Table 4.2 発光細菌および大腸菌に脂肪酸を添加して融合した時の影響

添加脂肪酸		顕微鏡下での	再生培地での	融合株の
発光細菌	大腸菌	融合率 (%) [*]	再生率 (%) ^{**}	回収率 (%) ^{***}
無添加	無添加	85.0	7.2	5.9×10^{-6}
オクタン酸	リノール酸	90.0	5.9	2.3×10^{-6}
EPA	リノール酸	80.0	10.0	1.1×10^{-5}
オクタン酸	リノレン酸	80.0	6.1	8.4×10^{-7}
EPA	リノレン酸	90.0	9.1	1.1×10^{-5}

* 顕微鏡下での融合率=(複数が繋がり重なっているプロトプラスト数/PEG添加前のプロトプラスト数)×100(%)

** 再生培地での再生率=(再生培地で増殖したコロニーの数/PEG添加前のプロトプラスト数)×100(%)

*** 融合株の回収率=(親株と異なる性質を持つコロニーの数/ PEG添加前のプロトプラスト数)×100(%)

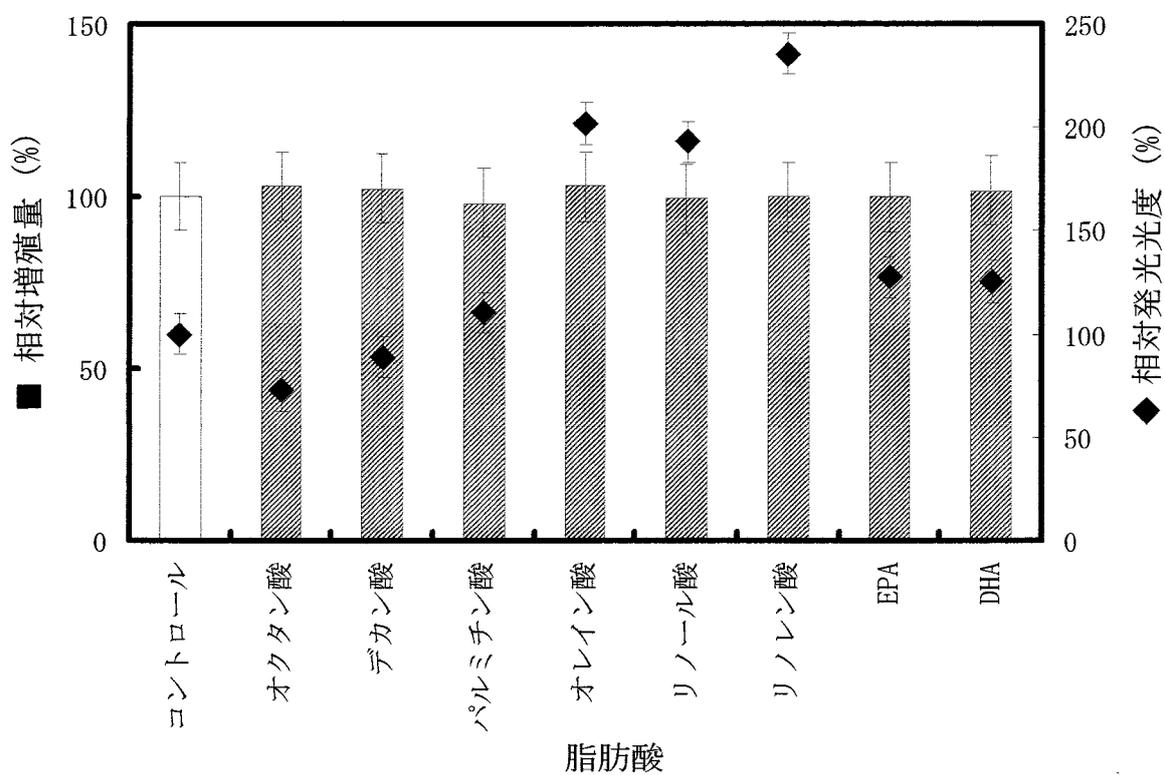


Fig. 4.1 発光細菌の相対増殖量と相対発光光度に与える脂肪酸の影響 (1mg/ml 脂肪酸添加、n=3)

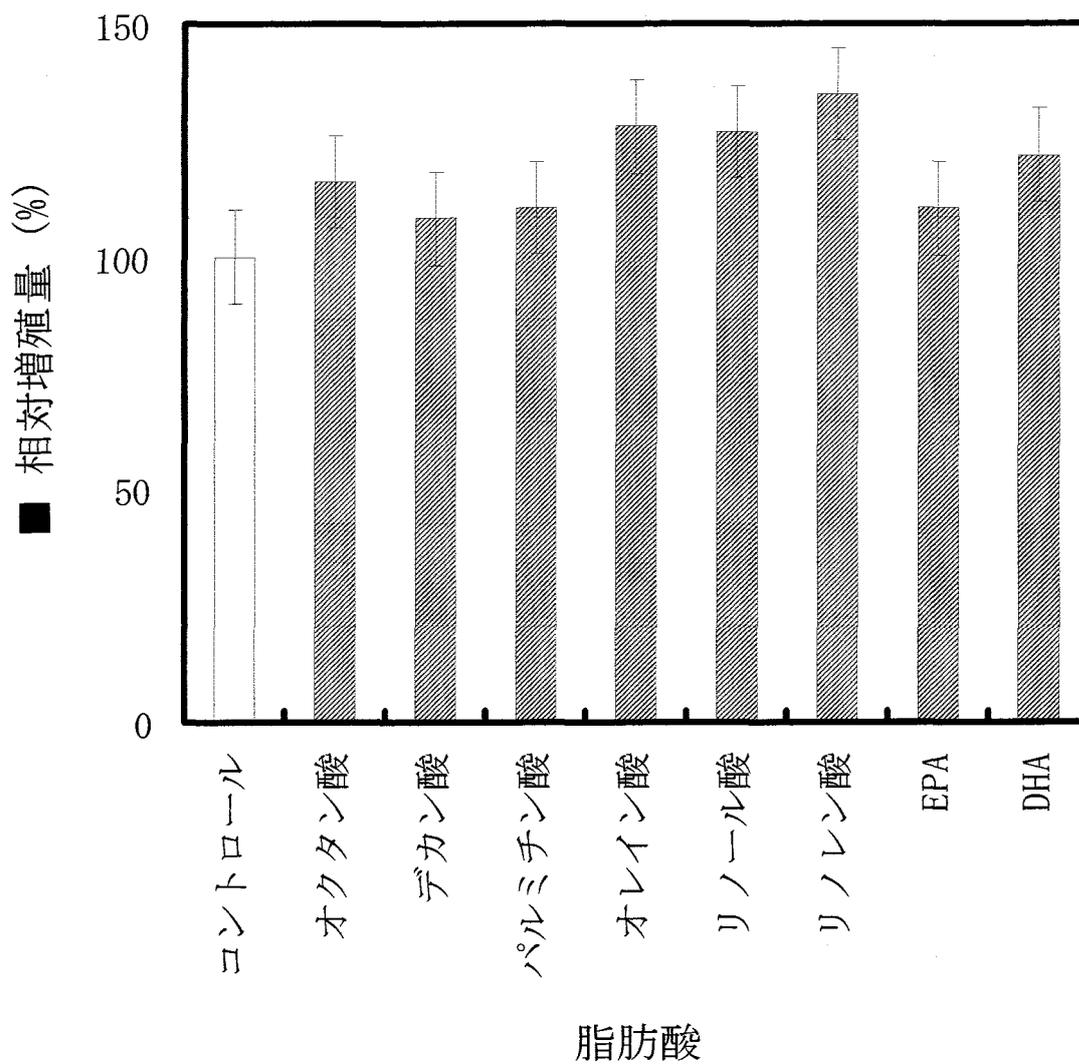


Fig. 4.2 大腸菌の相対増殖量に与える脂肪酸の影響
(1mg/ml 脂肪酸添加、n=3)

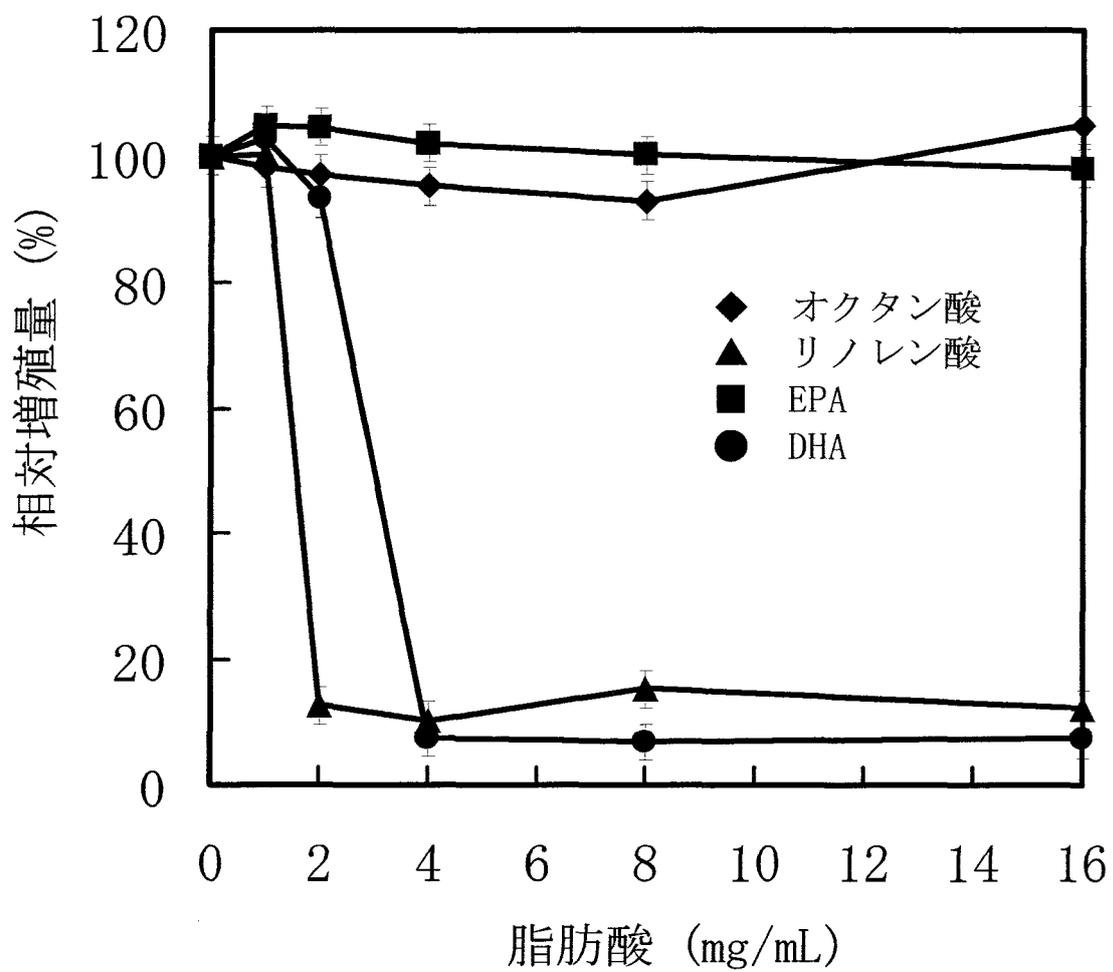


Fig. 4.3 脂肪酸の添加量が発光細菌の増殖に与える影響 (n=3)

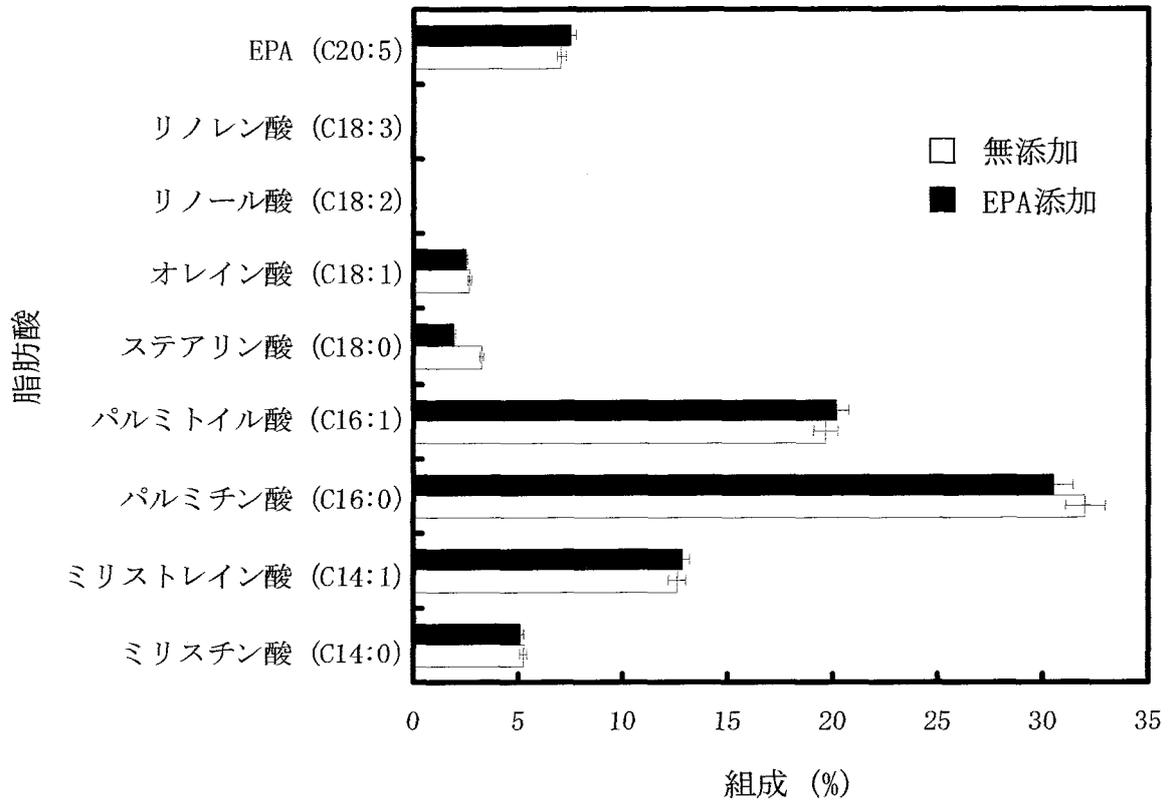


Fig. 4.4 発光細菌の細胞膜脂肪酸組成 (1mg/ml 脂肪酸添加、n=3)

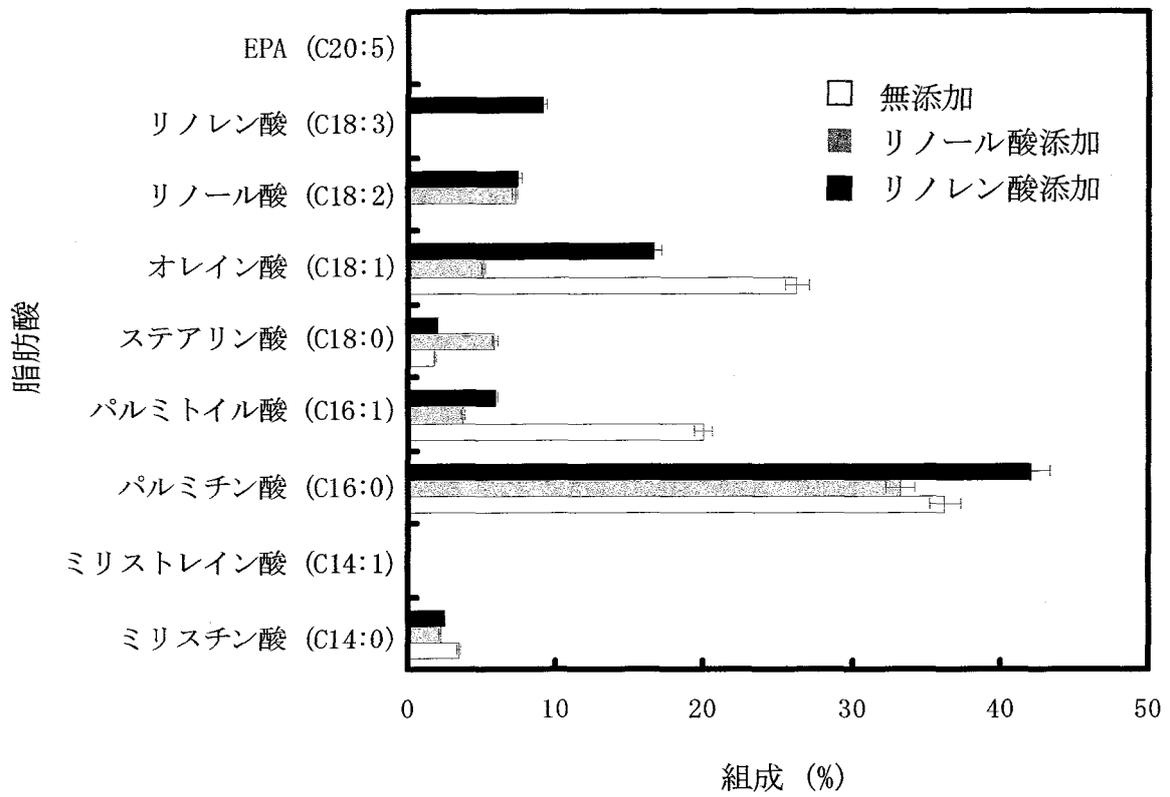


Fig. 4.5 大腸菌の細胞膜脂肪酸組成 (1mg/ml 脂肪酸添加、n=3)

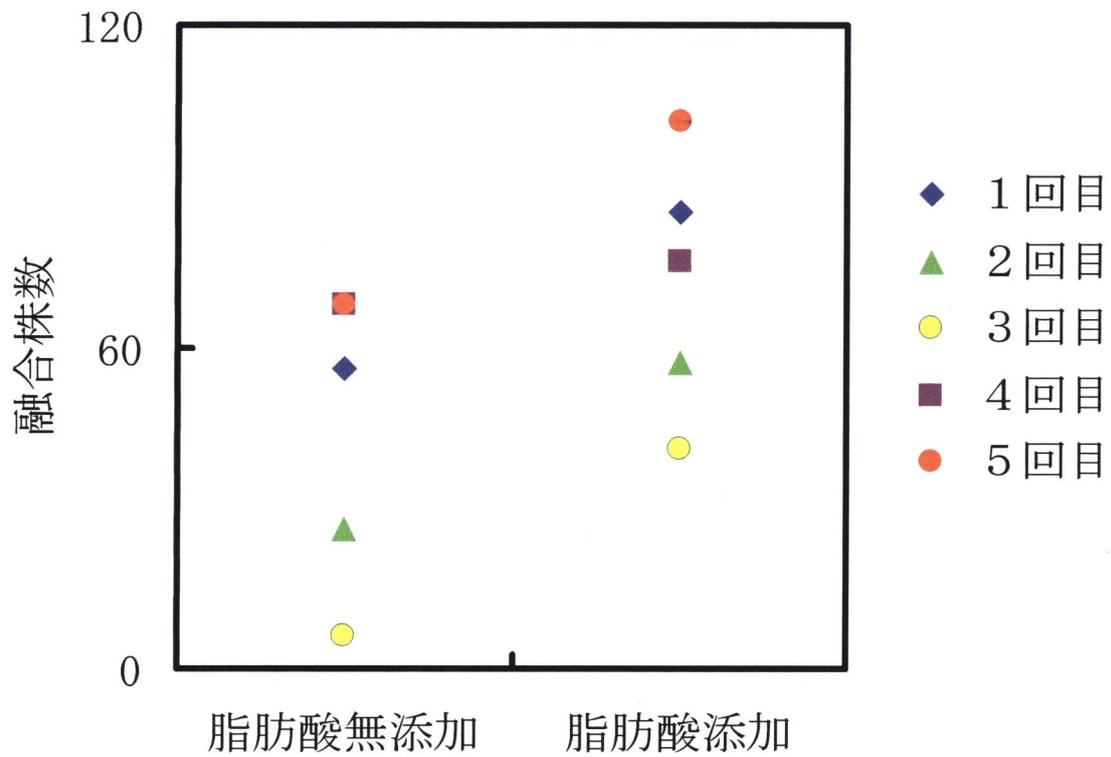


Fig. 4.6 海洋性発光細菌および大腸菌に脂肪酸(EPA およびリノール酸)を添加した時の融合株数 (1mg/ml 脂肪酸添加)

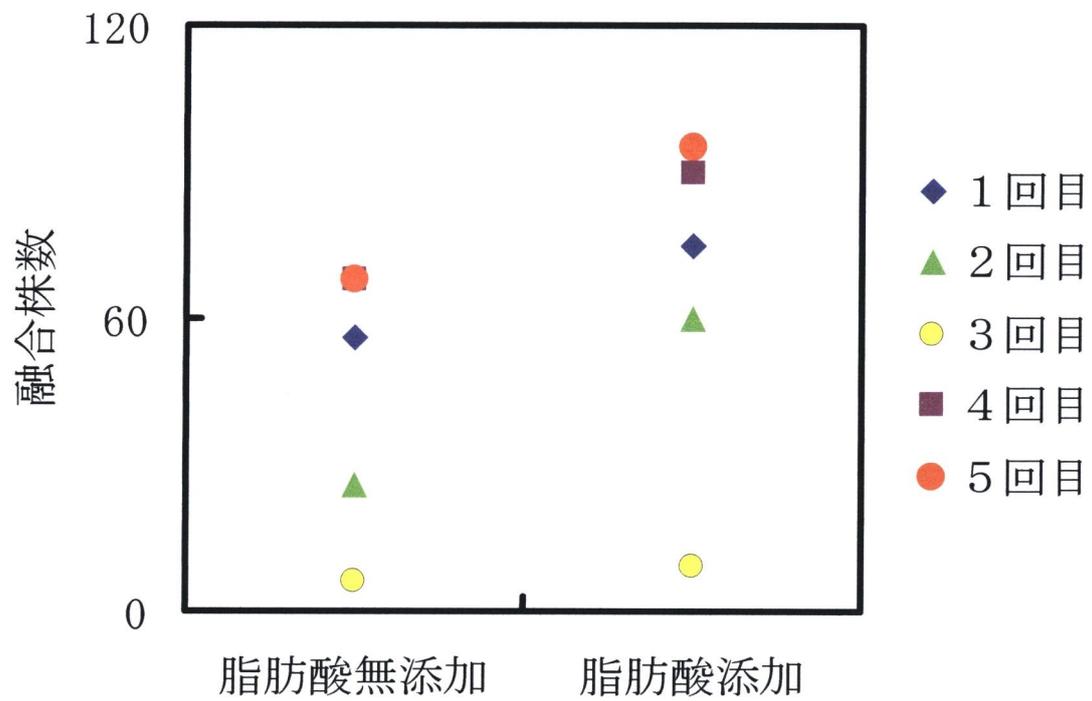


Fig. 4.7 海洋性発光細菌および大腸菌に脂肪酸 (EPA およびリノレン酸) を添加した時の融合株数 (1mg/ml 脂肪酸添加)

第 5 章

海洋性発光細菌 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の

VBNC 状態への誘導と蘇生

5.1 緒言

海洋環境には多種多様の微生物が生息しているが、その多くは生きてはいるが培養できない状態 (viable but nonculturable, VBNC) であることが知られている。これらの微生物は通常の培養方法では培養が難しいため、その性質はほとんど知られておらず、その応用研究は困難な状況にある。しかしながら、この VBNC 状態の微生物は新規の微生物である可能性が高く、これまで発見されていない有用遺伝子も数多く存在しているものと考えられる。⁷⁴⁾ これらの未利用遺伝子を有効利用するためにこれまで色々な方法が開発されている。例えば、PCR-DGGE 法や DNA マイクロアレイ法やメタジェノミクス法などが知られている。⁷⁵⁻⁷⁶⁾ しかしながら、これらの方法は操作が複雑でコストがかかるなどの問題点もある。そこで、本研究ではプロトプラスト融合法に着目し、海洋細菌および大腸菌間での融合のモデル系を構築し、プロトプラスト融合を行い、いくつかの融合株を取得した。しかしながら、これまで取り扱ってきた微生物は培養できるものに限られ、環境中に存在する VBNC 状態の微生物に応用するにはまだ不十分であると思われる。そこで、本章では VBNC 状態の細菌および大腸菌のプロトプラスト融合法のモデル系の構築を試みるために海洋性発光細菌 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株を VBNC 状態に誘導し、

大腸菌とプロトプラスト融合を行った。

5.2 実験方法

5.2.1 供試菌株の生育

S. woodyi 02HA-5-1 株は第 2 章で述べた海洋性発光細菌の生育条件と同一方法で培養した。本菌を -80°C から解凍した後、HSB 培地 (Table 2.2) に接種し、 20°C で静置培養し、これをさらに 20ml の HSB 培地に接種して一昼夜往復振盪培養した後 (50 往復/分)、新しい 100ml の同培地に 1ml 接種して 24 時間培養したものを本実験に供した。

5.2.2 供試菌株の VBNC 状態への誘導

海洋性発光細菌の溶解液は Table 5.1 に示した。誘導培地は溶解液の塩化ナトリウム濃度を 0、0.5、1、1.5 および 3%に変更し、さらにその pH を 5.0、7.0、7.8 に調整したものを使用した。本培養した供試菌を $6,000 \times g$ 、15 分間遠心分離し、細胞懸濁液に懸濁した。これを 100ml の誘導培地に終濃度 1×10^{10} cells/ml になるように接種し、 4°C で静置培養を行い、培養 7 日目ごとに VBNC 状態への移行を供試菌の全菌数 (TC) および生菌数 (VC) の測定結果から判定した。なお、全菌数および生菌数の測定は次に述べる方法で行った。

供試菌の全菌数 TC は LIVE/DEAD Bac Light Bacterial Viability Kits (Invitrogen)⁷⁷⁾ を用いた。すなわち、 4°C で静置培養したサンプル 1ml を $10,000 \times g$ で 10 分間遠心分離した後、0.85%塩化ナトリウム溶液 200 μl に菌体を懸濁した。この懸濁液を 100 μl ずつ 2 つの試験管に分注し、さらに 0.85%塩化ナトリウム溶液を添加してその全量を 2ml にした。こ

れを室温で1時間静置し、15分間経過することによく混合した。1時間経過後、 $10,000\times g$ で10分間遠心分離を行い、上清を除去した後、0.85%塩化ナトリウム溶液を1ml添加して菌体を懸濁し、その OD_{630} における濁度から増殖量を求めた。この処理を行った供試菌1mlに $3\mu l$ のキット試薬(Component AとComponent Bを等量混合したもの)を添加し、暗所において15分間静置した後、その $5\mu l$ を血球計数盤を用い、蛍光顕微鏡(オリンパス・BX51、400倍)下で細胞数を計数した。なお、赤く染色された菌体は死滅状態であり、青く染色された菌体は生存しているため、この青い細胞数のみを計数し、全菌数とした。なお、計数は $n=2$ で行い、その平均値をデータとした。

供試菌の生菌数VCは平板塗抹法により計数した。4°Cで静置培養したサンプルから1ml分取し、 $10^0\sim 10^{-7}$ cells/mlまで段階希釈し、1.5%寒天を添加したHSB培地にその $100\mu l$ を均一に培地表面に塗抹した。この寒天培地を20°Cで2日間静置培養後、生じたコロニー数を計数した。なお、計数は $n=3$ で行い、その平均値をVCとした。また、VBNC状態へ誘導する温度は供試菌によって異なるため、⁷⁸⁾本菌の最適生育温度である20°Cで培養を行い、これ以上の温度ではほとんど死滅するため、本実験では4°Cでの誘導条件のみについて検討を行った。

5.2.3 供試菌株のVBNC状態への各種誘導条件

(1) 供試菌株の初発菌数

1%塩化ナトリウム、pH7.0の誘導培地に供試菌を初発菌数 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 および 10^{10} cells/mlになるように添加し、VBNC状態への誘導を検討した。

(2) 供試菌株の対数増殖期および静止期

供試菌株を 12 時間(対数増殖期)および 24 時間(静止期)培養を行い、上記と同一条件で誘導培地に 10^7 cells/ml の初発菌数になるように接種し、同様に VBNC 状態への誘導を検討した。

(3) 金属イオンの添加

誘導培地に 8 種類の金属 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ および $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) を最終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように添加し、 10^7 cells/ml の初発菌を接種した後、VBNC 状態への誘導を調べた。

5.2.4 供試菌の VBNC 状態からの蘇生

1.5%の寒天を添加した HSB 培地に 200、500、1,000 及び 2,000 U のカタラーゼ(和光純薬工業)をそれぞれ添加し、 20°C で 2 日間静置培養した後、生じたコロニー数を計数し、無添加の HSB 培地でのコロニー数と比較し、供試菌の VBNC 状態からの蘇生状況を調べた。

5.2.5 VBNC 状態に陥った *S. woodyi* 02HA-5-1 株および大腸菌のプロトプラスト融合

1%塩化ナトリウム(pH7.8)の誘導培地で 63 日培養した結果、VBNC 状態に陥った海洋性発光細菌および大腸菌間でプロトプラスト融合を行った。VBNC 状態の海洋性発光細菌を第 2 章と同一方法でプロトプラストを作成し、プロトプラスト化した大腸菌と融合を行い、生じた再生コロニーから融合株を選択した。なお、融合株の選択には KM、SM および Amp に対する抗生物質耐性をマーカーとして用い、これらの抗生物質を $6 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ 添加した再生培地(Table 2.15)上に生じたコロニーを融合株とした。

5.3 結果および考察

5.3.1 VBNC 状態へ移行した海洋性発光細菌および大腸菌の融合

種々の濃度の塩化ナトリウム濃度および pH 調整による海洋性発光細菌の VBNC 状態への誘導状況を Fig. 5.1~3 に示した。その結果、Fig. 5.1 に示すように全培養日数を通じて pH 5.0 では塩化ナトリウム濃度 0% および 0.5% ではほとんど生菌数および全菌数が確認されなかった。これに対し、塩化ナトリウム濃度が低下すると生菌数の減少は早いことがわかった。しかしながら、どの濃度の塩化ナトリウムでも培養 70 日目でもまだ生菌数が計測されたため、完全な VBNC 状態の微生物を取得することはできなかった。

Fig. 5.2 に示すように、pH 7.0 の時も pH 5.0 と同様に塩化ナトリウム無添加ではほとんど生菌数および全菌数が確認できなかった。塩化ナトリウム濃度 0.5%、1%、1.5% および 3% を比較すると、1% の時に生菌数の減少が最も早く、70 日目に生菌数は確認されなくなったが、全菌数は 0 日目の状態とほとんど変化はなかった。その他の濃度の塩化ナトリウム存在下では 70 日目でも依然として 1×10^4 cells/ml 以上の生菌数が確認された。

また、pH 7.8 の時も pH 5.0 と pH 7.0 の時と同様に、塩化ナトリウム濃度 0% ではほとんど生菌数は確認されず、全菌数も確認されなかった (Fig. 5.3)。最も早く生菌数の減少が確認されたのは塩化ナトリウム 1% であり、63 日目に生菌数は全く確認されなかった。その時の全菌数は 0 日目の状態とほぼ同じ値であった。

以上より海洋性発光細菌の VBNC 状態への誘導条件は塩化ナトリウム濃度 1% および pH 7.8 が最も早いことが判明し、培養 63 日後に生菌数が

全く確認されなくなった。細菌の VBNC 状態への移行はその周囲の環境が最適成育環境より著しく悪化し、それでも何とか生き残るための手段であると考えられる。海洋性発光細菌では、塩化ナトリウム濃度が最適濃度である 3%付近では普通の生育状態と同じであるため VBNC 状態に陥ることはなく、塩化ナトリウム濃度 3%および 1.5%では 70 日間経過後も VBNC 状態に陥ることはなかったと考えられる。本供試菌では pH が 7.8 の時に最も早く VBNC 状態に陥ったが、*Vibrio parahaemolyticus* では酸性状態で VBNC になることが知られているため、⁷⁷⁾ 微生物の種類によってこの VBNC へ誘導する条件が大きく異なるものと考えられた。

VBNC 状態への移行をさらに向上させるための初発菌数の濃度を調べた。その結果、初発菌数の濃度に比例して生菌数が減少する傾向が見られ、菌数が少ないほど早く VBNC 状態に移行することが明らかになった。

また、Wong *et al.* は ⁷⁷⁾ 対数増殖期の微生物の方が静止期のものよりも VBNC 状態に移行しやすいことを報告しているが、本菌の場合は供試菌株の生理状態に関係なく VBNC 状態に陥る時間の変化は見られなかった。

VBNC へ移行するための金属イオンの影響を調べた結果を Fig. 5.4 に示した。この図からわかるように、 Cu^{2+} 以外の金属イオンは生菌数に大きな変化は見られなかった。すなわち、 Cu^{2+} を添加した場合には、14 日目で生菌数は確認されなくなり、全菌数は 0 日目の状態と同一状態であったことから、VBNC 状態への誘導には Cu^{2+} の添加が必要であると考えられた。なお、 Cu^{2+} はこの VBNC 状態への誘導作用 ⁷⁹⁾ 以外にも殺菌作用が強いことが知られているが、⁸⁰⁾ 本実験では全菌数にほとんど変化がみられないことから、殺菌作用は見られず、VBNC 状態への移行に作用したものと推察された。

供試菌株のVBNC状態からの蘇生を調べた結果を Fig. 5.5 に示した。その結果、すべてのカタラーゼ添加濃度で無添加より生菌数の数が多く検出され、中でも 1000U が最も多い生菌数が検出された。このカタラーゼの添加により、VBNC 状態の誘導の初期には大幅な蘇生が見られたが、⁸¹⁾ 培養時間の経過に伴いその蘇生率は低下した。その原因として考えられるのは、VBNC 状態の誘導の初期と後期の細胞自体の代謝状態が異なることである。すなわち、VBNC 状態への誘導の初期の細胞は温度の回復とカタラーゼ添加による培地の過酸化水素の消去によりすぐ元の状態に復帰できるが、VBNC 状態の時間が長くなるにつれて外部の条件が最適条件を満たしても元の状態に復帰する能力が低くなっていると考えられる。

5.3.2 VBNC 状態の海洋性発光細菌および大腸菌間でのプロトプラスト融合

VBNC 状態の *S. woodyi* 02HA-5-1 株および大腸菌間でプロトプラスト融合した結果を Table 5.2 に示した。この表からわかるように Amp を添加した再生培地では融合株が得られなかったが、KM および SM を添加した培地ではそれぞれ 9 株および 34 株の融合株が取得し、その融合率は $2.3 \times 10^{-6}\%$ であった。

VBNC 状態の *S. woodyi* 02HA-5-1 株と大腸菌のプロトプラスト融合により抗生物質耐性が異なる融合株が得られたことから VBNC 状態の微生物もプロトプラスト融合に活用できることが示唆された。しかしながら、今回得られた融合率は培養可能な微生物同士のプロトプラスト融合率 $7.4 \times 10^{-6}\%$ より低い値であった。この原因として大腸菌はプロトプラスト化状態の確認ができるものの、VBNC 状態の微生物は 100%プロトプラスト状態に移行することが難しいか、またはプロトプラストが形成しても

VBNC 状態の発光細菌はその代謝能力や形まで栄養状態のものと違うため、融合まで至らなかったのも、その融合率が培養可能な微生物同士のプロトプラスト融合より低かったものと考えられる。

本章では、プロトプラスト融合のモデル微生物である海洋性発光細菌 *S. woodyi* 02HA-5-1 株の VBNC 状態の誘導条件を明らかにするとともに、VBNC の本菌と大腸菌間でのプロトプラスト融合に成功した。今後、VBNC 状態の本菌と大腸菌間でのプロトプラスト融合率を向上させるための条件を検討するとともに、自然界に存在する VBNC 状態の微生物への応用を検討して行きたいと考えている。

Table 5.1 溶解液の組成

トリス-塩酸 (pH 7.0)	10 mM
塩化ナトリウム	85 mM
塩化カリウム	10 mM
塩化マグネシウム	28 mM
硫酸マグネシウム	30 mM
塩化カルシウム	10 mM
蒸留水	1000 ml

Table 5.2 VBNC状態の発光細菌および大腸菌間でのプロトプラスト融合

添加抗生物質	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	融合株数	融合率 (%) [*]
Amp	25	0	0
	12	0	0
KM	25	6	2.0×10^{-6}
	12	3	1.0×10^{-6}
SM	25	4	1.3×10^{-6}
	12	30	1.0×10^{-5}

*融合率 = (親株と異なる性質を持つコロニーの数/PEG添加前のプロトプラスト数) \times 100 (%)

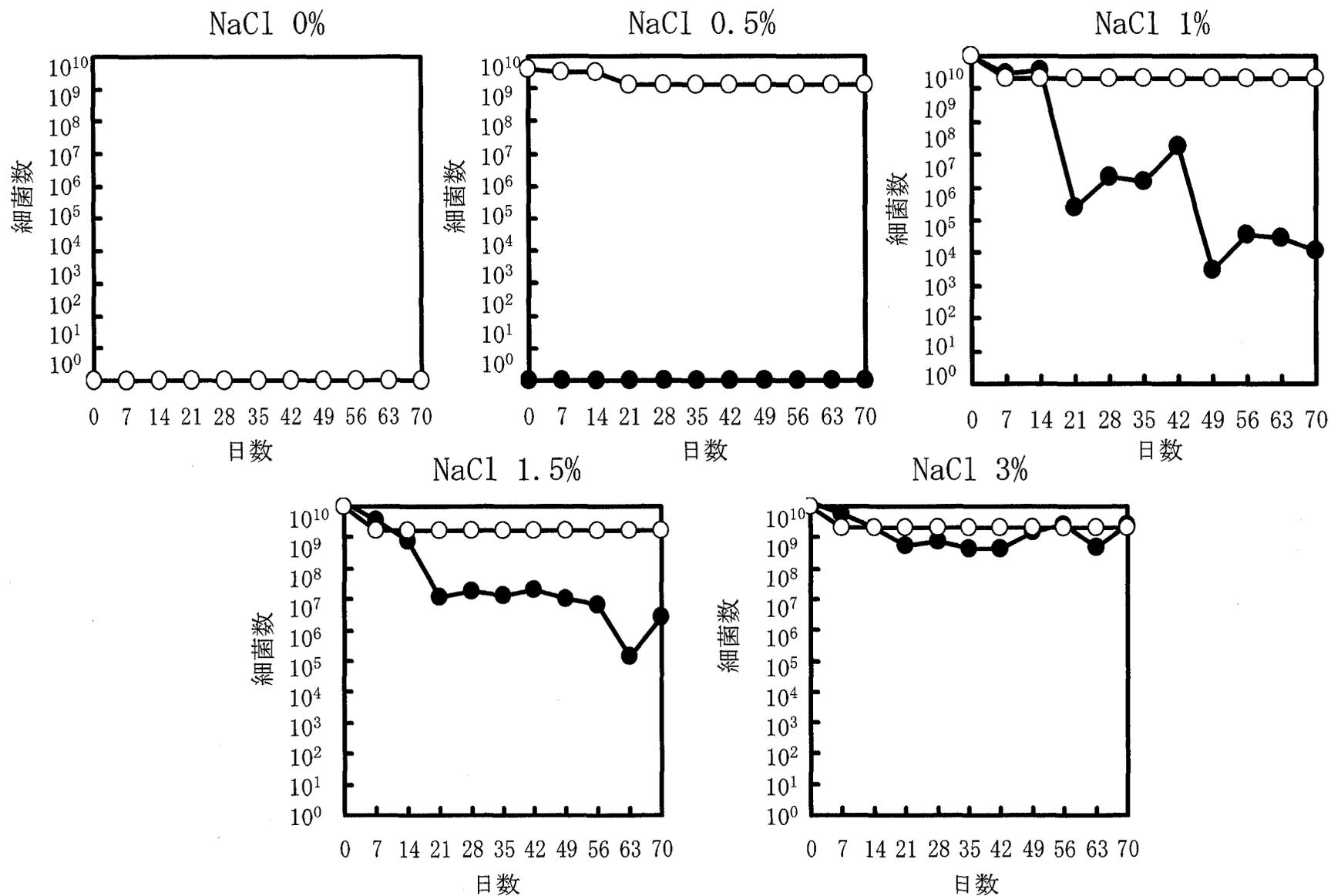


Fig. 5.1 pH 5.0における *Shewanella woodyi* 02HA-5-1株の生菌数および全菌数の経日的変化 (●:生菌数、○:全菌数)

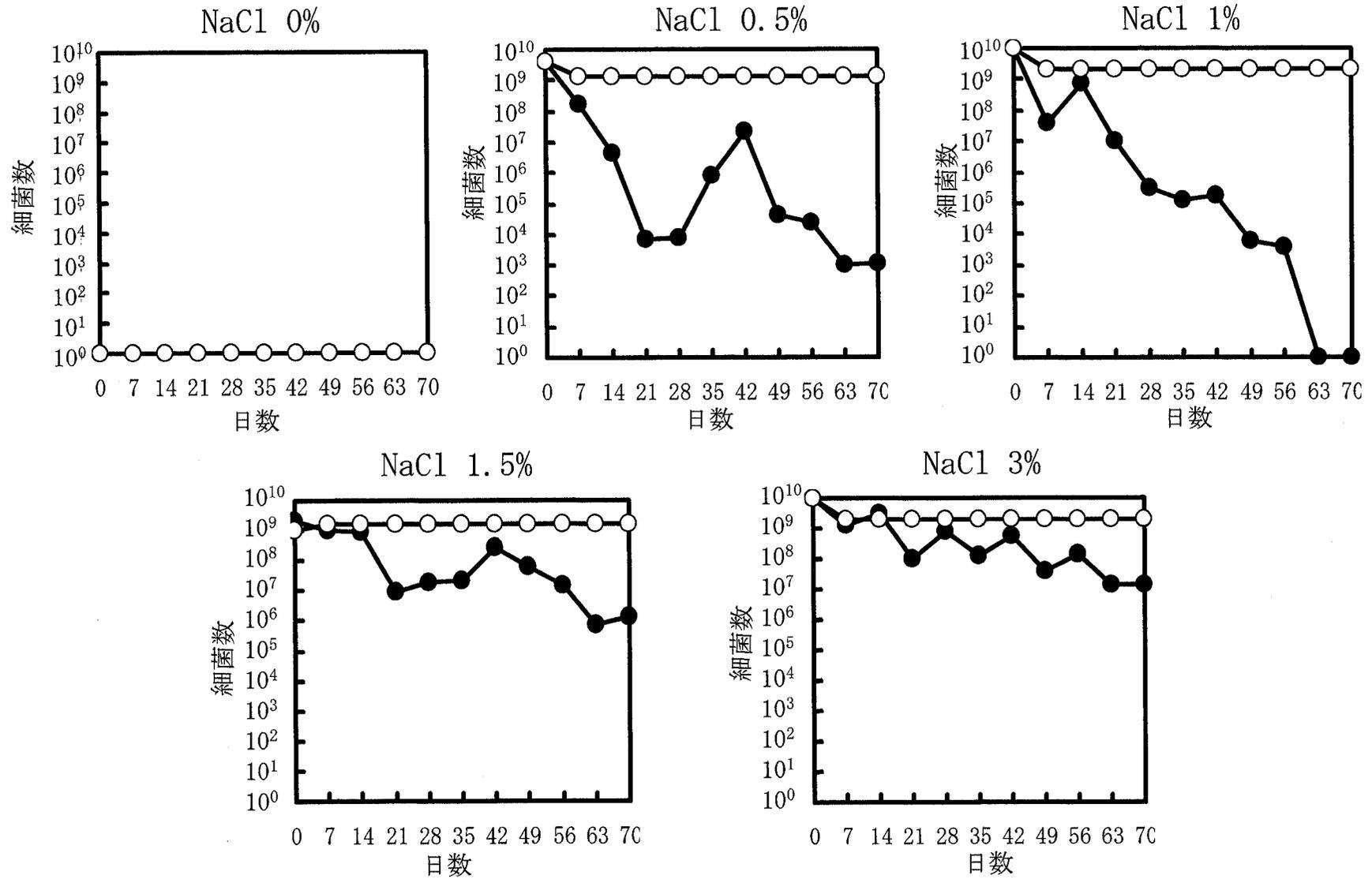


Fig. 5.2 pH 7.0における *Shewanella woodyi* 02HA-5-1株の生菌数および全菌数の経日的変化 (●:生菌数、○:全菌数)

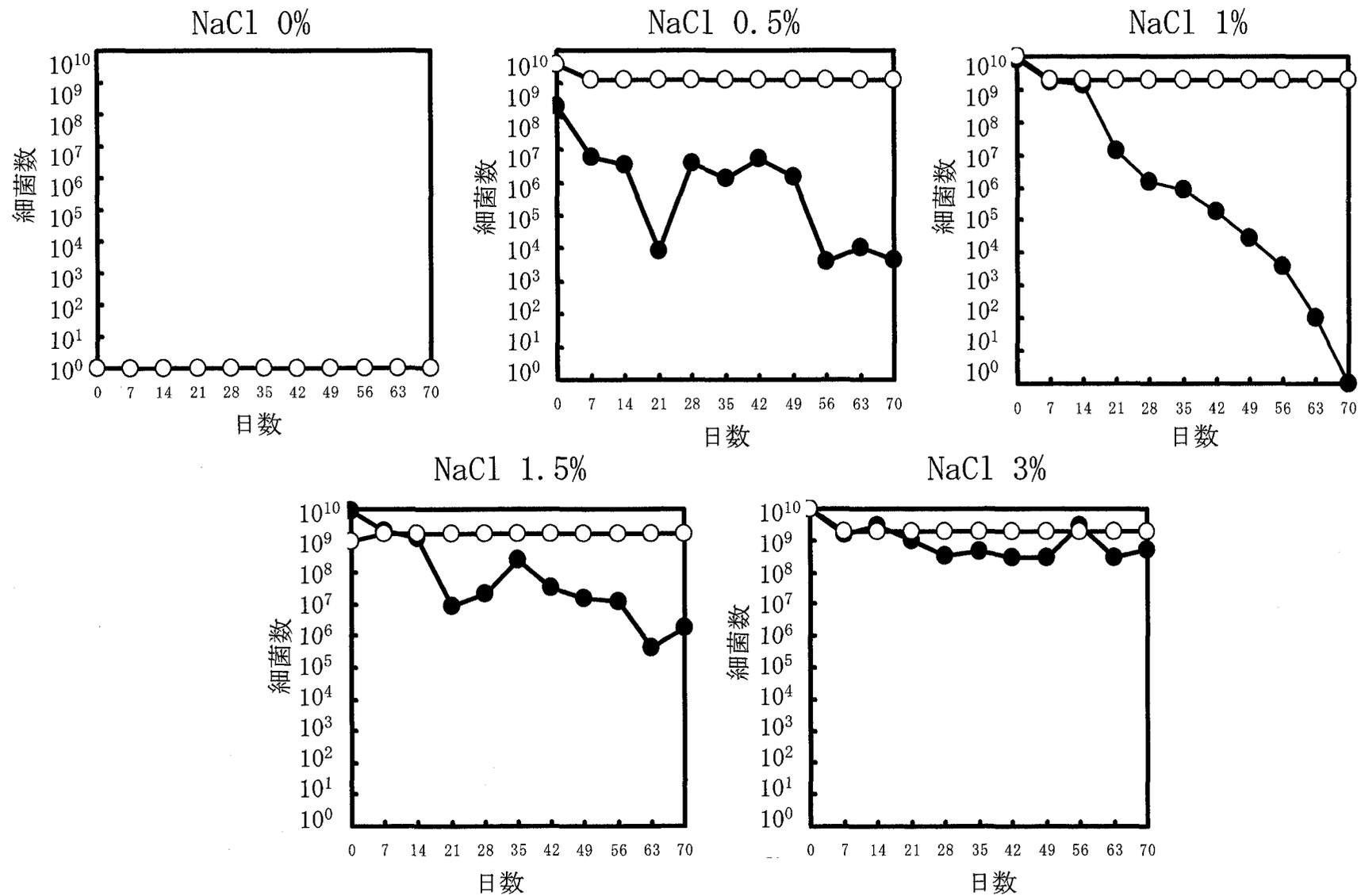


Fig. 5.3 pH 7.8における *Shewanella woodyi* 02HA-5-1株の生菌数および全菌数の経日的変化 (●:生菌数、○:全菌数)

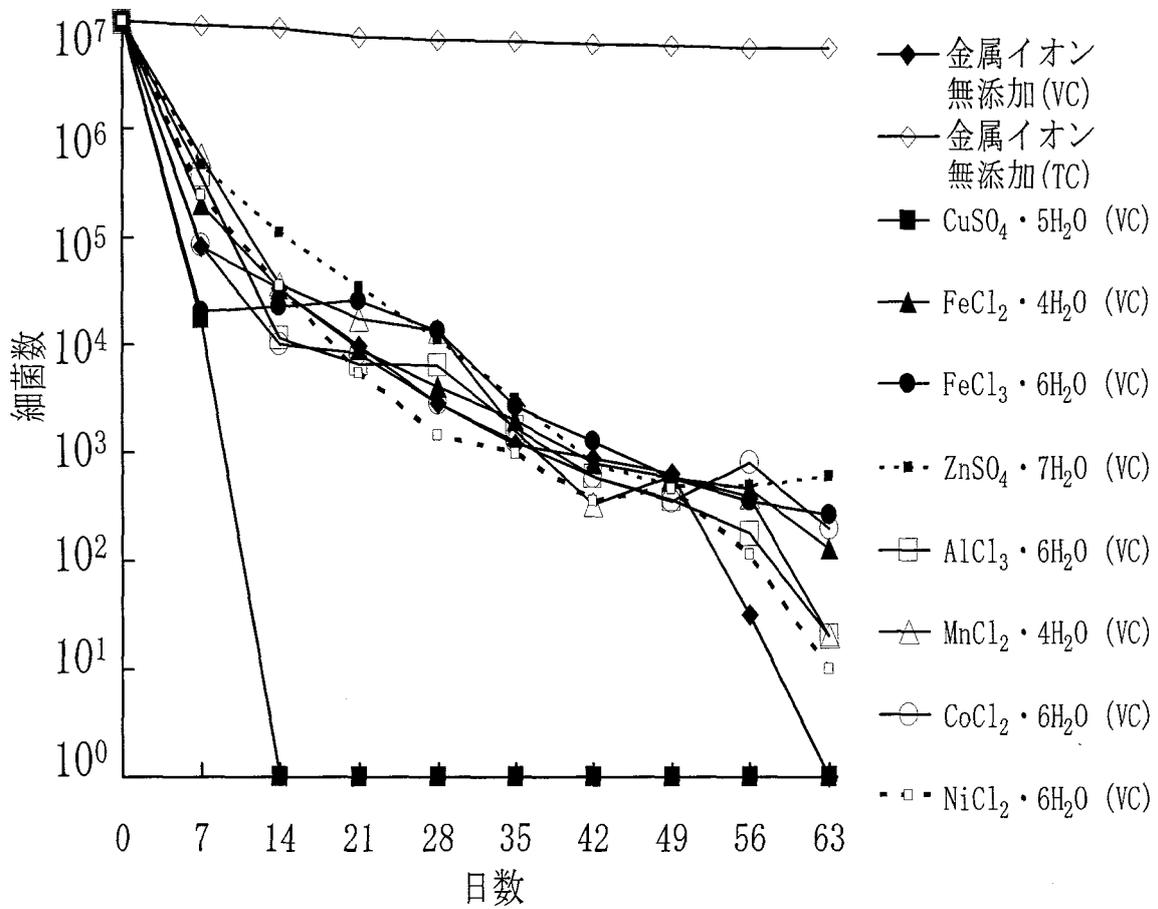


Fig. 5.4 各種金属イオン存在下における *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の生菌数の経日的変化

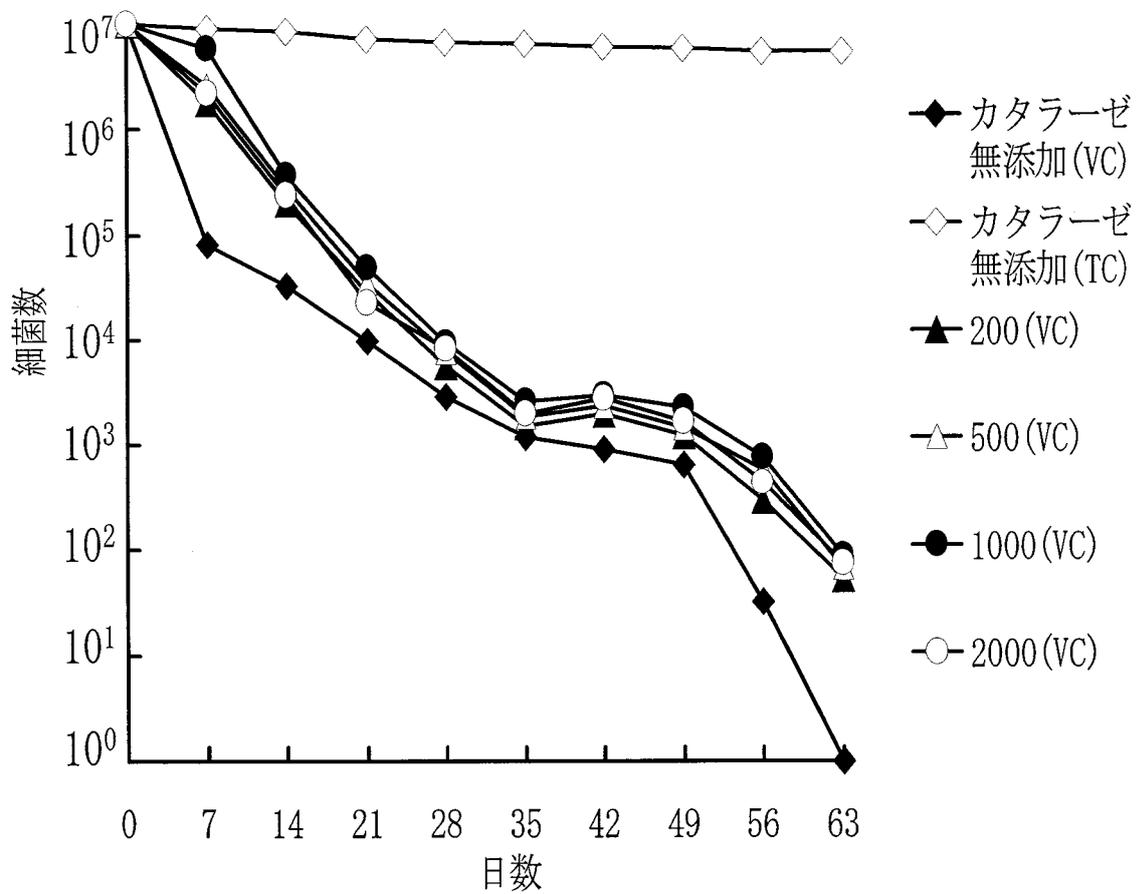


Fig. 5.5 カタラーゼを添加した *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株の生菌数の経日的変化

第 6 章

プロトプラスト融合法の応用

6.1 緒言

海洋細菌のプロトプラスト融合法の開発を行うために海洋細菌 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株および大腸菌をモデル微生物として選択した。それらの栄養状態および VBNC 状態のものを用いて融合を行い、いくつかの形質転換株を取得することに成功した。しかしながら、天然海水中には生きた微生物以外にも多種多様の遊離 DNA が数多く存在し、これらのほとんどは死滅した微生物由来のものであることが知られている。⁸²⁾ これらの遊離 DNA の中には有用遺伝子も数多く存在していると考えられ、新たな遺伝子資源としての有効利用が期待される。海洋環境には多種多様の微生物が生息しており、これらの微生物についての融合条件を色々検討することは不可能であるが、本研究で見出されたプロトプラスト融合条件を天然海水サンプルに応用した際にどの程度の頻度で形質転換が起きるかを立証する必要がある。また、天然海水サンプルとの形質転換を行うにあたり、天然海水サンプル中にも大腸菌が存在しているため、一般的には今回のモデル大腸菌の区別は困難であり、形質転換株の判別ができなくなる。そこで、天然海水中の大腸菌と形質転換株を区別するための工夫が必要となる。

本章ではまず遊離 DNA のモデル（モデル遊離 DNA）として *S. woodyi* 02HA-5-1 株の DNA をプロトプラスト化した大腸菌へ形質転換することを

検討した。さらに天然海水サンプル中の遊離 DNA を大腸菌へ形質転換を検討するとともに、遊離 DNA および生菌などを含む天然海水サンプル DNA の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 標識大腸菌への形質転換を目的とした。

6.2 実験方法

6.2.1 モデル遊離 DNA の大腸菌への形質転換

(1) モデル遊離 DNA の調製

モデル遊離 DNA は制限酵素処理した発光細菌 *S. woodyi* 02HA-5-1 株の DNA を用いた。すなわち、発光細菌の DNA を Ezaki *et al.*⁴²⁾ の方法に従って抽出した後、KM 耐性遺伝子を切断しないことが明らかな制限酵素 (*Mbo*I) を用いて酵素処理した。なお、処理条件として $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製した発光細菌のゲノム DNA $20 \mu\text{l}$ に $10\times\text{K buffer}$ (タカラバイオ) $5 \mu\text{l}$ および制限酵素 *Mbo*I $1 \mu\text{l}$ を添加し、超純水で $50 \mu\text{l}$ に調整した。37°C で一昼夜放置し、制限酵素処理後、70°C で 15 分間熱処理により残存酵素活性を失活させた後、ゲノム DNA を以下の方法で精製した。すなわち、 $50 \mu\text{l}$ のゲノム DNA 溶液に $2 \mu\text{l}$ の酢酸ナトリウムおよび $100 \mu\text{l}$ の 95% エタノールを添加し、20 分間静置した後、 $20,600\times g$ で 20 分間遠心分離し、上清を除いた後、さらに 70% 冷エタノール $500 \mu\text{l}$ を添加し、再び遠心分離し (5 分間)、その残渣を常温にて 30 分間風乾させ、超純水 $50 \mu\text{l}$ を添加した。なお、本サンプルの DNA 濃度は OD_{260} における吸光度から求めた。

(2) モデル遊離 DNA の大腸菌への形質転換

モデル遊離 DNA を大腸菌のプロトプラストへ形質転換した。すなわち、遊離 DNA 量は河川水、海水などの水圏に存在している DNA 量の濃度範囲

内である 50ng/ml に調製し、⁸³⁾ その 1ml を 20,600×g、15 分間遠心分離した後、上清を除去し、20%の PEG#6,000 1ml を添加した。これを第 2 章に示した方法で調製した大腸菌のプロトプラストと 1 分間混合した。さらに 1ml のプロトプラスト用高張溶液 (Table 2.14) を添加して形質転換を行い、プロトプラスト再生培地で形質転換株の再生を行った。次に、KM を 6~25 μg/ml 濃度添加した選択培地で KM 耐性を持つプロトプラストの選択を行い (37°C)、生じたコロニーを形質転換株として選択した。なお、第 4 章で述べたように培養中の大腸菌にリノール酸およびリノレン酸を添加することによりプロトプラスト融合率が向上することから、これらの脂肪酸を終濃度 1mg/ml 添加して培養した大腸菌へモデル遊離 DNA を形質転換した。なお、コントロールとしてモデル遊離 DNA をプロトプラスト状態になっていない大腸菌と混合し、27°C において 3 時間静置した後、同様に KM 添加選択培地に塗抹し、形質転換コロニーが生じるかを調べた。

6.2.2 天然海水サンプル中の遊離 DNA の大腸菌への形質転換

(1) 天然海水の採集

Fig. 6.1 に示すように 2008 年 1 月 8 日に東京湾にて採水したサンプル 6 点 (St. 1~6) の表面海水を用いた。なお、サンプリング海域の各環境因子を Table 6.1 に示した。

(2) 使用した選択培地

抗生物質耐性を標的に選択培地を作成した。すなわち、抗生物質耐性を有する形質転換株を取得するために KM、SM および Amp (各 25 μg/ml) を添加した再生培地を調製し、形質転換株の増殖の有無から抗生物質耐性を調べた。

(3) 天然海水サンプル中の遊離 DNA の調製

これらの天然海水を採水後、直ちに孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ の Nuclepore Track-Etch Membrane (Whatman) で濾過し、フィルター上に現場微生物を回収し、元の海水中の 50 倍濃度になるように人工海水に再懸濁したものを本実験に用いた。

天然海水サンプル中の遊離 DNA のみを大腸菌へ形質転換するために、50 倍濃縮を行った東京湾 6 点の天然海水サンプル 5ml を 60°C で 30 分間加熱処理を行い、共存する海洋細菌を殺滅させた。この加熱処理した天然海水サンプル $100\ \mu\text{l}$ を HSB 培地に塗抹し、 20°C で培養し、その生菌数も調べた。また、非加熱天然海水サンプルについても同様の操作を行い、生菌数を調べた。

天然海水サンプル中の遊離 DNA サイズが大腸菌の形質転換に与える影響を明らかにするために、加熱処理を行った天然海水サンプル 1ml に制限酵素 (*Mbo* I) を加えて以下の手順で酵素処理した。すなわち、50 倍濃縮した天然海水サンプル中の遊離 DNA 1ml に $10\times\text{K buffer } 100\ \mu\text{l}$ および制限酵素 *Mbo* I $10\ \mu\text{l}$ を添加し、 37°C で一昼夜放置した。その後、 70°C で 15 分間熱処理を行い、残存酵素活性を失活させたものを制限酵素処理した天然海水サンプル中の遊離 DNA とした。

(4) 天然海水サンプル中の遊離 DNA の大腸菌への形質転換

制限酵素処理および未処理の天然海水サンプル中の遊離 DNA を大腸菌のプロトプラストへそれぞれ形質転換した。すなわち、天然海水サンプル中の遊離 DNA 1ml を $20,600\times\text{g}$ 、15 分間遠心分離した後、上清を除去し、20%の PEG#6,000 1ml を添加した。これを第 2 章に示した方法で調製した大腸菌のプロトプラストと混合し、1 分間放置した。これにさらに 1ml のプロトプラスト用高張溶液を添加して形質転換を行い、プロトプ

ラスト再生培地で形質転換株の再生を行った。なお、この形質転換株の選択には KM、SM および Amp を $25 \mu\text{g/ml}$ 添加した再生培地における抗生物質耐性を指標とした。コントロールとして制限酵素処理した天然海水サンプル中の遊離 DNA をプロトプラスト状態になっていない大腸菌と混合し、 27°C において 3 時間静置した後、同様に抗生物質添加選択培地に塗抹し、形質転換コロニーが生じるかを調べた。

(5) 形質転換株の抗生物質耐性およびプラスミド保有状況

天然海水サンプル中の遊離 DNA を大腸菌プロトプラストへ形質転換し、得られた形質転換株について 8 種類の抗生物質に対する耐性およびプラスミド保有の有無を調べた。まず TSB 液体培地を作成し、これを 24 ウェルタイタープレートに 1ml ずつ無菌的に分注した。この各ウェルに形質転換株を植菌し、 37°C にて一昼夜往復振盪培養 (200 回/分) を行った。増殖した形質転換株をそれぞれ $10 \mu\text{g/ml}$ の抗生物質を添加した TSB 液体培地 $200 \mu\text{l}$ に $20 \mu\text{l}$ ずつ無菌的に接種した後、 37°C にて一昼夜振盪培養を行い、 OD_{630} における濁度 (増殖量) から耐性の有無を調べた。なお、抗生物質耐性は Amp、KM および SM に対する耐性以外に同一濃度のテトラサイクリン (TC)、エリスロマイシン (EM)、ノボビオシン (NB)、セファレキシン (CEX) および VM についても耐性を調べた。

形質転換株のプラスミド保有の有無は第 3 章に示したプラスミド抽出法と同一方法でプラスミド抽出を行い、プラスミド保有の有無を確認した。

6.2.3 天然海水サンプル DNA の GFP 標識大腸菌への形質転換

(1) 天然海水の採集

2008年7月9日に東京湾にて採水されたサンプル5点(St. 7~11)(Fig. 6.1)、2008年6月14日に伊豆半島にて採水されたサンプル2点(St. 1~2)(Fig. 6.2)、2008年6月20日に岩手県大槌湾にて採水されたサンプル10点(St. 1~10)(Fig. 6.3)の表面海水を用いた。サンプリング海域の各環境因子はTable 6.1に示した。また、これらをフィルターで50倍に濃縮した天然海水サンプルの生菌数、大腸菌数、大腸菌群数、KM耐性株数も同時に測定した。すなわち、生菌数は3%の人工海水⁵²⁾で作成したパールコア標準寒天培地(栄研器材株式会社)、大腸菌群および大腸菌の数はEMB培地(日水製薬株式会社)、KM耐性株数は上記の生菌数測定用培地にKMを終濃度6 μ g/mlになるように添加したものを使用した。そして、天然海水サンプルを各寒天培地に100 μ lずつ塗抹し、27 $^{\circ}$ Cで2日間静置培養し、得られたコロニー数を測定した。

(2) GFP 標識大腸菌の作成

第3章で示したケミカルコンピテントセル作成方法に準じて大腸菌JCM1649^T株のコンピテントセルを作成し、これに3.2.1の形質転換と同一方法でAcGFP1ベクター(タカラバイオ)を形質転換した。Amp 50 μ g/mlを添加した培地で増殖したコロニーから紫外線ランプ下で蛍光を有し、プラスミドの抽出によりAcGFP1ベクターが確認された株をGFP標識大腸菌とし、以後の実験に用いた。

(3) 使用した選択培地

抗生物質耐性を標的に選択培地を作成した。なお、GFPベクターはAmp耐性を持っているので、KM(6~25 μ g/ml)およびAmp(50 μ g/ml)を添加した再生培地を調製し、増殖の見られたコロニーで紫外線ランプ照射下で蛍光を有し、プラスミド抽出からGFPベクターが確認されたものを形質転換株として選択した。

(4) 天然海水サンプル DNA の大腸菌への形質転換

天然海水サンプル DNA を用いて GFP 標識大腸菌への形質転換を試みた。50 倍濃縮を行った東京湾 5 点 (St. 7~11)、伊豆半島 2 点 (St. 1~2) および岩手県大槌湾 10 点 (St. 1~10) の天然海水サンプル DNA を GFP 標識大腸菌のプロトプラストへ形質転換した。それぞれのサンプルについて合計 3 回の形質転換実験を行った。なお、形質転換株は $6\sim 25\ \mu\text{g/ml}$ の KM および $50\ \mu\text{g/ml}$ の Amp に対する抗生物質耐性および紫外線ランプ照射下で蛍光の見られたものから選択した。コントロールとしてリゾチーム処理を行っていない天然海水サンプル DNA をプロトプラスト状態になっていない大腸菌と混合し、 27°C において 3 時間静置した後、同様に抗生物質添加選択培地に塗抹し、形質転換コロニーが生じるかを調べた。また、得られた形質転換株について Amp および KM に対する耐性以外に $10\ \mu\text{g/ml}$ 濃度の SM、TC、EM、NB、CEX および VM についての耐性も調べた。

6.3 結果および考察

6.3.1 モデル遊離 DNA の大腸菌プロトプラストへの形質転換

モデル遊離 DNA を大腸菌プロトプラストへ形質転換した結果を Table 6.2 に示した。その結果、 $6\ \mu\text{g/ml}$ の KM 添加培地で再生コロニーが 2 株得られ、その KM 遺伝子の形質転換率は $2\times 10^{-7}\%$ であった。さらにリノール酸およびリノレン酸を添加して培養した時にはそれぞれ 5 株および 3 株の再生コロニーが得られ、それらの DNA 形質転換率はそれぞれ $5\times 10^{-7}\%$ および $3\times 10^{-7}\%$ であった。この結果から大腸菌をプロトプラスト状態にすることにより、さらに脂肪酸を添加することにより遊離 DNA の形質転換率が向上することが判明した。なお、モデル遊離 DNA をプロト

プラスト状態になっていない大腸菌と混合し、形質転換を行っても全く形質転換株は得られなかった。今回使用したモデル遊離 DNA 濃度は自然界に存在する遊離 DNA の濃度範囲であるため、自然界で生じる形質転換では形質転換株の取得は困難であると推測された。一般に自然界では 100 万分の一の確率で遺伝子組換えが起こると言われているが、⁸⁴⁾ 本実験では KM 遺伝子だけを標的に取り込み率を算出し、さらにモデル遊離 DNA との混合時間が短かったため、KM 耐性遺伝子は形質転換されなかったものと考えられた。

6.3.2 天然海水サンプル中の遊離 DNA の大腸菌への形質転換

60℃にて 30 分間加熱処理および未処理の東京湾 6 点の天然海水サンプルをそれぞれ HSB 培地に塗抹し、20℃における増殖の有無を確認した。その結果、未加熱処理の天然海水サンプルでは増殖コロニーが観察されたのに対し、加熱処理を行った天然海水サンプルでは全く増殖コロニーが観察されなかった。このことから天然海水サンプルを 60℃で 30 分間加熱処理することでサンプル中の現場微生物がすべて死滅することが確認された。

東京湾 6 点の天然海水サンプル中の遊離 DNA の制限酵素 *Mbo* I 処理および未処理のものを大腸菌のプロトプラストへ形質転換した。その結果、KM および SM を添加した再生培地では全く形質転換株が観察されず、Amp を添加した再生培地でのみ形質転換株が確認された (Table 6.3)。この表からわかるように、東京湾 St. 1 では制限酵素処理を行った天然海水サンプル中の遊離 DNA を大腸菌に形質転換することにより 5 株の Amp 耐性を有する再生コロニーが得られた。一方、St. 3、5 および 6 では制限酵素未処理の天然海水サンプル中の遊離 DNA を大腸菌に形質転換することに

よりそれぞれ 3 株、18 株および 8 株の Amp 耐性を有する形質転換株が確認された。この St. 1、5 および 6 は陸に近く、それぞれ多摩川、江戸川および荒川の河口域であるため、これらの河川水の影響を強く受けることから、東京湾湾央部に位置する St. 3 および 4 よりも抗生物質耐性株が多く出現し、数多くの形質転換株が得られたものと考えられた。また、St. 1 以外は制限酵素処理を行っていないものの方が酵素処理を行ったものより形質転換されたコロニー数が多く、Amp 耐性を有する形質転換株の形質転換率も制限酵素処理を行っていないものの方が高かった。

DDBJ の遺伝子データバンクに登録されている KM 耐性遺伝子および Amp 耐性遺伝子について制限酵素による切断部位の有無の確認を行った結果、*Mbo* I は両方の遺伝子とも切断しないことがわかった。しかしながら、本制限酵素は 4 塩基を識別することから高い確率で標的 DNA を短く切断した可能性が考えられる。本実験で用いた遊離 DNA は *Mbo* I 処理により短く切断されたため、大腸菌のプロトプラストへ形質転換されず、形質転換株の取得率が低かったものと考えられる。従って、天然海水サンプルの DNA を大腸菌に形質転換する際には制限酵素処理を行わなくても形質転換株は取得可能であり、制限酵素処理を行わない方が良いと考えられた。なお、天然海水サンプル中の DNA をプロトプラスト状態になっていない大腸菌と混合し、同様に抗生物質添加培地で再生を行った結果、抗生物質耐性を有するコロニーは全く得られなかった。このことから、天然海水サンプル中の遊離 DNA を大腸菌へ形質転換する際に大腸菌をプロトプラスト化した方がプロトプラスト化していないものより形質転換率が高いことが判明した。

次に、東京湾の天然海水サンプル中の遊離 DNA を大腸菌のプロトプラストへ形質転換して、得られた Amp 耐性を有する 34 株の形質転換株およ

びその親株である大腸菌について8種類の抗生物質に対する耐性パターンを調べた。その結果、大腸菌はすべての抗生物質添加培地で全く増殖が観察されなかった。このことから、大腸菌はこれらの抗生物質に対する耐性パターンを有していないことが判明した。その他の34株の形質転換株の抗生物質耐性をTable 6.4に示した。東京湾 St.1 から得られた形質転換株の中には Amp、NB、CEX および VN 耐性を有する株が存在し、St.3 からは Amp および CEX 耐性を有する株が存在し、St.5 および 6 からは Amp、EM および CEX 耐性を有する株が存在することが明らかになった。今回の抗生物質の耐性パターンを見るとほとんど同一であることから、これらはすべて同じ種の細菌である可能性が考えられる。なお、今回供試した抗生物質の中で Amp、EM、NB および CE は養魚場での日本水産用医薬品として承認された抗生物質であることから、⁸⁵⁾ これらの河川において人為的に使用された抗生物質の影響があり、耐性遺伝子を持つ微生物が数多く存在したのではないかと考えられた。

東京湾の天然海水サンプル中の遊離 DNA の大腸菌のプロトプラストへの形質転換により得られた34株の形質転換株の抗生物質耐性はプラスミド支配か、それともゲノム上での遺伝子伝播によるものかを明らかにするために、形質転換株34株およびその親株の大腸菌からプラスミドの抽出を行い、電気泳動によるプラスミドの保有の有無の確認を行った。その結果、すべての株はプラスミドを保有していないことが判明した。このことから今回得られた形質転換株はすべてゲノム DNA 上で形質転換が起ったものと考えられた。

6.3.3 天然海水サンプル DNA の GFP 標識大腸菌への形質転換

GFP ベクターを大腸菌へ形質転換した結果、Fig. 6.4 に示したように

紫外線ランプ照射下で GFP 未標識大腸菌(右)に対し、緑色の蛍光を発する大腸菌(左)が確認された。この蛍光を発するコロニーからプラスミド DNA を抽出し、電気泳動によるプラスミドの保有の確認を行った結果、約 3.3kb 付近にプラスミドのバンドが観察されたことから、GFP の挿入が確認された。

次に東京湾 5 点、伊豆半島 2 点および岩手県大槌湾 10 点で合計 17 点の天然海水サンプルの生菌数、大腸菌数、大腸菌群、KM 耐性株数および KM 耐性を有する形質転換株数を Table 6.5 に示した。この実験は 3 回繰り返したが、生菌数、大腸菌数、大腸菌群数および KM 耐性株数は明らかに東京湾の方が伊豆半島や大槌湾より多いという結果が得られた。しかしながら、大腸菌数、大腸菌群および KM 耐性株の生菌数中の割合はむしろ少ないことがわかった。さらに東京湾の天然海水サンプル中の KM 耐性菌数を比較すると St.9 では他の海域より少ないが生菌数は多いことから、実際海水中に存在する細菌のフローラは同じ東京湾でもかなり異なることがわかった。これらの天然海水サンプルの DNA を GFP 標識大腸菌へ形質転換した結果、合計 129 株の形質転換株を取得することができた。その中で東京湾 5 点の天然海水サンプルではそれぞれ 17 株、21 株、15 株、24 株および 12 株の合計 89 株の形質転換株が得られた。次に、伊豆半島 2 点の天然海水サンプルではそれぞれ 4 株ずつ計 8 株の形質転換株が得られた。大槌湾 10 点の天然海水サンプルからは合計 32 株の形質転換株を取得した。中でも St.1 および 10 からそれぞれ 19 株および 10 株、また St.2、3 および 9 からはそれぞれ 1 株ずつ取得できた。このことから、形質転換株が多く得られた東京湾 5 点の天然海水サンプルはともに陸に近いところであることから、東京湾のサンプルを用いると他の海域よりも多く形質転換株が得られる可能性高いと考えられた。伊豆半島の

天然海水サンプルは他の海域と比較しても海水中の大腸菌数が最も少なく、大腸菌群数や KM 耐性を持つ細菌数も少ないことから得られた形質転換株数が東京湾より少なかったものと考えられる。大槌湾の天然海水サンプルの生菌数、大腸菌数、大腸菌群数および KM 耐性株数は東京湾より少なかったが、伊豆半島天然海水サンプルとの差は見られなかった。さらに得られた形質転換株の分布を見ると、陸に近い所の方が遠い所よりも形質転換株が多く得られた。特に大槌湾の St.1 の天然海水サンプル DNA の採集海域は大槌川と小槌川および鶴住居川が大槌湾に流入するところであることから陸水の影響を大きく受けた可能性が高いと考えられた。

各海域の天然海水サンプルの全菌数と形質転換率の相関性を Fig. 6.5 にまとめた。このグラフから明らかなように、東京湾、伊豆半島および大槌湾の天然海水サンプルの DNA から得られ形質転換株率はそれぞれ海域ごとにクラスターを形成した。そして全菌数($10^2 \sim 10^6$)と形質転換率の間に正の相関が得られ、その相関係数は $R^2=0.68$ であった。

得られた形質転換株についてその他の抗生物質に対する耐性を調べた結果、Table 6.6 に示すように、供試したすべての抗生物質に対して耐性を持つ株が存在することがわかった。中でも TC、EM および NB 耐性を持つ株の割合は他の抗生物質よりも高いことがわかった。なお、TC は養魚場でよく使用されている抗生物質であり、今回得られた形質転換株の中で東京湾の天然海水から得られた形質転換株が他の海域より耐性株の割合が多いことから、東京湾の抗生物質耐性株の由来は人為的に使用された抗生物質による影響ではないかと考えられた。また、今回得られた東京湾の形質転換株はこれらの抗生物質に対して多剤耐性を有する株が多く、東京湾の天然海水サンプルの遊離 DNA のみを用いた結果と比較す

ると多剤耐性菌の割合が増加したことから、東京湾の天然海水サンプルでは遊離 DNA 以外の生菌の影響があったことが明らかとなった。さらに、今回得られた形質転換株はすべて GFP ベクターの挿入が確認され、その他のプラスミドの保有は確認されていないことからゲノム DNA での形質転換が生じたと考えられた。

本章ではモデル遊離 DNA および天然海水サンプル中の遊離 DNA を直接大腸菌へ形質転換したところ、その形質転換率がプロトプラスト未形成のものより上昇していることから、天然海水サンプル中の遊離 DNA を直接大腸菌へ形質転換することが可能であることが示唆された。さらに、天然海水サンプルを GFP ベクターで標識した大腸菌へ形質転換した結果、指標とした海洋の遺伝子資源の収集と大腸菌での発現に成功した。今後、本方法が海洋微生物由来の新規遺伝子の収集などに有効利用できることが期待される。

Table 6.1 サンプリング海域の各環境因子

海域	採集日	緯度 (N)	経度 (E)	水温 (°C)	塩分濃度 (‰)	溶存酸素 (mg/l)	pH	
東京湾	St. 1	2008年1月8日	35° 32.00'	139° 48.50'	12.01	29.71	9.81	7.98
	St. 2	2008年1月8日	35° 26.00'	139° 52.00'	12.46	32.04	8.39	7.99
	St. 3	2008年1月8日	35° 31.00'	139° 55.00'	11.63	31.36	9.96	7.96
	St. 4	2008年1月8日	35° 36.00'	139° 58.00'	11.26	31.43	10.25	7.96
	St. 5	2008年1月8日	35° 39.50'	139° 58.00'	10.87	30.83	9.79	7.82
	St. 6	2008年1月8日	35° 36.50'	139° 52.00'	12.00	30.61	8.17	7.82
	St. 7	2008年7月9日	35° 28.50'	139° 41.00'	25.18	20.37	9.40	8.48
	St. 8	2008年7月9日	35° 31.00'	139° 47.00'	24.63	10.25	7.86	8.02
	St. 9	2008年7月9日	35° 34.50'	139° 47.00'	25.12	14.43	10.69	8.04
	St. 10	2008年7月9日	35° 37.50'	139° 46.50'	24.28	16.49	6.90	7.86
	St. 11	2008年7月9日	35° 28.50'	139° 41.00'	24.63	7.40	4.92	7.24
伊豆半島	St. 1	2008年6月14日	34° 51.00'	138° 46.50'	22.25	33.76	10.65	9.78
	St. 2	2008年6月14日	34° 45.00'	138° 45.50'	23.45	33.96	12.19	9.85
岩手県 大槌湾	St. 1	2008年6月23日	39° 20.00'	141° 55.00'	15.97	30.61	26.20	9.52
	St. 2	2008年6月23日	39° 20.50'	141° 56.50'	15.69	31.31	26.49	9.51
	St. 3	2008年6月23日	39° 20.50'	141° 57.50'	15.29	32.18	25.65	9.53
	St. 4	2008年6月23日	39° 21.00'	141° 58.50'	14.71	33.06	18.15	9.57
	St. 5	2008年6月23日	39° 21.00'	141° 58.50'	14.01	33.41	26.92	9.57
	St. 6	2008年6月23日	39° 21.50'	141° 59.50'	12.90	33.55	11.44	9.60
	St. 7	2008年6月23日	39° 22.00'	142° 00.50'	12.88	33.66	23.56	9.57
	St. 8	2008年6月23日	39° 23.00'	142° 00.50'	12.93	33.63	35.69	9.53
	St. 9	2008年6月23日	39° 23.00'	141° 58.50'	12.89	33.65	27.14	9.68
	St. 10	2008年6月23日	39° 23.00'	141° 57.50'	13.66	33.68	23.55	9.63

Table 6.2 モデル遊離DNAの大腸菌への形質転換

発光細菌DNA	大腸菌	KM 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)			DNA 形質転換率 (%)
		25	12	6	
	プロトプラスト形成前	0	0	0	0
	プロトプラスト形成後	0	0	2	2×10^{-7}
<i>Mbo</i> I 処理	リノール酸添加	4	1	0	5×10^{-7}
	リノレン酸添加	1	2	0	3×10^{-7}

Table 6.3 加熱処理した東京湾海水サンプル中の遊離DNAの大腸菌への形質転換

海水	大腸菌	形質転換株数*							
		<i>Mbo</i> I 処理	プロトプラストの形成	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	St. 6
無	無			0	0	0	0	0	0
有	無			0	0	0	0	0	0
無	有			0	0	3	0	18	8
有	有			5	0	0	0	0	0

* Amp添加濃度 : 25 μ g/ml

Table 6.4 東京湾の形質転換株の抗生物質耐性

抗生物質 (10 μ g/ml)	抗生物質耐性株数			
	St. 1	St. 3	St. 5	St. 6
Amp*	5	3	18	6
TC*	0	0	0	0
EM*	0	0	6	3
NB*	5	0	0	0
CEX*	5	3	18	3
KM	0	0	0	0
SM	0	0	0	0
VM	5	0	0	0

* 日本水産用医薬品として承認された抗生物質

Table 6.5 天然海水の大腸菌への形質転換

サンプル	生菌数 (cells/ml)	大腸菌数 (cells/ml)	大腸菌群数 (cells/ml)	KM耐性株数 (cells/ml)	形質転換株数* (n=3)	
東京湾	St. 7	56000	2.0	340	600	17
	St. 8	125600	6.0	300	120	21
	St. 9	240000	2.0	300	40	15
	St. 10	160000	6.0	320	120	24
	St. 11	70000	12.0	240	200	12
伊豆半島	St. 1	200	0.2	26	8	4
	St. 2	300	0.2	31	16	4
岩手県 大槌湾	St. 1	562	1.3	20	32	19
	St. 2	252	0.8	16	8	1
	St. 3	340	0.6	10	16	1
	St. 4	194	1.0	14	4	0
	St. 5	100	0.4	24	8	0
	St. 6	146	0.4	16	20	0
	St. 7	174	1.0	16	20	0
	St. 8	355	1.6	24	4	0
	St. 9	276	1.0	32	12	1
	St. 10	224	1.6	36	36	10

* KM添加濃度 : 6~25 μ g/ml

Table 6.6 GFP標識した形質転換株の抗生物質耐性

抗生物質 耐性株数	抗生物質 (10 μ g/ml)								
	Amp*	TC*	EM*	NB*	CEX*	KM	SM	VM	
東京湾	St. 7	17	9	14	13	0	13	6	6
	St. 8	21	15	16	14	0	4	3	3
	St. 9	15	14	9	9	0	7	7	7
	St. 10	24	17	19	22	0	9	9	9
	St. 11	12	4	8	8	2	2	5	5
伊豆半島	St. 1	4	1	2	1	0	1	1	3
	St. 2	4	1	3	1	0	0	0	0
岩手県 大槌湾	St. 1	19	3	16	11	0	3	4	4
	St. 2	1	1	1	1	0	0	0	0
	St. 3	1	0	1	1	0	0	0	0
	St. 4	0	0	0	0	0	0	0	0
	St. 5	0	0	0	0	0	0	0	0
	St. 6	0	0	0	0	0	0	0	0
	St. 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	St. 8	0	0	0	0	0	0	0	0
	St. 9	1	1	1	1	0	0	0	0
	St. 10	10	8	10	10	1	5	8	8

* 日本水産用医薬品として承認された抗生物質



Fig. 6.1 東京湾の表面海水の採水点 (St. 1~11)

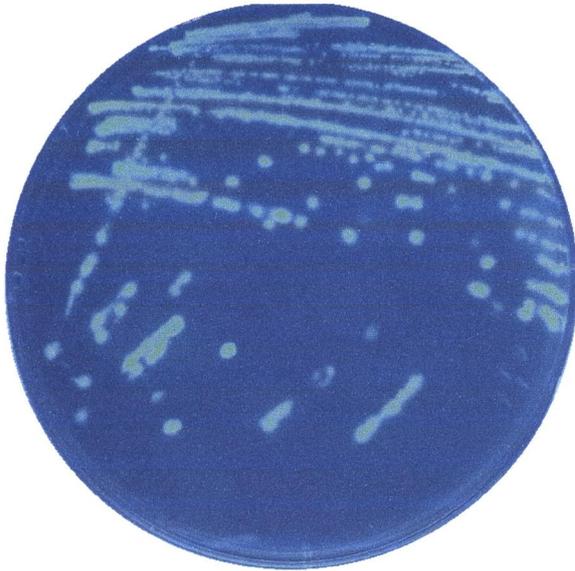


Fig. 6.2 伊豆半島の表面海水の採水点 (St. 1～2)



Fig. 6.3 岩手県大槌湾の表面海水の採水点
(St. 1～10)

GFP 標識



GFP 未標識

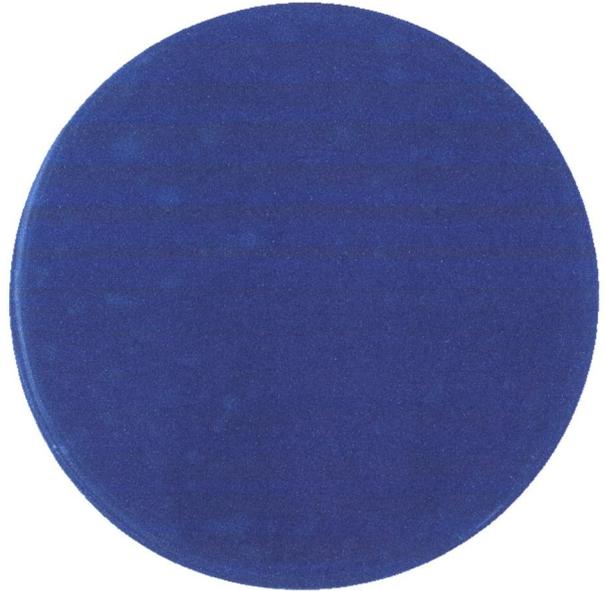
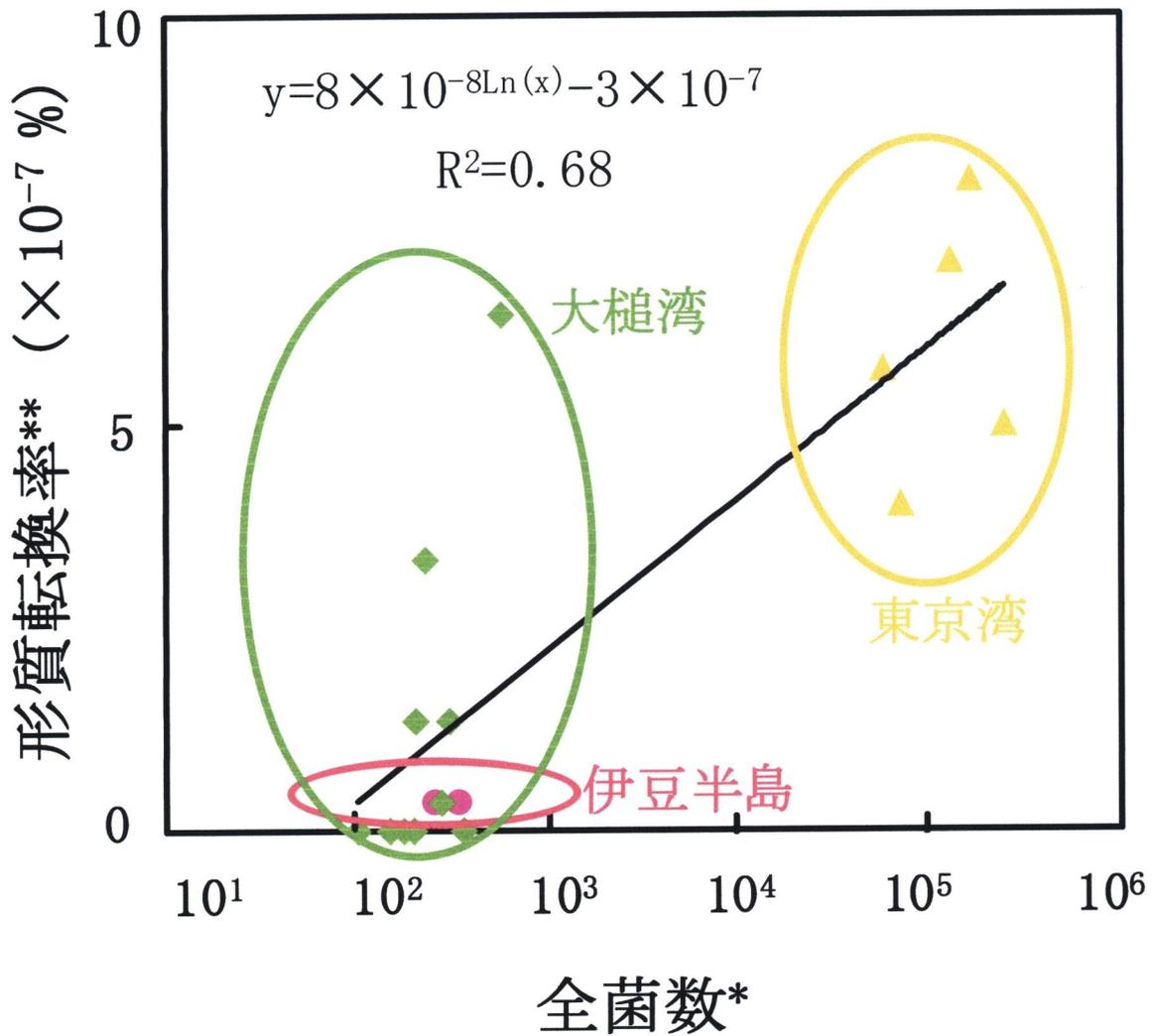


Fig. 6.4 GFP で標識した大腸菌(左)と未標識大腸菌(右)の写真



全菌数 = 形質転換に用いた GFP 標識大腸菌数 +

形質転換に用いた天然海水サンプル中の生菌数

形質転換率 = (形質転換株数 / 全菌数) × 100 (%)

Fig. 6.5 各海域の天然海水サンプルの全菌数と形質転換率の関係

第 7 章

総合討論

本研究では海洋細菌と大腸菌のプロトプラスト融合法を新たに開発し、VBNC 状態の微生物、遊離 DNA および天然海水サンプルなどへの適応性を拡張することにより本方法が海洋環境中の有用遺伝子を有効活用するための基礎技術の一つとして有用であることを明らかにした。

まず、第 2 章では海洋性発光細菌 *Shewanella woodyi* 02HA-5-1 株と大腸菌間でプロトプラスト融合法を確立し、抗生物質耐性や塩分要求性などが両親株と異なる性質を有する融合株 13 株を取得することができた。これまでのプロトプラスト融合は同属の植物や放線菌および酵母間などで盛んに行われているが、海洋細菌と大腸菌間で融合を行った例は全く見られない。海洋細菌は一般に塩分要求性があることから、陸上微生物と異なる独自の融合方法を考案する必要があるが、今回の融合では海洋細菌のモデル系を構築したことで、今後その他の海洋細菌の融合を試みる際に有効な知見となるものと考えられた。本研究では抗生物質耐性などの変化に留まったものの、大腸菌に本来存在しない表現形質が融合操作により融合株に発現したことから、今後海洋環境中に生息する様々な微生物の有用遺伝子が大腸菌へ形質転換できる可能性が示唆された。

本研究では海洋細菌および大腸菌間の融合で得られた融合株について従来の研究で行われているように、生理・生化学的性状を親株と比較した。一方、遺伝学的性状についても明らかにすることにより、生理・生化学的な性状に基づく融合株の選抜では見出すことのできなかつた融合

株を見出すことが期待できる。第3章では発光遺伝子をターゲットに表現形質の発現が観察されなかった融合株の存在を探索した。しかしながら、本海洋細菌の発光遺伝子の情報は明らかになっていないため、まず標的とする海洋細菌の全発光遺伝子の特定を行った。今回クローニングした発光遺伝子はこれまでクローニングされてきた遺伝子と比較すると全く同一のものは存在せず、本発光遺伝子は海洋細菌の中で特に強い光を発するという新規な特徴がある。生物発光は蛍光と並んでイメージングによく使用されている手法であり、これまで市販されているルシフェラーゼとルシフェリンは主にホタルやウミシイタケ由来のものが多く、海洋細菌由来のものはほとんど見当たらないのが現状である。今後本ルシフェラーゼ遺伝子の性質をより詳細に調べることにより、細胞機能解析の試薬として使用できるようにしたいと考えている。

プロトプラスト融合により得られた融合株の選択についてもこれまで顕微鏡観察や大きさの比較など様々な方法が用いられてきた。しかしながら、融合株は親株と比較してこれらの性質が変わっていることから、プロトプラスト融合は単純な遺伝子組換えとは異なり、ある特定の部位でのみ融合が選択的に起きるのではなく、遺伝子の特定の部分にランダムに生じる可能性が高い。これを立証するには両親株の全ゲノム配列を融合株のものと比較しなければならないが、これには莫大な時間とコストがかかるため、現段階では実現不可能であると思われる。しかし、親株に保有が確認されている特定遺伝子を融合株で確認することにより、プロトプラストの融合現象を調べることは可能である。本研究でも融合株の第一段階の選択に抗生物質耐性能および発光能の有無を取り上げ、155株の融合候補株を取得した。これらの融合候補株の中から発光遺伝子断片を検出した結果、16S rRNAによる同定では大腸菌の性質を持つと

思われる 5 株の融合株から *luxA* の一部分の断片の挿入が確認され、そのうちの 2 株から *luxA* の一部分に加え、*luxB* の全塩基配列の挿入が確認された。このことから発光遺伝子の断片が融合により大腸菌に形質転換されたことが明らかになり、表現形質のみならず遺伝学的にも変異が生じていることが確認できた。また、確認された発光遺伝子断片の塩基配列はすべて親株の塩基配列と完全に一致し、変異が全く認められないことから、遺伝子の水平伝播は起こっているものの、検出範囲内では遺伝子配列の変異が起きていないことが明らかになった。しかしながら、これは標的にした遺伝子配列の範囲内での結果であり、標的以外の融合状況の解明は難しい。本研究では発光細菌を融合のモデル細菌として使用し、その発光遺伝子の塩基配列を明らかにし、標的に用いることでプロトプラスト融合が生じたことを遺伝学的方法で証明することができ、融合のモデルとしての有用性をより明確に示すことができた。

本研究では海洋細菌と大腸菌間で融合を行ってきたが、その融合率は他の報告されている微生物間での融合率と比較するとかなり低い値であることから、今後融合率をさらに向上させる必要があった。これまでにプロトプラスト形成、融合、再生の各段階について詳細に検討してきたが、どの段階でもプロトプラスト状態の細菌の破裂が最も大きな問題となっていた。そこで第 4 章ではこの問題を解決するために、プロトプラストの安定性に注目し、安定性の改善による融合率の向上を検討した。その結果、供試菌株の細胞膜の安定性に影響を与える脂肪酸の添加が融合率の向上に有効であることが判明した。また代表的な 8 種類の脂肪酸を添加した結果、脂肪酸の種類によってプロトプラストの遠心力に対する安定性が高くなるものや、低くなるものおよび全く変化しないものの 3 つのタイプに分類できたが、添加した脂肪酸の炭素数や二重結合の数

との間に相関は見られなかった。本実験ではレシピエントとして使用した大腸菌は外部から遺伝子を受け入れ、さらに安定した融合および再生を行う必要があるためにプロトプラストの強度が大きくなる必要があるため、脂肪酸添加培養により安定性が增大するような脂肪酸を選択した。一方、ドナーとして使用した海洋細菌は融合しやすく、また自らの遺伝子を相手に形質転換しやすくするためにはプロトプラストの安定性が低下する脂肪酸を選択した。その結果、両親株に適した脂肪酸をそれぞれ添加して培養することでプロトプラスト融合率をさらに向上させることができた。すなわち海洋細菌のモデルとして使用した *S. woodyi* 02HA-5-1 株については EPA の添加が、大腸菌についてはリノール酸およびリノレン酸の添加が最適であった。なお、本実験では添加した脂肪酸の濃度を 1mg/ml に固定したが、この濃度を変更したり、その他の細胞膜の安定性に影響を与える諸条件について検討することにより、さらに融合率を向上させることも可能であろう。

本研究では培養可能な微生物同士でのプロトプラスト融合を試み、その融合率の向上を目的として実験を行ってきた。本方法の応用を行う上で、環境に存在する生きてはいるが培養が難しい、いわゆる VBNC 状態の微生物についてもモデル系を構築する必要があると思われた。そこで第 5 章では VBNC 状態の発光細菌と大腸菌間で融合を試みた。しかしながら、これまで VBNC 状態の細菌と培養可能なもの同士間でプロトプラスト融合を試みた例は皆無の状況である上に VBNC 状態の細菌はその諸性状が明らかにされていないことから実際融合が生じたとしても VBNC 状態の細菌由来なのかどうかを検証することは困難である。そこで、本研究では諸性状が明らかな発光細菌を VBNC 状態に誘導し、これを用いて大腸菌とプロトプラスト融合を行った。その結果、発光細菌は培養 63 日後に完

全に VBNC 状態に誘導され、VBNC 状態の微生物のモデルとしても十分使用可能であり、本供試菌が有する豊富なマーカーをそのまま融合株の選択の標的にすることから大変良い VBNC 状態の海洋細菌のモデルが構築できた。この VBNC 状態の海洋細菌と大腸菌間でプロトプラスト融合を行った結果、融合率は VBNC 状態に誘導する前のものと比較して約 1/3 と低い値ではあったが、高い抗生物質耐性能を有する大腸菌タイプの融合株を取得することができ、VBNC 状態の微生物が培養可能な微生物とプロトプラスト融合が可能であることが明らかとなった。本研究では抗生物質耐性のみを標的にして融合のモデル実験を行ったが、第 3 章に示したように、抗生物質耐性以外の遺伝子の伝播も生じているものと推察された。

これまで培養可能な微生物同士および VBNC 状態の細菌のプロトプラスト融合を試みたが、これら以外にも海洋中には、多種多様の遊離 DNA が存在し、さらに細菌と遊離 DNA などのすべてを含む天然海水サンプルとのプロトプラスト融合法を応用した形質転換はまだ行われていない。そこで、第 6 章ではまず遊離 DNA の大腸菌への形質転換を行った。モデル遊離 DNA をプロトプラスト状態になっていない大腸菌と混合しても形質転換株が得られなかったのに対し、プロトプラスト状態になった大腸菌へ形質転換すると KM 耐性を有する融合株を取得することができた。このことから、大腸菌をプロトプラスト化することにより遊離 DNA の取り込み率も向上することが明らかになった。実際、自然環境中では遊離 DNA の生細胞への取り込みが頻繁に起きていることが知られているが、⁸⁴⁾ プロトプラスト状態ではその取り込み速度をさらに加速すると考えられた。

モデル遊離 DNA を用いた場合に大腸菌へ形質転換可能であったことから、天然海水サンプル中の遊離 DNA を用いてプロトプラスト融合法の応用を検討した。加熱処理により生菌を殺滅した東京湾 6 点の天然海水サ

サンプル中の遊離 DNA を大腸菌へ形質転換した。その結果、高い抗生物質耐性を有する融合株を取得することができたことから、天然海水サンプル中の遊離 DNA が大腸菌へ形質転換されることが明らかとなった。また、その形質転換株は東京湾湾央部で採集されたサンプルよりも多摩川、江戸川および荒川の河口域に多く存在し、養魚場などでよく使用されている抗生物質に耐性を有する株が数多く存在することから、恐らく人為的に使用した抗生物質の影響でその海域に遊離の抗生物質耐性遺伝子が多く存在し、今回の形質転換により大腸菌側に形質転換されたものと考えられた。現存水産業の分野では養魚場での抗生物質の使用による抗生物質耐性株の出現が大変深刻な問題になっている。これらの微生物は養魚場だけでなく、河川などを通じて海洋に流入し、海洋環境の汚染を招いている。これらの遊離 DNA は自然の形質転換などを通じてさらに多くの微生物に移行し、新しい抗生物質耐性株を自然に作出しているものと思われる。また、これらの形質転換株はプラスミドの保有が全く確認されていないことから、ゲノム上で形質転換が生じたものと推定された。天然海水サンプル中の遊離 DNA の大腸菌への形質転換が可能であることが確認できたので、加熱処理を行っていない天然海水サンプル DNA を大腸菌へ形質転換することを試みた。なお、海洋環境中に元々存在する大腸菌と区別するために GFP 標識した大腸菌を作成し、天然海水サンプルの遊離 DNA を形質転換した結果、幾つかの形質転換株が得られ、天然海水サンプル中の遊離 DNA が大腸菌へ形質転換可能であることが示唆された。特に生菌数や抗生物質耐性菌が最も多い東京湾のサンプルを用いた時の形質転換率が最高であったことから、形質転換率は用いたサンプルの菌の組成に大きく影響されると考えられた。また、個々の海域の全菌数と形質転換率に正の相関が見られたことから、今後使用する海水サンプル

の全菌数を増加することで形質転換株をさらに多く取得できると推測された。また、抗生物質耐性を指標とした形質転換株の検出では遊離 DNA のみを用いた場合より多いことから、海水サンプル中に存在する生きた微生物の影響が大きいと考えられた。すなわち、微生物間の遺伝子水平伝播も遊離 DNA による形質転換同様に生じやすいことが示唆された。

本研究ではドナーである海洋細菌の効率的なプロトプラスト融合法を開発し、融合株の諸性状を調べた結果、レシピエントである大腸菌で様々な表現形質の発現や遺伝子の挿入が確認された。また、培養可能な海洋細菌だけでなく、難培養性微生物や環境中の遊離 DNA および天然海水サンプルについても本方法は応用可能であることが確認された。今後、その他の様々な海洋細菌や自然環境サンプルについても融合を行うことで、目的に適した新規微生物遺伝資源の発見に役立つことを期待している。

参考文献

- 1) 加藤清昭, 山本勝也, 信濃晴雄. 海洋細菌の利用に関する研究(第1報) 有用酵素の予備的検索. 食品総合研究所研究報告 1973; 28: 114-125.
- 2) Nichols CA, Bowman JP, Guezennec J. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents. *Mar. Biotechnol.* 2005; 7: 253-271.
- 3) 清水潮. バイオテクノロジーに関する海洋細菌研究の現状と展望. 発酵と工業 1988; 46: 183-188.
- 4) Kumar P, Jyothsna TS, Srinivas TNR, Sasikala C, Ramana CV, Imhoff JF. *Marichromatium bheemlicum* sp. nov., a non-diazotrophic, photosynthetic gammaproteobacterium from a marine aquaculture pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007; 57: 1261-1265.
- 5) 丸山明彦, 田中一裕, 東原孝規, 倉根隆一郎. 微生物による流出油漂着沿岸海域の環境修復技術に関する研究 (II) 沿岸海域における微生物の流出油分解機能の評価技術. 環境保全研究成果集 2004; 2002: 1-27.
- 6) Imada C, Koseki N, Kobayashi T, Hamada-Sato N, Kamata M. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica* 2007; 21: 27-31.
- 7) 菅原 庸. 海洋微生物が生産する溶菌酵素. 日本防菌防黴学会

- 1994; 22: 225-229.
- 8) 稲垣史生. 難培養微生物の利用研究の最前線 海底下生命圏に潜在する未知微生物・遺伝子資源の地理的分布と多様性. 月刊バイオインダストリー 2006; 23: 34-43.
 - 9) Colwell RR. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* 2000; 6: 121-125.
 - 10) Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, Hugenholtz P, Kim H, Kamagata Y, Nakamura K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003; 53: 1155-1163.
 - 11) Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 695-700.
 - 12) 辻元豪三. 網羅的遺伝子発現解析 (DNA チップ, マイクロアレイ) とそのゲノム創薬への応用. 日薬理誌 2005; 125: 153-157.
 - 13) 渡辺一哉. メタゲノムと微生物生態解析. 極限環境微生物学会誌 2005; 4: 74-76.
 - 14) Manome A, Zhang H, Tani Y, Katsuragi T, Kurane R, Tsuchida T. Application of gel microdroplet and flow cytometry techniques to selective enrichment of non-growing bacterial cell. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 197: 29-33.

- 15) Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M. Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; **99**: 15681-15686.
- 16) Schut F, Vries EJ, Gottschal JC, Robertson BR, Harder W, Prins RA, Button DK. Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; **59**: 2150-2160.
- 17) Carlson PS, Smith HH, Dearing RD. Parasexual interspecific planthybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1972; **69**: 2292-2294.
- 18) Keller WA, Melchers G. The effect of high pH and calcium on Tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch.* 1973; **8**: 737-741.
- 19) Melchers G, Sacristan MD, Holder AA. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commum.* 1978; **43**: 203-218.
- 20) Ohgawara T, Kobayashi S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor. Appl. Genet.* 1985; **71**: 1-4.
- 21) Vanwert SL, Saunders J. Electrofusion and electroporation of plants. *Plant Physiol.* 1992; **99**: 365-367.
- 22) Grosser JW, Olivares-Fuster O, Ollitrault P, Montpellier FRA. Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2000; **36**:

- 434-449.
- 23) Imada C, Okanishi M, Okami Y. Intergenous protoplast fusion between *Streptomyces* and *Micromonospora* with reference to the distribution of parental characteristics in the fusants. *J. Biosci. Bioeng.* 1999; 88: 143-147.
 - 24) Agbessi S, Beausejour J, Dery C, Beaulieu C. Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 62: 233-238.
 - 25) Prabavathy V, Mathivanan N, Sagadevan E, Murugesan K, Lalithakumari D. Intra-strain protoplast fusion enhances carboxymethyl cellulase activity in *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 2006; 38: 719-723.
 - 26) 勝田佳明, 細藤慎司, 大薮剛, 吉本明弘. アントラサイクリン抗生物質生産菌 *Streptomyces violaceus* A262 及び *Streptomyces* sp. D788 より生合成ブロック変異株の単離と異種間プロトプラスト融合の試み. 生物生産学研究 1995; 34: 33-41.
 - 27) Das A, Ghosh A. Breeding by protoplast fusion for glucoamylase production. *Biotechnol. Lett.* 1989; 11: 705-708.
 - 28) 山中信介, 松澤一幸, 山下浩一, 大森千寿代. プロトプラスト融合による正暦寺酵母の改良. 奈良県工業技術センター 研究報告 2000; 26: 36-41.
 - 29) Ikeda H, Inoue M, Tanaka H, Omura S. Interspecific protoplast fusion among macrolide-producing *streptomycetes*. *J. Antibiot.* 1984; 37: 1224-1230.

- 30) Okamura T, Nagata S, Misono H, Nagasaki S. New antibiotic-producing *Streptomyces* TT-strain, generated by electrical fusion of protoplasts. *J. Ferment. Bioeng.* 1989; 67: 221-225.
- 31) Imada C, Ikemoto Y, Kobayashi T, Hamada N, Watanabe E. Isolation and characterization of the interspecific fusants from *Streptomyces* obtained using a liquid regeneration method. *Fish. Sci.* 2002; 68: 395-402.
- 32) Jacquelyn G, Black. 1.4 原核生物と真核生物の特徴. 「ブラック微生物学」(林英生, 岩本愛吉, 神谷茂, 高橋秀実監訳) 丸善株式会社, 東京. 2003; 220-230.
- 33) Schaeffer P, Cami B, Hotchkiss RD. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1976; 73: 2151-2155.
- 34) Okanishi M, Suzuki N, Furuta T. Variety of hybrid characters among recombinants obtained by interspecific protoplast fusion in *Streptomyces*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996; 60: 1233-1238.
- 35) Rhodes ME, Payne WJ. Influence of cations on spheroplasts of marine bacteria functioning as osmometers. *Appl. Microbiol.* 1967; 15: 537-542.
- 36) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 1995; 59: 143-169.
- 37) 倉根隆一郎, 土田隆康. 難培養性微生物を分離する新しい方法. *化学と生物* 2001; 39: 431-433.
- 38) Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural

- genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 1994; 58: 563-602.
- 39) Hotta K, Yamashita F, Okami Y, Umezawa H. New antibiotic-producing *Streptomyces*, selected by antibiotic resistance as a marker. II. Features of a new antibiotic-producing clone obtained after fusion treatment. *J. Antibiot.* 1985; 38: 64-69.
- 40) Yamashita F, Hotta K, Kurasawa S, Okami Y, Umezawa H. New antibiotic producing *Streptomyces*, selected by antibiotic resistance as a marker. 1. New antibiotic production generated by protoplast fusion treatment between *Streptomyces griseus* and *S. tenjimariensis*. *J. Antibiot.* 1985; 38: 58-63.
- 41) Gomi S, Ikeda D, Nakamura H, Nakagawa H, Yamashita F, Hotta K, Kondo S, Okami Y, Umezawa H, Iitaka Y. Isolation and structure of a new antibiotic, indolizomycin produced by a strain SK2-52 obtained by interspecies fusion treatment. *J. Antibiot.* 1984; 38: 1491-1494.
- 42) Ezaki T, Hashimoto Y, Yamamoto H, Lucida ML, Liu SL, Kusunoki S, Asano K, Yabuuchi E. Evaluation of the microplate hybridization method for rapid identification of *Legionella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1990; 9: 213-217.
- 43) Smibert RM, Krieg N. Manual of methods for general bacteriology. *Amer. Soc. Microbiol.* 1981; 50: 409-443.
- 44) Makemson JC, Fulayfil NR, Landry W, Vanert LM, Wimpee CF, Widder EA, Case JF. *Shewanella woodyi* sp.nov., an exclusively

- respiratory luminous bacterium isolated from the alboran sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47: 1034-1039.
- 45) Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989; 39: 224-229.
- 46) 郡司章, 延城聰. 多酸性酵母の育種. 茨城県工業技術センター研究報告 1992; 20: 74-80.
- 47) Rajendran N, Sivamani E, Jayaraman K. Expression of the insecticidal crystal protein gene from a Gram-positive *Bacillus thuringiensis* in a Gram-negative *Pseudomonas fluorescens* mediated by protoplast fusion. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994; 122: 103-108.
- 48) Chen W, Nagashima K, Kajino T, Ohmiya K, Shimizu S. Intergeneric protoplast fusion between *Ruminococcus albus* and an anaerobic recombinant, FE7. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988; 54: 1249-1253.
- 49) Chen W, Ohmiya K, Shimizu S. *Escherichia coli* spheroplast-mediated transfer of pBR322 carrying the cloned *Ruminococcus albus* cellulase gene into anaerobic mutant strain FEM29 by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 54: 2300-2304.
- 50) 柳田友道. IX-1-1 グラム陰性菌からの RNA の調製. 「分類・代謝・

- 細胞生理」学会出版センター，東京．1988；86-87.
- 51) Kita-Tsukamoto K, Yao K, Kamiya A, Yoshizawa S, Uchiyama N, Kogure K, Wada M. Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 256: 298-303.
- 52) 今田千秋，東ひろみ，小林武志，櫻井美代子，濱田(佐藤)奈保子，渡辺悦生．エチレンジアミン四酢酸鉄キレート(Fe-EDTA)の海洋細菌による分解. 水環境学会誌 2003; 26: 231-235.
- 53) Wimpee CF, Nadeau TL, Nealson KH. Development of species-specific hybridization probes for marine luminous bacteria by using *in vitro* DNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991; 57: 1319-1324.
- 54) 野島博．手軽なコンピテントセル作成と形質転換法. 実験医学 1998; 16: 1681-1682.
- 55) Wu C, Teo VS, Farrell RL, Bergquist PL, Nevalainen KM. Improvement of the secretion of extracellular proteins and isolation and characterization of the amylase I (*amy1*) gene from *Ophiostoma floccosum*. *Gene* 2006; 384: 96-103.
- 56) 臼井英夫．電気融合によりタバコ葉肉プロトプラストから得られた多核体の核分裂. 三重大学教育学部研究紀要 自然科学 1991; 42: 35-41.
- 57) Okamura T, Nagata S, Misono H, Nagasaki S. Interspecific electrofusion between protoplasts of *Streptomyces antibioticus* and *Streptomyces fradiae*. *Agric. Biol. Chem.* 1988; 52: 1433-1438.

- 58) 岡田憲幸, 塚本チセ, 新国佐幸, 真鍋勝. *Bacillus subtilis* および *B. megaterium* を用いる同種間細胞融合-プロトプラスト再生培地におけるコロニー出現と高張剤濃度. 食総研報 1989; 53: 10-16.
- 59) Muralidhar RV, Panda T. Fungal protoplast fusion-a revisit. *Bioprocess Eng.* 2000; 22: 429-431.
- 60) Pattanavibool R, Von Aderkas P, Klimaszevska K. Interspecies protoplast fusion in *Larix*: comparison of electric and chemical methods. *In Vitro Cell & Dev. Biol. Plant.* 1998; 34: 212-217.
- 61) Okanishi M, Yamaura Y, Furuta T. Variety of intracellular products among recombinants obtained by interspecific protoplast fusion in *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997; 61: 748-751.
- 62) 金政泰弘. 細菌表層の適応現象. 病態生理 1986; 485-487.
- 63) Jacquelyn G, Black. 1.4 原核生物と真核生物の特徴. 「ブラック微生物学」(林英生, 岩本愛吉, 神谷茂, 高橋秀実監訳) 丸善株式会社, 東京. 2007; 86-88.
- 64) Treen M, Uauy RD, Thomas VL, Hoffman DR, Jameson DM. Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 294: 564-570.
- 65) Belagyi J, Pas M, Raspor P, Pesti M, Pali T. Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1421: 175-182.
- 66) 佐伯和弘, 谷口俊仁, 細井美彦, 松本和也, 入谷明, 松葉純子. ウシ卵子成熟用培地への不飽和脂肪酸の添加が体細胞核移植におけ

- る細胞融合に及ぼす影響. 近畿大学先端技術総合研究所紀要 2004;
9: 9-14.
- 67) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37: 911-917.
- 68) Watanabe K, Ishikawa C, Inoue H, Deng CH, Yazawa K, Kondo K. Incorporation of exogenous docosahexaenoic acid into various bacterial phospholipids. *Jaocs.* 1994; 71: 325-330.
- 69) Hodge DR, Clausen PA. Transcriptional activation analysis using bioluminescent reporter assays. *Mol. Biotechnol.* 2000; 16: 67-76.
- 70) Fang J, Lyon DY, Alvarez P, Wiesner MR, Dong J. Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environ. Sci. Technol.* 2007; 41: 2636-2642.
- 71) Beltrametti F, Barucco D, Rossi R, Selva E, Marinelli F. Protoplast fusion and gene recombination in the uncommon actinomycete *Planobispora rosea* producing GE2270. *J. Antibiot.* 2007; 60: 447-454.
- 72) Muranishi S, Tokunaga Y, Taniguchi K, Sezaki H. potential absorption of heparin from the small intestine and the large intestine in the presence of monoolein mixed micelles. *Chem. Pharm. Bull.* 1977; 25: 1159-1161.
- 73) Lucy JA. Membrane fusion cell surface review. *Elsevier/North-Holland Biomedical Press.* 1978; 5: 267-304.

- 74) 吉永郁生, 片野坂徳章, 上野雄介. 土壌・水圏における Viable but nonculturable (VBNC) 微生物 VBNC 海洋細菌の分子生物学的検討. *Microbes Environ.* 1999; 14: 123-129.
- 75) 小野 玲, 宮崎 亮, 永田裕二, 津田雅孝. 難培養微生物の利用研究の最前線 環境汚染物質を分解する酵素遺伝子の土壌からの直接的取得と解析. 月刊バイオインダストリー 2006; 23: 44-49.
- 76) Eiler A, Bertilsson S. Detection and quantification of *Vibrio* populations using denaturant gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods.* 2006; 67: 339-348.
- 77) Wong HC, Wang P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 96: 359-366.
- 78) Vattakaven T, Bond P, Bradley G, Munn CB. Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006 ; 72 : 6508-6513.
- 79) Ordax M, Marco-Noales E, Lopez MM. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006 ; 72 : 3482-3488.
- 80) Cross JB, Currier RP, Torraco DJ, Vanderberg LA, Wagner GL, Gladen PD. Killing of *Bacillus* spores by aqueous dissolved

- oxygen, ascorbic acid, and copper ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 2245-2252.
- 81) Mizunoe Y, Wai SN, Takade A, Yoshida S. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* 0157 cells by using H₂O₂-degrading compounds. *Arch. Microbiol.* 1999; 172: 63-67.
- 82) 丸山史人, 谷 佳津治, 那須正夫. 自然生態系における細胞外 DNA の動態と遺伝子伝播. 環境バイオテクノロジー学会誌 2005; 4: 131-137.
- 83) Day M. Bacterial sensitivity to bacteriophage in the aquatic environment. *Sci. Prog.* 2004; 87: 179-191.
- 84) Jacquelyn G, Black. 第 8 章 遺伝子移行と遺伝子組み換え技術. 「ブラック微生物学」(林英生, 岩本愛吉, 神谷茂, 高橋秀実監訳) 丸善株式会社, 東京. 2003; 226-228.
- 85) 農林水産省消費・安全局 畜水産安全管理課. 第 20 報 水産用医薬品の使用について 農林水産省, 東京. 2006; 1-25.

謝辞

はじめに本研究を行うに当たり直接ご指導くださいました東京海洋大学 大学院 海洋科学技術研究科 応用微生物学講座 今田千秋教授に謹んで御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり貴重な助言および御校閲を賜りました当講座の小林武志准教授及び濱田奈保子准教授ならびに同大学 海洋科学部 海洋環境学科 生物環境学講座 浦野直人教授に厚く御礼申し上げます。

共同研究者としてプロトプラスト融合技術を詳細にご教授くださいました山野美容芸術短期大学 美容芸術学科 鎌田正純准教授に心から感謝致します。

本研究において共同研究として海洋細菌の同定をサポートしていただいた東京大学 海洋研究所 木暮一啓教授および同研究室の皆様へ深く感謝いたします。

本研究において脂肪酸の分析にご協力いただいた本大学ヘルスフード科学講座の西原政晃氏および岩崎純氏に深く感謝いたします。

本研究を行うに当たり、サンプリングにご協力頂いた本講座の野村道康氏、春成円十郎氏、武本裕樹氏ならびに様々の実験に協力頂いた高正秀氏、王旭光氏、樂天堯氏を始めとする友人たちにも多くのご応援を頂きました。ありがとうございました。

私が本研究室に入る機会を与え、初めて日本に来た時からずっと暖かく見守ってくださいました元東京水産大学大学院 食品生産学専攻応用微生物学講座 渡辺悦生教授に謹んでお礼申し上げます。

日本の留学生活をもっと充実にごさせるように経済的に応援してくださいましたヒロセ国際奨学金財団の皆様へ深くお礼を申し上げます。

最後に、私の長い学生生活をいつも暖かく応援してくれた両親と弟に感謝します。