

医薬生産資源としての新規粘液細菌の探索と特性評価  
(Isolation and characterization of novel myxobacteria and their  
significance as biomedical resources)

2016年1月

博士（工学）

飯 塚 俊

豊橋技術科学大学

## 医薬生産資源としての新規粘液細菌の探索と特性評価

飯塚 俊

### 要旨

粘液細菌は、デルタプロテオバクテリア (*Delataproteobacteria*) 綱のミクソコックス (*Myxococcales*) 目に属するグラム陰性、好気性の従属栄養細菌であり、飢餓ストレスによって栄養細胞が集合する子実体 (fruiting body) に変化し、そこから栄養細胞が再び増殖する生活環を有する。本菌群は古くから土壌、動物の糞、腐朽木などから分離される陸生菌として位置づけられてきたが、分離や純粋培養が比較的困難な菌が多く、生息域や分類学的多様性については未解明な部分が多い。粘液細菌は産業的応用についても注目されているが、抗生物質生産菌としてよく知られる放線菌と比較して研究は遅れている。また、粘液細菌は原核生物の中では最大のゲノムサイズをもつ菌群である(最大約 15 Mb)。以上のように、粘液細菌は、その特異な生活環とともに生物多様性や生態学的役割に興味がもたれているばかりでなく、新規二次代謝産物の探索源としても注目されている。しかしながら、前述のように分離困難なことが多く、探索源として開拓の余地が大きい。以上の背景をふまえて本研究は、海洋、汽水、温泉などのより広い環境を対象として新規粘液細菌の探索と特性評価を行なうこと、およびそれらから新規二次代謝産物を見出すことを目的として実施した。

まず、日本各地の海岸や河口域で採取した試料から、海水あるいは汽水の成分組成を模した寒天培地を用いて粘液細菌を分離した。分離した中で 24 株は、先行研究で分離した菌株と同様、浅く陥没したクレーター状もしくは薄膜状の溶菌性 swarm を形成し、外見上は既知の *Nannocystis* 属や *Chondromyces* 属粘液細菌と似ていた。これらの溶菌性 swarm 形成菌について、先行研究で得た未同定の swarm 形成菌 25 株も加え、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析を行なった。それらは既知の陸生粘液細菌から属レベルで隔たり、*Nannocystineae* 亜目中の新規な分類群を形成した。その内の 2 菌株は、NaCl や海水中カチオン ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  および  $K^{+}$ ) が生育に必要で、最適 NaCl 濃度は 2-3% (w/v) であり、これらについて新属新種名 *Plesiocystis pacifica* を提唱した。ほかの 6 株も NaCl や海水中カチオン ( $Mg^{2+}$  または  $Ca^{2+}$ ) を生育に要求し、最適 NaCl 濃度は 1-2% であり、これらについて新属新種名 *Enhygromyxa salina* を提唱した。汽水環境からは、海水より低塩分の環境に適応した溶菌性粘液細菌として 2 株を分離した。その 1 株、SYR-2<sup>T</sup> 株は NaCl 濃度範囲 0-2% (至適濃度 0.5-1%) で生育し、カチオン ( $Mg^{2+}$  と  $Ca^{2+}$ ) を要求した。この菌に対し新属新種名 *Pseudenhygromyxa salsuginis* を提唱した。さらに SMH-27-4 株は、分子系統上は既知の海洋性粘液細菌や SYR-2<sup>T</sup> 株とも異なることから、新属新種名 "*Paraliomyxa miuraensis*" を提唱した。

つぎに、新規な粘液細菌の分離源開拓をめざし、50℃以上で生育する高温性菌株の分離を試みた。温泉由来試料を接種源とする 50℃での集積培養によって、27 点から粘液細菌様の滑走細菌が出現した。しかし、集積培養物には他の滑走細菌が混在し、純粋分離は困難だった。集積培養物の系統的位置を推定するため、粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に特異的なプライマーを用いた nested PCR とアンプリコンの系統解析を行った結果、新規な粘液細菌と考えられる 6 クローンを検出した。このように温泉環境由来の粘液細菌の純粋分離に至らなかったが、温泉環境に特異的に適応した新規な高温性粘液細菌の存在が示唆された。

さらに、上記の新規粘液細菌分離株からの抗真菌物質の探索を行った結果、“*Paraliomyxa miuraensis*” SMH-27-4 株に新規な抗真菌物質を見いだした。構造解析の結果、この抗菌物質を新規 19 員環ハロゲン化デブシペプチドと同定し、*miuraenamide* と命名した。本物質は、植物疫病卵菌 *Phytophthora capsici* に対し強力な抗菌性を示した。また、化学構造中に  $\beta$ -methoxyacrylate 残基を含み、酵母ミトコンドリア呼吸鎖の NADH オキシダーゼを強く阻害することから、作用点はミトコンドリア呼吸鎖と推定された。

以上のように、本研究では、分類学的に新規な粘液細菌を多数分離し、その 1 株から抗菌活性を有する新規二次代謝産物を発見し、新たな生物遺伝資源としての海洋性および汽水性粘液細菌の生物学的、産業的意義を証明した。

# Isolation and characterization of novel myxobacteria and their significance as biomedical resources

Takashi Iizuka

## Abstract

Myxobacteria are Gram-stain-negative bacteria that belong to a monophyletic phylogenetic group as the order *Myxococcales* in the class *Deltaproteobacteria*. Cells move by gliding across solid surfaces and form spreading colonies or so-called “swarms”. They show complex cellular life cycles with cell to cell signaling networks and conspicuous morphogenetic abilities including fruiting-body formation. Within the maturing fruiting body, the vegetative cells convert into short, optically refractive myxospores. The myxospores are resistant to desiccation or starvation and allow myxobacteria to survive under unfavorable environmental conditions. With respect to physiology, myxobacteria are categorized into two nutritional groups, one of which is of the predatory type decomposing cells of other microorganisms, and one of which is of the cellulolytic type feeding on rotten plant materials. Both groups of the myxobacteria produce secondary metabolites. Myxobacteria have large genome sizes compared to other phylogenetic groups of bacteria. The largest genome size (15 Mb) among the prokaryotes has been reported for a strain of *Sorangium cellulosum*. Such large genomes allow to have many functions of proteins resulting in the production of diverse secondary metabolites.

Although myxobacteria have for long time been described as soil and terrestrial bacteria, our previous study revealed that coastal marine environments yield slightly halophilic myxobacteria. Therefore, the main purposes of this study are to isolate novel myxobacteria from more diverse habitats including marine environments and hot springs and to characterize them from phylogenetic and taxonomic viewpoints. In addition, I tried to find out novel secondary metabolites from these isolates and evaluated the significance of the novel myxobacteria as the biomedical resources.

A total of 24 strains of myxobacteria that formed swarms on agar solid media with viable cells of Gram-negative bacteria were isolated from coastal samples collected from different areas in Japan. No cellulolytic marine myxobacteria were isolated. Out of the 29 isolates, 5 seemed to be halotolerant myxobacteria. The remaining 24 isolates were phylogenetically analysed together with 25 strains previously isolated in our laboratory. 16S rRNA gene sequence comparisons showed that the 49 test strains could be classified into 7 operational taxonomic units designated as OTU-1 to OTU-7 within the suborder *Nannocystineae*. None of the 7 OTUs could be assigned to established genera of myxobacteria; that is, all the OTUs detected were taxonomically new at the generic level. Among the 7 OTUs, 4 OTUs (OTU-1 to OTU-4) were phenotypically characterized in detail from taxonomic viewpoints. Based on these phenotypic data, I proposed 4 novel genera and species, *Plesiocystis pacifica*, *Enhygromyxa salina*, *Pseudenhygromyxa salsuginis*, and *Paraliomyxa miuraensis* to accommodate the strains of OTU-1, OTU-2, OTU-3, and OTU-4, respectively. *Plesiocystis pacifica* and *Enhygromyxa salina* were marine myxobacteria that exhibited optimal growth in a NaCl range of 1 to 2%. On the other hand, *Pseudenhygromyxa salsuginis* and *Paraliomyxa miuraensis* are brackish water myxobacteria that grew best at lower concentration of NaCl (0.5-1.0 %).

Both marine and brackish water myxobacteria isolated in this study were mesophilic, showing the highest growth temperature up to 45°C. Therefore, I further tried to isolate thermophilic myxobacteria as additional biomedical resources. Cultivating hot spring samples on solid media at 50°C resulted in the formation of swarm-like colonies. However, it was very hard to purify myxobacteria from these cultures because of the co-existence of other gliding bacteria. Thus, I attempted to detect myxobacteria in the thermophilic cultures by PCR cloning and sequencing of 16S rRNA genes. A clone library constructed by nested PCR using myxobacteria-specific primers and the bulk DNA from the thermophilic cultures generated 6 clones that represent new lineages within the suborders *Sorangiiineae* and *Nannocystineae*.

In order to find out novel secondary metabolites, I prepared culture extracts from the 49 isolates of myxobacteria and tested them for anti-fungal activity. As the results, one sample prepared from *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> showed significant inhibitory activity against the oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. A novel cyclic depsipeptide compound was retrieved from the culture extract of strain SMH-27-4<sup>T</sup> and was named miuraenamamide. This compound inhibited NADH oxidase activity of yeast mitochondria. Recently, miuraenamamide was also demonstrated to have anticancer activity by another group of researchers.

Based on the aforementioned results, it is logical to conclude that myxobacteria are widely distributed in marine and hot spring environments and are promising resources of novel bioactive compounds applicable for biomedical use.

## 目次

第1章 概論—粘液細菌とは	1
1.1 はじめに	1
1.2 粘液細菌の研究概史	4
1.3 粘液細菌の分類学	7
1.4 粘液細菌の粘質成分および菌体成分	9
1.5 “Social prokaryotes”としての粘液細菌	10
1.6 先行研究における新しい粘液細菌の分離と生態	14
1.7 本研究の目的および本論文の構成	15
第2章 粘液細菌の応用および医薬探索資源としての意義	17
2.1 はじめに	17
2.2 粘液細菌からの生理活性物質の探索	18
2.3 粘液細菌の食農産業への応用	20
2.4 ケミカルバイオロジーの時代における微生物医薬	22
2.5 21世紀における微生物探索の意義	23
第3章 海洋性、汽水性粘液細菌の探索と特性評価	26
3.1 はじめに	26
3.2 実験材料および方法	27
3.2.1 海洋性粘液細菌の分離用試料	27
3.2.2 粘液細菌の分離用培地	29
3.2.3 分離菌株の保存・培養用培地	30
3.2.4 海洋性、汽水性粘液細菌の分離操作	31
3.2.5 供試菌株	33
3.2.6 形態学的表現型試験	34
3.2.7 生理的・生化学的表現型試験	34
3.2.8 API-ZYM 試験	37
3.2.9 キノン分析	38
3.2.10 菌体脂肪酸組成の分析	38
3.2.11 DNA の G+C 含量の測定	39
3.2.12 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅と塩基配列決定	39
3.2.13 系統解析と類別化	40
3.3 結果	41
3.3.1 新規海洋性、汽水性粘液細菌の分離	41
3.3.2 海洋性、汽水性粘液細菌分離株の形態および培養上の特徴	44

3.3.3	16S rRNA 遺伝子配列およびキノン型に基づく分離株の類別化	46
3.3.4	OTU-1 の系統解析	49
3.3.5	OTU-2 の系統解析	50
3.3.6	OTU-3 の系統解析	51
3.3.7	OTU-4 の系統解析	52
3.3.8	OTU-1 の分類学的性状	52
3.3.9	OTU-2 の分類学的性状	57
3.3.10	OTU-3 の分類学的性状	61
3.3.11	OTU-4 の分類学的性状	66
3.4	考察	70
3.4.1.	海洋性、汽水性粘液細菌の分離	70
3.4.2	新規粘液細菌の系統・高次分類	71
3.4.3	OTU-1 に対する新属・新種 <i>Plesiocystis pacifica</i> の提唱	71
3.4.4	OTU-2 に対する新属・新種 <i>Enhygromyxa salina</i> の提唱	73
3.4.5	OTU-3 に対する新属・新種 <i>Pseudenhygromyxa salsuginis</i> の提唱	75
3.4.6	OTU-4 に対する新属・新種 <i>Paraliomyxa miuraensis</i> の提唱	76
第4章	温泉環境由来の新規粘液細菌の探索	79
4.1	はじめに	79
4.2	実験材料および方法	80
4.2.1	温泉試料	80
4.2.2	溶菌性粘液細菌の分離および培養用培地	81
4.2.3	セルロース分解性粘液細菌の分離用培地	82
4.2.4	未純化培養物の保存用培地	83
4.2.5	生育温度検討用培地	84
4.2.6	粘液細菌に混在する滑走性細菌用の培地	84
4.2.7	粘液細菌様培養物からの DNA 抽出	84
4.2.8	16S rRNA 遺伝子の PCR とクローンライブラリーの構築	84
4.2.9	RFLP 解析および塩基配列解読	85
4.2.10	分子系統解析	85
4.3	結果	86
4.3.1	温泉由来粘液細菌の分布	86
4.3.2	温泉由来粘液細菌の集積と培養性状	87
4.3.3	温泉由来粘液細菌様培養物の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析	91
4.3.4	温泉由来粘液細菌様培養物の生育温度特性	95
4.3.5	粘液細菌様培養物に混在する滑走性細菌の分類学的性質	97

4.4 考察	98
第5章 新規抗菌物質ミウラエナミドの単離と特性評価	103
5.1 はじめに	103
5.2 実験材料および方法	104
5.2.1 供試菌株	104
5.2.2 抗菌物質探索用の培地および培養法	104
5.2.3 抗菌物質の探索および生産のための培養条件	105
5.2.4 <i>Phytophthora capsici</i> を用いた抗菌試験法	106
5.2.5 発酵産物・ <b>MA-A(1)</b> および <b>MA-B(2)</b> の精製方法の概要	107
5.2.6 発酵産物のクロマトグラフィーと分画	109
5.2.7 機器分析	109
5.2.8 化学構造決定のための <b>MA-A(1)</b> の誘導体の合成	110
5.2.9 誘導体 <b>10</b> の合成	110
5.2.10 誘導体 <b>11</b> の合成	110
5.2.11 誘導体 <b>12s</b> の合成	111
5.2.12 誘導体 <b>12r</b> の合成	111
5.2.13 <b>MA-A(1)</b> の加水分解とマーフィー法による誘導体化	112
5.2.14 酵母ミトコンドリア画分の抽出	112
5.2.15 呼吸阻害活性の測定	113
5.2.16 抗菌活性の測定法	114
5.3 結果	115
5.3.1 海洋性、汽水性粘液細菌における抗菌物質のスクリーニング	115
5.3.2 新規抗真菌物質の生産と精製	116
5.3.3 新規抗真菌物質 <b>MA-A(1)</b> の質量分析および吸収スペクトル	117
5.3.4 新規抗真菌物質 <b>MA-A(1)</b> の NMR スペクトル	119
5.3.5 <b>MA-A(1)</b> の絶対立体配置の決定および化合物の命名	123
5.3.6 化合物 <b>MA-B(2)</b> の構造決定	125
5.3.7 化合物の生物学的活性	127
5.4 考察	130
5.4.1 海洋性・汽水性粘液細菌からの抗菌物質の検出	130
5.4.2 ミウラエナミド類および誘導体の生物学的活性および構造活性相関	132
5.4.3 ミウラエナミド類と既知物質との比較および抗がん細胞活性	133
第6章 総合考察	135
6.1 新規粘液細菌の生態	135
6.2 新規粘液細菌の系統分類学的位置づけ	137

6.3 医薬資源としての粘液細菌－課題と展望	139
引用文献	145
謝辞	166
付録－論文目録	167

## 第1章 概論—粘液細菌とは

### 1.1 はじめに

粘液細菌 (myxobacteria) は 19 世紀末に発見された原核生物の一群であり、1892 年に発表された *Myxococcus* 属 (Thaxter, 1892) が最初の記載例である。古くから微生物学の教科書には、粘液細菌について以下のような五つの特徴が列挙されている (Stanier *et al.*, 1976)。(1) グラム染色陰性、絶対好気性、従属栄養性の桿菌で、特異な生活環 (life cycle) を有し、飢餓などストレス下で栄養細胞が集合し子実体 (fruiting body) を形成する (子実体の内部に乾燥や飢餓に耐性の粘液孢子 [myxospore] を収納)。(2) 捕食性の滑走性細菌で、呼称のように細胞群から粘質物を分泌しつつ固体表面上を這うように運動し、周囲へと広がる拡散性のコロニー、すなわち“swarm”を形成する (鞭毛はもたず線毛 [pili] が滑走運動に関与)。(3) 土壌や動物の糞や腐朽木などから分離される陸生菌で、生育適温は 15–35°C の常温の範囲にあり、生育 pH 域は中性付近である (土壌環境に偏在するが多くは純粋培養が困難)。(4) 生理的特徴として、溶菌性・蛋白分解性およびセルロース (ろ紙) 分解性の栄養型に二分され、それぞれ土壌中の微生物捕食者、およびバイオマス分解者と推定される。(5) ゲノム DNA の G+C モル含量は 67–72% で、細菌としては高 G+C 群に属する。

粘液細菌は、細胞が凝集して子実体を形成するという見かけ上の類似性のために、ときとして粘菌 (slime molds) と混同されることがある。かつて南方熊楠が観察したことで有名な粘菌は真核生物であり、粘液細菌とはまったく異なる。また、myxospore という用語は、ミクソゾア (Myxozoa) 門に属する小寄生虫である粘液孢子虫 (Myxosporidia) がつくる粘液孢子も指して使われるため、これも混同しやすい。粘液孢子虫の多くは魚類の寄生虫であり、それらの組織内や管腔内で発育して多数の粘液孢子を形成するが、真核生物ということもあり、その大きさは 10–20  $\mu\text{m}$  程度と粘液細菌の孢子と比べても著しく大きい。

粘液細菌の生活環の一時期に出現する子実体が、細菌によるものとして認識されたのは、米国の生物学者 Roland Thaxter の研究以後である。彼は桿菌が集合し、ときには高さ数百  $\mu\text{m}$  に達する子実体へと変化する様子を光学顕微鏡で観察し、細密に描写し記録した (Thaxter, 1892)。これが粘液細菌に関する世界初の学術報告で、“myxobacteria”の術語が初めて用いられた (Reichenbach and Dworkin, 1992)。ここでいう“myxo”とはギリシャ語で粘質物 (slime) を意味し、細胞から粘性物質を分泌する性質を表わしている。粘液細菌は、以上のような独特の性質を有する点で、原核生物のなかで細胞形態学上特異な存在である。

粘液細菌の生活環の模式図を図 1-1 に示す。また、図 1-2 および 1-3 に、それぞれ溶菌性およびセルロース分解性の粘液細菌の子実体の写真を示す。粘液細菌の生活環は大別して二つのサイクルから構成され、栄養増殖（vegetative growth cycle）と分化（developmental cycle）の過程が知られている。前者では、栄養あるいは餌となる微生物が比較的豊富な条件下で、通常の細菌のように二分裂で増殖する。この間にも細胞群集が滑走運動し、他の微生物を溶菌するなどの集団的挙動を示す。栄養源が不足し飢餓状態になると、細胞同士が凝集塊を形成し、多数の細胞と粘質物からなる構造物である子実体へと変化する。子実体の内部には、休眠状態の細胞である粘液孢子が数千〜数万個収納されている。孢子は飢餓や乾燥や高温などの環境ストレスに耐性を有し、場合によっては数十年間の生残が可能である。増殖に好適な条件がそろえば、孢子は発芽し、栄養増殖を再開する。

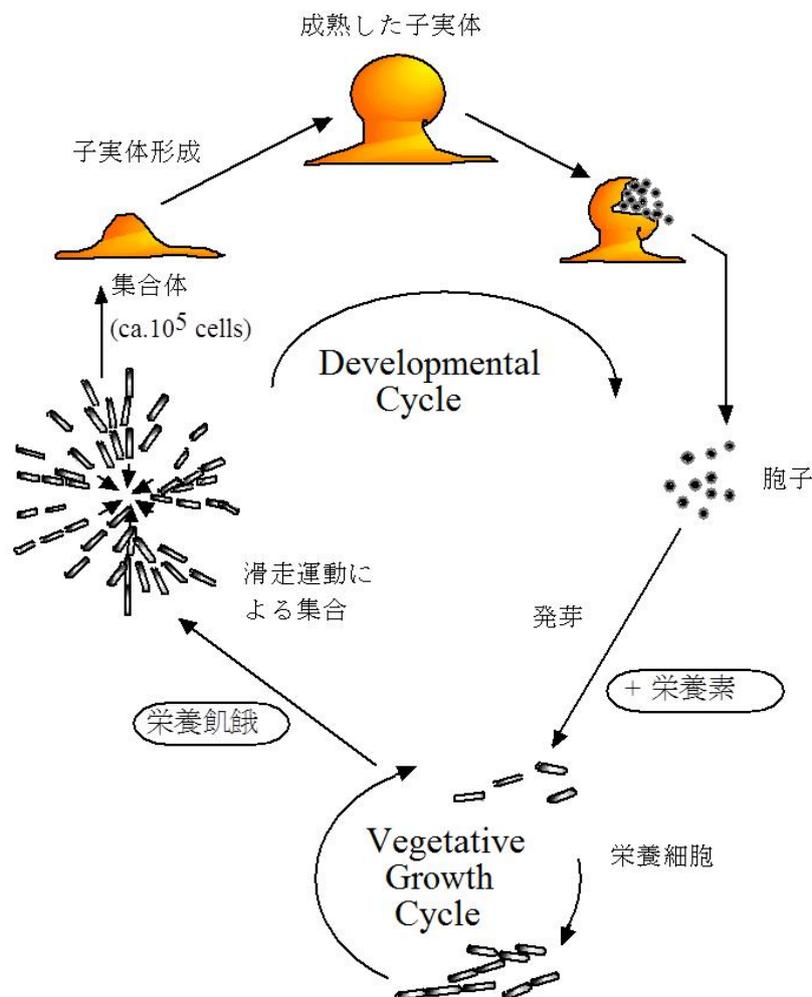


図 1-1. 粘液細菌の生活環. 不藤(2002)から改変.

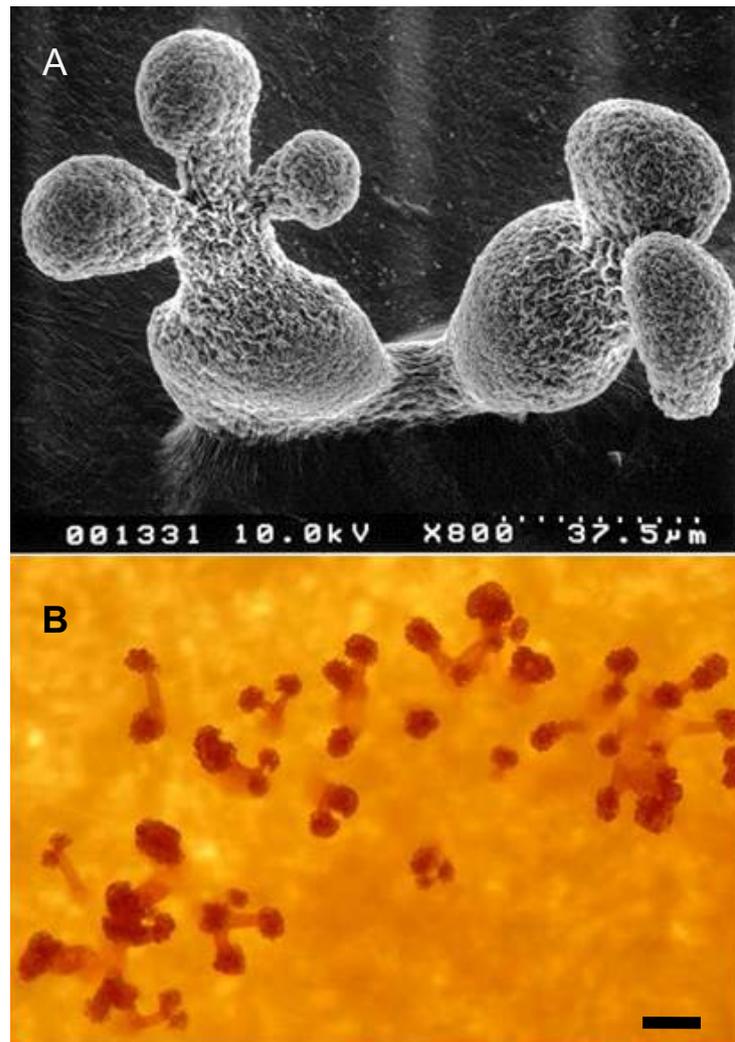


図 1-2. 細菌溶解性粘液細菌の子実体—細菌溶解性菌株. A. *Stigmatella aurantiaca* DW4 の子実体の走査電子顕微鏡像(不藤・山中, 1992). 子実体は、柄の先端に球状—卵型の孢子嚢を持ち、その中に多数の粘液孢子(myxospore)を含む. B. *Chondromyces* sp.の子実体の実体顕微鏡写真. 子実体は、柄の先端に房状の孢子嚢を持ち、その中に多数の孢子を含む(筆者撮影). Bar=100  $\mu$ m.

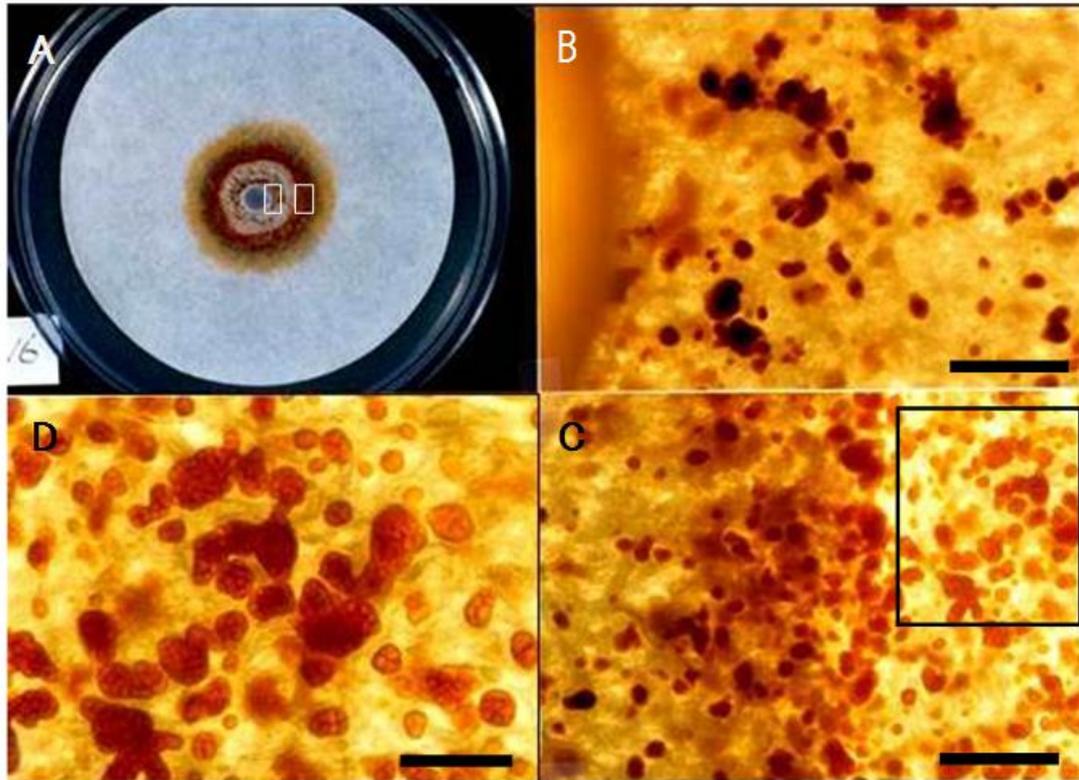


図 1-3. セルロース分解性粘液細菌の子実体. *Sorangium cellulosum* KW6 株の子実体の実体顕微鏡写真(筆者撮影). A, ろ紙上に生育したコロニー(swarm); B, 左側の長方形の内側、寒天片に近い部分の拡大図; C, 右側の長方形内の部分の拡大図. Bar(右下)=0.5 mm D, 黒い長方形内の部分の拡大像. bar(右下)=0.25 mm.

## 1.2 粘液細菌の研究概史

20 世紀に入り、主として形態学的、分類学的な観点からの粘液細菌の研究が開始された。1910 年代以降には、Baur、Kofler、Jahn (1924) らの研究があり (Reichenbach, 2005)、1920-30 年代には Krzemieniewska and Krzemieniewski (1926) の報告がある。Pinoy (1921) は、粘液細菌 *Chondromyces crocatus* によるグラム染色陽性細菌 (*Micrococcus*) の溶菌現象を初めて報告し、粘液細菌がほかの菌を栄養源とすることを示唆した。東北帝国大学の Yoshii (1926) は、日本各地の土壌試料や動物糞から *Myxococcus* 属細菌を分離し、豆腐やおからを培地に加えるなど培養法に工夫を施し、日本初と思われる粘液細菌に関する報告を行なった。二次代謝産物の生産菌として近年に注目されるセルロース分解性粘液細菌については、Imshenetski and Solntseva (1936) や Krzemieniewska and Krzemieniewski (1937) の報告があるが、それらの内容は形態学的、分類学的な記載にとどまった。Solntseva (1939) は、*Chondromyces* などの細菌溶解性の粘液

細菌による植物病原細菌の溶菌について報告したが、これは粘液細菌の農学的応用に関する先駆的研究である。

粘液細菌は、細胞を覆う粘質物により細胞同士が凝集するため、個々の細胞が液体媒質中に分散することがない。したがって、通常の希釈平板法によるコロニー分離が困難な点が、研究上の課題である。分離法として粘液細菌の細菌捕食性に着目し、細菌細胞を「生き餌」とした集積培養法も考案されてきたが、この方法は煩雑な植え継ぎ操作を伴い、効率的な手法ではない。Singh (1947) は細菌溶菌性の粘液細菌の分離および純化法 (live bacteria-baiting method) を考案し、グラム染色陰性菌に対する捕食性を利用して土壌から粘液細菌を分離し、分離株による抗生物質生産の可能性についても言及した。この頃、Oxford (1947) は *Myxococcus virescens* の培養物中に、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* の生育阻害物質を見出した。Katō (1955) は日本の山岳土壌から粘液細菌 *Myxococcus fulvus* を分離し、分離株の抗細菌活性や、すでに出現していた抗生物質耐性菌に対する抗菌性も確認した。1960年代には、おもに土壌試料から分離された粘液細菌の分類学的研究が行なわれた。とくに、McCurdy (1963, 1969, 1989) は多数の菌株を分離し、子実体の形態的特徴などにに基づき粘液細菌を分類した。その頃、粘液細菌に関して、溶菌酵素 (Bender 1962, Gillespie and Cook 1965) や抗インフルエンザウイルス物質 (Katzenberger and Kausche 1957) などの応用研究も開始された (岡崎, 1970)。粘液細菌の二次代謝産物が注目されるようになったのは、Warner & Lambert 社による ambruticin (アンブルテシン) の構造決定の報告 (Ringel *et al.*, 1977) 以降である。1980年代以降は、ドイツの GBF (Gesellschaft für biotechnologische Forschung) が研究を主導した (Reichenbach and Höfle 1989)。日本では、Onishi *et al.* (1984) が粘液細菌の抗生物質の研究を開始し、抗大腸菌物質 M-230B を見出した。その後、抗真菌、抗ウイルスや抗癌活性物質が粘液細菌から続々と発見され、単離・構造決定が行なわれた。近年は粘液細菌のゲノム情報解析も行われるようになり、二次代謝産物の生合成遺伝子群 (polyketide synthase [PKS] genes) の構成や制御機構が解明されつつある (Perlova *et al.*, 2006)。この点は、次の第2章でも触れる。

近年に明らかになった粘液細菌の際立った特徴の一つとして、長大なゲノムサイズを有することが挙げられる (表 1-1)。とくに、セルロース分解性粘液細菌 *Sorangium cellulosum* の一菌株は約 15 Mb のゲノムサイズを有し (Han *et al.*, 2013)、抗生物質の生産菌として知られている *Streptomyces* 属放線菌の 6–12 Mb (Romero-Rodriguez *et al.*, 2015) や、さらに真核生物である出芽酵母サッカロマイセスの 12 Mb をも凌駕している。このように大きなゲノムを有することで、多数の遺伝子が保有され、多様な機能のタンパク質が生産され、複雑な形態分化や、多様な二次代謝産物の生産が可能になったと考えられる。他方で、細菌溶解性の粘液細菌 *Myxococcus* 属や *Stigmatella* 属のゲノムサイズはやや小さく、9–10 Mb と報告されている。これらのサイズも、放線菌に匹敵する大きさであ

り、細菌溶解性の粘液細菌による二次代謝産物の生産能も、決して小さくはないと考えられる。

本章冒頭で述べたように、粘液細菌は長年にわたり好気性菌とされてきたが、2-chlorophenol の脱塩素化菌の集積培養の過程で、嫌気性粘液細菌 *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP が分離された (Sanford *et al.*, 2002)。この菌は重金属還元能や放射性元素 (U, Tc) の還元・不溶化能も示し、重金属や放射性物質で汚染された土壌の浄化への応用も試みられた (Wu *et al.*, 2006; Marshall *et al.*, 2009)。なお、*Anaeromyxobacter* のゲノムサイズは粘液細菌としては比較的小さく、5 Mb と報告され、二次代謝産物の生産遺伝子群は欠失しているようである。

表 1-1. 粘液細菌および他の代表的微生物のゲノムサイズの比較

菌種・菌株	ゲノム サイズ (Mbp)	CDS	文献
粘液細菌			
<i>Sorangium cellulosum</i> So0157-2	14.8	11,599	Han <i>et al.</i> 2013
<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	13.0	9,367	Schneiker <i>et al.</i> 2007
<i>Stigmatella aurantia</i> DW4/3-1	10.3	8,352	Huntley <i>et al.</i> 2011
<i>Haliangium ochraceum</i> SMP-2 <sup>T</sup>	9.44	6,719	Ivanova <i>et al.</i> 2010
<i>Mxococcus xanthus</i> DZ2	9.29	7,709	Müller <i>et al.</i> 2013
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C <sup>T</sup>	5.01	4,346	Thomas <i>et al.</i> 2008
その他の細菌			
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32 (放線菌) <sup>*1</sup>	10.2	9,228	Zhao <i>et al.</i> 2010
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110 (根粒菌)	9.11	8,317	Kaneko <i>et al.</i> 2002
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 <sup>T</sup> (放線菌) <sup>*2</sup>	9.03	7,574	Ikeda <i>et al.</i> 2003
<i>Escherichia coli</i> K-12 (大腸菌)	4.64	4,288	Blattner <i>et al.</i> 1997
<i>Bacillus subtilis</i> 168 <sup>T</sup> (枯草菌)	4.21	4,100	Kunst <i>et al.</i> 1997
<i>Mycoplasma genitalium</i> G37 <sup>T</sup> (マイコプラズマ)	0.58	470	Fraser <i>et al.</i> 1995
<i>Candidatus Carsonella ruddii</i> (細胞内寄生菌)	0.16	182	Nakabachi <i>et al.</i> 2006
アーキア			
<i>Methanococcus jannaschii</i> DSM 2661 <sup>T</sup> (メタン生成菌)	1.66	1,738	Bult <i>et al.</i> 1996
真核微生物			
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 (麹カビ)	37.0	12,074	Machida <i>et al.</i> 2005
<i>Dictyostelium discoideum</i> (粘菌)	34.0	12,500	Eichinger <i>et al.</i> 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C (出芽酵母)	12.1	6,340	Goffeau <i>et al.</i> 1996

\*1, リファマイシン生産菌; \*2, エバーメクチン生産菌

### 1.3 粘液細菌の分類学

従来、粘液細菌の分類では、子実体の形態的特徴をもとに属や種が記載されてきた。子実体の形態や色調は多様で、*Myxococcus* 属の単純な球状、*Cystobacter* 属や *Archangium* 属の不定形集塊状、*Stigmatella* 属や *Chondromyces* 属に見られる樹状のガラス工芸品のような複雑な形状（図 1-2）まであり、子実体の形態的特徴は分類学上重要である。しかし、寒天培地上で培養する間に色調や形態が変化し、また、ときとして子実体を作らなくなるなど、形態的特徴が不安定な場合も多い。近年は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析が確立し、粘液細菌の分類学に客観性が付与された。分子系統解析による系統樹と、形態的分類との照合から、形態的特徴に基づいた従来の分類もおおむね妥当と考えられる（Spröer *et al.*, 1999）。Reichenbach (2005) は、Bergey's manual of Systematic Bacteriology、第 2 版で、粘液細菌群をデルタプロテオバクテリア (*Deltaproteobacteria*) 綱の中の 1 目 (order *Myxococcales*、粘液細菌目)、3 亜目 (suborder)、5 科 (family)、16 属 (genus) に分類した。彼は前掲書の中で、海洋性粘液細菌や通性嫌気性粘液細菌にも言及したが、上記の分類体系には未編入であった。現在における細菌分類学の中での粘液細菌の系統的位置を図 1-4 に、粘液細菌目の高次分類群を表 1-2 に示す。なお、ハリアンギウム (*Haliangiaceae*) 科は正当名としてはまだ認められていない。

粘液細菌に共通の生理的性質として、大部分の属種は溶菌性か蛋白分解性を示すが、*Byssohaga* と *Sorangium* の 2 属はセルロース分解能を示す。筆者の観察では、*Sorangium* 属は弱い溶菌活性も示し、菌株間で活性に差はあるが、大腸菌生菌体はおおむね溶解しにくく、オートクレーブ処理菌体なら溶解する傾向にある。化合物利用性については、筆者の観察では、ほぼすべての粘液細菌の分離株は、カゼインを基質として生育可能であり、この点から考えて、プロテアーゼによる菌体分解産物のアミノ酸やペプチドを利用するらしい。硝酸塩やアンモニウム塩などの無機窒素源の資化能に関しては、セルロース分解性粘液細菌である *Byssovorax* (Reichenbach *et al.*, 2006) と *Sorangium* の 2 属のみが保持する。これらの菌株の多くは、糖と硝酸塩および若干の生育因子を含む単純な組成の培地で培養可能である。粘液細菌の糖の資化性については、*Stigmatella aurantiaca* はグルコースを利用するが、*Myxococcus xanthus* は利用せず、ともにデンプンは利用しない。*Coralloccoccus coralloides* はグルコースやマルトースなどの単糖を利用しないが、デンプンは部分的に分解し、三糖の形で摂取する (Reichenbach, 2005)。本研究の先行研究において、Fudou *et al.* (2002) が記載した海洋性粘液細菌 *Haliangium* は、溶菌性 (蛋白分解性) であり、デンプンは分解するがセルロース (ろ紙) は分解しない。

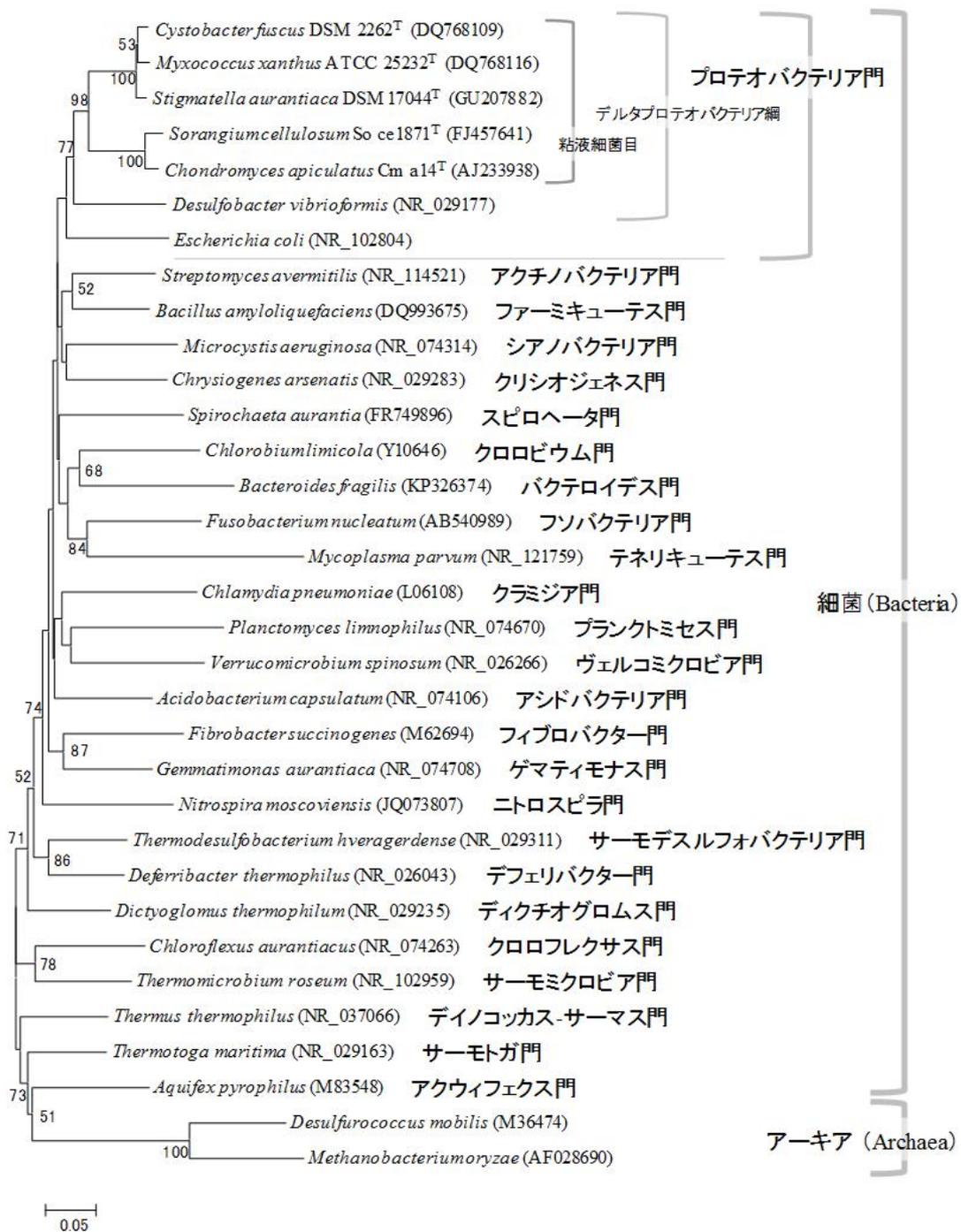


図 1-4. 細菌超界における粘液細菌群の分子系統学的位置. NCBI (National center for biotechnology information) に登録された 16S rRNA 遺伝子配列をもとに作成した近隣結合 (NJ) 系統樹. 細菌の門レベルの呼称を, 系統樹上の各細菌の学名の右側に示す. アーキア (*Desulfurococcus mobilis* および *Methanobacterium oryzae*) の配列を外群とする. 各分岐点の数値は, 1,000 抽出による bootstrap 値 ( $\geq 500$  のみを表示). bar=5% 塩基置換.

粘液細菌の酸素要求性に関しては、陸生粘液細菌属および 1 属の海洋性粘液細菌 (*Haliangium*) はすべて絶対好気性であるが、前述のように通性嫌気性粘液細菌 *Anaeromyxobacter dehalogenans* が発見された (Sanford *et al.*, 2002)。この菌は溶菌性を示さず、子実体も形成しないが、光学的高屈折性を呈する楕円体形の細胞が観察され、これらは粘液胞子と考えられる。また、生理的性質の点では、2-chlorophenol の脱ハロゲン活性を示すなどの特徴を有しており、既知の粘液細菌と性質が大きく異なる。16S rRNA 遺伝子の分子系統上では、シストバクター (*Cystobacteraceae*) 科に属している。粘液細菌目のほかの科に属する嫌気性菌株の報告はない。

近年、*Sorangineae* 亜目の新規粘液細菌が相次いで分離され、新属新種として *Phaselicystis flava* および *Sandaracinus amylolyticus* と命名され、これらを包括する新しい科 (family) として、*Phaselicystidaceae* および *Sandaracinaceae* が提唱された (Garcia *et al.*, 2009; Mohr *et al.*, 2012)。このように、100 年以上の研究史がある陸生粘液細菌ではあるが、21 世紀に入っても新規な高次分類群の発見が相次いでいる。

表1-2. 粘液細菌目 (order *Myxococcales*) の分類群

亜目 (suborder)	科 (family)	基準属 (type genus)
<i>Cystobacterineae</i> (シストバクター)	<i>Cystobacteraceae</i>	<i>Cytobacter</i>
	<i>Myxococcaceae</i>	<i>Myxococcus</i>
<i>Nannocystineae</i> (ナノシスティス)	" <i>Haliangiaceae</i> "	<i>Haliangium</i>
	<i>Kofleriaceae</i>	<i>Kofleria</i>
	<i>Nannocystaceae</i>	<i>Nannocystis</i>
<i>Sorangineae</i> (ソランギウム)	<i>Phaselicystidaceae</i>	<i>Phaselicystis</i>
	<i>Polyangiaceae</i>	<i>Polyangium</i>
	<i>Sandaracinaceae</i>	<i>Sandaracinus</i>

#### 1.4 粘液細菌の粘質成分および菌体成分

粘液細菌が分泌する粘質物の主成分は多糖であり、*Cystobacter* 属や *Archangium* 属の多糖は主にグルコース、ラムノースおよびマンノースから成る。*Stigmatella aurantiaca* の多糖はグルコースやガラクトースを、*Sorangium* 属の多糖はガラクトースやマンノースを多く含む (Reichenbach, 2005)。

陸生粘液細菌の主な脂質成分は、イソ分岐鎖型の C15, C17 脂肪酸、およびモノ不飽和の直鎖 C16 脂肪酸 (C16:1) である。ミクソコックス (*Myxococcaceae*) 科とシストバクター科の菌株はヒドロキシ脂肪酸を含み、その大部分は 2-hydroxy 脂肪酸

(isoC17:1.2OH) である。他方、ポリアンギウム (*Polyangiaceae*) 科、ナノシステイス (*Nannocystaceae*) 科、およびコフレリア (*Kofleriaceae*) 科はヒドロキシ脂肪酸を含まない。*Myxococcus xanthus* のリン脂質の大部分 (60–80%) は phosphoethanolamine で外膜に多く、分岐鎖脂肪酸とともに細胞膜の柔軟性に寄与し、滑走運動を可能にするらしい。ほかの特徴的成分として、細菌には珍しいステロイド脂質を有し、こちらも膜の柔軟性に関与するらしい (Reichenbach, 2005)。*Nannocystis* 属は乾燥重量の 1.5–2.2% の cholestenol と cholestadienol を、*Polyangium* 属は lanosterol を、*Cystobacter* 属は lanosterol 類似物質をそれぞれ含む。*Corallocooccus* 属は squalene や steroid を有し、一方、*Myxococcus*、*Chondromyces* や *Sorangium* の 3 属はこれらを欠く (Reichenbach, 2005)。

菌体に含まれる主要な呼吸鎖キノンは、陸生粘液細菌では menaquinone-8 (MK-8) である (Reichenbach, 2005)。本研究の先行研究にて不藤や飯塚らが見出した海洋性粘液細菌 *Haliangium* 属の場合も、主要キノン種は MK-8 である (Fudou *et al.*, 2002)。菌体 polyamine の主成分は、陸生粘液細菌では homospermidine であるが、海洋性粘液細菌 *Haliangium* 属では spermidine や spermine である (Hamana *et al.*, 1998; 2004)。

粘液細菌の酵素やタンパク質としては、細菌としては報告例が少ない、Ser/Thr protein kinase、DOPA decarboxylase、G-protein や calmodulin-like S-protein が報告され、細胞間信号伝達や細胞の分化誘導に関与するらしい。これらは細胞膜に含まれるステロイド脂質とともに、粘液細菌の真核生物に類似した特徴とされる (Reichenbach, 2005)。

## 1.5 “Social prokaryotes”としての粘液細菌

粘液細菌はその独特の生活環とともに、捕食性を示す点で他の細菌から区別される。粘液細菌は捕食性微生物 (micro predator) とされ、プロテアーゼやグルカナーゼなどを分泌しながら周囲の微生物や有機物を徐々に分解し、溶出するアミノ酸やペプチド、糖などを利用すると考えられる。その際には細胞が群集をなし、粘質物を分泌して固体表面を滑走運動しながら、いわゆるスワーム (swarm) と称する独特の外観の拡散性コロニーを形成する。粘液細菌は鞭毛を有さず、滑走運動には線毛 (pili) が関与する (Dworkin, 2000; Pelling *et al.*, 2005)。スワーム形成の利点は、多数の粘液細菌の細胞からの溶解酵素や抗菌性物質が、周囲の微生物細胞や高分子に対して集積的に作用する点にあるとされる。そのような細胞群集を狼の群れになぞらえ“wolf pack”と呼ぶこともある (Kaiser, 2004)。前述のように、粘液細菌の細胞は粘質物に覆われ純化困難なことが多い。そのため、粘液細菌としては比較的培養が容易で、細胞がかなり分散して生育するモデル微生物として、*Myxococcus xanthus* や *Stigmatella aurantiaca* が従来の研究には繁用されてきた。また、粘液細菌は独特の生活環を有し (図 1-1)、生育に好適な条件下では細胞分裂により増えるが、その場合でも倍加時間は 3–14 時間であり、大腸菌や枯

草菌と比較して増殖速度は遅い (Reichenbach, 2005)。乾燥や栄養制限などの環境ストレスが加わると、多数の栄養細胞が滑走運動して集合し、高さ 100  $\mu\text{m}$ –1.0 mm に達する子実体を形成する (図 1-2, 1-3)。その内部では、一部 (0.1–10%) の栄養細胞が耐久性細胞である孢子に変化し、乾燥や飢餓などの生育困難な状況下でも生き残る。孢子は栄養細胞に比べ乾燥や高温 (60°C) や紫外線、あるいは超音波などへの耐性度が増し、常温の乾燥状態において 22 年の長期保管の後にも生存した例がある (Reichenbach, 2005)。生育に適した条件が回復すれば、子実体の中の孢子は一斉に発芽して栄養細胞となり、細胞集団として栄養増殖の過程に復帰すると考えられる (図 1-1)。集団で増殖を再開する場合には、溶解酵素の集積的作用による栄養物の確保、あるいは細胞間の信号伝達物質の高濃度の蓄積という意味で、個々の細胞が単独で増殖を始めるより生存に有利と推定される。

前述のように、粘液細菌は生活環の大半を細胞集団として行動するため、“social prokaryotes”と呼ばれる。子実体や孢子の形成の際には通常栄養増殖の時期と比較し、新たに 30 種類以上のタンパク質が合成される (Kaiser, 2004)。 *Myxococcus xanthus* の細胞間情報伝達には主に、化学物質を介した信号伝達系 (chemical signals) および細胞間の直接接触 (physical contact) を介した信号系、の二つがはたらく (Kaiser, 2004; Ueki and Inouye, 2006)。子実体や孢子の形成に関わる化学的信号系は少なくとも 5 種 (A–E) あるとされる (Kaiser, 2004; Ueki and Inouye, 2006)。子実体形成の過程は細胞凝集と分化誘導の二段階からなり、まず栄養の制限により細胞内の (p)ppGpp 濃度が上昇し、A-signal 信号系が始動して細胞が凝集する (図 1-5)。さらに一連の反応により、C-signal 信号系が作動して細胞の滑走運動が制御され、子実体形成が誘導される (図 1-6)。A-signal の実体は、特異的プロテアーゼの作用で生成したアミノ酸とペプチドとの混合物と考えられている。シグナルとなるアミノ酸濃度は細胞密度におおむね比例するため、A-signal 系は細胞密度感知機構 (quorum sensing) の一つと推定され、*asgA, B, C* の 3 遺伝子の産物が関与する。一方、C-signal は細胞表層に局在し、その伝達には細胞同士の直接接触が必要である。その際に特異的プロテアーゼにより、*csgA* 遺伝子産物の分子量 25 kDa の SCAD タンパク質 (short chain alcohol dehydrogenase) が切断され、17 kDa の C-signal 分子へ変換されるらしい。C-signal 量が少ない間は細胞の運動方向は周期的に逆転し (waving あるいは rippling)、これにより細胞間の接触頻度が増加し表層の C-signal 量が徐々に上昇し、やがて閾値に達すれば細胞集団の同一方向への移動 (streaming) が誘起され子実体形成が開始される (Kaiser 2004)。C-signal は *act* オペロンを活性化し、その遺伝子産物が CsgA タンパク質の発現量を制御する。さらに、FruA タンパク質のアスパラギン酸残基のリン酸化が誘導され、二つのオペロン (*frz* と *dev*) への信号伝達を促す (図 1-5)。*frz* 遺伝子は、腸内細菌である *Escherichia* や *Salmonella* の走化性遺伝子と相同性を示した。FrzCD タンパク質のメチル化・脱メチル化が運動方向の制御に、他方で

*dev* 遺伝子産物は孢子形成に関与する。

*Myxococcus xanthus* では、タンパク質リン酸化を介した信号伝達系が大別して二つ知られている。第一は His/Asp phosphorelay 系であり、センサーの機能を果たす His kinase と response regulator から構成され、これらは他の細菌にも見られる。His kinase は環境中の信号を感知し、自身の His 残基を ATP でリン酸化し、さらにリン酸基は response regulator の receiver 領域の Asp 残基へ転移し、次に effector 領域が活性化する。この領域に DNA 結合部位があり、response regulator は転写因子としてはたらく。類似の系は酵母の浸透圧調整に関与する MAP kinase cascade である。*M. xanthus* では、His/Asp phosphorelay 系が線毛形成や運動性、細胞の分化誘導、浸透圧耐性、あるいは熱ショック応答などに関与するらしい。第二は、真核生物の Ser/Thr/Tyr リン酸化系に類似した伝達系、protein Ser/Thr kinase (PSTK) であり、細菌では *M. xanthus* から最初に見いだされた。*M. xanthus* の PSTK は分化誘導のさいの信号伝達に関与すると推定され、粘液細菌以外の細菌ゲノムからも PSTK 類似酵素の遺伝子群が見つかった。

粘液細菌の集団的挙動の際には、化学物質や酵素系の他に、pili (線毛) や fibril (邦訳なし) を介した情報伝達も必要らしい。*M. xanthus* の線毛の生合成遺伝子が特定され、*Pseudomonas aeruginosa* の IV 型線毛の生合成系との相同性が示された。線毛 (Pili) は細胞の極に着生するのに対し、fibril は細胞に周生し、長さ 50  $\mu\text{m}$ 、径 15–30 nm で多糖とタンパク質から構成され、これらの中には ADP ribosyl transferase が含まれる。このリボシル化が fibril を介した細胞間情報伝達に関与し、これにより細胞同士が互いの位置関係を認識し立体的に配列する (Dworkin, 2000)。滑走運動や細胞間の接着にはカルシウムイオンが必用であり fibril の形成を誘導する。

*Stigmatella aurantiaca* の子実体形成機構も比較的によく研究されており、細胞が凝集し分化が誘導され子実体を形成する点は *M. xanthus* と共通であるが、相違点もあり光およびフェロモンが凝集に関与する (White and Schairer, 2000)。

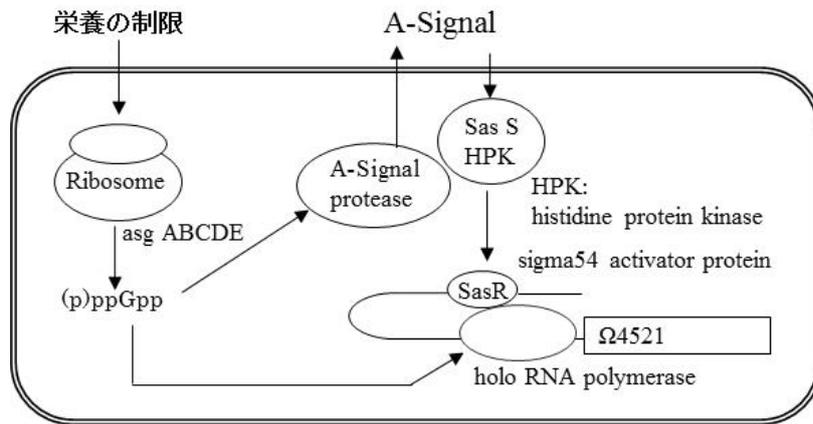


図 1-5. A-signal 伝達系の概略図(Kaiser, 2004). 栄養の制限により A-signal の生産が誘導され, A-signal センサー-HPK(Sas S)を介し, A-signal 依存性遺伝子( $\Omega$ 4521)の発現が活性化される.

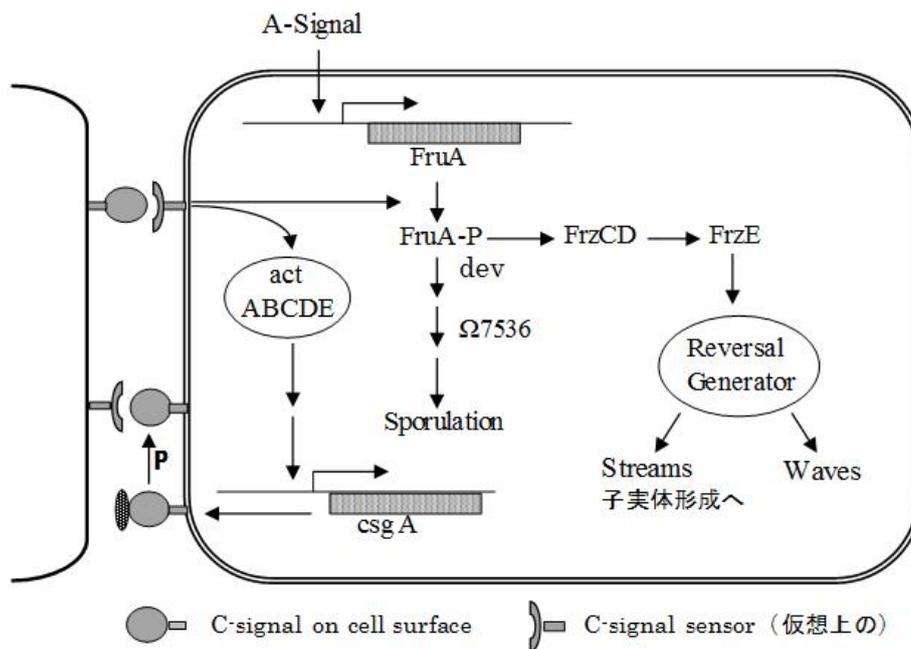


図 1-6. C-signal 情報伝達系の概略図(Kaiser, 2004). 二細胞が細胞端同士で接触し情報を伝達する. 図中には主に右側の細胞を示したが, 左側の細胞でも同様な機構の作用を想定している. “P”は細胞表層でのプロテアーゼによる切断を示し, C-signal 分子が 25k から 17kDa へ小型化し細胞表層に止まる. 仮想的 C-signal sensor 分子と 17kDa タンパク質は相互作用し, 信号が“reversal generator”に伝達され, 信号強度に応じて二種類の運動, streaming あるいは waving が誘起される. Streaming により細胞が集合, 子実体形成に至る.

## 1.6 先行研究における新しい粘液細菌の分離と生態

前述したように、粘液細菌は 20 世紀後半に至るまで一世紀間にわたり土壌細菌とされてきた (Reichenbach, 1999)。海岸環境から海洋性粘液細菌を分離したとの報告も過去にあったが (Roper and Marshall 1977; Yamamoto *et al.*, 1982; 山本, 1983)、それらの菌株の系統解析結果もないため詳細は不明である。1990 年代後半になって、本研究の先行研究において、筆者らのグループが人工海水培地を用いて、細菌捕食性を利用した分離手法により、初めて海洋性粘液細菌の本格的な分離に成功した (Iizuka *et al.*, 1998)。分離株の中で、黄色の皮膜状のコロニーを形成した一菌株とその後に分離した同属異種株について、新属新種 *Haliangium ochraceum* (基準株 SMP-2<sup>T</sup>) および *Haliangium tepidum* (基準株 SMP-10<sup>T</sup>) を命名した (Fudou *et al.*, 2002; 不藤, 2002)。これらの菌株は、海水 (海岸) 相当の NaCl 濃度 2-3% (w/v) の環境に適応していると考えられる。

粘液細菌が生育する物理化学的条件については、中性付近の pH 域における常温環境とされてきた。しかし近年には、いわゆる極限環境からも粘液細菌が見いだされた (Dawid, 2000)。たとえば、ケニアのアルカリ湖からは pH9 以下で生育しない好 (耐) アルカリ性粘液細菌 (*Myxococcus* sp.) が分離された。

生育温度に関しては、南極の土壌から 18°C 以上で生育しない好冷性の粘液細菌様の細菌溶解性菌株が得られた。これらの菌株の外観は陸生粘液細菌である *Nannocystis* 属や *Polyangium* 属に類似していたが、その後の続報や寄託菌株も存在せず、詳細は不明である。高温側では、45°C 以上の高温環境に分布する粘液細菌の報告は少ないが、土壌由来の *Myxococcus* sp. GT-7 株は至適生育温度 42-44°C で、生育最高温度は 48°C と報告された (Gerth and Müller, 2005)。代表的な高温環境は温泉や深海熱水噴出孔であるが、これらの環境試料から高温性粘液細菌を分離した例はまだない。

非培養アプローチによる系統解析に関しては、海底火山付近の海底試料から、粘液細菌由来と推定される 16S rRNA 遺伝子断片が検出された (Moyer *et al.*, 1995)。しかし、菌株自体は分離されていないため、この遺伝子を保持していた菌が実際に高温性かどうかは不明である。

粘液細菌は非病原性とされてきたが、近年、米国西部におけるダニ媒介性の家畜風土病 “Epizootic bovine abortion” の病原体として、シストバクター亜目の未分離の粘液細菌 (aoEBA) の関与が疑われている (Teglas *et al.* 2006; Brooks *et al.*, 2011)。この病原体はダニ唾液腺に局在するらしい (Chen *et al.*, 2007)。この報告は粘液細菌の安全性に関して再考を促すと同時に、動物体内という粘液細菌の新たな生息環境を示唆する点で非常に興味深い。

以上に述べたように、従来は常温性の陸生菌とされた粘液細菌について、新たな生息環境や生態が明らかにされつつある。これらの中で、Fudou *et al.* (2002) が海洋性粘

液細菌 *Haliangium* を見出し、培養可能な菌株として分離した点については、特筆すべき点である。*Haliangium ochraceum* からは、次節に述べるように新規生理活性物質も得られている (Fudou *et al.*, 2001; 不藤, 2002)。したがって、未開拓の生息環境からの粘液細菌の探索は、分類学的に新規な粘液細菌の発見をもたらすだけでなく、応用微生物学的な観点からも有意義であると考えられ、筆者が本研究に着手する動機となった。

## 1.7 本研究の目的および本論文の構成

前述のように、粘液細菌の多様性や生態については、新しい知見がもたらされてはいるが、なお未知の点が多く、探索源を広げることによって新規な粘液細菌の発見につながることを期待される。しかしながら、粘液細菌研究の最大の課題は、今日でも数十年前と同様に、効率的分離法がない点にある。抗菌剤による粘液細菌の選択的分離法も報告されたが (Karwowski *et al.*, 1996; Reichenbach and Dworkin, 1992)、筆者らの追試では、その有効性は確認できていない。このような分離や純粋培養の困難性のために、多種多様な生理活性物質を生産する生物資源としての潜在的利用価値があるにもかかわらず、放線菌などと比較して十分に利用されてこなかった (不藤・山中, 1992)。

とくに、海洋あるいは温泉など未開拓の生息環境に由来する粘液細菌に関しては、従来はほとんど研究例がないため、陸生粘液細菌の生産物とは異なる化学構造の物質や活性が異なる新規物質の発見が可能と考えた。実際に、筆者らの先行研究において、粘液細菌の新しい探索源として海洋環境に着目し、沿岸地域から 33 株の粘液細菌を得た (Fudou *et al.*, 2001; 不藤, 2002)。これらは、コロニーや子実体の形状から、6 株は *Myxococcus* 属と推定され、他の 27 株は *Polyangium* 属あるいは *Nannocystis* 属に近縁の新規分類群と推定された (不藤, 2002)。これらの中で、2 株については詳細な分類学的検討を加え、前述のように粘液細菌の新属 *Haliangium* 属を提唱している (Fudou *et al.*, 2002)。また本属の一種 *Haliangium ochraceum* からは、図 1-7 に示す新規生理活性物質 *haliangicin* が得られた (Fudou *et al.*, 2001)。生理活性物質の生産の観点からは、上記の *haliangicin* 生産菌以外に、2 株について抗菌活性が検出された。この内、陸生粘液細菌の *Nannocystis* 属に外観が類似した 1 菌株の生産物は、*Nannocystis* 属菌が生産するキレート化合物である既知物質 *nannochelin* と同定された。しかし、ほかの *Nannocystis* 属様菌株の 1 株の生産物は、生成量が微量であり構造推定に至らなかった (不藤, 2002)。

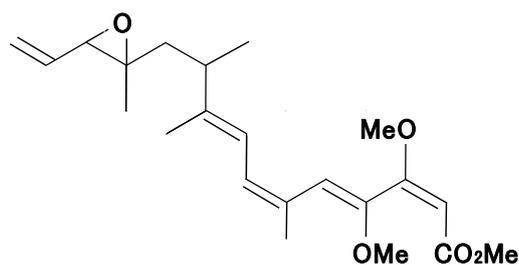


図 1-7. 海洋性粘液細菌 *Haliangium ochraceum* から発見された haliangicin の化学構造.

そこで本研究では、新たに海洋や温泉由来の新規な粘液細菌を分離し、先行研究において詳細な分類学的検討を行わなかった海洋性粘液細菌分離株をも加えて、それらの分離株の純粋培養法の確立と特性評価を行うことを目的として探索と実験を行なった。また、分離株の培養物から、新規生理活性物質を見出すことも研究目標として、抗菌活性物質の探索を行なった。

本論文では、本章につづき、1) 海岸由来の新規海洋性粘液細菌の探索、2) 新たな分離源としての温泉環境における新規粘液細菌の生息の確認、3) 新規粘液細菌からの新規代謝産物の発見、の三つの項目を中心に次のように各章で報告する。第 2 章では微生物医薬の歴史を概説し、さらに 21 世紀における粘液細菌も含めた微生物からの医薬品探索の意義と先行研究を含めた背景について述べる。第 3 章では、海洋性、汽水性粘液細菌の探索と新規分類群の提唱について述べる。第 4 章では、温泉環境における新規粘液細菌の探索について述べる。第 5 章においては、海岸土壌から分離された新規粘液細菌の 1 株に由来する新規環状デプシペプチドであるミウラエナミドの特性評価について報告する。最後に、第 6 章において本研究に関する全体的考察を行ない、21 世紀の粘液細菌研究の方向性についても展望する。

新規粘液細菌については、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統的解析を行ない、その分類学的性質について記載する。群別化した粘液細菌について、公開された菌株データベースの情報も考慮に入れ、その生態を推定する。新規環状デプシペプチドについては、既知の類似化合物との比較、および最新の知見から、医薬への応用の可能性について推論する。

## 第2章 粘液細菌の応用および医薬探索資源としての意義

### 2.1 はじめに

微生物学の研究の歴史の中で、微生物が医薬探索資源として注目され始めたのは抗生物質 (antibiotics) の発見からである (天児, 1988)。抗生物質とは、ストレプトマイシンの発見者 Waksman による 1942 年の造語で、本来は「微生物が生産する物質で、微生物の発育や代謝を阻止するもの」を意味する (田中, 1992)。1928 年、Fleming がグラム染色陽性菌に対する生育阻止物質を青カビ *Penicillium notatum* から発見し、ペニシリンと名付けたことが抗生物質の最初の例である。Chain *et al.* (1940) は、Fleming が分離した青カビの培養物からペニシリンを茶色の粉末として抽出することに成功し、多くの細菌に対する顕著な生育阻害効果を確認した。さらに 1943 年に大型タンクでの通気攪拌培養によるペニシリン発酵生産がアメリカで実現し (田中, 2000)、第二次大戦中にはペニシリンが傷病治療に絶大な威力を発揮した。この大成功が契機となり抗生物質の研究は 1940-1950 年頃に最盛期を迎え、多数の抗生物質の登場により感染症による死者は激減した。たとえば結核は 1950 年頃まで日本人の死因の首位を占め、サルファ剤やペニシリンも結核菌には無効だったが、ストレプトマイシンの登場で治療可能となり、結核死は急減した (中山, 1988)。

抗生物質は人類の健康と福祉に大きく貢献してきたが、一方で耐性菌の問題がある。上記したペニシリン抽出に成功した 1940 年には、すでにペニシリンの耐性菌が確認されている (Abraham and Chain, 1940)。20 世紀後半において、医療や畜産・水産業などの現場において抗生物質が濫用された結果、耐性菌が急増し、大きな問題となってきた (吉川, 1995)。院内感染の原因となる多剤耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) や多剤耐性緑膿菌 (multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP) などの相次ぐ発生に続き、近年はカルバペネム耐性腸内細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) などの出現も懸念されている (「カルバペネム耐性腸内細菌に関する米国 CDC の発表と日本国内の状況」国立感染症研究所、2013/3/8)。いったん制圧されかけた結核についても、多剤耐性結核菌 (multiple-drug-resistant tuberculosis, MDR-TB) や広範囲薬剤耐性結核菌 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) が出現し (青木, 2007)、新規な抗結核菌剤も要望されている。全世界では年間三百万人が結核により死亡しており (Ducati *et al.*, 2006)、決して過去の病気ではない。

抗生物質の過剰使用は抑制する必要があるが、21 世紀の今日も感染症の根絶にはほど遠い現状にあるため、微生物代謝産物あるいは合成化合物からの新規な作用機構の抗生

物質の探索は継続している。たとえば、病原菌の菌体密度感知機構に注目し、病原細菌が分泌するオートインデューサーなどホルモン様増殖制御因子の受信を妨害し感染を阻止する試み（石田ら, 2006; 西口ら, 2006; 篠原, 2006）、あるいは病原細菌の付着機構に着目した、人体への定着防止の試み（三浦, 2006）などもある。

細菌の自己防衛（損傷修復）手段の一つである SOS 反応に着目した例もあり、Achaogen 社がその鍵となる LexA タンパク質分解の抑制剤として新規アミノグリコシド剤 plazomicin を開発中である。この物質は放線菌由来抗生物質 sisomisin の誘導体で、多剤耐性グラム陰性菌や MRSA などに対する抗菌性、および人体への安全性も確認された（Cass *et al.*, 2011）。この例は、既知抗生物質や開発中止製品について新たな適応を探索する、いわゆるドラッグ・リポジショニング（Schubert, 2010）の例としても興味深い。他方で、グラム陰性菌の多剤排出蛋白質 AcrB の立体構造解明を手掛かりとして排出蛋白質の発現を抑制する薬剤を設計し、耐性獲得の阻止を試みた例もある（Bohnert *et al.*, 2013; Opperman and Nguyen, 2015）。

## 2.2 粘液細菌からの生理活性物質の探索

応用微生物学の視点からの粘液細菌の最も注目すべき特徴は、多数の新規な二次代謝産物を生産する点にある。とくにセルロース分解性粘液細菌である *Sorangium* 属菌種から多くの新規物質が見い出されている。第 1 章でも述べたように、この分野は主として GBF で研究され（Reichenbach, 2001）、現在は HZI (Helmholtz Zentrum für infektionsforschung)に引き継がれている。しかし、それらの中で医薬として商品化されたのは、epothilone の誘導体 Ixabepilone の一例のみであり（図 2-1）、他の多くの物質の実用化が将来に期待される。

粘液細菌由来化合物として、今までに 100 種以上の基本骨格と 350 種の構造類縁体を含む約 650 の物質が得られ、その大半は新規物質だった（Gerth *et al.*, 2003）。それらの中で代表的物質の構造上の特徴として、図 2-2 に示すようにマクロサイクリックラク톤環、ラクタム環や直鎖状および環状ペプチド類が多く、次いで芳香環、複素環やアルカロイドも含まれる。細菌としては珍しいテルペノイド類（aurachins）や三重結合を含む物質（maracins）、あるいはホウ素化合物（tartrolon）などもある。それらの代謝産物に共通的に見られる構造上の特徴は、ポリケチドや非リボソーム性ペプチド、あるいは両者のハイブリッド型である（小鹿・不藤, 2009）。その中で、*Sorangium* 属細菌由来の maracin（Herrmann *et al.*, 1998）や同属由来のチアゾール環を含むマクロライド thuggacin は抗結核菌作用を示し（Steinmetz *et al.*, 2007）、新規抗結核薬のリード化合物として期待される。粘液細菌の生産物の特筆すべき点は抗癌剤候補物質が多いことであり（Weissman and Müller, 2010）、たとえば、tubulyisin、disorazol（Kopp *et al.*, 2005）や前述

の epothilone (図 2-1) は真核生物の微小管へ作用し細胞分裂を阻害する。Epothilone は粘液細菌の代謝産物として初めて商品化された 16 員環マクロライドで、イチイ科植物起源の抗腫瘍剤 Taxol® に類似した微小管骨格の安定化作用を示す。水溶性のため製剤化に有利とされ (Dömling and Richter, 2005)、誘導体 Ixabepilone (商品名 IXEMPRA™) は乳癌治療薬として 2007 年に FDA に認可された。本剤の年間売上は一時期に約 1 億ドルに達したが、欧州と日本で薬事承認されず (「国内未承認薬に関する情報: 2012/10 更新」、がん情報サービス)、現時点で Taxol® に比し顕著な優位性はないが、本剤の薬効改良研究は継続中である (Khrapunovich-Baine *et al.*, 2011)。一方、tubulysin は epothilone とは逆に微小管の脱重合を促進し、近年は誘導体が化学合成可能となり構造活性相関が研究されている (Herrmann *et al.*, 2012)。また、*Myxococcus* 属粘液細菌から見出された抗腫瘍性アルカロイド bengamide は、細胞毒性を示さないような低濃度において nuclear factor-B (NF-B) 活性を示したので、抗炎症作用が期待される (Johnson *et al.*, 2012)。さらに、その類縁体からは抗結核菌薬の薬効の指標である MetAP (methionine aminopeptidase) 阻害作用も検出され、抗結核薬のリード化合物としても注目される (Lu *et al.*, 2011)。*Sorangium* 属粘液細菌からは、虫菌菌 *Streptococcus mutans* に対するバイオフィーム形成阻害剤 calolacton が見いだされ、歯科医療材料への応用が検討されている (Apel *et al.*, 2013; Schäberle *et al.*, 2014)。

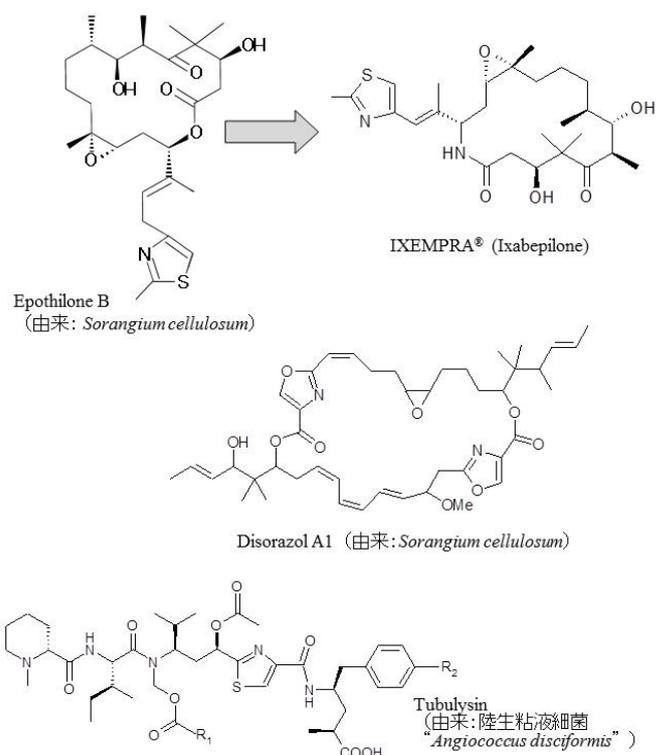


図 2-1. 粘液細菌由来の抗がん化合物

この例以外にも、粘液細菌に由来の代謝産物については、ドラッグ・リポジショニングの対象となり、従来に見いだされた抗菌活性などとは異なる活性が新たに見いだされる例も増えてきている (Castro *et al.*, 2015)。近年も粘液細菌からの新規代謝産物が続々報告されており、陸生粘液細菌 *Aetherobacter rufus* SBSr003<sup>T</sup> (Garcia *et al.*, 2015) から抗 HIV 活性を有する環状デプシペプチド aetheramide が、*Sorangium cellulosum* So ce1485 株からマクロリド系抗腫瘍細胞物質 maltepolide がそれぞれ見出された (Plaza *et al.*, 2012; Irschik *et al.* 2013)。他にも、粘液細菌由来の新規生理活性物質の発見が続いており (Ahn *et al.*, 2008; Gerth *et al.*, 2008; Guo and Tao, 2008; Kunze *et al.*, 2006; Kunze *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Ohlendorf *et al.*, 2008a, b; Ohlendorf *et al.*, 2009; Steinmetz *et al.*, 2012)、陸生粘液細菌は放線菌と同等以上の二次代謝産物の生産能を有すると考えられる (Schäberle *et al.*, 2014)。これらの新規物質に抗マラリア薬 (Held *et al.*, 2014) や抗ウイルス薬が含まれる点は、近年の新興・再興感染症の増加への対策という観点からも注目される (Müller and Wink, 2014)。

粘液細菌の二次代謝産物について推定される機能は、周囲の生物の生育を抑制し自身の生活空間を確保する、周囲の微生物を弱らせ捕食しやすくする (Xiao *et al.*, 2011)、あるいは、細胞間信号伝達に関与するシグナル物質の役割などが列挙される。シグナル物質としては、*Myxococcus xanthus* の孢子形成に関与する、DKxanthene が発見された (図 2-2)。この物質は疎水性ポリエーテル部分と親水性ヒドロキシアスパラギン残基を有する両親媒性物質で、細胞間信号伝達に必要である (Meiser *et al.*, 2006)。その類縁体は、*Stigmatella aurantiaca* による生産も確認された (Obwald *et al.*, 2014)。

本研究において主要テーマの一つとしている海洋性粘液細菌については、分布や生理・生態がほとんど不明であったため、医薬探索資源や生理活性物探索資源としての検討はほとんど行なわれて来なかった。しかしながら、第 1 章でも述べたように、新属新種として記載された *Haliangium ochraceum* からは、新規生理活性物質 haliangicin が得られている (Fudou *et al.*, 2001)。

### 2.3 粘液細菌の食農産業への応用

粘液細菌は、医薬探索資源としてのみならず酵素の生産菌としても注目され、多種類の溶菌酵素や高分子分解酵素の生産が知られている。一部については、工業用酵素への応用が検討された。*Myxococcus xanthus* 由来のプロテアーゼは、牛乳の凝固剤としてチーズ製造への利用が試みられたが (Poza *et al.*, 2004)、実用化には至っていない。Yamanaka *et al.* (1993) は、*Myxococcus* の溶菌酵素による赤色酵母 *Rhodotorula glutinis* の溶解を試みたが、細胞壁は溶解されず、他方で細胞膜が損傷され、酵母細胞の内容物の漏出が観察された。近年は、*Sorangium cellulosum* からの洗剤配合用酵素 (リパーゼ) の探索例も

報告された (Cheng *et al.*, 2011)。

粘液細菌の植物病原菌に対する抗菌性に着目し、植物防疫への応用を意図した研究は旧ソ連における報告 (Solntzeva, 1939) に始まり、近年には米国農務省 (USDA) によるレタス栽培への応用研究の例もある (Bull, 2005)。しかし、いずれの事例も実験段階に止まり実用化には至っていない。

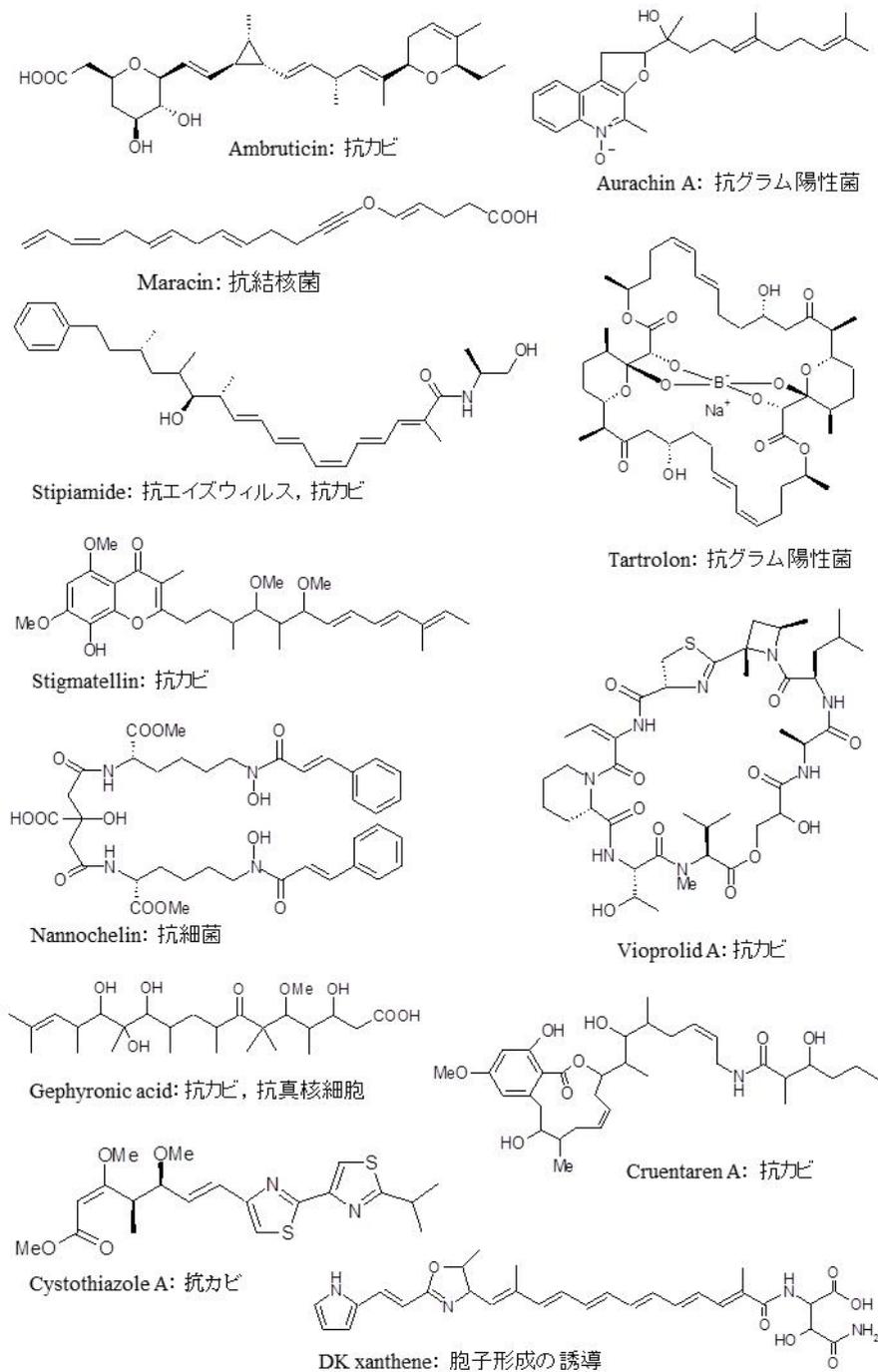


図 2-2. 粘液細菌由来の二次代謝産物およびその生物活性.

## 2.4 ケミカルバイオロジーの時代における微生物医薬

近年、微生物代謝産物から、抗菌活性以外にも注目すべき多様な生理活性が続々と発見され、実用化されてきた。たとえば、エバーメクチン (ivermectin) は放線菌 *Streptomyces avermitilis* 由来の抗線虫薬で、それを基に合成されたイベルメクチン (ivermectin) がアフリカの風土病オンコセルカの制圧に多大な貢献をした (Omura and Crump, 2004) ことは、大村智博士の 2015 年ノーベル医学・生理学賞の受賞により広く知られるところとなった。コレステロール合成の律速酵素 HMG-CoA 還元酵素の特異的阻剤 ML-236B は、*Penicillium citrinum* の培養物から見いだされ、その水酸化物メバロチンは高脂血症治療薬として 1989 年に発売された (塚崎, 2013)。類縁体の高脂血症治療薬リピトール (atorvastatin) は、2011 年度の世界の大型医薬品の売上高ランキング中で一位を占めた (大枝, 2013)。移植医療用の免疫抑制剤タクロリムス (FK506) は *Streptomyces tukubaensis* に由来する物質で、藤沢薬品が単離し商品化した。その抑制機構の研究から、T 細胞活性化シグナル伝達経路が解明されて以来、いわゆるケミカルバイオロジーの研究が活発化した (上村, 2012)。

ケミカルバイオロジー、すなわち生理活性物質の作用機構解明、標的タンパク質同定、および医薬合成に関する研究分野において、分子標的薬が重要な役割を果たしている。それらのもととなるリード化合物として、天然有機物や微生物代謝産物からの生理活性物質の重要性が近年は再認識されている (田代・井本, 2009; 石川, 2012; 石川ら, 2012; 芝崎, 2012; 北川ら, 2014)。特定の標的分子に作用し、その機能を促進あるいは抑制する分子標的薬の候補には、合成物、天然物、抗体や人工 RNA などが含まれる。合成低分子医薬としては、インフルエンザウィルスのノイラミニダーゼ阻害薬タミフル (柴崎ら, 2006) が、抗体医薬としては、乳がんの受容体チロシンキナーゼ HER-2 抗体のハーセプチン (中嶋ら, 2009) がそれぞれ有名である。分子標的薬開発の大前提として、生体内の信号伝達機構の正確かつ広範な解明が必要であり、さもないと標的分子に特異性が高いはずの物質が想定外の部位に作用し、副作用をおこす危険性がある。たとえばタミフルは一部の若年者に対して異常行動を誘発した疑いがある。また散発的事例に止まるがタミフル耐性ウィルスの出現も注意を要する (国立感染症研究所 HP)。安全で効果の高い新規抗ウイルス薬の探索は、今日なお重要なテーマである。粘液細菌の代謝産物は、抗ウイルス活性物質を多く含む点でも注目される (Martinez *et al.*, 2013)。一方、抗体医薬ハーセプチンについては、悪性乳がんでは単剤投与の効果は少なく、放線菌由来のアントラサイクリン系抗生物質や植物由来のタクサン系薬剤、あるいは放射線治療との併用が効果的である (中嶋ら, 2009)。

このように合成低分子や抗体による分子標的薬の場合にも臨床試験の適用数に限界があり、有効性や副作用の完全な予測は困難である。微生物代謝産物や天然物の探索に関

しては、要する時間、労力や費用の問題から、企業や研究機関の撤退が相次いだ。しかし、先述のように強力な生理活性を有する代謝産物も多いため、近年に再注目されつつある（田代・井本, 2009）。その物質が、医薬への応用がむずかしい場合にも、計算機化学や化学合成による新規物質設計のヒントを与えることがある。たとえば、放線菌由来の抗真菌物質 trichostatin A や子囊菌（キノコ）由来化合物 rapamycin B の作用点解析から、抗癌剤の標的分子の一つである HDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）遺伝子の存在が示された（吉田, 2002; Ververis *et al.*, 2013）。HDAC 阻害剤 trichostatin A は、近年に医療への応用が期待される iPS 細胞の分化誘導剤としても検討された（Kaichi *et al.*, 2010）。また放線菌由来の免疫抑制剤 rapamycin の作用点解析から、mTOR シグナル伝達経路が解明された（太田 2013）。mTOR 経路は、タンパク質中のセリンやスレオニン残基をリン酸化するキナーゼによる信号伝達系で、栄養状態など総合的な細胞環境をモニターし細胞の成長や分裂を制御するとされる。マウス mTOR 経路を rapamycin で阻害した場合、寿命が 10% 以上も延長したという（Fok *et al.*, 2014）。この驚くべき結果は直ちに人間の寿命延長には繋がらないが、微生物代謝産物の想像を超えた作用を示す例として興味深い。他の例として、骨粗しょう症に関連し、微生物由来の reveromycin A、mevastatin や FK506 などは破骨細胞による骨吸収に対する抑制作用が注目される（Woo *et al.*, 2009）。粘液細菌 *Sorangium cellulosum* 由来の抗菌物質 soraphen A は、農薬への応用が検討されたが毒性のため開発が中断された（Gerth *et al.*, 1994）。しかし近年に、T 細胞への作用を介した免疫修飾活性が注目されている（Castro *et al.*, 2015）。このように微生物代謝産物には合成化合物に比し、生体に対し特異な強い活性を有する物質が多い。その理由として、分子構造中に多数のキラル中心や多様な環構造からなる複雑かつ堅い立体を有する、分子内に酸素原子が比較的に多いため、生体タンパク質との相互作用に重要な水素結合を形成しやすい官能基を多数有する、などの点が指摘されている（齋藤ら, 2014）。

## 2.5 21 世紀における微生物探索の意義

微生物代謝産物の医薬品への応用では、(1) 有望な分離源の選定、(2) 薬理効果判定のための適切な生理活性測定系の設定、(3) 不安定で複雑な化合物の構造決定、(4) 効果の増強と毒性低減、などの課題があるが、研究者間の学際的協力や、アカデミア（大学や研究機関）と製薬企業の協力により突破口を開く必要がある。とくに (4) に関して、DDS (drug delivery system) の一環として、ナノ微粒子運搬体による抗癌剤の副作用軽減や薬効の増強（中山・岡野 2005; 平島 2009）、あるいはミサイル療法として抗癌剤と抗体との結合体 ADC (antibody-drug conjugates) や tumor-homing peptides による癌細胞内への低分子抗がん剤の特異的運搬（Ducry and Stump, 2010; Teesalu *et al.*, 2013; 大枝 2013）などが注目される。たとえば、先述の乳がん治療用抗体医薬ハーセプチンでは、植物由

来の細胞毒性物質 maytansine の誘導体 emtansine (DM1) とリンカーを介し結合させた T-DM1 が合成された。この薬剤は、癌細胞に特異的に取り込ませ、細胞内で DM1 を放出させるというもので、2013 年に FDA により承認された (大枝, 2013)。粘液細菌 *Sorangium cellulosum* 由来の抗がん細胞物質 disorazol についても、類似の発想により、難治性乳がん細胞に特異的に作用させる研究が行われている (Seitz *et al.*, 2015)。これらの例のように抗体医薬が脚光を浴びる 21 世紀の今日でも、有機天然物、とくに強い生理活性を有する微生物代謝産物が医薬開発に貢献する可能性は大きいであろう。

近年は非培養的技法による菌相解析の結果から、環境中の微生物の多くは人工的条件下では生育しないことが判明している。人工培地で培養できる細菌は、環境中の全菌数の 1.0% にも満たず、土壌微生物の場合は約 0.3%、淡水微生物の場合は約 0.25% とされ、海洋微生物ではさらに少ない 0.001-0.1% と推定されている (鎌形, 2006)。このような人工培地中で培養困難な難培養微生物、VBNC (viable but nonculturable) 状態の菌 (Colwell and Huq, 1994)、あるいは微生物ダークマター (microbial dark matter) (Rinke *et al.*, 2013) と称される菌が環境中に広く存在しており、医薬品の候補化合物の生合成遺伝子なども含む潜在的な有用遺伝子の宝庫と目される。これらの遺伝子資源の獲得方法として、VBNC を培養可能にして微生物自体を分離する、あるいは菌は分離せず目的とする微生物遺伝子のみを環境中から取得し生産菌へ導入し利用する、という二つの方針が考えられる。近年は、後者の方針による研究例が増加し、培養困難な共生系微生物、あるいは極限環境菌叢などのゲノムライブラリーを構築し、それらゲノム情報の中から、有用酵素や代謝物質の関連遺伝子を探索する、メタゲノム解析が世界的に盛んになり、次世代シーケンサーの急速な普及がこれを促進している (Kimura, 2006; Lok, 2015; Rinke *et al.*, 2013)。

一般的に、二次代謝は多くの場合に数十座以上の遺伝子が関与する複雑な代謝制御下であり、生産菌の一部の遺伝子群だけを取得し大腸菌などの宿主菌へ導入しても、期待した生産量が得られないことが多い。たとえば大腸菌を宿主とし、放線菌由来の抗腫瘍物質 echinomycin の生合成および耐性遺伝子群の合計 16 座、約 37 kb の ORF を導入した例では生産量の向上が課題だった (渡辺ら, 2006)。またメタゲノム法の問題点として、環境中の遺伝子増幅の際には、特定塩基配列の PCR 増幅用プライマーを用いるため、細胞数が少ない希少菌遺伝子の場合には増幅率が低い (Kimura, 2006)。この点を克服するため、希少菌ゲノム DNA の選択的増幅法 (PARM や IAN-PCR) も開発されているが、その有効性は限定的である (下山ら, 2007)。最新のゲノム情報解析技術をもってしても新規な二次代謝系の解析や検出に限界があるが (町田ら, 2013)、“*Entotheonella*”と称される細菌の単一細胞のメタゲノム情報から新規の生理活性物質が見つかった例も報告されている (Wilson *et al.*, 2014)。“*Entotheonella*”については、第 6 章でも述べる。

近年は難培養菌の分離法にも進歩があり（工藤・大熊, 2006; 鈴木, 2006; 松本 2006; 青井ら, 2006; 橋床, 2014）、得られた新規微生物から有用遺伝子の探索も続いている。ごく最近には、特別な培養器 *ichip* を工夫した分離法が注目される（Nichols *et al.*, 2010）。この方法は、多数の小孔を施した板状培養器に物質透過性の膜を貼り、これを土中に埋設するというもので、小孔中での難培養性細菌の培養に成功した。得られたベータプロテオバクテリア綱細菌から新規抗生物質 *teixobactin* が見いだされ、この物質は微生物の細胞膜中の脂肪分子に結合するという新たな作用機作の点でも画期的なものである（Ling *et al.* 2015）。このように新規な分離法を用いれば、分離微生物から新規な作用機作の物質を見出すことが可能になることを示した点で、この報告の意義は大きい。新規微生物の分離・培養と環境 DNA のメタゲノム解析とは、両者の相補的発展により大きな成果創出が期待される。したがって、21 世紀の今日でも新規微生物を自然環境から探索する意義は、十分に高いと考えている。本論文の主要テーマである新規粘液細菌の探索についても、これまで主として陸生菌が対象とされてきたことから考えても、その続行の意義は非常に高い。

### 第3章 海洋性、汽水性粘液細菌の探索と特性評価

#### 3.1 はじめに

第1章でも述べたように、粘液細菌はこれまでおもに土壤環境由来試料から分離されてきた。Singh (1947) によれば土壤中の粘液細菌の生息菌数は  $1.0 \times 10^3 - 4.5 \times 10^5 \text{ g}^{-1}$  と推定され、湿った腐植質土壤中では菌数が多い傾向にあった。一方、海岸環境に関しては粘液細菌の生息菌数の報告はなく、20世紀までにおいて海岸試料由来の粘液細菌として *Myxococcus. sp* などの分離例がある程度であった (Brockman, 1967)。既報の海岸由来の粘液細菌は、塩分に対する生育応答の点では陸生菌の特徴を示している。すなわち、培地中の NaCl 濃度の増加とともに生育が抑制され、生育 NaCl 濃度の上限は海水の NaCl 濃度 3.0–3.5% (w/v) よりも低い 2.0–2.5% (w/v) である (Rückert, 1984)。したがって、これらの分離株は、陸生粘液細菌が海洋環境へ流入した菌株と推定される。一方、真の意味での海洋性粘液細菌の存在を示唆した報告も少数あり、たとえばグラム陰性菌を溶菌・捕食し、さらに子実体を形成する滑走性の海洋性細菌が報告されている (Roper and Marshall, 1977; Yamamoto *et al.*, 1982; 山本, 1983)。しかし、それらの菌株の正確な分類学的帰属は不明である。また、非培養的技法による海洋底泥試料の菌相解析によって、海底環境における粘液細菌の近縁菌の分布が示唆された (Moyer *et al.*, 1995; Gray and Herwig, 1996)。

以上の背景から、本研究の先行研究において、著者らのグループは粘液細菌の生態学的ニッチとして海洋環境が成立すると考え、海岸試料からの粘液細菌を含む捕食性滑走性細菌の探索を行った。その結果、八丈島や三浦半島の海岸の試料から海洋性粘液細菌の分離に成功した (Iizuka *et al.*, 1998)。これを端緒に、海岸からの粘液細菌の探索を続け、33株の粘液細菌を分離した (不藤 2002)。その内 27株は海洋性細菌の特徴である塩分要求性を示し、16S rRNA 遺伝子塩基配列による分子系統上は粘液細菌だったが、系統樹上の位置からは、陸生粘液細菌とは別属に相当する新奇な粘液細菌と判明した。第1章で述べたように、その内 2株、SMP-2<sup>T</sup> と SMP-10<sup>T</sup> については分類学的記載を行い、新属 *Haliangium* と本属に含まれる 2つの新種名 *Haliangium ochraceum* および *Haliangium tepidum* を提唱した (Fudou *et al.*, 2002)。

本研究ではさらに、日本国内のさまざまな沿岸地域や汽水地域における粘液細菌の探索と分離を行い、先行研究で得た分離株をも含めて、生理的性質や 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づいた系統解析を詳細に実施した。これの中の一部の分離株に関し、海洋性粘液細菌の三つの新属を提唱することを本章で記述する。

## 3.2 実験材料および方法

### 3.2.1 海洋性粘液細菌の分離用試料

試料の採取は、先行研究では1997年2月-1999年4月の期間に、本研究では1999年5月-2002年7月の期間に行なった。それらの採取地点を図3-1および表3-1に示す。日本全国の海岸から、5年5ヶ月間に約800試料を収集した。内訳は、砂264試料、泥35試料、海草86試料、海藻200試料、木片85試料、海岸動物65試料、貝殻26試料を含んでいる。試料の大部分は潮間帯かそれよりも陸側で採集した。

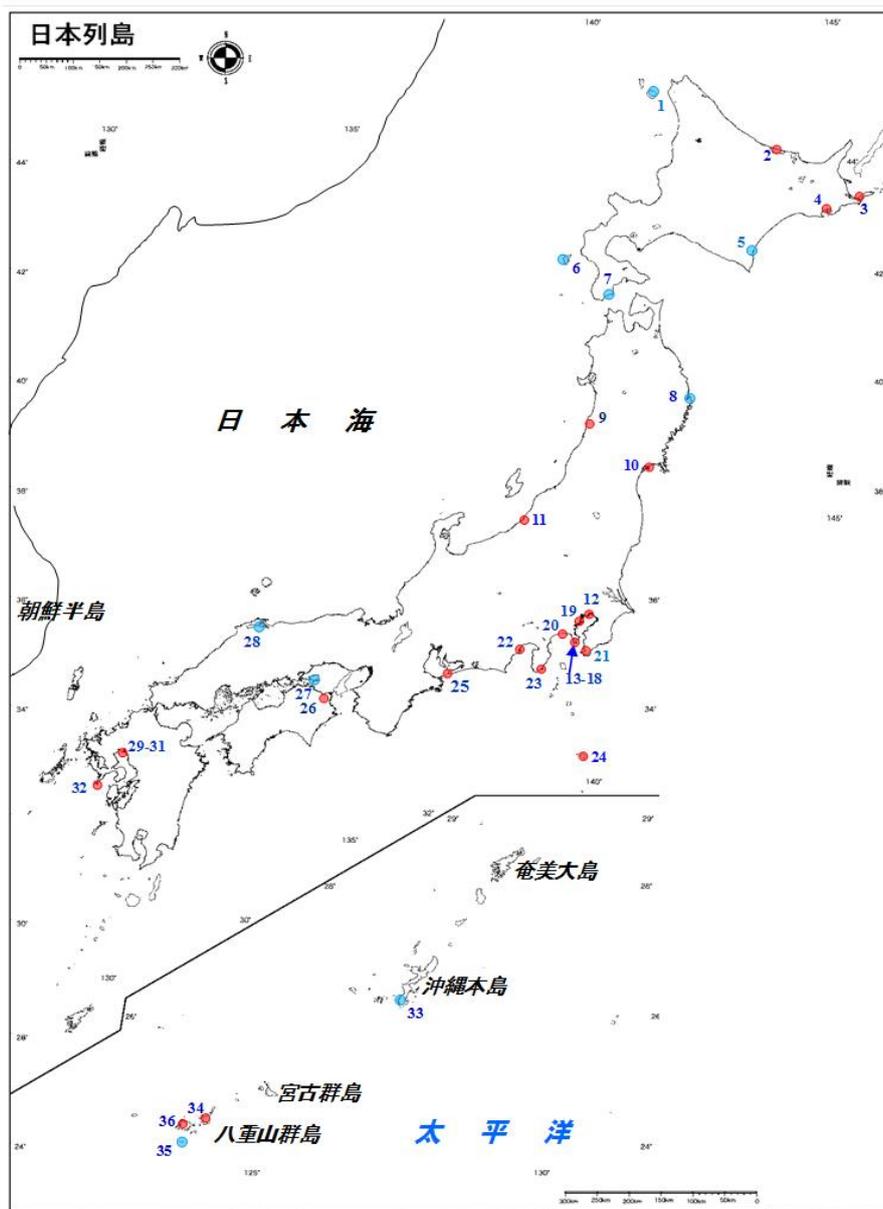


図 3-1. 試料採集地点. 赤色は海洋性粘液細菌の分離に成功した地点、青色は分離に至らなかった地点を示す.

表 3-1. 海岸試料の一覧

採集地点 (都道府県) * <sup>1</sup>	採取年月	水温 (°C)	pH	試料 の数	試料概要 [試料採集地点付近の NaCl 濃度% (w/v)]
1.利尻島 (北海道)	1997年7月	15		18	海藻8, 動物遺体10 (カニ6, ウニ4)
2.サロマ湖(北海道)	1999年9月			3	泥3
3.春国岱・風蓮湖 (北海道)	2001年9月	20		18	砂8, 泥3, 土2, 海草3, 植物遺体2
4.厚岸湖 (北海道)	2001年9月	19	7.0	8	海草4, 泥3, 砂1 [海水 NaCl 2.0%]
5.広尾 (北海道)	1997年7月	20		16	海藻4, 動物遺体4, 植物遺体2, 木片4, 貝殻2
6.奥尻島 (北海道)	1997年7月	20		14	海藻6, 動物遺体2, 木片4, 貝殻2
7.木古内 (北海道)	1997年7月	16		14	砂2, 動物遺体4, 植物遺体4, 木片4
8.宮古 (岩手)	1998年10月			7	砂1, 土1, 海藻3, 海草1, 樹皮1
9.象潟 (秋田)	1998年11月			23	砂4, 海藻9 (緑1, 紅4, 褐4), 木片10
10.松島 (宮城)	1998年12月			31	砂10, 泥2, 海藻10 (緑1, 紅3, 褐6), 植物遺体7, 貝殻1, 魚骨1
11.柏崎 (新潟)	1998年9月			96	砂20, 海藻29 (緑14, 紅2, 褐13), 植物遺体13 (草2, 木片9, 落葉2), 動物遺体16, 貝殻2, 羽毛1, 他15
12.葛西海浜公園 (東京)	1997年10月			22	砂5, 泥1, 海藻6, 木片1, 動物遺体3, 貝殻3, 魚骨1, 塩2
13.三浦・荒井浜 (神奈川)	1997年7月			26	砂7, 海藻7, 海草3, 木片3, 動物遺体6
14.三浦・荒井浜	1999年6月	26		20	砂, 海藻, 海草, 土壌
15.三浦・荒井浜	1999年7月			20	砂, 海藻, 海草, 土壌
16.三浦・荒井浜、横堀海岸	2000年2月	15, 15		20	砂, 海藻, 海草, 土壌
17.三浦・荒井浜、横堀海岸	2000年5月	25, 23	8.8, 8.3	20	砂, 海藻, 海草, 土壌
18.三浦・荒井浜	2002年7月	30	8.4	45	砂20, 海藻10, 海草5, 土壌10 [海水 NaCl 2.8%]
19.多摩川河口 (神奈川)	1998年6月			24	砂4, 泥2, 海藻2, 木片9, 植物3, 動物遺体4
20.江ノ島 (神奈川)	1997年9月			26	砂6, 海藻5, 木片3, 貝殻2, 動物遺体8, 塩1, 他1
21.岩井 (千葉県)	1998年8月			31	砂12, 土3, 海藻6, 木片10
21-2.館山 (千葉県)	1999年9月			3	木片3
22.三保海岸・清水 (静岡)	1998年10月			23	砂7, 礫2, 海藻5, 植物遺体5, 貝殻2, 動物遺体2
23.伊豆・弓ヶ浜	2000年3月			27	砂5, バイオマット1, 木片10, 海藻4, 草1, 海草2, 動物遺体1, 貝殻1, 植物遺体2
24.八丈島 (東京)	1997年2月			50	砂12, 海藻6, 木片8, 動物遺体19, 貝殻5
25.篠島 (愛知)	1998年4月			29	砂4, 海藻6, 木片4, 動物遺体13, 貝殻1, 海草1
26.吉野川河口 (徳島)	1998年8月			10	泥5, 草3, 貝2 [河川水 NaCl, 0-2 %]
27.小豆島 (香川)	1998年5月			10	砂3, 海藻6, 動物遺体1
28.宍道湖 (島根)	1997年8月			13	砂6, 海藻2, 木片3, 海草2
29.東与賀町 (佐賀)	1997年3月			19	泥7, 海藻3, 動物遺体6, 植物3
30.東与賀町 (佐賀)	1999年4月			20	泥, 海藻, 動物遺体, 植物
31.筑後川河口・沖洲	1999年5月			20	泥, 海藻, 動物遺体, 植物
32.野母崎 (長崎)	1998年3月			10	砂5, 小石1, 海藻3, 動物遺体1
33.沖縄	1998年9月			9	砂5, サンゴ小片2, 海藻2
34.石垣島	1997年12月	23		31	砂12, 海草4, 海藻5, 動物遺体4, 植物遺体6
35.波照間島	1997年12月	24		19	砂4, 海草2, 海藻4, 動物遺体4, 植物遺体5
36.西表島・浦内川河口	1999年7月			10	砂3, 海草2, 動物遺体2, 植物遺体 (樹皮, 落葉) 3

\*<sup>1</sup> 試料地点の番号は図 3-1 のそれに対応している。

### 3.2.2 粘液細菌の分離用培地

#### 1) 溶菌性粘液細菌分離用培地

分離環境の塩分濃度を考慮し、必要に応じて人工海水基礎培地（SWS）を添加した培地を調製した。培地の基本溶液として、当初ジャマリン・ラボラトリー株式会社（大阪）の Jamarine Seawater kit（JSK）を 75%（v/v）溶液（JSK\*75）として使用した（Iizuka *et al.*, 1998）。75% とした理由は海洋細菌の分離に際し、海水相当よりも塩濃度が低い溶液を用いることにより、より多様な菌を分離できるとの知見による（林, 1985）。しかし、この製品の組成が非公開であったため、文献（林 1985; 北野 1991; 石田 2001）を参考として、あらたに人工海水基礎培地 S100（SWS）（表 3-2）を調製して冷蔵保存し、培地調製の際には常温に戻し、基本溶液として用いた。培地の pH 調整には、NaOH を用いた。固形培地として用いるときは、1.5%（w/v）の寒天を添加した。培地は 120°C、20 分オートクレーブ滅菌後に、成育因子 cyanocobalamin（B<sub>12</sub>）0.5 mg L<sup>-1</sup>、およびカビの生育阻止剤 cycloheximide 25 mg L<sup>-1</sup> を、それぞれのろ過滅菌した冷蔵保存溶液から無菌的に添加した（Reichenbach and Dworkin 1992）。

表 3-2. 人工海水基礎培地 S100（SWS）

成分	添加量（g）* <sup>1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0
KCl	0.5
NaHCO <sub>3</sub>	0.16
クエン酸第 2 鉄·nH <sub>2</sub> O（Nacalai tesque）	0.01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.02
KBr	0.08
SrCl <sub>2</sub>	0.03
β-グリセロリン酸 2Na（Nacalai tesque）	0.01
微量金属溶液* <sup>2</sup>	1.0（mL）
脱イオン水	1,000（mL）

\*<sup>1</sup> 固形培地とするときは 1.5%（w/v）Bacto Agar（Becton, Dickinson & Co）を添加。

\*<sup>2</sup> Reichenbach and Dworkin（1992）に従って調製。

表 3-3. 人工海水培地 S75-15（pH 7.5）

成分	添加量
人工海水基礎培地 S100（SWS）	750 mL
脱イオン水	250 mL
NaCl	15 g

\*<sup>1</sup> 固形培地とするときは 1.5%（w/v）Bacto Agar（Becton, Dickinson & Co）を添加。

人工海水培地は、基礎培地 S100 を適宜希釈し、NaCl 添加濃度も変えて使用した。たとえば、海岸由来試料からの分離の際には、S100 を 75% 濃度に希釈し、NaCl 15 g L<sup>-1</sup> を含む培地を調製した。この場合、人工海水基礎培地の希釈率と NaCl 濃度に応じて、S75-15 培地として表記した（表 3-3）。このほか、海水よりも低い NaCl 濃度の汽水環境などに由来する試料からの分離の際には、SWS の混合比率や NaCl 濃度をさらに低く設定した S20-10 培地も用いた。S75-15 は pH 7.5、S20-10 は pH 7.2 に設定した。こうして調製した培地を寒天で固化して平板培地とし、その上に、餌としてのグラム染色陰性細菌の生菌体を線状（2 本平行）に塗抹した（図 3-2）。これらのグラム染色陰性菌として、大腸菌 (*Escherichia coli*) W3110 株、あるいは海洋性細菌 *Alteromonas haloplanktis* IAM 12915 株を用いた。各菌体を塗抹した S75-15 寒天培地を S75-15-Ec および S75-15-Alt 寒天培地と表記した。

## 2) セルロース分解性菌株の分離用培地

表 3-4 の Ce-S1 寒天培地を用いた。硝酸塩と少量の酵母エキスを加えた寒天培地上にオートクレーブ滅菌したろ紙（径 7 cm, ADVANTEC TOYO）を置いた（図 3-3）。基本溶液として、海水試料には S75-15 を、汽水試料には、S75-15 および S20-10 を使用した。

表 3-4. Ce-S1 寒天培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )* <sup>1</sup>
Yeast Extract (Becton, Dickinson & Co)	0.01
NaNO <sub>3</sub> (Nacalai tesque)	1.0
HEPES (Nacalai tesque)	2.0
Bacto Agar (Becton, Dickinson & Co)	15.0

\*<sup>1</sup> 人工海水培地 S75-15, または S20-10 として 1,000 mL あたり添加。

### 3.2.3 分離菌株の保存・培養用培地

#### 1) VY/2-SWS 培地 (表 3-5)

分離株の生理的性質に応じ、基本溶液として S100-20、S75-15 あるいは S20-10 を用いて、酵母菌体培地 VY/2-SWS (Reichenbach and Dworkin, 1992) を調製した。乾燥酵母 (和光純薬、大阪) を純水に懸濁し、20 分間の攪拌後に、3000 rpm、15 分間の遠心集菌を行った。懸濁および集菌の操作を計 3 回繰り返し、洗浄して得た湿菌体を培地に添加した。

#### 2) 1/3CY-SWS 培地、および 1/6CY-SWS 培地 (表 3-6)

酵母菌体を含まない培地として、表 3-6 に示した 1/3CY-SWS 寒天培地も使用した。菌株によっては、さらに薄い濃度の栄養分をふくむ、1/6CY-SWS 培地も用いた。

#### 3) N2.0-S75-15 培地 (表 3-7)

分類学的な比較を行うために、同一条件下で近縁の粘液細菌の菌体を調製する必要がある場合には、海洋性および汽水性粘液細菌がともに生育可能な培地として、基本溶液

S75-15 にカゼインナトリウム (Natrose [sodium caseinate], Wako) 2.0 g L<sup>-1</sup> を添加した N2.0-S75-15 培地 (表 3-7) を調製した。なお、分離株の培養条件を検討のため、カゼインナトリウム添加量を 0.5 あるいは 1.0 g L<sup>-1</sup> とした培地も用いた。

表 3-5. VY/2-SWS 寒天培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )* <sup>1</sup>
Yeast Extract (Becton, Dickinson & Co)	0.1
酵母湿菌体(和光純薬)	5.0
HEPES (Nacalai tesque)	2.0
Bacto Agar (Becton, Dickinson & Co)	15.0

\*<sup>1</sup> 人工海水培地を S100-20, S75-15, または S20-10 として 1,000 mL に添加。

表 3-6. 1/3CY- および 1/6CY-SWS 培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )* <sup>1</sup>	
	1/3CY-SWS	1/6CY-SWS
Bacto Casitone (Becton, Dickinson & Co)	1.0	0.5
Yeast Extract (Becton, Dickinson & Co)	0.3	0.15
Bacto Agar (Becton, Dickinson & Co)	15.0	15.0

\*<sup>1</sup> 人工海水培地 S100-20, S75-15, または S20-10, 1,000 mL に添加。

表 3-7. N2.0-SWS 培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )* <sup>1</sup>
Casein natrium (Natrose, Wako)	2.0

\*<sup>1</sup> 人工海水培地を S100-20, S75-15, または S20-10 として 1,000 mL に添加。

### 3.2.4 海洋性・汽水性粘液細菌の分離操作

#### 1) 細菌捕食性粘液細菌の分離法—大腸菌生菌体塗抹法

図 3-2 に示す方法で、細菌捕食性の海洋性粘液細菌の分離を行なった。基本的な分離操作は先行研究 (Reichenbach and Dworkin, 1992; 不藤, 2002) と同様である。まず S75-15 寒天培地 (表 3-3) の表面に *Escherichia coli* (*E. coli*) 生菌体を線状に塗抹し、その一端に少量の試料 (砂, 海藻など) を乗せ、試料や培地の乾燥を防ぐために密閉容器 (アナエロパック嫌気ジャー, 三菱化学(株)製) に収納し、暗所、30°C で 2 - 3 週間置いた (図 3-2A)。この間 2 - 3 日おきに粘液細菌に特徴的な、大腸菌生菌体を溶解しながら拡散するコロニー、いわゆる swarm の出現を実体顕微鏡下で観察した。一度、swarm が出現しても、しばらく放置すると、生育が速い別の滑走細菌が後から出現して swarm 上を覆う場合があり、粘液細菌の純化が困難となることがあった。さらに純化のために、swarm

最外縁の雑菌が少なそうな部分から少量の菌体を柄付針で寒天小片(1 mm 角)ごと採取し(図 3-2B)、人工海水培地上の線状に塗抹した大腸菌生菌体の一端へ再接種した(図 3-2C)。なお、実際には、菌体は寒天上に二本平行線状に塗抹したが、図 3-2A, B では簡略化し、1 本線で示した。この移植操作を数回反復し、粘液細菌がほぼ純化されたら、次の操作でより高栄養の寒天培地である VY/2-SWS または 1/3CY-SWS 培地への接種を行なった。これらのアミノ酸やペプチドを比較的到高濃度含有する培地上では、粘液細菌以外の夾雑細菌(滑走性細菌)が存在する場合は、拡散性のより厚みのあるコロニーが比較的短時間(2 - 3 日間)で形成されるので、純化が不十分であることが容易に判定できる。接種後、2 - 7 日間培養し、粘液細菌以外の混入菌の生育が見られない場合には、swarm の外縁部分の菌体を寒天片ごと切り出し、12% (w/v) glycerol 溶液に浸し-80°Cでグリセロール・ストックとして凍結保存した。著者の経験では大部分の分離株は、この方法で 10 年以上の長期冷凍保存が可能だった。

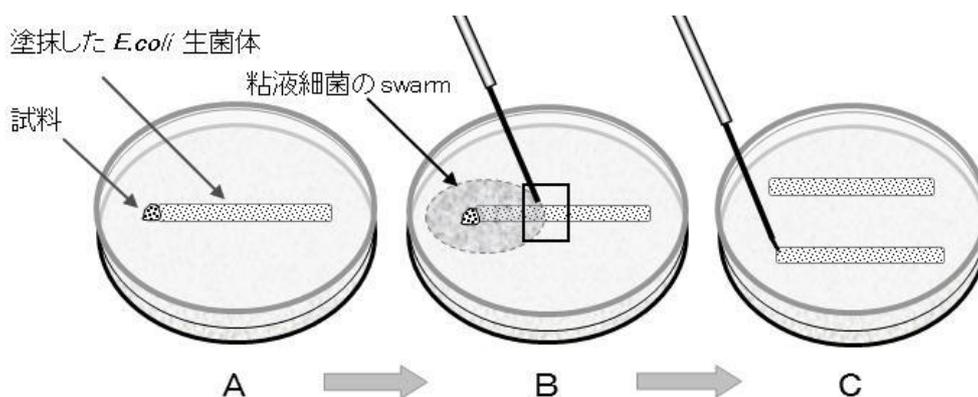


図 3-2. 海洋性・溶菌性粘液細菌の分離方法 (*E.coli* 菌体塗抹法).

以上の操作は、試料の採集から粘液細菌の分離および純化に至るまでに、1-3 ヶ月間を要し、決して効率的方法ではないが、それに代わる迅速な粘液細菌の分離法は考案されていない。新規な粘液細菌の分離を意図した本研究でも、分離法の基本は従来の細菌捕食性の陸生粘液細菌の場合と同様な原理と手法を踏襲した。その上で、分離環境の水質や温度を考慮し、培地や培養温度を工夫して新規な粘液細菌の分離を試みた。分離操作に先立つ試料前処理法として、乾熱処理により分離効率が向上する可能性があることが放線菌などで知られている。そこで、一部試料について乾熱処理(80°C, 5 および 10 分)を行ない、分離効率の向上効果を検討した。

## 2) セルロース分解性菌株の分離法—「ろ紙分解法」

セルロース分解性の粘液細菌は分離操作が煩雑であるが、陸生のセルロース分解性粘

液細菌 *Sorangium cellulosum* からは、第2章に示したように、新規な生理活性物質が数多く見い出されている。そこで本研究でも、海岸環境からの新規なセルロース分解性の粘液細菌の分離を試みた。基本的な分離手法は、*S. cellulosum* の分離法 (Reichenbach and Dworkin, 1992) に従った。図 3-3 に示すように、窒素源として硝酸塩および少量の酵母エキスを添加した Ce-S1 寒天培地 (表 3-4) などの上にろ紙を置き、その中央に少量の試料を乗せ、30°C で培養した (図 3-3A)。ろ紙分解性コロニーが出現したら (図 3-3B)、点線で囲んだコロニーの成長端から、滅菌した柄付き針で少量の菌体を採取した。新たな培地上に置いたろ紙片 (2.0×2.5 cm) の上へ、採取した菌体を接種した (図 3-3C)。このような移植操作を、混在菌の生育状況も見ながら数回繰り返した。次の段階では、細菌溶解性の菌株と同様の純化操作を行ったが、この場合には、生菌体ではなくオートクレーブ処理 (120°C, 5 分間) した菌体を用いた。その理由は、セルロース分解性粘液細菌では、細菌溶解性の陸生粘液細菌 (*Myxococcus xanthus* や *Nannocystis exedens*) に比べ、大腸菌生菌体溶解活性が弱かったからである。さらに、次の操作では、細菌捕食性菌株の場合と同じく、より高栄養の寒天培地 VY/2-SWS または 1/3CY-SWS 培地で培養し、粘液細菌以外の混入菌のコロニー形成の有無を調べた。

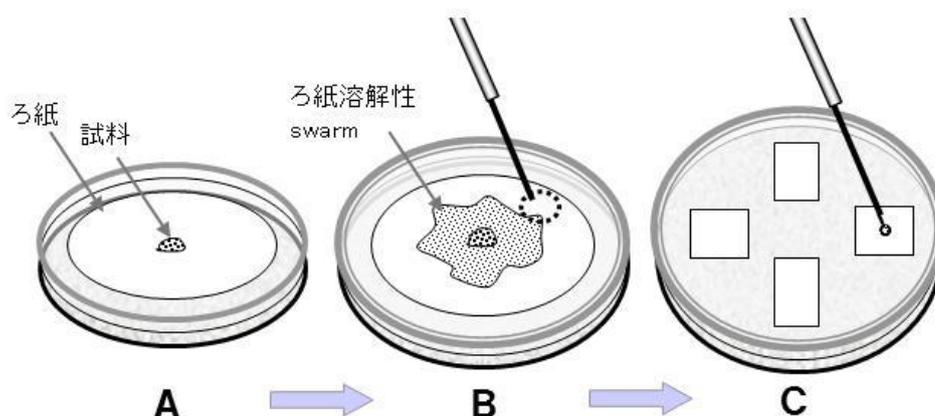


図 3-3. セルロース分解性粘液細菌の分離方法ーろ紙分解法.

この方法の特徴は、まず前段の操作でセルロース分解性の滑走細菌を集積培養してある程度純化し、後半の操作で、さらに溶菌性(あるいは蛋白分解活性)も兼ね備えた菌株を集積培養した点にある。以上は、海洋性菌株の場合を代表例として説明したが、他の異なった環境、たとえば温泉からの探索では(第4章)、それぞれの水質や温度を考慮し、異なる培地組成や培養温度を設定した。

### 3.2.5 供試菌株

海洋性、汽水性粘液細菌の特性評価については、先行研究において分離された未同定の 25 株、および本研究において新規に分離された 24 株を加えて行なった。これらの供試菌株の分離源や分離方法については結果で後述する（表 3-16）。分離株の分類学的特性評価においては、表 3-8 に示す既知の陸生および海洋性の粘液細菌菌種を対照菌株として使用した。

表 3-8. 既知粘液細菌の使用菌株

菌種	菌株	分離源	文献
陸生粘液細菌			
<i>Myxococcus xanthus</i>	IFO 13542 <sup>T</sup> = ATCC 25232 <sup>T</sup>	土壌	Dworkin 1962
<i>Nannocystis exedens</i>	DSM 71 <sup>T</sup>	土壌	Reichenbach 1970
<i>Sorangium cellulosum</i>	YA-2 = AJ13585	土壌	Komaki <i>et al.</i> 2008
海洋性粘液細菌			
<i>Haliangium ochraceum</i>	SMP-2 <sup>T</sup> (= JCM 11303 <sup>T</sup> = DSM 14365 <sup>T</sup> )	海藻	Fudou <i>et al.</i> 2002
<i>Haliangium tepidum</i>	SMP-10 <sup>T</sup> (= JCM 11304 <sup>T</sup> = DSM 14436 <sup>T</sup> )	海草 堆積物	Fudou <i>et al.</i> 2002

### 3.2.6 形態学的表現型試験

栄養細胞については、分離株を 1/3CY-または 1/6CY-SWS 培地（表 3-6）、あるいは N2.0-S75-15 培地（表 3-7）にて、28°C で 3-7 日培養し、位相差顕微鏡 Nikon OPTIPHOT で観察した。子実体および swarm については、VY/2-SWS 寒天（表 3-5）で 28°C、1-2 週間培養し、出現した子実体や swarm を実体顕微鏡で観察した。SIR-1<sup>T</sup> 株については電子顕微鏡により子実体を観察した。試料を osmium (VIII)-oxide (Nacalai) 蒸気中で 3 時間固定し、次に凍結乾燥した後に、白金/パラジウムを真空蒸着し、走査型電子顕微鏡（SEM）Hitachi FE-SEM（S-4000）で写真撮影した。菌体調製の際には液体培地を Erlenmeyer フラスコ（500 mL 容）に 100 mL 分注し、各菌株が生育した寒天培地上のコロニー（swarm）成長部から、寒天小片（5 mm 角）5-10 個分を無菌的に採取して接種し、28-30°C、180 rpm で旋回振とう培養を行なった。

### 3.2.7 生理的・生化学的表現型試験

分離株の生理的性質を検討のため、表 3-9 に示す各種の試験用寒天培地に接種して生育応答を調べ対照菌株と比較した。大部分の粘液細菌については、前培養の際は VY/2-SWS 寒天培地上で、30°C で 1-2 週間生育させた。コロニー先端部分から滅菌ストロー（直径 3 mm）で寒天小片とともに生育菌体を切り出し、表 3-9 に示した各試験用培地に

接種した（寒天小片接種法）。Na<sup>+</sup>などのカチオン要求性や、pH や温度に対する生育の応答は、表 3-9 に示した寒天培地上で、30°C で 2-3 週間の培養後に判定した。嫌気下での生育は、嫌気培養容器（アネロパック、三菱ガス化学）の中で一月間、30°C に保温してから判定した。なお、一部の分離株では、表 3-9 に示す 1/3CY 培地では生育しにくかったため、さらに低濃度の 1/6CY 培地を用いて培養した。培地調製の基本溶液の組成について、汽水性菌株では、低濃度（SWS の 20%）の海水成分と NaCl 10 g L<sup>-1</sup> をふくむ S20-10 溶液も用いた。高分子基質分解活性は、坂田・吉川（2000）の方法を参考として培地を調製した。海洋性粘液細菌の分離株について、以下の生理的諸性質を検討した。

#### 1) NaCl 要求性

各分離株について、NaCl 代替培地 [表 3-9-(1)] で 14 日間の培養を行い、培地中の NaCl を他の無機塩で代替可能か検討した。

#### 2) 生育 NaCl 濃度

各分離株について、表 3-9-(2) に示す NaCl 濃度を 5.0 g L<sup>-1</sup> 刻みで変化させた VY/2-SWS 培地で 14 日間生育させ、そのコロニーの直径を測定し比較することで、生育濃度範囲や至適濃度を求めた。

#### 3) カチオン要求性

各分離株を、表 3-9-(3) に示す各カチオンを除去した寒天培地に接種し、生育の有無を調べた。

#### 4) 生育温度

各試験温度（8-55°C）について、三枚の VY/2-SWS 寒天平板上で同時平行して 1 か月間の培養後に、swarm の直径を測定し、各温度間で比較した。

#### 5) 生育 pH

表 3-9-(5) に示したように、緩衝液で pH 5.2-9.7 に調整した 1/3CY-SWS 寒天上で、30°C にて 2-3 週培養し、pH に対する生育応答を検討した。

#### 6) Congo-Red 反応

VY/2-S75-15 寒天上で培養した供試菌株の swarm に、Congo-Red（赤色色素）の溶液を滴下し、赤色に着色する部分の有無を観察した（McCurdy 1989）。

#### 7) カタラーゼ

過酸化水素（3%）からの酸素発生の有無により判定した。1/3CY-SWS または VY/2-SWS 寒天培地上のコロニーに過酸化水素水を滴下し、10-20 秒以内に発泡が生じれば陽性とした。

#### 8) オキシダーゼ

オキシダーゼテスト・ワコー（和光純薬）を使用した。1/3CY-SWS または N2.0-SWS 液体培地で 3-5 日培養した生育初期の菌体について、直径 2-3 mm の菌塊を滅菌スパテラなどで採取し、試験用キットの濾紙片上に押し付け塗抹した。説明書に従い、試薬が

30 秒以内で濃紺色に変色した場合に、陽性と判定した。

#### 9) デンプン分解活性 (アミラーゼ)

でん粉寒天培地 [表 3-9-(9)] で分離株を培養し、ヨウ素でん粉反応でデンプン分解の有無を判定した。

#### 10) セルロース分解活性

Ce-S1 培地 (表 3-4) のろ紙上における分離株の生育および、ろ紙分解を観察した。

#### 11) キチン分解活性

キチン寒天 [表 3-9-(11)] で分離株を培養し、swarm 周辺でキチン粉末が溶解した部分が観察されれば分解活性陽性と判定した。

#### 12) アルギン酸分解 (アルギナーゼ)

アルギン酸寒天 [表 3-9-(12)] で分離株を培養し、swarm とその周囲にアセトンを滴下した。アルギン酸が未分解の部分は白濁し、分解された部分は透明になるので、透明な部分があれば酵素活性は陽性と判定した。

#### 13) キシラン分解

キシラン寒天培地 [表 3-9-(13)] 上で供試菌株を 1 - 2 週培養したのち、swarm およびその周囲にヨウ素液 (グラム染色用ルゴール液, Nacalai) を滴下し、非染色部分が観察されれば、キシラン分解活性を陽性と判定した (Lang *et al.*, 2008)。

#### 14) ゼラチン分解 (ゼラチナーゼ)

ゼラチン寒天 [表 3-9-(14)] で分離株を培養し、swarm の周囲にトリクロロ酢酸 : 30% (w/v) の溶液を滴下し、透明部分が認められればゼラチナーゼ陽性と判定した。

#### 15) カゼイン分解活性

N2.0-SWS 液体培地 (表 3-7) に、VY/2-SWS 寒天上で前培養した菌体を寒天片とともに接種し、5 - 10 日間の旋回振とう培養を行った。カゼインの熱変性による白い不溶性物質が溶解し、培地が透明になった場合は分解活性が陽性と判定した。

#### 16) エステル (Tween 80) 分解活性

Tween 80 寒天 [表 3-9-(16)] において、Tween 80 がリパーゼにより加水分解され、脂肪酸が遊離しカルシウム塩となり、swarm の周囲に不溶性白沈が生じれば Tween 80 分解陽性と判定した。

#### 17) DNA 分解活性

DNA 寒天 [表 3-9-(17)] で分離株を培養し、swarm 径が 10-20 mm に達した時点で 1.5 M 塩酸を swarm とその周囲に滴下し、透明部分が観察されれば陽性と判定した。

表 3-9. 海洋性粘液細菌の生理的・生化学的表現型試験

表現型	試験培地	培地の特徴
(1) NaCl 要求性	NaCl 代替培地	人工海水 (SWS) に NaCl を添加せず, かわりに等モル: 0.34 M の次の無機塩を添加. MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, KCl, LiCl, NaBr, または NaI
(2) 生育 NaCl 濃度	VY/2-SWS 寒天培地	NaCl 濃度を 0.0–50.0 g L <sup>-1</sup> の間で, 5.0 g L <sup>-1</sup> 刻みの各濃度に調製.
(3) カチオン要求性	カチオン除去培地	SWS 中の無機塩を一成分だけ除去した各溶液 (OM1-6) を調製. これらに対し VY/2 培地および 1/3CY 培地の成分を添加. 各溶液の名称および除去した成分: OM1, (-) MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; OM2, (-) CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O; OM3, (-) KCl; OM4, (-) KBr; OM5 (-) KCl および (-) KBr; OM6, (-) 微量金属溶液
(4) 生育温度	VY/2-SWS 寒天	表 3-5
(5) 生育 pH	1/3CY-SWS 寒天	緩衝剤 (Sigma) を添加, 各 pH に調製. pH 5.2–6.7, 5 mM MES; pH 6.5–8.5, 5 mM TES; pH 8.0–9.7, 5 mM AMPSO
(6) Congo red 反応	VY/2-S75-15 寒天	
(7) カタラーゼ	1/3CY または VY/2-SWS 寒天	
(8) オキシダーゼ	1/3CY または N2.0-SWS 液体培地	
各種基質の分解活性		基本溶液 (SWS) 組成は, S100-20 または S75-15 を用い, 培地 pH は 7.2 に調整.
(9) デンプン分解	でん粉寒天	1/3CY-SWS および VY/2-SWS 寒天に可溶性でん粉 2 g L <sup>-1</sup> を添加.
(10) セルロース分解	Ce-S1 培地	寒天培地の表面にろ紙を置く.
(11) キチン分解	キチン寒天	1/3CY-SWS 寒天培地の基層上に, キチン (purified, Sigma) 4 g L <sup>-1</sup> ; Bacto agar 12 g L <sup>-1</sup> を含むゲルを重層.
(12) アルギン酸分解	アルギン酸寒天	1/3CY-SWS 寒天培地の基層上に, アルギン酸 Na, 25 g L <sup>-1</sup> ; Bacto agar 12 g L <sup>-1</sup> を含むゲルを重層.
(13) キシラン	キシラン寒天	C0.5 (Bacto Casitone, 0.5 g L <sup>-1</sup> ) 培地に xylan (from oat spelt, Sigma-Aldrich), 5 g L <sup>-1</sup> 添加.
(14) ゼラチン分解	ゼラチン寒天	Bacto gelatin (Becton, Dickinson & Co) 4.0 g L <sup>-1</sup> ; HEPES (Nacalai tesque) 2.0 g L <sup>-1</sup> を SWS に添加.
(15) カゼイン分解	N2.0-SWS 液体培地	表 3-7
(16) エステル分解	Tween80 寒天	1/3CY-SWS 寒天培地に Tween80 1.0 g L <sup>-1</sup> を添加.
(17) DNA 分解活性	DNA 寒天	1/3CY-SWS 寒天に, DNA (サケ精子由来, Nacalai), 4.0 g L <sup>-1</sup> を添加.

### 3.2.8 API-ZYM 試験

API-ZYM Msystem (API BioMerieux) を用い, 説明書に従い測定した。VY/2 寒天培地上で 28–30°C (分離株の至適温度) にて 1–2 週間生育させてから, swarm の先端部分から寒天小片 (一辺 3 mm の立方体) を無菌的に切り出し酵素源として供試した。37°C で 6 時間反応させ, 反応液の発色度合いから酵素活性の強弱を判定した。

### 3.2.9 キノン分析

海洋性粘液細菌の菌体キノンの分析は、既知の方法 (Hiraishi *et al.*, 1984) に従った。1/3CY-または N2.0-SWS 液体培地で培養して得た湿菌体をアセトン脱水し、クロロホルム：メタノール混液 (2 : 1, v/v) で菌体脂質を抽出した。脂質画分を濃縮乾固後、ヘキササンでキノン類を抽出して濃縮し、シリカゲル TLC によりメナキノン画分 ( $R_f$  値, 0.65–0.75) を分取した (表 3-10)。得られたメナキノン画分を少量のアセトンに溶解し、HPLC 分析に供試し、分子種の同定と定量を行った (表 3-11)。さらに、質量分析を行い (EI-MS : JEOL JMS-DX300 spectrometer at 70eV)、構造を確認した。

表 3-10. キノン分画のための TLC の分析条件

方法・構成	条件・仕様
TLC プレート	シリカゲル TLC plate (Merck), 0.5 mm、20×20 cm
展開液	ヘキササン-ジエチルエーテル (85 : 15, v/v)
検出	UV ランプ (254 nm)

表 3-11. キノン分析のための HPLC 条件

構成	条件・仕様
ポンプ	Beckman 110B
カラム	Beckman Ultrasphere ODS (4.6×250 mm)
移動相	メタノール : ジイソプロピルエーテル (4 : 1, v/v)
流速	1 mL min <sup>-1</sup>
検出器	Beckman 168 Diode Array detector
モニター波長	254 nm, 270 nm

### 3.2.10 菌体脂肪酸組成の分析

乾燥菌体 (約 25 mg) に対してメタノリシス反応 (5% HCl-MeOH 液 : 1 mL、100°C、3 時間) を行い、その後ヘキササン-水混合液 (2 mL:1 mL) を加えて抽出し、ヘキササン層に脂肪酸メチルエステルを回収した。ヘキササン画分を無水硫酸ナトリウムで脱水し、さらに減圧濃縮後、少量のクロロホルムに溶解し、GC-MS [ガスクロマト-マスフラグメントグラフィ、および MIDI 社の Sherlock Microbial Identification System (MIS software ; <http://www.midi.inc.com/index.html>) ] により、分子種を分析・同定した。

表 3-12. 脂肪酸分析のための GC-MS 条件

構成	条件・仕様
機種	Model HP 5972 (Hewlett Packard)
カラム	Fused capillary column (TC-70) 0.25 mm×30 m
カラム温度	70°C (1 min) → 5°C min <sup>-1</sup> → 240°C (7 min)
キャリアーガス	He (スプリットレス注入)
流速	1 mL min <sup>-1</sup>

### 3.2.11 DNA の G+C 含量の測定

Saito and Miura (1963) の方法で DNA を抽出し、DNA Genomic-tips (QIAGEN) を用いて精製した。DNA は Nuclease P1 (Yamasa) によりヌクレオチドとし、HPLC 法 (Tamaoka and Komagata, 1984) (表 3-13) により、DNA 塩基組成 (G+C mol%) を測定した。定量の標準試料として、*Micrococcus luteus* の DNA (G+C 含量 72 % mol/mol; Sigma) を用いた。

表 3-13. DNA 塩基組成分析のための HPLC 条件

構成	条件・仕様
ポンプ	Shimadzu LC-6A
カラム	Shiseido CAPCELL Pack C18 (4.6 mm×250 mm)
移動相	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
流速	1.2 mL min <sup>-1</sup>
検出器	UV ランプ (270 nm)

### 3.2.12 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅と塩基配列決定

平石 (1995a, b, c) の方法に従って、16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅と塩基配列解読を行なった。1/3CY-SWS または N2.0-SWS 液体培地中で菌体を調製し、生理食塩水に懸濁して 1 回洗浄後、溶菌緩衝液を加え、60°C、20 分加熱してプロテアーゼ処理した。次に、沸騰水中で 5 分加熱しプロテアーゼを失活させ、その遠心上清を cell lysate として回収し、これを PCR の鋳型 DNA 試料として用いた。PCR primer は、大腸菌の 16S rRNA のポジション 8-27 および 1492-1510 に相当する universal primers 27f および 1492r を使用した (表 3-14)。PCR は ExTaq DNA polymerase kit を用い、反応液 50 μl 当たり、鋳型 DNA 1.0 μL、各プライマー 0.4 pmol μL<sup>-1</sup> を添加して行なった。反応条件は、94°C-1 分→50°C-1 分→72°C-1.5 分、の反応を 30 サイクル行い、最後に伸長後反応を 72°C-5 分間で行った。PCR 反応後、PCR 産物を PEG 沈殿法で回収した。増幅反応 Primer は、forward (8-

27) に fD1、reverse (1492-1510) に rP1 をそれぞれ用いた。Direct PCR 法に従い、Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus) 反応により cell lysate から 16S rRNA 遺伝子断片を増幅し、PCR 増幅産物はゲル切り出し法により精製した。生成した PCR 産物について Sequi Therm™ Long-Read™ Cycle sequencing kit (Epicenter Technology) を用いてシーケンス反応を行い、レーザー蛍光 DNA シーケンサー A.L.F. DNA sequencer (Pharmacia) によって反応生成物を泳動、検出した。

表 3-14. PCR に用いた 16S rRNA 遺伝子増幅用プライマーの塩基配列

名称	方向	位置*	塩基配列 (5'-3')
27f	forward	8-27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492r	reverse	1492-1510	CGGTTACCTTGTTACGACTT

\* *Escherichia coli* 16S rRNA 遺伝子上の位置.

### 3.2.13 系統解析と類別化

得られた塩基配列データは GENETYX-MAC (ソフトウェア開発株式会社) により編集した。編集した配列は、Ribosomal Data Project (RDP) の Seqmatch プログラム (Cole *et al.*, 2014) を用いて相同性解析した。系統解析用配列データファイル (fasta 形式) は、YooEdit (日経 MIX) を用いて作成した。DDBJ/Genbank/EMBL の DNA データバンクから既知の粘液細菌の配列データをダウンロードし、CLUSTAL W プログラム (Thompson *et al.*, 1994) を用いて多重アラインメント、進化距離 (Kimura [1980] の two-parameter model による  $K_{nuc}$  値) の計算、および系統樹作成を行った。系統樹作成は、近隣結合法 (neighbour-joining method) のアルゴリズム (Saitou and Nei, 1987) を使用し、各分節の統計学的信頼度はブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) による 1,000 回抽出で算出した。系統樹作成と描画には MEGA6 プログラム (Tamura *et al.*, 2011) を用いた。

このような系統解析の結果に表現型試験のデータを加味して、既知属とは異なる分離株を操作的分類単位 (operational taxonomic units, OTU) に分類した。結果 (§ 3.3) で述べるように、海洋性、汽水性の分離株は 7 つの OTU に分類され、これらの中で、明らかに新属と考えられる 4 つの OTU (OTU-1, -2, -3, -4) に焦点を当てて系統・分類学的検討を行なった。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 新規海洋性、汽水性粘液細菌の分離

先行研究（不藤および飯塚）において採取した試料および今回日本各地の海岸から採取した合計 755 試料から、細菌溶解性の拡散性コロニー（swarm）形成性細菌として合計 54 株を分離した。それらのうち、25 株は先行研究で分離したもの、34 株は今回新たに分離したものである。先行研究の 25 株および新規に分離した中の 24 株を合わせた 49 株は培養上粘液細菌の特性を示した。すなわち、図 3-4A, B に示すように、浅く陥没したクレーター状もしくは薄膜状の swarm を形成した。このような形態的特徴は、陸生の *Nannocystis* 属や *Chondromyces* 属の粘液細菌と類似した。類似した swarm を形成する細菌は、北海道から南西諸島まで日本沿岸に普遍的に分布していた。他方で、利尻島から分離された SRI-2 株を含む 5 株は、16S rRNA 遺伝子配列の系統上（後述 § 3.3.3）は *Myxococcus* 属に近縁であり、好塩性でなく耐塩性であった。これら 5 株は、NaCl 濃度が 2.0 - 2.5% (w/v) までは生育したが、海水相当の NaCl 濃度 3.0% では生育しなかった。

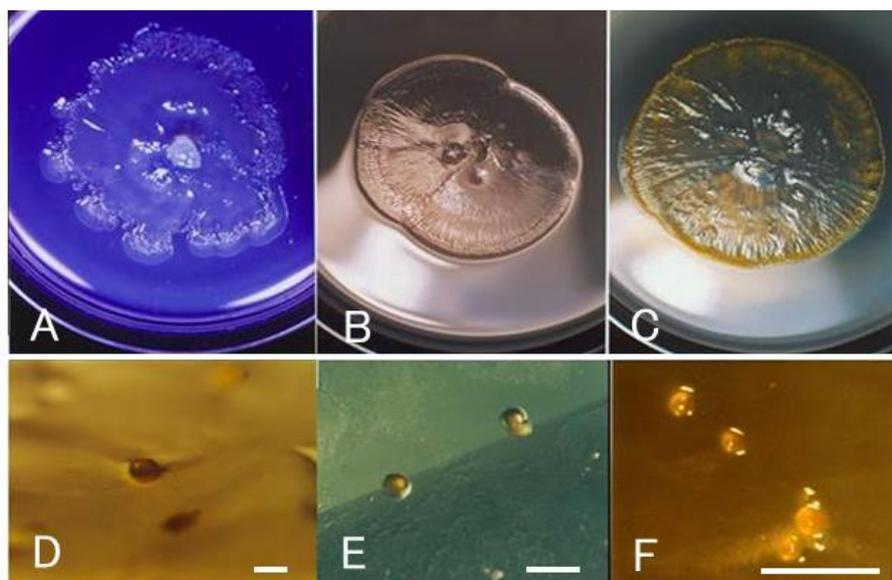


図 3-4. 寒天培地上における海洋性粘液細菌のコロニーと子実体. (A) SHK-1<sup>T</sup>, 1/3CY-S100-20 培地; (B) SHI-1, VY2-S100-20 培地; (C) 比較対象株 *Haliangium ochraceum* SMP-2<sup>T</sup> (Fudou *et al.* 2002), VY2-S100-20 寒天培地上で黄色の皮膜状のコロニーを形成; (D) SHK-1<sup>T</sup> の子実体, bar=100 μm; (E) SHI-1 子実体, Bar=100 μm; (F) SMP-2<sup>T</sup> 子実体, Bar=1mm. 培地は (D)-(F) ともすべて VY2-S100-20 寒天.

供試した試料総数あたりの細菌溶解性コロニー (swarm) の出現率は、平均で約 20% であった。さらに、粘液細菌の分離株として純化できた試料数 (菌株数) は試料総数あたり約 7% であり、出現した swarm 形成菌株の内の純化の成功率は約 35% となった。表 3-15 には、1997 年 7 月から 1998 年 12 月までに採取した試料について、試料の種類ごとに、分離培地の餌細菌の菌種による、swarm の出現率および純化率を比較した結果を示す。なお、この場合には試料の加熱前処理は行わなかった。粘液細菌の出現率は、泥、海岸動物、砂および海草で比較的に高い傾向を示した。一方で純化率は、砂や泥で比較的に高く、試料点数あたり 8-10% だった。これに対し、海岸動物や海草の場合には、純化を妨げる滑走細菌が出現することが多く、分離率は低い傾向にあった。餌として用いた 2 種の細菌については、粘液細菌の分離効率にほとんど差は認められなかった。

表 3-15. 海岸試料の種類および分離培地の餌細菌と粘液細菌の出現・分離率の関係

試料の種類	分離培地・餌細菌	試料数	出現株数 (出現率 %)	分離株数 (分離率 %)
海岸動物	Ec -S75,15	18	5 (28)	0 (0)
	Alt -S75,15	25	6 (24)	0 (0)
海草 (アマモ)	Ec -S75,15	29	7 (24)	1 (3)
	Alt -S75,15	14	2 (14)	0 (0)
海藻 (褐藻)	Ec -S75,15	21	3 (14)	1 (5)
	Alt -S75,15	21	2 (10)	0 (0)
海藻 (緑藻)	Ec -S75,15	27	3 (11)	0 (0)
	Alt -S75,15	45	2 (4)	0 (0)
木片	Ec -S75,15	19	1 (5)	0 (0)
	Alt -S75,15	23	3 (13)	0 (0)
砂	Ec -S75,15	45	7 (16)	3 (7)
	Alt -S75,15	88	22 (25)	8 (9)
泥	Ec -S75,15	8	2 (25)	1 (12)
	Alt -S75,15	11	6 (55)	1 (9)
合計				15

先行研究および本研究で分離した海洋性粘液細菌 49 株およびそれらの分離源や分離培地について表 3-16 に一覧する。分離株の大部分は、グラム染色陰性細菌である大腸菌または *Alteromonas haloplanktis* を餌とした 2 つの分離用寒天培地、Ec-S75-15 および Alt-S75-15 を用いて分離された。セルロース分解性粘液細菌についても、不藤の方法 (2002) に基づいて約 200 試料から分離を試みたが、検出できなかった。その理由として、セルロース分解性粘液細菌は海洋環境には分布していない、または生息はしているが集積培養が困難、などが考えられる。

表 3-16. 海洋性粘液細菌の分離源および分離培地

菌株名	採集地点	分離源	分離方法* <sup>1</sup>
			培地 (乾熱処理)
SHK-1 (★)	2	泥	Ec-JSK*75 (80/5)
SHK-4 (★)	3	泥 (腐植質)	Ec-S75-15
SHK-11	4	泥 (アマモ葉下)	Ec-S75-15
SKK-1	9	砂	Alt-JSK*75 (80/5)
SKK-2	9	海藻 (緑藻)	Ce-S1 (80/10)
SMK-1-1	10	砂	Alt-JSK*75 (-)
SMK-1-2	10	砂	Alt-JSK*75 (80/5)
SMK-1-3	10	砂	Alt-JSK*75 (-)
SMK-2-1 (★)	10	砂	Alt-JSK*75 (-)
SMK-2-2 (★)	10	砂	Alt-JSK*75 (-)
SMK-3-1 (★)	10	砂	Ce-S1 (80/5)
SMK-3-2 (★)	10	砂	Alt-S75-15 (80/10)
SMK-3-3 (★)	10	木片	Ce-S1 (80/5)
SMK-4-1 (★)	10	海藻 (褐藻)	Alt-JSK*75 (80/5)
SMK-4-2 (★)	10	海藻 (褐藻)	Ce-S1 (80/5)
SMK-5-1 (★)	10	海藻 (紅藻)	Ce-S1
SMK-5-2 (★)	10	海藻 (紅藻)	Ce-S1 (80/5)
SMK-9 (★)	10	砂	Alt-JSK*75 (-)
SMK-10 (★)	10	海藻 (褐藻)	Alt-JSK*75 (-)
SNB-1	11	砂	Alt-S75-15 (-)
SNB-2	11	砂	Alt-S75-15 (-)
SNB-3	11	砂	Alt-S75-15 (-)
SKP-2	12	海藻 (緑藻)	Ec-JSK*75 (-)
SMP-4	13	砂	Ec-JSK*75 (-)
SMP-6	13	砂	Ec-JSK*75 (-)
SMP-3	13	砂	Ec-JSK*75 (-)
SMH-97-3	15	砂	Ec-S75-15 (-)
SMP-7	16	海藻 (褐藻)	Ce-S1
SMP-8 (★)	16	海藻 (褐藻)	Ce-S1
SMH-02-3	16	砂	Ec-S75-15 (-)
SMH-27-4 (★)	18	海岸土壌	Ec-S20-10 (-)
STM-1	19	木片 (杭)	Ce-S1
SIW-2	21	砂	Alt-S75-15 (-)
SIW-3	21	砂	Alt-S75-15 (-)
SBP-1 (★)	21-2	木造物	Ec-S75-15 (-)
SSB-1	22	砂	Alt-S75-15 (-)
SYM-1 (★)	23	砂	Ec-S75-15 (-)
SYM-2 (★)	23	砂浜の落ち葉	Ec-S75-15 (-)
SYM-3 (★)	23	海草	Ec-S75-15 (-)
SYM-4 (★)	23	砂	Ec-S75-15 (-)
SYM-5 (★)	23	海草	Ec-S75-15 (-)
SHI-1	24	砂	Ec-JSK*75 (-)
SSJ-1	25	カニ遺体 (甲)	Alt-S75-15 (80/5)
SYR-2 (★)	26	泥 (河口域)	Ec-S20-10 (-)
SAB-1	29	泥 (干潟)	Ec-S75-15 (-)
SNM-1	32	砂	Alt-S75-15 (-)
SIS-1	34	マングローブ樹皮	Alt-S75-15 (80/5)
SIS-2	34	砂 (珊瑚礁域)	Alt-S75-15 (80/5)
SIR-1 (★)	36	海草	Ec-JSK*75 (-)

(★), 本研究の分離株. \*<sup>1</sup>, (80/5), 80°C, 5 分間の試料の乾熱前処理; (-), 試料無処理; それ以外は加熱と非加熱の両方を供試; JSK\*75, Jamarine Seawater kit の 75 % 溶液を培地調製に使用.

海水よりも低い NaCl 濃度の環境に適応した粘液細菌の菌株を得るため、NaCl 濃度 1.0% (w/v) の Ec-S20-10 寒天培地を用い、粘液細菌の分離を試みた。その結果、汽水性粘液細菌 SYR-2<sup>T</sup> 株および SMH-27-4<sup>T</sup> 株を得た。SYR-2<sup>T</sup> 株は吉野川河口域の泥質試料の一つから、SMH-27-4<sup>T</sup> 株は三浦半島・荒井浜海岸の低木灌木林の根圏土壌試料の一つから、それぞれ分離された。しかし、汽水性粘液細菌の分離を目的とした低塩分の寒天培地での分離操作では、海洋性粘液細菌や陸生粘液細菌も分離された。このように、汽水性粘液細菌に対し、特異的かつ効率的に分離する方法は本研究では見いだせなかった。

また、海岸土壌試料からの SMH-27-4<sup>T</sup> 株の分離操作中、抗真菌剤 cycloheximide を添加した寒天培地でもカビが出現し、旺盛に生育した。その場合には nystatin 粉末を追加的に添加することによりカビの生育は抑制され、分離が可能となった。このような、糸状菌が優占すると思われる試料では、分離操作の前処理として、試料の乾熱処理 (80°C, 5 分) が有効な場合もあった。なお、80°C, 10 分処理では、かえって分離効率が低下する傾向がみられた。土壌試料の場合には、無処理試料ではカビ、ダニや線虫も出現し、粘液細菌の分離は困難な場合が多かった。

### 3.3.2 海洋性、汽水性粘液細菌分離株の形態および培養上の特徴

海洋性粘液細菌の 49 株について、コロニーや子実体の形態観察や生理的性質に基づいて分類学的区分を試みた。しかし、**図 3-4C** に示すように、外観上識別可能な淡褐色・黄色の膜状コロニーを形成する比較対照株の *Haliangium ochraceum* SMP-2<sup>T</sup> とは異なり、分離株のコロニー (swarm) は外見が互いに類似し、培養・形態的特徴による識別は困難だった。10-20 日の培養後は、球状もしくは多角体の細胞塊が寒天培地上または寒天ゲル内に形成されることがあり、それらは子実体あるいは子実体様の細胞塊と考えられた (**図 3-4D-F**)。しかし、これらの子実体あるいは細胞塊にも際立った形態的特徴がなく、外見からの区別は困難だった。それらの内部には球形-楕円体の細胞が観察され、孢子 (myxospore) と推定された。子実体の外側には明瞭な袋状の外皮は形成されなかったが、粘質物から成る皮膜状の覆いが顕微鏡下で観察された。菌株によっては子実体の形成は再現しなかった。

分離株の培養上の特徴や生理的表現型について、*Haliangium* 属粘液細菌と比較しながら **表 3-17** に示す。海洋性、汽水性粘液細菌の分離株は、すべて NaCl 要求性であったが、NaCl 濃度に対する生育の応答は異なっていた。分離株のカチオン要求性については、カチオン除去培地での生育結果から、一部の分離菌株は NaCl 以外に Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、あるいは K<sup>+</sup> を生育に要求することが判明した。なお、全分離株について、要求する NaCl は NaBr により代替可能だったが、その場合は生育が遅くなった。NaI は NaCl を代替できず、むしろ生育阻害した。K<sup>+</sup> および Li<sup>+</sup> は Na<sup>+</sup> を代替しなかった。生育至適 pH はどの分離株も中性付近だった。生育温度は、大半の分離株は中温域の 25-30°C 付近が至適

であり、40°C 以上では生育しなかった。しかし、SYM-1 株のみ、既報の *Haliangium tepidum* SMP-10<sup>T</sup> 株 (Fudou *et al.*, 2002) と同様に、45°C でも生育可能であった。

表 3-17. 海洋性粘液細菌の分離株および *Haliangium* 属粘液細菌の形態的, 生理的表現型

菌株名	子実体様 構造物	生育食塩濃度 (%)		陽イオン 要求性* <sup>2</sup>
		範囲	至適	
SHK-1	+	0.1 - 4.0	1.0 - 2.0	Ca or Mg
SHK-4	+	Nt* <sup>1</sup>	1.0 - 2.0	Nt
SHK-11	+	Nt	1.0 - 2.0	Nt
SKK-1	-	Nt	1.0 - 2.0	Ca, K
SKK-2	+	0.1 - 4.0	1.0 - 2.0	Ca or Mg
SMK-1-1	+	0.1 - 4.0	1.0 - 2.0	Ca or Mg
SMK-1-2	+	Nt* <sup>1</sup>	Nt	Nt
SMK-1-3	-	0.1 - 4.0	1.0 - 2.0	Ca or Mg
SMK-2-1	+	Nt	1.0 - 2.0	Nt
SMK-2-2	-	Nt	Nt	Nt
SMK-3-1	+	Nt	1.0 - 2.0	Mg, (Ca), K
SMK-3-2	-	Nt	1.0 - 2.0	Nt
SMK-3-3	-	Nt	Nt	Nt
SMK-4-1	+	0.1 - 4.0	1.0 - 2.0	Nt
SMK-4-2	+	Nt	1.0 - 2.0	Nt
SMK-5-1	+	Nt	1.0 - 2.0	(K)
SMK-5-2	+	Nt	1.0 - 2.0	Nt
SMK-9	+	Nt	1.0 - 2.0	Nt
SMK-10	+	0.1 - 4.0	1.0 - 2.0	Ca or Mg
SNB-1	+	0.0 - 4.5	1.0 - 2.0	Nt
SNB-2	+	0.0 - 4.5	1.0 - 2.0	Nt
SNB-3	-	0.2 - 4.0	0.5 - 2.5	K
SKP-2	-	0.0 - 3.5	0.5 - 2.0	Nt
SMP-4	-	Nt	Nt	Nt
SMP-6	+	0.1 - 4.0	1.0 - 2.0	Ca or Mg
SMP-3	-	1.0 - 7.5	2.0 - 2.5	Nt
SMH-97-3	+	Nt	Nt	Nt
SMP-7	+	Nt	1.0 - 2.0	K
SMP-8	+	Nt	Nt	Nt
SMH-02-3	+	Nt	1.0 - 2.0	Nt
SMH-27-4	-	0.0 - 3.0	0.5 - 1.5	Mg, Ca
STM-1	+	0.2 - 4.5	1.0 - 2.0	Ca
SIW-2	-	Nt	1.0 - 2.0	K
SIW-3	-	Nt	Nt	Nt
SBP-1	+	Nt	1.0 - 3.0	Ca or Mg
SSB-1	-	Nt	Nt	Nt
SYM-1	+	Nt	Nt	Nt
SYM-2	-	Nt	Nt	Nt
SYM-3	-	Nt	Nt	Nt
SYM-4	-	Nt	Nt	Nt
SYM-5	-	Nt	Nt	Nt
SHI-1	+	0.5 - 4.0	2.0 - 2.5	Mg, Ca, K
SSJ-1	+	0.0 - 4.5	1.0 - 2.0	K
SYR-2	+	0.0 - 2.5	0.5 - 1.0	Mg, Ca
SAB-1	+	0.2 - 5.0	1.0 - 2.0	Ca
SNM-1	+	0.5 - 5.0	1.0 - 2.0	K
SIS-1	+	0.2 - 4.5	2.0 - 2.5	Ca
SIS-2	+	0.5 - 4.5	2.0 - 3.0	Ca
SIR-1	+	0.5 - 4.0	2.0 - 2.5	Mg, Ca, K
<i>Haliangium ochraceum</i> SMP-10 <sup>T</sup>	+	0.2 - 6.5	1.0 - 3.0	Ca
<i>Haliangium tepidum</i> SMP-2 <sup>T</sup>	+	0.2 - 6.5	1.0 - 3.0	Mg, Ca

\*<sup>1</sup> Nt, 未試験.

\*<sup>2</sup> (K), (Ca): K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>なしでも生育可, しかし生育速度低下.

### 3.3.3 16S rRNA 遺伝子配列およびキノン型に基づく分離株の類別化

上記したように、海洋性粘液細菌分離株は培養・形態的特徴による区別が困難だった。そこで分離した 49 株の中で 30 株を選択し、16S rRNA 遺伝子の全長塩基配列に基づく分子系統解析と呼吸鎖キノン系の化学分類学的解析を行ない、属・科レベルでの分類学的帰属を試みた。これらの結果について、表 3-18 に一覧する。

16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を PCR 増幅し、サンガー法により塩基配列を解読した。得られた編集後の配列は 1424-1554 塩基であり、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長をカバーした。これらの解読配列について RDP Seqmatch を用いて相同性解析を行ない、この結果に基づいて DNA データバンクより類縁配列を取得し、近隣結合法による系統樹を作成した(図 3-5)。その結果、試験した 30 株中 26 株は、ミクソコックス (*Myxococcales*) 目の中のナノシステイス亜目 (suborder *Nannocystineae*) に属した。科 (family) としては、25 株がナノシステイス (*Nannocystaceae*) 科、1 株はハリアンギウム ("*Haliangiaceae*") 科に属した。図 3-5 の系統樹上の位置からも明らかのように、ナノシステイス科の 25 株は既知の陸生粘液細菌や海洋性の *Haliangium* 属細菌とは、明らかに属レベルで隔たっていた。また、これらの 25 株は、お互い属レベルあるいは種レベルで明らかに異なると思われる 7 系統に分けられ、OTU-1 から OTU-7 として分類した。さらに本研究では、属レベルで異なるのではないかと推定される四つの OTU (OTU-1 から OTU-4) を選択し、詳細な分類学的検討を行うことにした。まず、SHI-1 と SIR-1<sup>T</sup> の 2 株は互いに分子系統上の相同性が高く、種レベルで同一と考えられ、これらに近縁と考えられる SIS-2 株を加えて OTU-1 として分類した。二番目として、この OTU-1 から進化距離が少し隔たった別系統として、19 株から構成される OTU-2 が認められた。この中で、とくに SHK-1<sup>T</sup>、SKK-2、SMK-1-1、SMK-1-3、SMK-10 および SMP-6 の 6 株はお互い相同性が高く、OTU-2 内で同一種とするのが妥当と考えられるサブクラスターを形成した。3 番目として、汽水性粘液細菌 SYR-2<sup>T</sup> 株、4 番目として同じく汽水性の SMH-27-4<sup>T</sup> 株のそれぞれ 1 株が独自の系統を成しており、それぞれ OTU-3 および OTU-4 とした。OTU-5 から OTU-7 も 1 株ずつで構成された。なお、16S rRNA 遺伝子解析に用いた上記 30 株の内、2 株 (SKP-2、SKP-3) は、系統解析結果から粘液細菌ではない、デルタプロテオバクテリア綱デスルフォバクター (*Desulfobacterales*) 目の新規な滑走性細菌であることが判明した。残りの 1 株 SRI-2 は *Myxococcus* 属菌株であった。

分離株の大部分についてキノン型の分析を行なった結果、メナキノン-7 (MK-7)、MK-8、および MK-8(H2) (1 部分飽和型メナキノン-8) の三つのキノン系が検出され、上記の 7 つの OTU ではキノンが異なることが判明した。すなわち、OTU-1 は MK-8(H2)、OTU-2、-3、-6、-7 は MK-7、OTU-4 は MK-8 を主要キノンとしてもつことがわかった。したがって、系統解析とキノン分析の結果を合わせて、とくにキノン型と分離源 (海洋性、汽水性) が異なるの四つの OTU (OTU-1~OTU-4) を選択し、さらに分

類学的検討を行なうことにした。以下、これら四つの OTU ごとに系統・分類学的位置を詳細に述べる。

表 3-18. 海洋性粘液細菌 49 分離株の一覧および高次分類学的帰属

菌 株* <sup>1</sup>	16S rRNA 遺伝子 解読鎖長	DDBJ 登録番号	系統・分類学的帰属 (科, 属)	OTU No.	キノン型	子実体 様構造 物* <sup>2</sup>
1. SIR-1 <sup>T</sup>	1484	AB083432	<i>Nannocystaceae</i>	1	MK8(H2)	+
2. SHI-1	1483	AB016469	<i>Nannocystaceae</i>	1	MK8(H2)	+
3. SIS-2	1554	LC068864	<i>Nannocystaceae</i>	1	MK8(H2)	+
3. SHK-1 <sup>T</sup>	1480	AB097590	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
4. SKK-2	1480	AB097590	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
5. SMK-1-1	1480	AB097590	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
6. SMK-1-3	1479	AB097591	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
7. SMK-10	1480	AB097590	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
8. SMP-6	1480	AB097590	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
9. SHK-4	1479	LC068850	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
10. SHK-11	1479	LC068851	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
11. SMP-8	1481	LC068857	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
12. SMH-02-3	1492	LC066680	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
13. SNB-1	1505	LC066681	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
14. SIW-2	1492	LC068855	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	-
15. SIW-3	1492	LC068856	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	-
16. SNM-1	1482	LC068862	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
17. SSJ-1	1486	LC068860	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
18. SYM-2	1499	LC068859	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	-
19. SMK-5-2	1424	LC068853	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
20. SMK-2-1	1494	LC068852	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
21. SMK-9	1492	LC068854	<i>Nannocystaceae</i>	2	MK-7	+
22. SYR-2 <sup>T</sup>	1494	AB600195	<i>Nannocystaceae</i>	3	MK-7	+
23. SMH-27-4 <sup>T</sup>	1504	AB252740	<i>Nannocystaceae</i>	4	MK-8	-
24. SAB-1	1481	LC068861	<i>Nannocystaceae</i>	5	MK-7	+
25. SIS-1	1485	LC068863	<i>Nannocystaceae</i>	6	MK-7	+
26. SYM-1	1495	LC068858	<i>Nannocystaceae</i>	7	MK-7	+
27. SBP-1	1506	LC068865	" <i>Haliangiaceae</i> ", <i>Haliangium</i>		MK-8	+
28. SRI-2	1491	LC068849	<i>Myxococcaeae</i> , <i>Myxococcus</i>		MK-8	+
29. SKP-2	1477	LC068956	<i>Desulfobacterales</i>		MK-7	-
30. SMP-3	1511	LC068955	<i>Desulfobacterales</i>		MK-7	-
31. SKK-1	NT				MK-7	-
32. SMK-1-2	NT				NT	+
33. SMK-2-2	NT				NT	-
34. SMK-3-1	NT				NT	+
35. SMK-3-2	NT				NT	-
36. SMK-3-3	NT				NT	-
37. SMK-4-1	NT				MK-7	+
38. SMK-4-2	NT				NT	+
39. SMK-5-1	NT				NT	+
40. SNB-2	NT				NT	+
41. SNB-3	NT				NT	-
42. SMP-4	NT				NT	-
43. SMH-97-3	NT				MK-7	+
44. SMP-7	NT				NT	+
45. STM-1	NT				MK-7	+
46. SSB-1	NT				NT	-
47. SYM-3	NT				NT	-
48. SYM-4	NT				MK-7	-
49. SYM-5	NT				MK-7	-

\*<sup>1</sup> 上付き T を付した菌株は、本研究で提唱する新属・新種 (OTU-1, 2, 3, 4) のそれぞれの基準株。 \*<sup>2</sup>+, 子実体様構造物あり。

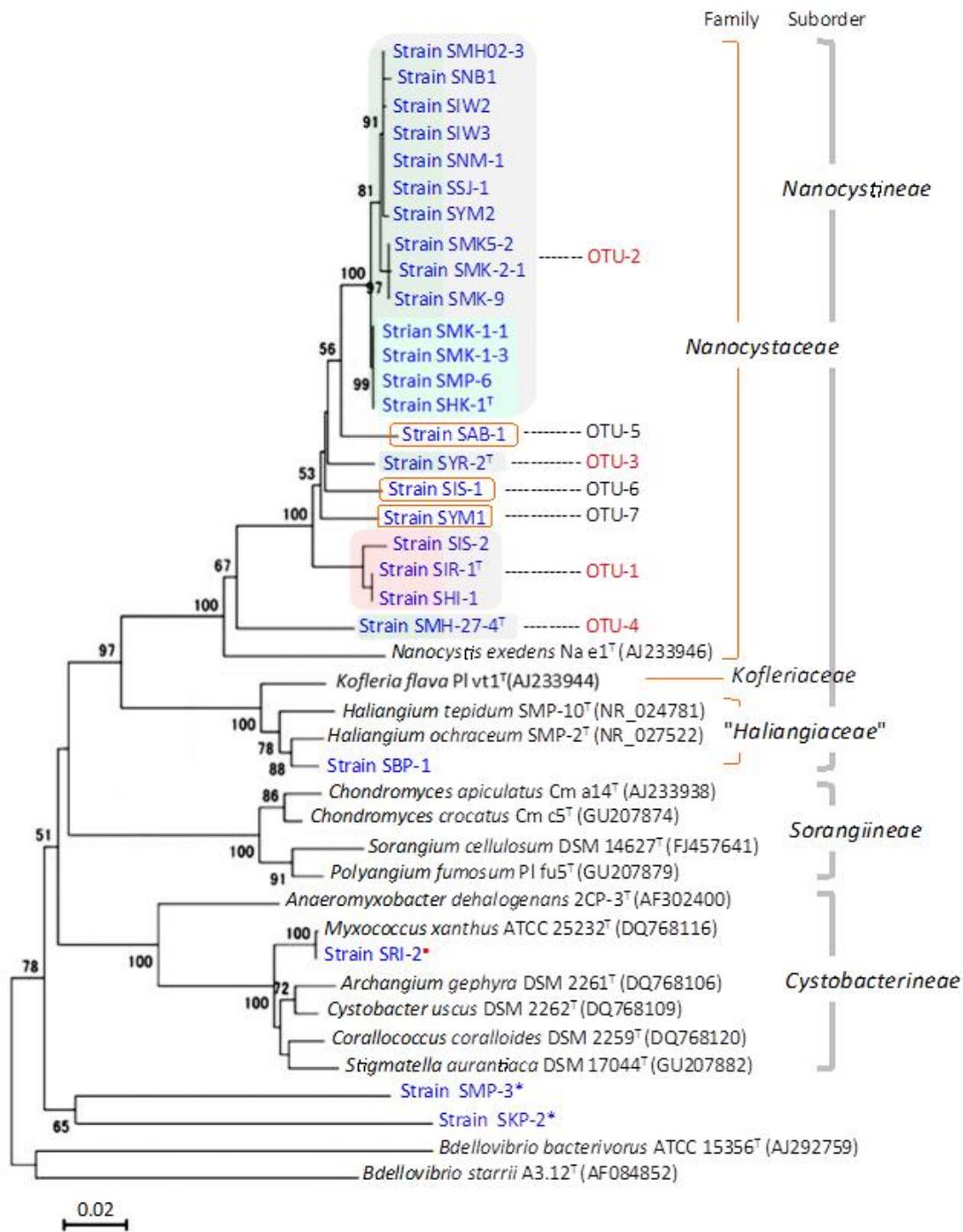


図 3-5. 海洋性、汽水性粘液細菌の分離株(OTU-1~OTU-7)の 16S rDNA 遺伝子配列に基づく近隣結合系統樹. 外群は *Bdellovibrio starrii* A3.12<sup>T</sup> (AF084852) および *Bdv. bacteriovorus* ATCC 15356<sup>T</sup> (AJ292759). 各分岐点の数値は、1,000 抽出による bootstrap 値(≥500 のみを表示). 赤丸を付した SRI-2 株は耐塩性菌株で *Myxococcus* 属の粘液細菌. 青い星印の SMP-3 株と SKP-2 株は、粘液細菌ではないデルタプロテオバクテリア(*Desulfobacterales*). Bar=2% 塩基置換.

### 3.3.4 OTU-1 の系統解析

OTU-1 の中でとくに近縁と考えられる SIR-1<sup>T</sup>株と SHI-1 株の塩基配列相同性は 99.5% だった。この結果から、2 株は互いに約 1,800 km 離れた 2 地点である八丈島と西表島の試料から分離されたものであるが、同一種と考えられた。また、生理的性質や化学分類的特徴の類似性もこれを支持した。この 2 株と既知の *Haliangium* 属細菌および代表的な陸生粘液細菌について、さらに 16S rRNA 遺伝子配列に基づく近隣系統樹を作成した (図 3-6)。SIR-1<sup>T</sup>株と SHI-1 株は陸生粘液細菌や *Haliangium* 属から離れた独自の系統に位置した。OTU-1 と既知粘液細菌種との 16S rRNA 遺伝子配列の比較では、*Nannocystis exedens* に最類縁であったが、相同性値は 89.3–89.4% であった。この値は、属レベルの区別の境界値とされる 94% (Bouchotroch *et al.* 2001; Arahal *et al.* 2002) よりもはるかに低いため、OTU-1 はナノシステイス科の新属とするのが妥当と考えられた。*Haliangium* 属海洋性粘液細菌 (*H. ochraceum* と *H. tepidum*) との相同性値は 84.4–84.5% とさらに低い値であった。

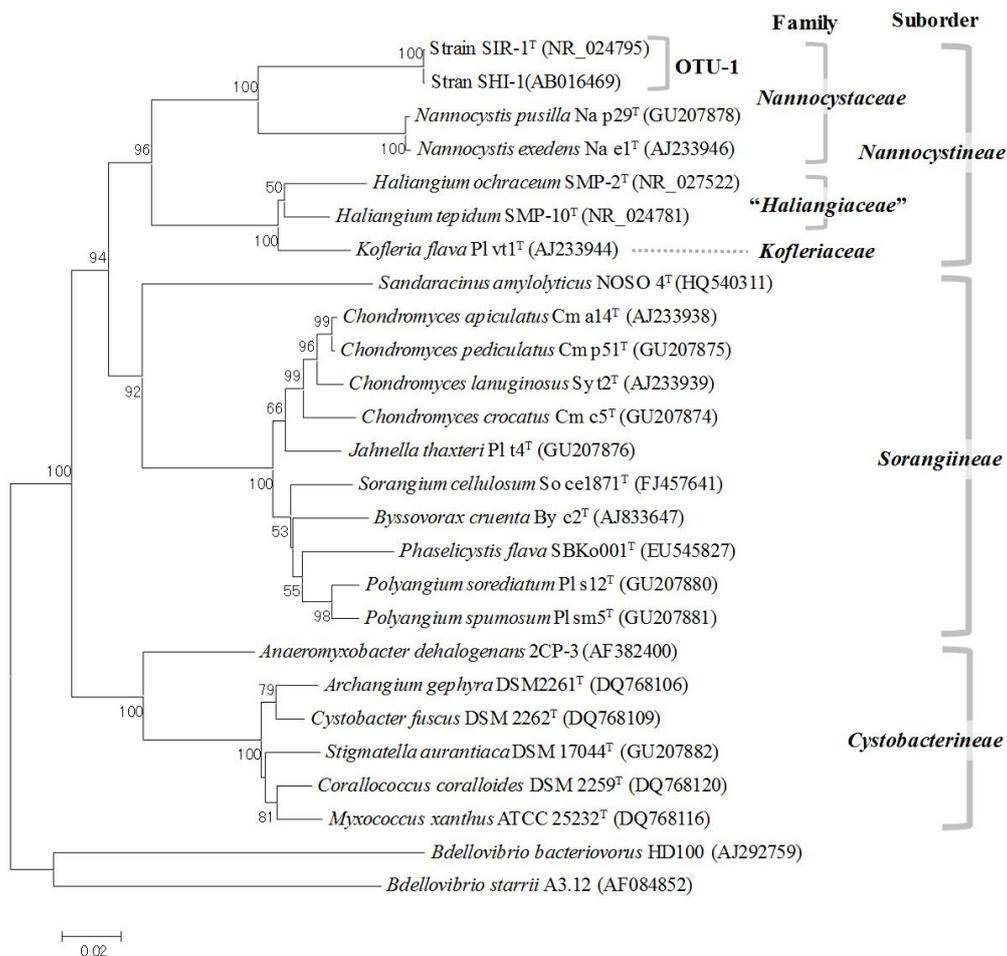


図 3-6. OTU-1 の 2 菌株 SIR-1<sup>T</sup>株および SHI-1 株の系統的位置. 系統樹作成法、外群、ブートストラップ値および、スケールバーについては図 3-5 と同じ。

### 3.3.5 OTU-2 の系統解析

OTU-2 は分子系統解析からナノシスティス亜目に分類された。種レベルでとくに近縁と考えられる 6 株 (SHK-1<sup>T</sup>、SKK-2、SMK-1-1、SMK-1-3、SMK-10 および SMP-6) は地理的に離れた地域から分離されたものであるが、16S rRNA 遺伝子配列の相同性は 99.9–100% であり、同一種と考えられた。また生理的、化学分類的表現型の 6 株間の類似性もこれを支持した。これらの 6 株と *Haliangium* 属細菌および代表的な陸生粘液細菌について、16S rRNA 遺伝子配列に基づく近隣結合系統樹を作成した (図 3-7)。

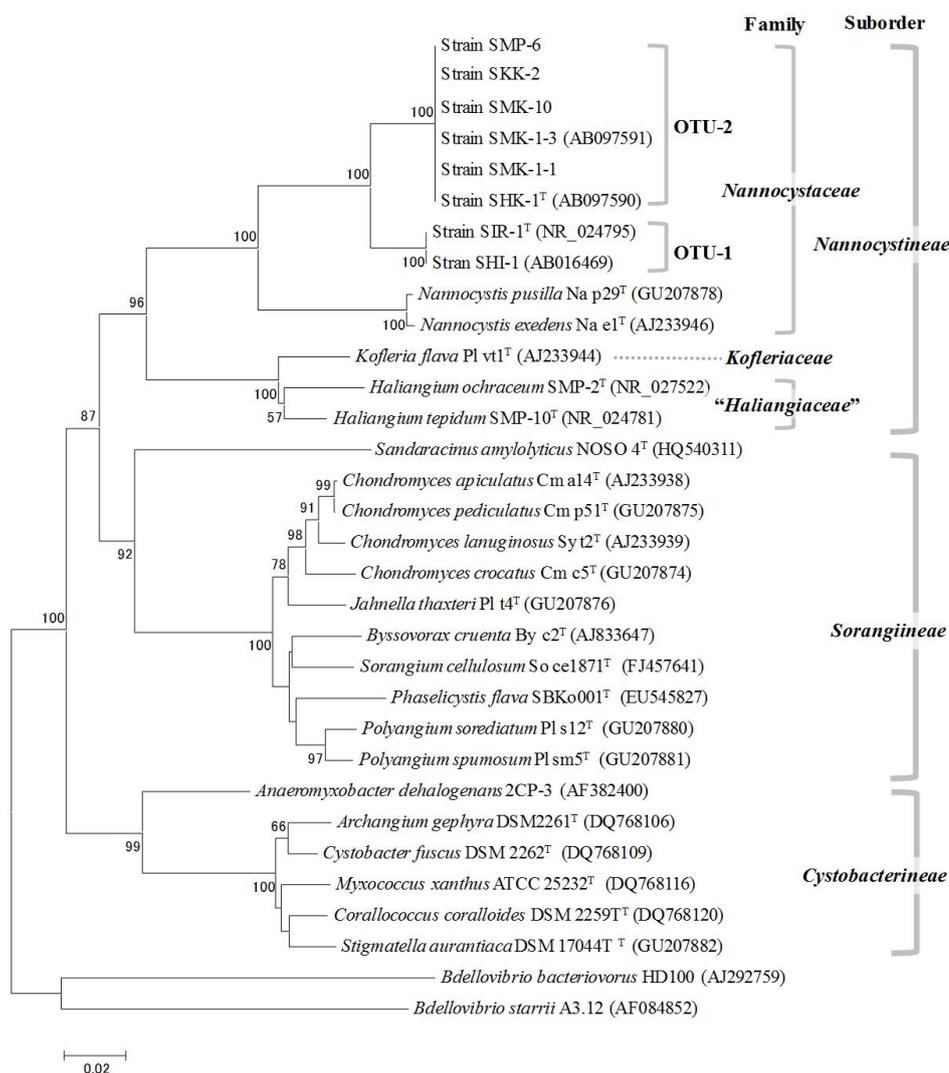


図 3-7. OTU-2 に属する 6 菌株の系統的位置. 系統樹作成法、外群, ブートストラップ値および、スケールバーについては図 3-5 と同じ。

OTU-2 の 6 菌株は、前述の OTU-1 とは 95.9–96.0% の類似度を示した。また、既知の陸生粘液細菌や *Haliangium* 属細菌からは、OTU-1 からよりもさらに進化距離が離れてお

り、OTU-2 はいずれにも該当しない独自の分類群と考えられた。OTU-2 は菌体キノンが MK-7 なのに対し、OTU-1 は MK-8(H2)であった (表 3-18)。この相違点も考慮し、OTU-2 の系統の菌株について新属提唱が妥当と考えられた。

### 3.3.6 OTU-3 の系統解析

OTU-3 は SYR-2<sup>T</sup> 株の 1 株のみで構成されるが、ナノシスティス亜目の中で独自の系統を示した。その系統樹を図 3-8 に示す。

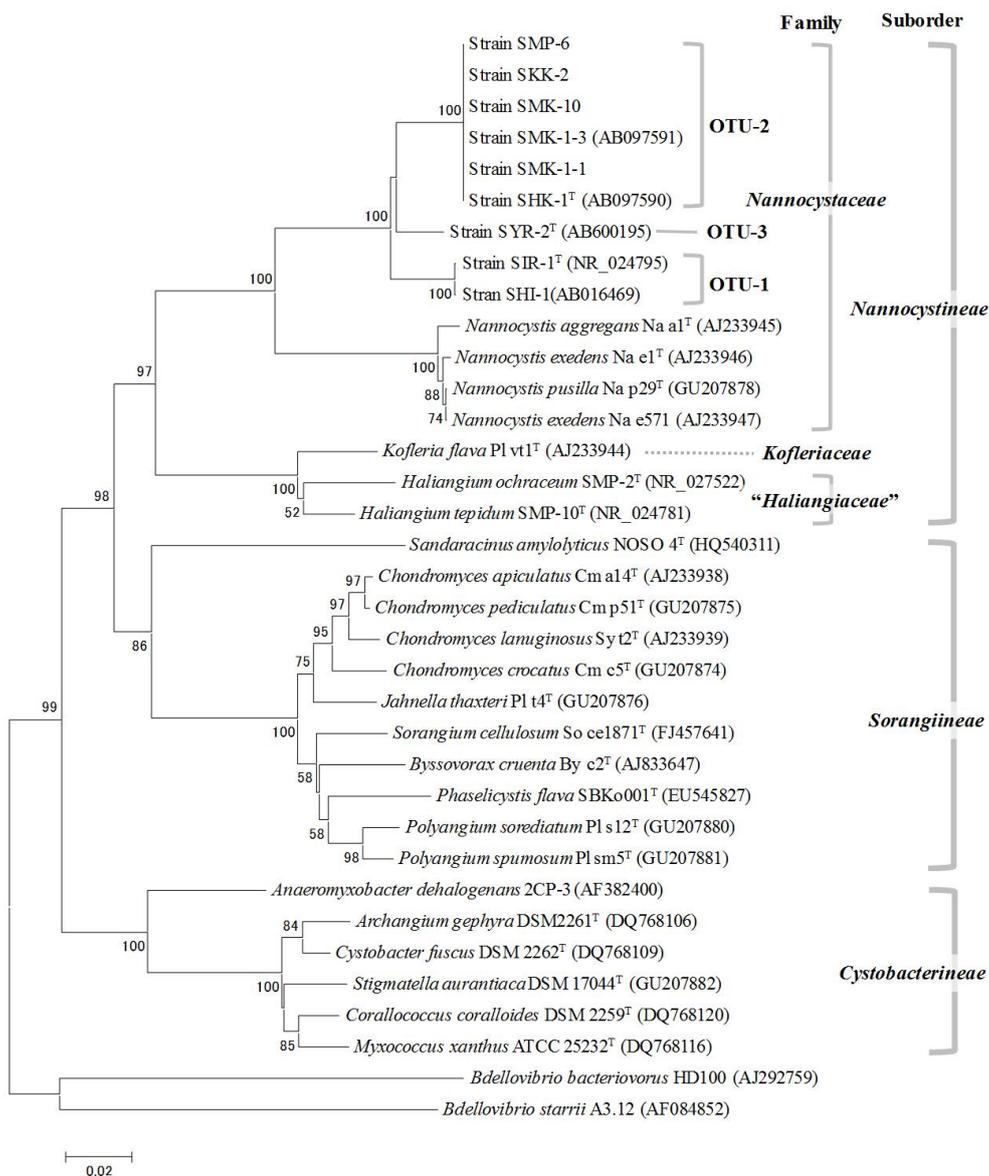


図 3-8. OTU-3 に属する SYR-2<sup>T</sup> 株の系統的位置. 系統樹作成法、外群, ブートストラップ値および、スケールバーについては図 3-5 と同じ.

OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup> 株は、SIR-1<sup>T</sup> 株 (OTU-1) および SHK-1<sup>T</sup> 株 (OTU-2) に対して、それぞれ 96.0% および 96.5% の 16S rRNA 遺伝子配列の類似度を示した。これらの数値の単純比較からは、SYR-2<sup>T</sup> 株は OTU-2 相当の属の中の新種とも考えられたが、本株は後述するように、生理的性質の点では、SHK-1<sup>T</sup> よりもさらに低い NaCl 濃度範囲で生育する特徴を有していた。このように、生理的性質の差異も考慮に入れると、OTU-3 と OTU-2 とは別属とするのが妥当と考えられた。

### 3.3.7 OTU-4 の系統解析

OTU-4 の SMH-27-4<sup>T</sup> 株は、**図 3-5** の系統樹上で SYR-2<sup>T</sup> 株 (OTU-3) と同様にナノシステイス亜科の粘液細菌と考えられた。既知の陸生および海洋性粘液細菌との比較では、16S rRNA 遺伝子配列の類似度はいずれも 93% 以下であり、OTU-1、OTU-2 および OTU-3 の分離株の 16S rRNA 遺伝子配列との比較では、いずれも類似度は 91% であった。これらの結果から、OTU-4 は明らかに属レベルで独自の系統に位置し、したがって、OTU-4 についても新属・新種の粘液細菌に分類するのが妥当と考えられた。

### 3.3.8 OTU-1 の分類学的性状

分類学的性質が互いに類似し、同一種と判定された新規海洋性粘液細菌 OTU-1 の 2 菌株、SIR-1<sup>T</sup> 株および SHI-1 株の表現型の特徴を以下に記載する。

#### 1) 形態および培養上の特徴

栄養細胞は幅 0.5-0.8 μm、長さ 1.5-7.0 μm の桿状で、細胞端は丸みを帯び、細胞の両端には、しばしば顆粒状の暗色部が認められた (**図 3-9a**)。拡散性・溶菌性のコロニーである swarm を形成し、コロニー内の寒天面には、しばしば放射状もしくは同心円状に亀裂が生じたが、寒天ゲル自体は液化されなかった (**図 3-9b, c**)。Swarm 内部の寒天面はしばしば浅く陥没し、表面は粗い質感を呈した。その場合にはコロニー外縁部の細胞密度は高くなり、外周を取り巻くように細胞が帯状に密集した部分が確認された (**図 3-9c**, 図中に長方形で示す)。また、寒天表面にごく薄い菌膜が広がり、膜状のコロニーとなる場合もあった (**図 3-9b**)。これら二つの異なる外観的特徴を示す部分が、同一の swarm 内にときおり見られた。コロニーの色調は、1/3CY-S100-20 寒天上ではピンクから薄いオレンジ色を呈したが、VY2-S100-20 寒天上では着色はほとんど認められず、コロニー外周の細胞が密集した帯状の部分でクリーム色を呈した。Swarm 内の寒天表面には球状あるいは楕円体の細胞塊が形成され、この細胞塊は swarm の中心部から外側に向かい、寒天面上を滑るように移動するのが観察された「 (**図 3-9d**)。細胞塊はやがて移動を停止して固くなり、色調は赤色から褐色へと変化し、子実体に似た細胞塊となった (**図 3-9e**)。SIR-1<sup>T</sup> 株では、VY2-S100-20 寒天上での子実体様細胞塊の形成が再現して見られたが、SHI-1 株は植え継ぐ間に細胞塊を形成しにくくなった。子実体様の細胞塊

は直径 100 - 200  $\mu\text{m}$  の球状・多面体状であり、球状の細胞と粘質物から成るように見えた (図 3-9f, 図 3-10b)。陸生粘液細菌 *Chondromyces* 属や *Stigmatella* 属の子実体にて観察されたような柄や外皮や隔壁など、分類学的な基準となり得るような特徴的構造物は、電子顕微鏡下でも観察されなかった (図 3-10a)。細胞塊は寒天面に分散して出現し、また寒天ゲル内部にも認められ、色調はピンクから褐色を呈した。細胞塊が表面から内部へ移動し、寒天質に潜り込む際に、寒天表面に微小な穿孔が生じた。細胞塊の内部には直径が 0.5-0.7  $\mu\text{m}$  の多数の球状細胞が観察され (図 3-10b)、これらは孢子と考えられる。

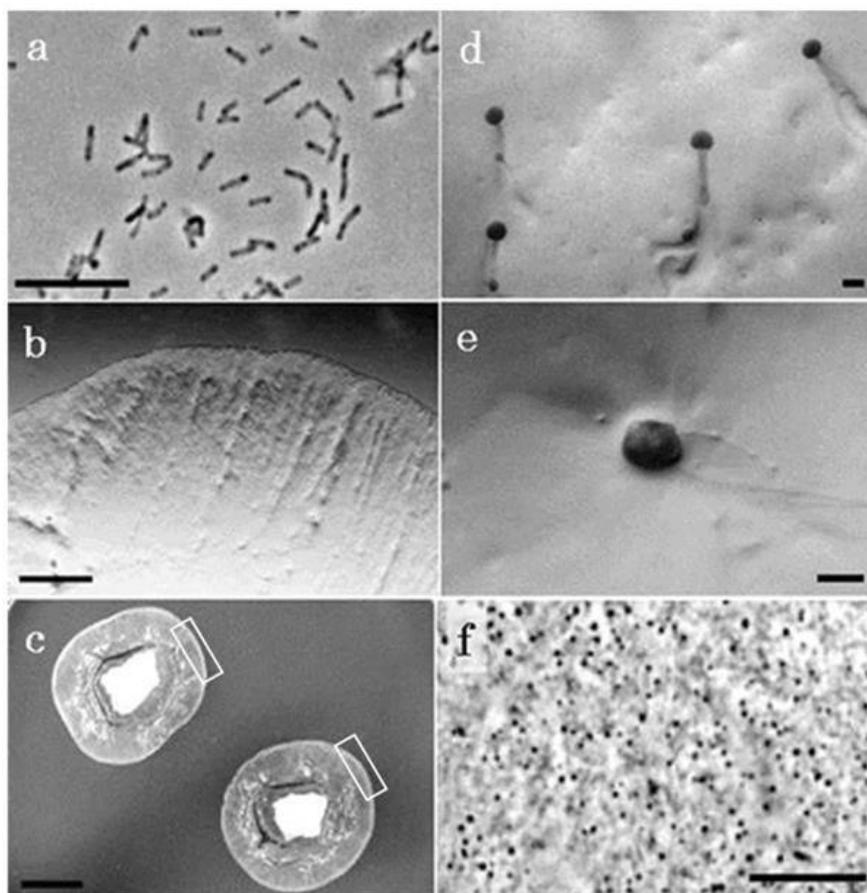


図 3-9. OTU-1 の菌株 SIR-1<sup>T</sup> の光学顕微鏡像. (a) 栄養細胞の位相差顕微鏡像 (bar=10  $\mu\text{m}$ ); (b) VY/2-S100-20 寒天上に生育した寒天面を浅く etching する薄膜状の swarm の実体顕微鏡像 (bar=2 mm); (c) 1/3CY-S100-20 寒天上での swarm の成長一移植片周囲の寒天面の亀裂および swarm 外周部の密集細胞の帯状部分 (長方形部分, bar=10 mm); (d) VY/2-S100-20 寒天上で移動する細胞塊の実体顕微鏡像 (bar=100  $\mu\text{m}$ ); (e) VY/2-S100-20 寒天上における子実体様の細胞塊の実体顕微鏡像 (bar=100  $\mu\text{m}$ ); (f) 子実体様細胞塊の中の球状細胞の位相差像 (VY/2-S100-20 寒天上, bar=10  $\mu\text{m}$ ).

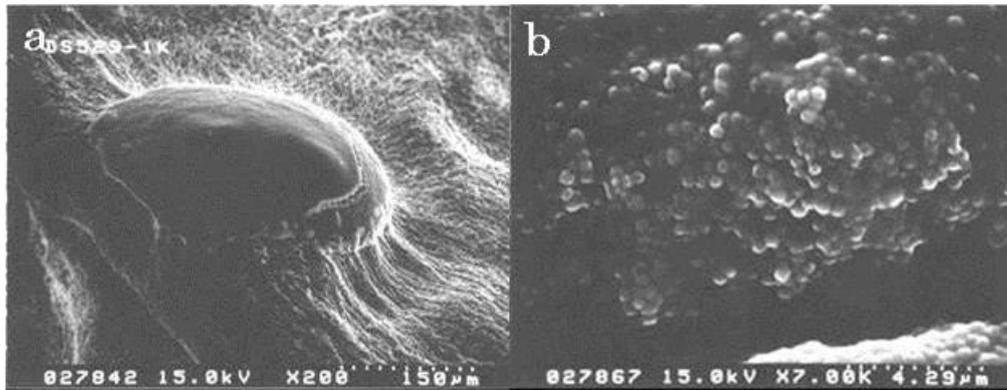


図 3-10. OTU-1 の菌株 SIR-1<sup>T</sup> の SEM 画像. (a) 粘質物からなる薄い膜で覆われた子実体様細胞塊(明瞭な外被は観察されない); (b) 子実体様細胞塊の内部の粘液孢子(内部に密集する孢子 [myxospore] と推定される多数の球状細胞).

以上のような子実体様の細胞塊や孢子の形態的性質については、*Nannocystis* 属の陸生粘液細菌との類似点も認められた (Reichenbach, 1989)。相違点として、*Nannocystis* 属の子実体には厚い膜状の外被が観察されたのに対し (Reichenbach, 1989)、SIR-1<sup>T</sup> 株の子実体様細胞塊では粘質物からなる薄い膜が形成された (図 3-10a)。

## 2) 生理・生化学的表現型

SIR-1<sup>T</sup> 株と SHI-1 株は、嫌気条件下で生育せず、絶対好気性を示した。有機窒素源 (ペプチドなど) を生育に利用する従属栄養細菌であり、無機窒素源 (硝酸塩やアンモニウム塩) による生育は認められなかった。生育温度は中温域にあり温度範囲 15-32°C で生育し、至適生育温度範囲は 28-30°C で、10°C 以下や 34°C 以上で生育しなかった。このような生育温度の特徴は、2 菌株が暖流の影響下にある沿岸水温が 20°C 以上の海岸から分離されたことと関連付けられる。生育至適 pH 範囲は 7.5-8.5 付近であり、pH 5.5 以下や pH 9.5 以上では生育せず、この点は海水環境の pH である 8.0-8.5 付近に適応した性質と考えられた。培養性状に関しては、両菌株とも液体培地中では分散して生育しにくく、細胞が凝集して菌塊を形成した。この性質は既知の海洋性粘液細菌 *Haliangium* 属、あるいはすでに報告された陸生粘液細菌とも似ており、粘液細菌全般に共通の特徴といえよう。

海洋性細菌は海水の主成分である NaCl とともに、Mg<sup>2+</sup>などのカチオンも同時に生育に要求することが多い (MacLeod, 1965)。SHI-1 株や SIR-1<sup>T</sup> 株について、このような海洋性細菌としての性質を確認するために、陽イオン要求性を検討した。まず、NaCl に関しては添加しない培地で生育せず、濃度範囲 1.0-4.0% (w/v) で生育し、生育の最適 NaCl 濃度範囲は海水相当か、少し低濃度の 2.0-3.0% (w/v) だった。両菌株の NaCl 要求

性は  $\text{Na}^+$  の要求性と関連し、他の 1 価カチオン類 ( $\text{K}^+$  および  $\text{Li}^+$ ) では  $\text{Na}^+$  を代替できなかった。また、両菌株の生育には  $\text{Na}^+$  とともに  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{K}^+$  も同時に必要であり、これら 3 カチオンのいずれか 1 つを培地から除去した場合は、3 カチオンすべてを添加した場合に比べ、生育が著しく遅くなった。以上の結果から、両菌株は  $\text{Na}^+$  および海水中の複数の無機塩類（あるいはカチオン）を生育に要求することが判明した。 $\text{NaCl}$  要求性の定義上は、2 株とも比較的に低濃度の  $\text{NaCl}$  を要求するという意味で、“slightly halophilic bacteria” の特徴を示した (Kushner, 1978; 石田, 2001)。

酵素活性 (表 3-19) に関しては、両菌株ともオキシダーゼは陽性、カタラーゼは弱いか陰性だった。API ZYM 活性の特徴は 2 株とも一致し、他の粘液細菌との比較では、*Nannocystis exedens* と類似していた。アルカリ性フォスファターゼ、酸性フォスファターゼやナフトール-AS-BI-フォスフォハイドロラーゼは陽性だったが、そのほかの試験項目はすべて陰性であった。

表 3-19. SIR-1<sup>T</sup> 株および SHI-1 株 (OTU-1) の主な酵素活性

酵素活性	反応
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	w/-
API ZYM 活性	
アルカリ性フォスファターゼ、 酸性フォスファターゼ	+
グルコシダーゼ ( $\alpha$ , $\beta$ )	-
ガラクトシダーゼ ( $\alpha$ , $\beta$ )	-
$\alpha$ -マンノシダーゼ	-
$\alpha$ -フコシダーゼ	-
$\beta$ -グルクロニダーゼ	-
N-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ	-
ナフトール-AS-BI-フォスフォハイドロラーゼ	+
エステラーゼ (C4 および C8)	-
リパーゼ (C4)	-
ロイシン・アシルアミダーゼ	-
バリン・アシルアミダーゼ	-
システイン・アシルアミダーゼ	-
トリプシン	-
キモトリプシン	-

溶菌性については、グラム染色陰性菌（大腸菌や *Alteromonas haloplanktis*）の生菌体に対して認められたが、VY/2-S100-20 寒天培地における酵母菌体の溶菌班（lytic zone）は観察されなかった。2 株の高分子基質への作用に関しては、カゼインやゼラチンに対するタンパク質分解活性を示し、このような性質はグラム染色陰性菌の溶菌や捕食に関与すると考えられた。また、2 株は弱い DNA 分解活性を示した。多糖類の利用性については、デンプン、キチン、アルギン酸、セルロースのいずれも分解しなかった。Tween 80 分解活性は弱いもしくは陰性だった。

### 3) 化学分類学的特徴

前述のように、SIR-1<sup>T</sup> 株と SHI-1 株のキノン型は MK-8(H<sub>2</sub>) だった。このような部分的に水素原子で飽和されたメナキノンは、高 GC 含量グラム陽性菌であるアクチノバクテリア (*Actinobacteria*) 門菌種にのみ分布するとされてきた。したがって、グラム染色陰性細菌の粘液細菌から MK-8(H<sub>2</sub>) が見いだされた例は、本研究が初めてである。なお、粘液細菌と同じくデルタプロテオバクテリア綱に属する硫酸還元菌の一部についても、部分飽和型のメナキノンは報告されている (Collins and Widdel, 1986)。

脂肪酸組成は両株ともほぼ同一であり、イソ型分岐鎖脂肪酸 iso-C15:0 と iso-C16:0 が総脂肪酸に占める割合が高く、含有比率 (mol%) はそれぞれ 32.3-35.6% および 13.5-14.6% だった (表 3-20, No.1-2)。これらの脂肪酸の構成比は、既知の陸生粘液細菌とも類似していた (Yamanaka *et al.*, 1988)。他方で、既知の粘液細菌と異なる 2 株の際立った特徴として、長鎖不飽和脂肪酸 (C20:4) を有し、総脂肪酸に占める割合 (mol%) が 14.1-17.5% に達した (表 3-20, No.1-2)。C20:4 脂肪酸の分子種を同定しなかったが、アラキドン酸の可能性が大きいと考えている。長鎖不飽和脂肪酸は低温性海洋細菌の *Shewanella* 属などにも見いだされており、低温下での細胞膜の流動性の維持に関与するとの説もある (Russell and Nichols, 1999)。しかし 2 株とも 15°C 以下では生育しなかったため低温細菌ではなく、両株における C20:4 脂肪酸の存在意義は不明である。なお、*Haliangium* 属は海洋性細菌の特徴を示したが (Fudou *et al.* 2002; Zhang *et al.*, 2005)、菌体脂質中に C20:4 脂肪酸は検出されなかった (表 3-20, No.3-4)。アンテイソ型 (anteiso-) 脂肪酸も SIR-1<sup>T</sup> 株や SHI-1 株から検出され、anteiso-C16:0 は 0.3-1.0%、anteiso-C17:0 は、0.9-1.2% が含まれていた (表 3-20, No.1-2)。アンテイソ脂肪酸は *Haliangium* 属からも見いだされたが (Fudou *et al.* 2002)、陸生粘液細菌からは検出されず (表 3-20, No. 5-7)、海洋性粘液細菌に特有の菌体脂質成分と考えられた。こちらもその機能は不明だが、カチオン存在下での膜の流動性や膜構造の維持などに関与すると推定される。

### 4) DNA G+C 含量

ゲノム DNA の塩基組成は、既知の粘液細菌と同様に高 G+C 含量であり、69.3-70.0 mol% の範囲であった。

表 3-20. OTU-1 の新規海洋性粘液細菌の分離株の菌体脂肪酸組成\*<sup>1</sup>

脂肪酸の種類	本研究の新規な 海洋性粘液細菌		先行研究の 海洋性粘液細菌		既知の陸生粘液細菌		
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
(分岐鎖脂肪酸)							
iso-C13:0	0.6	0.9	Tr* <sup>3</sup>	0.1	0.2	0.0	Tr
iso-C14:0	0.9	1.4	Tr	0.8	4.7	Tr	2.9
iso-C15:0	35.6	32.3	2.8	1.3	17.6	9.5	44.0
iso-C16:0	13.5	14.6	15.3	40.3	2.9	2.9	1.6
iso-C16:1	0.1	0.4	7.1	1.0	0.0	0.0	0.0
iso-C17:0	3.6	5.2	5.0	6.5	12.0	7.2	13.2
iso-C17:1	0.0	0.0	0.0	0.0	9.6	0.0	0.0
anteiso-C16:0	0.3	1.0	5.0	9.7	0.0	0.0	0.0
anteiso-C17:0	1.2	0.9	2.0	4.8	0.0	0.0	0.0
(直鎖鎖脂肪酸)							
C14:0	0.7	1.2	2.0	5.9	23.8	3.3	3.0
C15:0	6.9	7.6	5.6	1.6	Tr	Tr	1.3
C16:0	9.2	13.1	38.3	15.1	2.7	39.0	3.0
C17:0	7.1	3.5	3.4	3.8	3.6	1.5	2.3
C18:0	0.4	0.4	3.8	1.8	0.0	6.6	0.0
C16:1	2.4	3.3	6.4	8.4	14.7	13.4	12.8
C17:1	0.2	0.2	1.0	2.2	3.1	1.5	3.5
C20:4	17.5	14.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
(水酸化脂肪酸)							
2-OH acids	0.0* <sup>2</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3
3-OH acids	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6

\*<sup>1</sup> 各脂肪酸の含量を全脂肪酸組成に対する百分率(mol %)として示す。

No.1, SIR-1<sup>T</sup> 株; No.2, SHI-1 株; No.3, *Haliangium ochraceum* SMP-2<sup>T</sup>; No.4, *Haliangium tepidum* SMP-10<sup>T</sup>; No.5, *Nannocystis exedens* DSM 71<sup>T</sup>; No.6, *Sorangium cellulosum* YA-2; No.7, *Myxococcus xanthus* IFO 13542<sup>T</sup>

\*<sup>2</sup> 0.0: 検出限界以下を示す。

\*<sup>3</sup> Tr, 微量。

### 3.3.5 OTU-2 の分類学的性状

OTU-2 の 6 菌株、SHK-1<sup>T</sup>、SMK-1-1、SMK-1-3、SMK-10、SKK-2 および SMP-6 の特徴を以下に記載する。

#### 1) 形態および培養上の特徴

互いに類似した 6 株の中で最も明瞭に子実体様の細胞塊を形成した菌株：SHK-1<sup>T</sup>については、とくに詳細に形態的特徴を観察した(図 3-11)。栄養細胞は幅 0.5-0.7 μm、長さ 1.5-7.0 μm の桿菌で、細胞の両端が丸みを帯びていた(図 3-11a)。粘液細菌に特有の拡散性・溶菌性のコロニー(swarm)を形成し、その内側の寒天面は浅く陥没シクレ

一ター状になるか (図 3-11b)、あるいはコロニーが寒天面上を薄膜状に拡がり生育した。コロニー形状は培養日数が短い間は円形だったが、培養日数を経るに従い弧状に広がった部分が外周部に複数生じることもあった (図 3-11b)。コロニーの内側には多数の小孔が生じて粗い質感を呈し、ときには溝や亀裂が生じたが寒天ゲルの溶解や液化はみられなかった (図 3-11b, c)。陥没性コロニーの外周部で細胞密度が高くなる傾向があり、その部分の寒天内には細胞が密集したクリーム色の帯状の部分が観察される場合もあった。コロニーの色調は、1/3CY-S100-20 寒天上で薄いオレンジ色から薄い赤色を呈し、VY2-S100-20 寒天上ではほぼ無色だった。

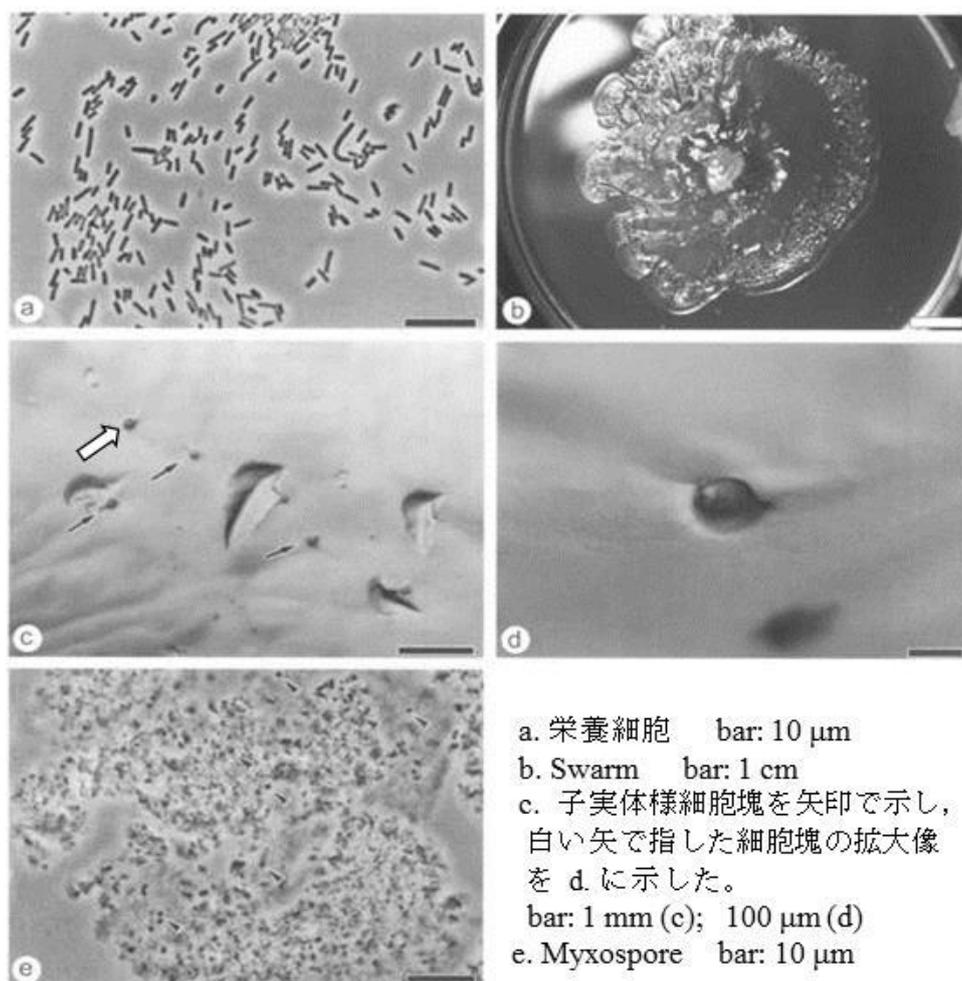


図 3-11. OTU-2 の菌株 SHK-1<sup>T</sup> の光学顕微鏡像. (a) 栄養細胞の実体顕微鏡像 (N2.0-S100-20 液体培地で, 28°C, 5 日間培養); (b) 1/3CY-S100-20 寒天培地上で, 28°C, 10 日間培養後の寒天片周囲に生育した陥没性・拡散性 swarm; (c) VY/2-S100-20 寒天培地上で, 28°C, 10 日間培養した子実体様細胞塊の位相差顕微鏡像; (d) 白い矢印(c)で示した子実体様細胞塊を高倍率画像; (e) 粘液胞子の位相差像 (VY/2-S100-20 寒天上の子実体様細胞塊を採取し、スライドガラス上で潰してから観察).

子実体様細胞塊については、VY2-S100-20 寒天上のコロニー内においては比較的高頻度で形成された（図 3-11c, d）。細胞塊の形状は直径 50-300  $\mu\text{m}$  の球状 - 多面体で、陸生粘液細菌の *Chondromyces* 属や *Stigmatella* 属で報告されたような、柄や外皮や隔壁などの特徴的な構造物は観察されなかった。子実体様細胞塊は、寒天培地表面だけではなく内部にも形成され、しばしば弧状に並んで配列し（図 3-11c）、オレンジ色・赤色あるいは淡褐色・褐色の色調を呈した。細胞塊を潰した際には、内部に直径 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  の球状から楕円体の多数の細胞が観察され、孢子と考えられた（図 3-11e）。このような子実体様細胞塊や孢子の形態的特徴は、陸生粘液細菌の *Nannocystis* 属や、§ 3.3.4 に記載した OTU-1 とも類似していた。*Nannocystis* 属では子実体を覆う袋状の外皮が観察されたが（Reichenbach, 1989）、これら 6 菌株の子実体様細胞塊では明瞭な外皮は観察されなかった。*Nannocystis* 属の孢子の直径は 0.75-1.5  $\mu\text{m}$  と記載された（Reichenbach, 1989）。これら 6 株の孢子と思われる球状細胞は、直径がより小さかった。細胞塊の近傍の寒天ゲル表面がしばしば開裂した点も（図 3-11c）、*Nannocystis* 属や *Plesiocystis* 属との類似点であった。

## 2) 生理・生化学的表現型

OTU-2 の 6 菌株は絶対好気性の化学従属栄養性細菌であった。生育温度範囲は 5-34°C、至適生育温度は 28-30°C であり、37°C 以上で生育しなかった。至適生育 pH は 7.0-8.5 の中性から弱アルカリ性で、pH 5.0 以下もしくは pH 9.5 以上では生育しなかった。このような特徴は、海水環境の pH (8.0-8.5) に適応した性質と考えられる。粘液細菌を液体培地中で培養した際には分散して生育せず、細胞が凝集して菌塊を成す場合が多い。この 6 株も液体培地中（1/3CY-S100-20 あるいは N2.0-S100-20）の培養では細胞が分散せず、直径が 1-3 mm のオレンジ色の菌塊を形成しながら生育した。

6 株について、海洋性細菌としての生理的性質も確認した。前述のように、海洋性細菌の多くは NaCl 以外に、他の陽イオン類を生育に要求する（MacLeod, 1965）。6 株についてこの点を確認のため、陽イオンに対する要求性を検討した。まず NaCl については、添加しない培地で生育しなかったが、1.0 g L<sup>-1</sup> の低濃度でも生育可能であり、生育濃度範囲は 0.1-4.0% (w/v) だった。生育に最適な食塩濃度範囲は 1.0-2.0% (w/v) であり、海水相当かそれより薄い濃度だった。Na<sup>+</sup> 要求性については、他の 1 価カチオン（K<sup>+</sup> および Li<sup>+</sup>）で代替できなかった。6 株は、Na<sup>+</sup> 以外に Mg<sup>2+</sup> や Ca<sup>2+</sup> も生育に要求した。すなわち、この 6 株は 1/3CY+Na<sup>+</sup>+Mg<sup>2+</sup> 培地や 1/3CY+Na<sup>+</sup>+Ca<sup>2+</sup> 培地には生育したが、1/3CY+Na<sup>+</sup> 培地や 1/3CY+Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup> 培地では生育しなかった。以上の結果から、これら 6 株は、カチオン要求性の点で、海洋性細菌の性質を有していると考えられた。NaCl 要求性については、6 株ともに低濃度の NaCl を生育に要求する性質を示し、いわゆる *slightly halophilic bacteria* の特徴を示した（Kushner 1978; 石田 2001）。

酵素活性（表 3-21）については、6 株ともオキシダーゼおよびカタラーゼは陽性だっ

た。API ZYM キットによる酵素活性は、6 株ともまったく同一の活性パターンを示し、他の粘液細菌との比較では、*Nannocystis exedens* や SIR-1<sup>T</sup> 株 (OTU-1) と類似していた。

表 3-21. OTU-2 に属する 6 株の主な酵素活性

酵素活性	反応
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
API ZYM 活性	
アルカリ性フォスファターゼ	+
酸性フォスファターゼ	+
グルコシダーゼ ( $\alpha$ , $\beta$ )	-
ガラクトシダーゼ ( $\alpha$ , $\beta$ )	-
$\alpha$ -マンノシダーゼ	-
$\alpha$ -フコシダーゼ	-
$\beta$ -グルクロニダーゼ	-
N-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ	-
ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ	+
エステラーゼ (C4 および C8)	w/-
リパーゼ (C4)	w/-
ロイシン・アシルアミダーゼ	w/-
バリン・アシルアミダーゼ	-
システイン・アシルアミダーゼ	-
トリプシン	-
キモトリプシン	-

溶菌性については、グラム染色陰性細菌（大腸菌など）の生菌体を溶菌したが、グラム染色陽性細菌の菌体は溶解せず、また酵母の生菌体やオートクレーブ処理菌体は溶解しなかった。高分子基質への作用については、6 株ともカゼインやゼラチンに対するプロテアーゼ活性を示した。これらの蛋白分解活性は、微生物細胞の捕食や、環境中のタンパク質の分解や摂取に関与すると考えられる。多糖類であるデンプン、キチン、アルギン酸、セルロースや、DNA および Tween 80 は分解しなかった。

### 3) 化学分類学的特徴

粘液細菌の既知菌種のキノン型は MK-8 であるが、この 6 菌株の主要キノン種は MK-7 だった。

菌体脂肪酸組成は 6 株とも類似し、主成分はイソ型分岐鎖脂肪酸で、iso-C15:0、iso-C16:0 および iso-C17:0 が比較的多く含まれていた。この組成は、海洋性粘液細菌をも含め既知の粘液細菌と類似していた。長鎖不飽和脂肪酸 (C20:4) やアンテイソ型脂肪酸

(anteiso-C16:0 および anteiso-C17:0) も検出された点は、OTU-1 と類似していた。C20:4 脂肪酸については OTU-1 からも見いだされており、アラキドン酸の可能性もあるが詳しくは同定しなかった。アンテイス脂肪酸は先述のように、*Haliangium* 属や OTU-1 にも含まれていることから、海洋性あるいは好塩性の粘液細菌に共通した膜脂質成分と考えられる。

#### 4) DNA G+C 含量

ゲノム DNA の塩基組成は 6 菌株ともに、既知の粘液細菌と同様に高 G+C 含量であり、65.6-67.4% (mol %) の範囲であった。

### 3.3.6 OTU-3 の分類学的性状

#### 1) 形態および培養上の特徴

汽水性である OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup> 株は、接種した寒天片を中心とした、その周囲に円形に広がる拡散性コロニー (swarm) を形成した。コロニー内の寒天面はごく浅く陥没することが多く、その部分の細胞は寒天質中に潜り込む傾向を示したが (図 3-12A, B)、ときには寒天面に薄膜上に広がり生育することもあった。コロニー内の寒天質が収縮し亀裂が生じる場合があり (図 3-12A)、さらに開裂することもあったが、寒天ゲル自体の完全な液化はみられなかった。Swarm 内側の寒天面上にはときとして、幾何学的模様の溝が生じた (図 3-12B)。コロニーの色調は VY/2-S20-10 寒天および VY/2-S75-15 寒天上において、無色から淡いピンク色を呈した。1/3CY-S20-10 寒天上で生育しにくく、1/6CY-S20-10 寒天上では比較的良好に生育し、円形の swarm を形成した。このような生育の特徴は、低栄養の培地を好む性質による考えられる。

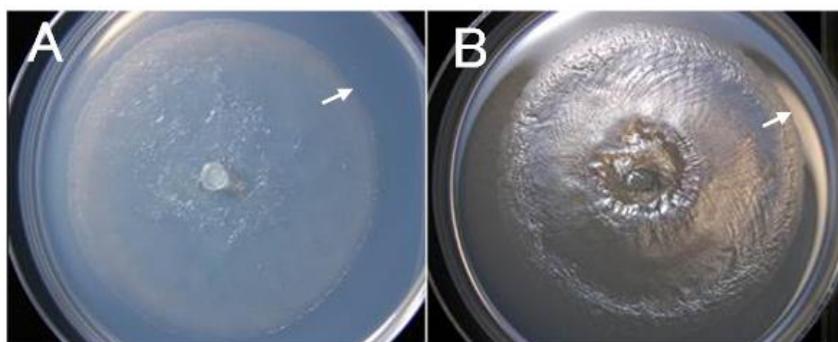


図 3-12. OTU-3 の菌株 SYR-2<sup>T</sup> のコロニー (swarm). (A), N0.5-S20-10 寒天で、30°C、20 日間培養後の swarm (白い矢印は成長端); (B), VY/2-S20-10 寒天の表面に生育した swarm.

栄養細胞は、VY/2-S20-10 寒天、1/6CY-S20-10 寒天や N1-S20-10 寒天 [S20-10 を基本溶液とし、カゼインナトリウム (Natrose)  $1.0 \text{ g L}^{-1}$ 、Bacto Agar  $15 \text{ g L}^{-1}$  を含む] などの上で、幅  $0.5\text{-}0.8 \mu\text{m}$ 、長さ  $2.0\text{-}5.0 \mu\text{m}$  の両端が丸みを帯びた桿菌だった。

子実体様細胞塊は、径  $50\text{-}800 \mu\text{m}$  の球状もしくは多面体状で、色調は茶色を帯びたオレンジ色 - 赤色の子実体様細胞塊を形成した (図 3-13)。本研究で多種類の培地を検討した範囲では、N1-S20-5 寒天の上で比較的細胞塊を形成しやすかった。培養期間が長くなると (5 ヶ月)、子実体様細胞塊は徐々に寒天表面からゲル内下方へと移動し、硬さを増すのが観察された。この細胞塊は赤褐色の硬い膜に覆われ、内部には粘液胞子に似た光学的屈折率が高い楕円体状の細胞が多数集合しているのが観察された。しかし、これらの細胞の耐熱性や耐乾燥性などは確認できず、胞子とは断定できなかった。

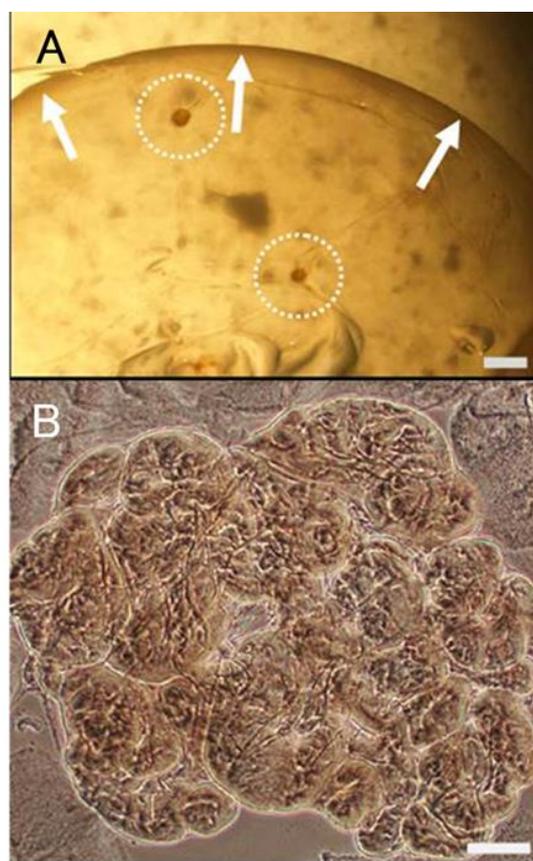


図 3-13. OTU-3 の菌株 SYR-2<sup>T</sup> 株の子実体様の細胞塊. (A), VY/2-S75-15 寒天上で,  $27^{\circ}\text{C}$ , 2 週間培養後に形成された子実体様細胞塊 (白い点線内, 白い矢印は swarm の成長端, Bar=1 mm); (B), N1.0-S20-5 寒天上で,  $30^{\circ}\text{C}$ , 10 日間培養後に形成された細胞塊 (薄い膜に覆われた多数の袋状の細胞塊が集合し, 内部には, 栄養細胞に比べ細胞が小さな短桿菌 (幅:  $0.5\text{-}0.8 \mu\text{m}$ 、長さ:  $1.5\text{-}3.0 \mu\text{m}$ ) が多数集合して存在, Bar=100  $\mu\text{m}$ ).

## 2) 生理・生化学的表現型

SYR-2<sup>T</sup> 株は絶対好気性の化学合成従属栄養細菌であった。生育温度は中温域にあり、20-40°C の範囲で生育し、至適生育温度は 30-35°C だった。生育 pH については、中性付近が至適であった。液体培養を行った場合は、他の多くの陸生あるいは海洋性粘液細菌と同様に、細胞が分散して生育せず、径 0.5-3.0 mm の細胞塊を形成した。

汽水環境からの分離株という観点から、SYR-2<sup>T</sup> 株の NaCl 濃度に対する生育応答を調べ、海洋性粘液細菌分離株と比較した (図 3-14)。培地として酵母寒天培地を使用し、NaCl や人工海水基礎培地 (SWS) の濃度を变化させ生育応答を調べた。

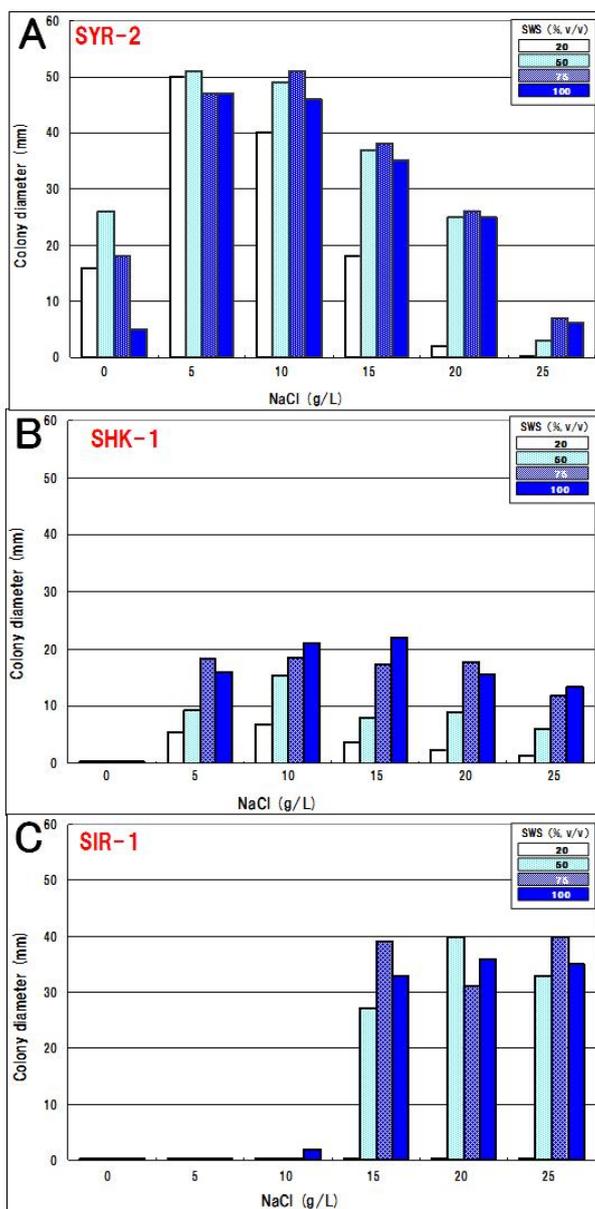


図 3-14. 汽水性(SYR-2<sup>T</sup>)および海洋性粘液細菌(SIR-1<sup>T</sup>, SHK-1<sup>T</sup>)の NaCl 濃度に対する生育応答. 縦軸は 30°C, 14 日間の培養後のコロニー (swarm) の直径(mm).

図 3-14A に示すように、SYR-2<sup>T</sup> 株は NaCl 濃度への応答の特徴から、海洋性粘液細菌よりも低塩分の環境、すなわち分離源の汽水環境に特異的に適応したと推定された。この菌株は、陸生菌用の VY/2 寒天で生育せず、Na<sup>+</sup>以外に 2 価陽イオンである Mg<sup>2+</sup>や Ca<sup>2+</sup>を生育に要求した。生育 NaCl 濃度範囲は 0.0-2.0% (w/v) で、至適は 0.5-1.0% (w/v) だった。添加 NaCl 濃度が 0.0% および 2.0% での生育は遅く、14 日間の培養後のコロニーの直径は、至適濃度 0.5-1.0% の場合の 1/2 以下だった (図 3-14A)。

さらに、SYR-2<sup>T</sup> 株や他の陸生および海洋性粘液細菌の生育 NaCl 濃度範囲を比較した結果を図 3-15 に示す。陸生および海洋性粘液細菌の場合は、VY/2 (Reichenbach and Dworkin, 1992) および VY/2-S100 寒天上で、汽水性粘液細菌：SYR-2<sup>T</sup> の場合は VY/2-S20 および VY/2-S75 寒天上でそれぞれ培養し、NaCl 生育濃度を決定した。一部の粘液細菌については文献値 (Schäberle *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2005)を参照した。

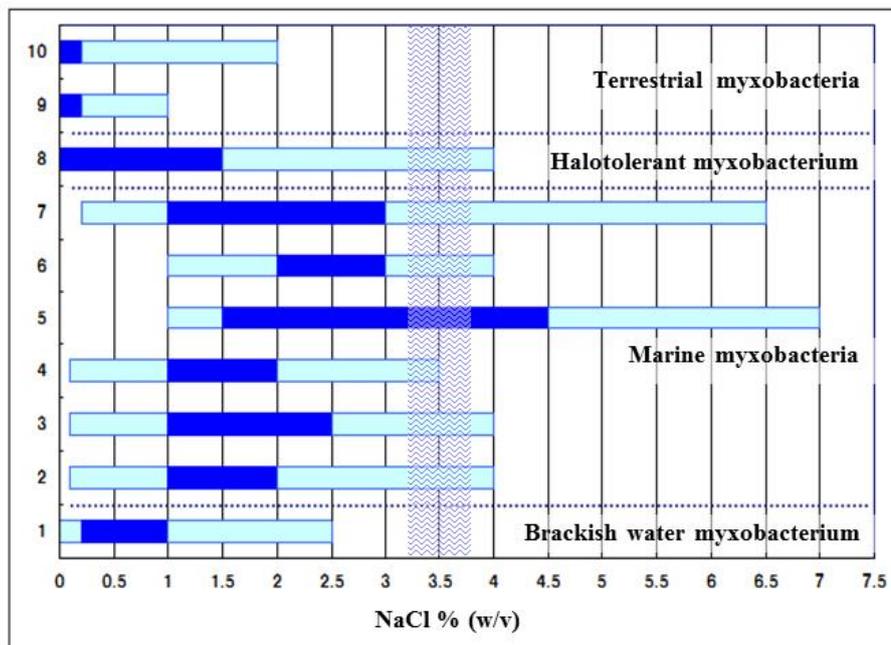


図 3-15. 汽水性の SYR-2<sup>T</sup>(OTU-3)と海洋性および既知の陸生粘液細菌の生育 NaCl 濃度の比較. 生育濃度範囲を水色, 至適濃度範囲を紺色で示す. 波線の影は海水の平均 NaCl 濃度 3.2-3.8% (w/v)を示す. 試験菌(分離源): 1, SYR-2<sup>T</sup>(OTU-3)(吉野川, 泥); 2, SHK-1<sup>T</sup>(OTU-2)(サロマ湖, 泥); 3, SWB004 株(OTU-2, 海岸沈殿物, オランダ, Schäberle *et al.*, 2010); 4, SWB006 株(OTU-2, 海岸沈殿物, ドイツ, Schäberle *et al.*, 2010); 5, SWB005 株(OTU-2, 海岸沈殿物, アメリカ, Schäberle *et al.*, 2010); 6, SIR-1<sup>T</sup>(OTU-1)(西表島, 海草); 7, *Haliangium ochraceum* SMP-2<sup>T</sup>(荒井浜, 海藻, 三浦半島); 8, *Myxococcus fulvus* HW-1(海水, 中国, Zhang *et al.*, 2005); 9, *Nannocystis exedens* DSM 71<sup>T</sup>(砂漠土壌, 米国); 10, *Myxococcus virescens* ATCC 25203(土壌).

沿岸海水中の NaCl 濃度は、0.1-4.4%の範囲内で変動するとされる (Rheinheimer, 1992)。汽水性粘液細菌 SYR-2<sup>T</sup> (OTU-3) は、NaCl 濃度範囲 0.0-2.5% (w/v) で生育し、至適 NaCl 濃度が 0.5-1.0% (w/v) の範囲にあり、海洋性粘液細菌よりも低い NaCl 濃度の環境に適応していると考えられた。このような生育の NaCl 濃度範囲は、海洋性の SHK-1<sup>T</sup> 株 (OTU-2) および SIR-1<sup>T</sup> 株 (OTU-1) とは異なり、陸生粘液細菌の *Myxococcus virescens* と同等だった。しかし、SYR-2<sup>T</sup> 株は、0.5-1.0% (w/v) の NaCl 添加で生育が促進されるのに対し、陸生粘液細菌はこの範囲の NaCl 存在下では、無添加時に比べて生育は遅くなった。これらの結果より、SYR-2<sup>T</sup> 株の NaCl 濃度に対する生育応答は、陸生菌とは異なり、汽水性の特徴を示していると考えられた。

SYR-2<sup>T</sup> 株の酵素活性については、オキシダーゼ陽性、カタラーゼ陰性であった。高分子基質の分解活性について、カゼインに対するタンパク質分解活性は陽性だった。デンプン分解活性 (アミラーゼ) は、SYR-2<sup>T</sup> にはごく弱い活性が認められた。ただし、この活性はコロニー (swarm) の内部にのみ検出され、コロニー周囲の寒天中のデンプンは分解されなかった。ろ紙は分解しなかった。DNAase、Tween80 エステラーゼは陰性だった。溶菌活性については、グラム陰性細菌の生菌体を溶菌したが、酵母の生菌体やオートクレーブ処理菌体は溶解しなかった。

### 3) 化学分類学的特徴

SYR-2<sup>T</sup> 株からは、菌体キノンの主成分として、MK-7 が検出された。

菌体脂肪酸組成については、イソ型分岐鎖脂肪酸 (iso-C15:0, iso-C16:0 および iso-C17:0) が比較的によく含まれており、これらの合計は全脂肪酸組成の 60%以上を占めた (表 3-22)。この点では、他の陸生および海洋性の粘液細菌と類似していた (Fudou *et al.*, 2002)。その他に少量のアンテイソ型脂肪酸として、微量ながら anteiso-C15:0、anteiso-C17:0 や、アラキドン酸相当の長鎖多価不飽和脂肪酸 (PUFA) として C20:4 も検出された。PUFA は表 3-23 の 3 株中では、OTU-1 の SIR-1<sup>T</sup> に最も多く含まれ、11.5%を占めた。なお PUFA は、ソランギウム垂目の陸生粘液細菌である *Phaselicystis* 属や *Sandaracinus* 属からも検出されている (Garcia *et al.* 2009; Mohr *et al.*, 2012)。したがって、海洋性もしくは汽水性粘液細菌に特異的に含まれるものではないと考えられる。iso-C13:0 は SYR-2<sup>T</sup> と SIR-1<sup>T</sup> から検出されたが、SHK-1<sup>T</sup> からは検出されなかった。一方、cyclo-C19:0 $\omega$ 8c が SHK-1<sup>T</sup> から検出されたが、SYR-2<sup>T</sup> と SIR-1<sup>T</sup> からは見出されなかった。anteiso-C16:0 は既述のように、SIR-1<sup>T</sup> や SHK-1<sup>T</sup> から一度は検出されたが (表 3-20)、N2.0-S75-15 液体培地で調製した菌体からは検出されなかった (表 3-22)。したがって、脂肪酸組成が培養条件に影響されることが示唆される。なお、表 3-20 の結果を得た際の SIR-1<sup>T</sup> 菌体は、N2.0-S100-20 培地で調製したものであった。ヒドロキシ脂肪酸が一部の陸生粘液細菌から検出されているが (Garcia *et al.*, 2011)、SYR-2<sup>T</sup>、SHK-1<sup>T</sup> および SIR-1<sup>T</sup> の 3 株からは検出されなかった。

#### 4) DNA GC 含量

SYR-2<sup>T</sup>株のゲノム DNA の塩基組成は既知の粘液細菌と同様に高 GC 含量であり、69.7 mol%であった。

表 3-22. 汽水性粘液細菌 SYR-2<sup>T</sup>(OTU-3)の菌体脂肪酸組成(mol%)—OTU-1 および OTU-2 との比較

脂肪酸の種類	OTU-3 SYR-2 <sup>T</sup>	OTU-2 SHK-1 <sup>T</sup>	OTU-1 SIR-1 <sup>T</sup>
<b>分岐鎖脂肪酸</b>			
iso-C13:0	1.3	0.0	0.7
iso-C14:0	0.8	0.5	0.3
iso-C15:0	43.8	24.2	40.7
iso-C16:0	9.6	24.0	11.8
iso-C17:0	22.4	12.6	9.8
iso-C18:0	1.4	1.6	0.0
iso-C18:1H	0.6	0.0	0.0
iso-C19:0	1.5	0.0	0.0
anteiso-C15:0	0.5	0.7	0.0
anteiso-C17:0	0.3	0.9	0.2
<b>直鎖脂肪酸</b>			
C14:0	2.4	3.4	1.3
C15:0	0.5	2.8	2.4
C16:0	4.2	9.2	13.9
C16:1 $\omega$ 5c	2.4	5.3	2.9
C16:1 $\omega$ 9c	0.3	0.0	0.0
C17:0	0.6	1.0	0.5
C18:0	2.0	3.2	1.0
C18:1 $\omega$ 9c	1.0	3.7	1.1
<b>PUFA</b>			
C18:3	0.0	0.0	0.3
C20:4	4.3	5.6	11.5
<b>環状</b>			
cyclo-C19:0 $\omega$ 8c	0.0	1.4	0.0

#### 3.3.7. OTU-4 の分類学的性状

##### 1) 形態および培養上の特徴

OTU-4 の SMH-27-4<sup>T</sup>株は、接種寒天片の周囲に円形に拡大する swarm を形成した。1 ヶ月間の培養後も、NaCl 濃度 0.0-2.5% (w/v) の寒天培地上では、swarm の輪郭は円形だった。細胞は寒天質中へ潜り込む傾向を示し、コロニー内側の寒天面は浅く陥没した(図 3-16)。ときには寒天質が収縮し断裂したが、寒天ゲル自体は完全には溶解液化しなかった。コロニー内側の寒天面に蝕刻様の独特の幾何学的模様が生じる場合もあった(図 3-16B)。コロニー外周部で細胞密度が高くなり、図 3-16A に矢印で示すように、外周部に栄養細胞が帯状に密集した部分が生じた。コロニー色調は、VY/2-S20-10 寒天上で淡褐色・ベージュ色を呈した。この菌株も、OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup>と同様に、1/3CY-S20-10 寒天上で生育が遅く、1/6CY-S20-10 寒天上で比較的良好に生育した。

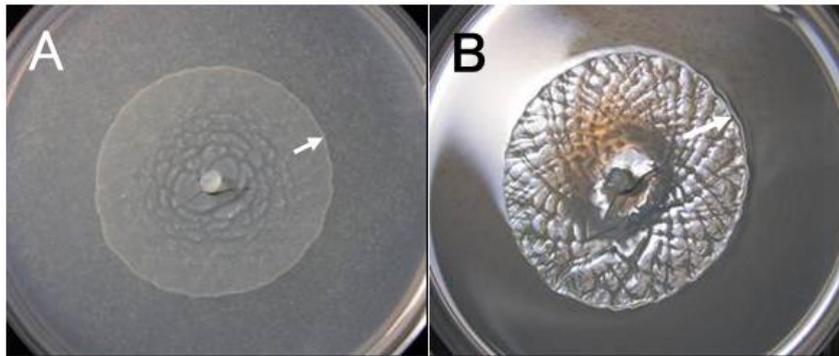


図 3-16. SMH-27-4<sup>T</sup> 株(OTU-4)のコロニー(swarm). (A), VY/2-S20-10 寒天上の swarm(淡褐色ー肌色の swarm が接種寒天片を中心に円形に拡大 [矢印は先端]); (B), 寒天培地を傾斜させたときの斜め上方光源下での画像.

栄養細胞について、VY/2-S20-10 寒天、1/6CY-S20-10 寒天の上では、幅 0.5-0.7  $\mu\text{m}$ 、長さ 1.5-7.0  $\mu\text{m}$  で、細胞の両端が丸みを帯びた桿菌だった。子実体について、VY/2-S20-10 および VY/2-S75-15 寒天では、明瞭な子実体形成は観察されなかった。

液体培養を行った場合は、他の多くの陸生あるいは海洋性粘液細菌と同様に、これらの菌株は細胞が分散して生育せず、径 0.5-3.0 mm の細胞塊を形成した。

## 2) 生理・生化学的表現型

SMH-27-4<sup>T</sup> 株は絶対好気性細菌であり、嫌気条件下では生育しなかった。本菌株は、化学合成従属栄養細菌 (chemoheterotrophs) であった。生育温度は中温域で、18-40°C の範囲で生育し、至適生育温度は 30-34°C で、42°C 以上で生育しなかった。生育 pH については、中性付近で最もよく生育した。液体培養を行った場合は、他の多くの陸生あるいは海洋性粘液細菌と同様に、細胞が分散して生育せず、径 0.5-3.0 mm の細胞塊を形成した。

SMH-27-4<sup>T</sup> 株の汽水性粘液細菌としての特徴を明らかにするために、酵母寒天培地中の NaCl や他の無機塩類の濃度を変化させ生育応答を調べた。NaCl 濃度に対する生育応答を、図 3-17 に示す。生育 NaCl 濃度範囲は 0.0-3.0% (w/v)、至適は 0.5-1.5% (w/v) だった。食塩濃度 0.0-0.5%では、培地中の NaCl 濃度の増加に応じ生育が促進されたので、この菌株は食塩要求性と判定された。SYR-2<sup>T</sup> 株と同様に、NaCl 濃度 0% でも遅い生育を示したが(図 3-17)、陸生菌用の VY/2 寒天では生育しなかった。以上から、この菌株の生育にも、Na<sup>+</sup>以外の 2 価カチオン、Mg<sup>2+</sup>もしくは Ca<sup>2+</sup>、あるいはその両方が必要と推定された。NaCl 濃度が 2.0% (w/v) 以上では、0.5-1.5% の場合に比べ生育は遅く

なり、3.5%以上ではまったく生育しなかった。このような汽水性細菌としての性質は、OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup> と似ていた。

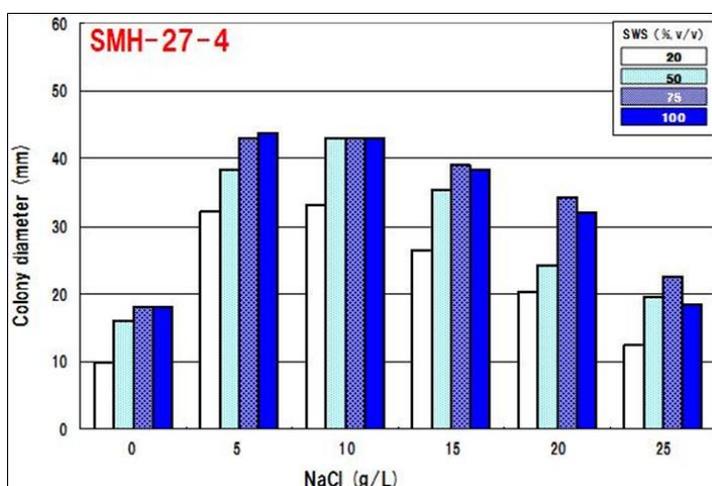


図 3-17. SMH-27-4<sup>T</sup> 株 (OTU-4) の NaCl 濃度に対する生育応答. VY/2-Sx-y 寒天培地上, 30°C, 14 日間の培養後にコロニー (swarm) の直径を測定.

酵素活性については、オキシダーゼ陽性、カタラーゼは陰性もしくは弱い活性を示した。高分子基質の分解活性について、カゼインに対するタンパク質分解活性は陽性だった。デンプン分解活性（アミラーゼ）は陰性だった。DNAase は陰性もしくは弱い活性が認められ、Tween 80、リパーゼは陰性だった。溶菌活性グラム陰性細菌の生菌体を溶菌したが、酵母の生菌体やオートクレーブ処理菌体は溶解しなかった。

### 3) 化学分類学的特徴

SMH-27-4<sup>T</sup> 株の菌体キノンの主成分として、MK-8 が検出された。

菌体脂肪酸については、N0.5-S20-10 培地（S20-10 を基本溶液とし、Natrose [カゼインナトリウム] 0.5 g L<sup>-1</sup> を含む）で調製した菌体の場合は、他の粘液細菌と同様に主要な成分は、イソ型分岐鎖脂肪酸であり、iso-C15:0 および iso-C17:0 が比較的多く含まれ、ピーク面積比はそれぞれ 29.5% および 33.5% で両者の合計は 60% 以上であった。その他に iso-C15:1、iso-C16:0、iso-C10:0 および iso-C13:0 なども少量含まれ（ピーク面積比% : 8.0、3.3、2.6 および 1.2）、イソ型分岐鎖脂肪酸を有する点は既知の粘液細菌の特徴と類似していた。その他に、C16:1 $\omega$ 5c（面積比 : 5.6%）、C15:0（面積比 : 3.1%）も検出された。アンテイソ型脂肪酸は、OTU-1 の SIR-1<sup>T</sup> 株、OTU-2 の SHK-1<sup>T</sup> 株、OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup> 株、および既知の海洋性粘液細菌の *Haliangium* 属からも検出されたが、SMH-27-

4<sup>T</sup>株からは検出されなかった。また、OTU-1 の SIR-1<sup>T</sup>株、OTU-2 の SHK-1<sup>T</sup>株、OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup>株や一部の陸生粘液細菌から見出された、アラキドン酸と類似の長鎖不飽和脂肪酸 C20:4 は SMH-27-4<sup>T</sup>株からは検出されなかった。このように、SMH-27-4<sup>T</sup>株の脂肪酸組成は、他の陸生および海洋性、汽水性粘液細菌の場合と比較し、構成分子種や各成分の構成比率の点で異なっており、この菌株の分類学的な独自性を反映していると考えられる。

### 3.4 考察

#### 3.4.1 海洋性、汽水性粘液細菌の分離

今回、沿岸海域試料からの海洋性粘液細菌の分離を試みたところ、砂や泥や海岸動物および海草からの出現頻度が比較的に高率であった（表 3-15）。それらの試料では、溶菌性コロニー（swarm）の出現率が 20% 以上に達した。砂粒については、表面にある多数の微小な凹部が、細菌の生息場所となることが指摘されている（松田, 1991）。粘液細菌がこうした微小環境において、捕食者あるいは高分子基質（タンパク質や多糖など）の分解者としての役割を果たしていると推測される。泥の場合にも、粒子表面や粒子間隙に粘液細菌が生息していると思われる。海岸動物遺体や海草については、それらの生物体表面に粘液細菌が生息し、表面の他の微生物や生物体由来の多糖などの高分子基質を利用している可能性がある。一方、これらの試料が海岸に漂着後に、粘液細菌が周囲の砂などから移動してきた場合もあると思われる。粘液細菌の純化率に関しては、砂や泥では 10% 程度の値に達したものの、他の試料からの場合はそれ以下だった。海岸動物からの粘液細菌の純化率が低かった理由は、結果にも述べたように、粘液細菌以外に他の滑走細菌が混在し、分離用寒天培地の表面で粘液細菌の swarm より速やかに広がり生育したことによる。これらの滑走細菌の多くは、結果では述べなかったが、16S rRNA 遺伝子の分子系統ではバクテロイデス (*Bacteroidetes*) 門の細菌だった。

ガンマプロテオバクテリア綱に属する異なるグラム染色陰性菌を餌とした 2 つの分離培地 (Ec-S75-15 および Alt-S75-15) を比較すると、粘液細菌の出現率や純化率について、明瞭な差は認められなかった（表 3-15）。大腸菌は海水中での生残性は低いことが知られているが、ある程度の耐塩性を有していると思われ、海水相当の NaCl (2.0%, w/v) を含む寒天培地上でも自己溶解しなかった。このため、捕食性粘液細菌の分離用の餌として、大腸菌および海洋性の *Alteromonas haloplanktis* とを比較した場合に、互いの分離結果に大差がなかったと考えられる。この結果から、海洋性粘液細菌を分離するための釣菌用餌細菌として、大腸菌は十分に利用可能との結論に達した。

海岸由来試料からの分離の際に、試料を無処理あるいは前処理として 80°C の加熱処理も検討した (§ 3.3.1)。前述のように、一部の試料では、80°C、5 分間の乾熱処理を加えた場合には、粘液細菌以外の滑走性細菌の出現はある程度抑制され、swarm 形成菌（粘液細菌）の出現率や純化率は向上する場合もあった。しかし、自然界における粘液胞子の形成状態と栄養細胞との存在割合が影響していることも推定され、栄養細胞が多い場合には、80°C、10 分の加熱では、粘液細菌の細胞自体に熱損傷が生じ、出現率が低下した可能性がある。

本研究の結果から、人工海水基礎培地 SWS (表 3-2) をもとにして調製した低栄養寒天培地を用い、大腸菌溶解性の捕食性滑走性細菌として新規な粘液細菌が分離可能なこ

とが示された。それらの菌株の大部分は、菌体キノンとして MK-7 を有するナノシスティス科の粘液細菌であった（表 3-18）。人工海水の NaCl 濃度を海水より低濃度（0.5-1.0%）に調製することにより、選択性が高い分離法とはいえないが、汽水性粘液細菌の分離が可能と考えられる。

従前の研究（Fudou *et al.*, 2002）および本研究によって、海洋や汽水環境に、陸生粘液細菌とは系統的に異なる特有の粘液細菌が生息していることは明らかである。しかしながら、本研究では定量的な検出を行っていないために、海洋や汽水環境にどの程度の菌数で粘液細菌が生息しているか、あるいはこれらの微生物生態系での役割は、今なお定かでない。すでに、非培養的技法による海洋底泥試料の菌相解析によって、海底環境における粘液細菌の近縁菌の分布が示唆されているが（Moyer *et al.*, 1995; Gray and Herwig, 1996）、今後はメタゲノムの技法や次世代シーケンサーを利用した網羅的な細菌叢の解析によって、海洋・汽水環境での粘液細菌の群集構造や生態的役割がより明らかになることが期待される。

#### 3.4.2 新規粘液細菌の系統・高次分類

本研究で分離した海洋性、汽水性の粘液細菌のほとんど全部は、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた分子系統解析の結果から、ナノシスティス亜目、ナノシスティス科に分類されることが分かった。筆者がこれらの粘液細菌を分離した当時では、The Prokaryotes 第 2 版（Springer-Verlag）において粘液細菌はシストバクター（*Cystobacterineae*）亜目とソランギウム亜目の二つの亜目に分類されていた（Reichenbach, 1992）。2005 年に出版された Bergey's Manual of Systematic Bacteriology（第 2 版）においては、“Order VIII. Myxococcales”（粘液細菌目）の章で粘液細菌の高次分類体系が変更された。すなわち、Bergey's Manual ではシストバクター亜目およびソランギウム亜目に加え、ナノシスティス亜目が新設され、粘液細菌目は 3 つの亜目から構成されることになった。この変更理由は、*Nannocystis* 属を含む一群の粘液細菌群が系統樹上で突出した分枝を構成している点を考慮したことによる（Shimkets and Woese 1992; Spröer *et al.*, 1999）。本章での図 3-5 の系統樹は、これを証明している。

本研究の系統解析の結果は、新規分離株が 7 つの OTU に分別可能なこと、さらにその中の 4 つの OTU（OTU-1, -2, -3, -4）は新属に相当することを示唆した。これらの OTU の分類学的命名提唱について、OTU ごとに具体的な“description”も含めて以下に述べる。

#### 3.4.3 OTU-1 に対する新属・新種 *Plesiocystis pacifica* の提唱

結果で述べたように、OTU-1 として分類した海洋性粘液細菌 SIR-1<sup>T</sup> 株と SHI-1 株の 2 株に関しては、新属新種の命名が妥当と考えられた。表現型に基づく分類学的性質として、プロテオバクテリア門としては希少な部分飽和型メナキノンである MK-8(H<sub>2</sub>) を有

していた点や、菌体脂質に多価不飽和脂肪酸 (C20:4) を含んでいた点、あるいは生理的性質の面で典型的な海洋性細菌の特徴を示したことなども、新学名提唱の妥当性を支持している。

そこで、これら 2 株を包括する OTU-1 に対して新属新種 *Plesiocystis pacifica* gen nov., sp. nov. を提唱する。新属名 *Plesiocystis* は、SIR-1<sup>T</sup> 株と SHI-1 株の両菌株が、16S rRNA 遺伝子による分子系統樹上で、*Nannocystis* 属に隣接した分枝上に位置していることに由来する。すなわち、ギリシャ語で「隣人」を意味する“*plesion*”と、子実体の形状が袋状であることを意味する“*cystis*”の合成語として“*Plesiocystis*”を造語し、「*Nannocystis* 属に隣接した、袋状の子実体を形成する粘液細菌」を表わしている。*Plesiocystis pacifica* の基準株は SIR-1<sup>T</sup> 株であり、理化学研究所の微生物材料開発室 (JCM) (<http://jcm.brc.riken.jp/ja/>) に JCM 11591<sup>T</sup> として、ドイツの The Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (<https://www.dsmz.de/>) に DSM 14875<sup>T</sup> として寄託済みである。

地理的に遠く離れた 2 地点、八丈島から SHI-1 が、西表島からは SIR-1<sup>T</sup> がそれぞれ分離されたことから、*Plesiocystis pacifica* は太平洋の暖流域に広範に分布すると推定される。

## 新属・新種の記載

### Description of *Plesiocystis* gen. nov.

*Plesiocystis* [Ples.i.o.cys'tis. Gr.masc.n.*plesion* neighbour; Gr. fem. n.*cystis* bladder; N. L. fem. n. *Plesiocystis* neighbour bladder (to imply the genus is phylogenetically clustered next to the genus *Nannocystis* on the dendrogram)]

Cells are straight rods with blunt, rounded ends ('*Sorangium*' type). Gram-negative. Spherical myxospores with diameters 0.5–0.7 μm are formed. Vegetative cells move by gliding on solid surfaces, tending to concentrate at the swarm periphery; the agar gel within the swarms is often cleaved. Spherical or oval-shaped cell clusters that migrate away from the centre and leave etched paths in the gel surface are observed on agar media. Fruiting bodies are pinkish- to brownish-orange. They are solitary aggregates, without a distinct wall. Strictly aerobic chemoorganotrophs. Mesophilic, neutrophilic and slightly halophilic. Oxidase-positive and weakly catalase-positive or negative. Casein and gelatin are hydrolysed, whereas starch, chitin, alginate and cellulose are not. Agar gel is not liquefied. Tween 80 is weakly hydrolysed or not hydrolysed. DNA is weakly hydrolysed. The major quinone is MK-8(H<sub>2</sub>). The major cellular fatty acid components are iso-C15:0, iso-C16:0, anteiso-C16:0 and anteiso-C17:0 and a long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA), C20:4 are also detected. Hydroxy fatty acids are not detected. The G+C content of genomic DNA is nearly 70 mol%. The phylogenetic position is

in the suborder *Sorangineae*, order *Myxococcales*. The type species is *Plesiocystis pacifica*.

#### **Description of *Plesiocystis pacifica* sp. nov.**

*Plesiocystis pacifica* (pa.cif'ic.a. N.L. fem. adj. *pacifica* pertaining to the Pacific Ocean).

Has all the characteristics of the genus. Colonies are coloured light-pink to orange on 1/3 CY SWS medium. Growth temperature is between 15 and 32°C. No growth occurs above 34°C or below 10°C. Growth occurs at an NaCl concentration between 1.0 and 4.0% (w/v), with an optimum at 2.0–3.0% (w/v). The Na<sup>+</sup> requirement cannot be substituted by Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup>. NaBr can partially replace NaCl, but NaI cannot. Besides NaCl, cations of seawater (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>) are also required. The pH range for growth is 5.5–9.0, with the optimum at neutral pH (7.0–8.5). Acid phosphatase, alkaline phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase are detected using the API ZYM system. Esterases and glucosidases are not produced. Autoclaved yeast cells were not decomposed in Vy2-SWS agar. Isolated from the Pacific coasts of Japan. The type strain is SIR-1<sup>T</sup> (= JCM 11591<sup>T</sup> = DSM 14875<sup>T</sup> = AJ 13960<sup>T</sup>).

#### **3.4.4 OTU-2 に対する新属・新種 *Enhygromyxa salina* の提唱**

OTU-2 の 6 株については、16S rRNA 遺伝子配列解析に基づく進化距離のみからは、*Plesiocystis* 属と比較的近く、これとは異なる新属に含めるべきかどうかは、微妙な判断であった。化学分類の重要な指標である菌体脂肪酸組成については、他の粘液細菌属との類似点が認められた。しかし、キノン型は *Plesiocystis* 属の MK-8(H2)、陸生粘液細菌や *Haliangium* 属の MK-8 とは異なる MK-7 だった。DNA の G+C 含量は、*Plesiocystis* 属の 69.3–70.0% より少し低い値で、65.6–67.4% だった。これらは、OTU-2 と *Plesiocystis* 属との鑑別性状として重要な指標となる。

さらに、生理的性質については *Plesiocystis* 属との差異が認められた。カチオン要求性について、これらの 6 株は、培地へ Na<sup>+</sup> を単独で添加の場合には生育せず、Na<sup>+</sup> 以外に Mg<sup>2+</sup> あるいは Ca<sup>2+</sup> のどれか一方を加えれば生育可能だった。これに対し、*Plesiocystis pacifica* SIR-1<sup>T</sup> 株および SHI-1 株は、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> および K<sup>+</sup> の 3 つのカチオンを同時に要求した。このようなキノン型の特徴、生理学的性状、G+C 含量に加えて系統樹上での *Plesiocystis* 属からの進化距離なども考慮し、6 株について新属新種の学名を提唱するのが妥当と判断した。

そこで、OTU-2 の 6 株に対する新属・新種名として *Enhygromyxa salina* gen. nov., sp. nov. を提唱する。この属名の接頭語である *enhygro* は「湿った環境に生息する」の意であり、*Enhygromyxa* で湿った環境に生きる粘液細菌の意味になる。種形容名の *salina* は好塩性の性質を表わす。*Enhygromyxa salina* の基準株 SHK-1<sup>T</sup> は、JCM および DSM にそれぞれ JCM 11769<sup>T</sup>、DSM 15217<sup>T</sup> として寄託した。

*Enhygromyxa salina* は以下の生理的特徴を有する。NaCl のほかに、Mg<sup>2+</sup>あるいは Ca<sup>2+</sup> を生育に要求する海洋性細菌の性質を示す。生育可能な NaCl 濃度範囲は 0.1–4.0% (w/v) なので、汽水域から海水相当濃度域まで広く分布すると推定される。生育温度範囲は 5–34°C であり、低水温の海域から暖海において生育すると考えられる。実際に、*E. salina* に相当する 6 株は、本州から北海道に至る日本沿岸各地の 4 地点から分離された (図 3-1)。これらの地点間は遠く隔たり、各地点は水温の季節変動や水質などの点で、互いに異なる環境条件下にあると考えられる。*E. salina* が日本各地の海岸から分離された理由は、本菌の生育可能な NaCl 濃度や温度の範囲が広いことによると推定される。

### 新属・新種の記載

#### Description of *Enhygromyxa* gen. nov.

*Enhygromyxa* [En.hydro.myxa. Gr. adj. *enhydro* growing or living in wet or moist habitats, Gr. fem. n. *myxa* slime; N. L. fem. n. *Enhygromyxa* slime of wet or moist habitat, that means aquatic myxobacteria].

Cells are straight rods with blunt, rounded ends (*Sorangium* type). Gram-negative. Spherical myxospores with diameters 0.5–0.7 μm are formed. Vegetative cells move by gliding, tend to concentrate at the swarm periphery and the agar gel within the swarms is sometimes cleaved, but agar gel is not liquefied. Fruiting bodies are orange to brownish-orange. They are solitary aggregates, with thin slimy wall. Strictly aerobic chemoorganotrophs. Mesophilic, neutrophilic and slightly halophilic. The major quinone is MK-7. The major cellular fatty acid components are iso-C15:0, iso-C16:0 and iso-C17:0. Anteiso acids (anteiso-C16:0 and anteiso-C17:0) and a long chain PUFA (C20:4) are also detected. Hydroxy fatty acids are not detected. The G+C content of genomic DNA ranges from 65 to 67 mol%. The phylogenetic position is in the family *Nannocystaceae*, the order *Myxococcales*. The type species is *Enhygromyxa salina*.

#### Description of *Enhygromyxa salina* sp. nov.

*Enhygromyxa salina*. (sa.li'na. L. adj. *salina* salted, saline).

Has all the characteristics defining the genus. Colonies are colored light-orange to red on 1/3 CY-SWS medium. Growth temperature is between 5–34°C, with an optimum at 28–30°C. No growth occurs at 37°C or above temperatures. The ability of the isolates to grow at low temperatures between 5–10°C distinguish them from the other marine myxobacteria. Growth occurs at a NaCl concentration between 0.1–4.0% (w/v), with the optimum at 1.0–2.0% (w/v). The Na<sup>+</sup> requirement cannot be substituted with Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup>. NaBr can partially replace NaCl, but NaI cannot. Besides NaCl, divalent cations of seawater (Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup>) are also required. The pH range for growth is 5.5–9.0, with an optimum pH of 7.0–8.5. Oxidase- and

catalase-positive. Casein and gelatin are hydrolyzed, while starch, chitin, alginate, cellulose and DNA are not. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, and naphthol- AS- BI- phosphohydrolase are detected by the APIZYM enzyme assay. Esterases(C4 and C8), lipase(C4), and leucine-arylamidase were weakly positive or negative. Valine- arylamidase, cystine-arylamidase, trypsin, chymotrypsin, galactosidases( $\alpha$  and  $\beta$ ),  $\beta$ -glucuronidase, glucosidases( $\alpha$  and  $\beta$ ), N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase, and  $\alpha$ -fucosidase activities were not detected. Autoclaved yeast cells were not decomposed in VY/2-SWS agar. Isolated from the coasts of Japan. The type strain is SHK-1<sup>T</sup> (JCM 11769<sup>T</sup> = DSM 15217<sup>T</sup>).

#### 3.4.5 OTU-3 に対する新属・新種 *Pseudenhygromyxa salsuginis* の提唱

OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup> 株については、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析の結果、いかなる属とも隔たった独自の系統を示した。さらに、*Plesiocystis* 属菌株 (OTU-1) や *Enhygromyxa* 属菌株 (OTU-2) とは異なる汽水性を示す生理的特徴から、前 2 属に近縁の新属・新種相当の粘液細菌とするのが妥当と判定された。

そこで、OTU-3 の SYR-2<sup>T</sup> 株を包括する新属・新種名として *Pseudenhygromyxa salsuginis* gen. nov., sp. nov. を提唱する。*Pseudenhygromyxa* は、「*Enhygromyxa* 属に近縁」を意味する属名であり、種形容名 *salsuginis* は「塩分を含む環境における分布」を表わす。SYR-2<sup>T</sup> 株は徳島県、藍住 (あいずみ) 町の吉野川流域 (河口から 12 km 上流) の塩性湿地の泥試料から分離された。*Pseudenhygromyxa salina* の基準株 SYR-2<sup>T</sup> は、NBRC および DSM にそれぞれ NBRC 104351<sup>T</sup>、DSM 21377<sup>T</sup> として寄託した。

#### 新属・新種の記載

##### **Description of *Pseudenhygromyxa* gen. nov.**

*Pseud(o)enhygromyxa* (Pseu. d(o). enhygromyxa. Gr. Adj. pseudēs, false; L.n. *Enhygromyxa*, genus of marine myxobacteria; L.n. *Pseudoenhygromyxa*, false *Enhygromyxa*).

Cells are rod-shaped, move by gliding and form swarms on agar media. Fruiting body (FB)-like structures and myxospore-like optically refractive cells are formed. Mesophilic bacterium which grows between 20–40°C. Requires lower concentration of NaCl than the average seawater level for the growth. Grows at neutral pH range. The fatty acid profile is characterized by major amount of BCFAs and minor amount of SCFAs, when cultured in N<sub>2,0</sub>-S<sub>75,15</sub> liquid medium. PUFAs are also found among cellular FAs. The major cellular quinone is MK-7. The DNA G + C content of the type strain of the type species is 69.7 mol %. As shown by 16S rRNA gene sequence analysis, the genus belongs to the suborder *Nannocystineae*, the order *Myxococcales*, the class *Deltaproteobacteria*. The phylogenetic position of the genus is more closely related to the genus *Enhygromyxa* than to the genus *Plesiocystis*. The type

species is *Pseudenhygromyxa salsuginis*.

#### **Description of *Pseudenhygromyxa salsuginis* sp. nov.**

*Pseud(o)enhygromyxa salsuginis* (sal.su'gi.nis. L. gen. n. *salsuginis*, of brackish water)

Cells are gliding rods, measuring  $0.5\text{--}0.8 \times 2.0\text{--}5.0 \mu\text{m}$ . In addition to the characteristics reported above in the genus description, globular to polyhedral, solitary and sessile FB-like cell aggregates,  $50\text{--}800 \mu\text{m}$  in diameter, colored in brownish-red to -orange, appeared on the surface of agar media. Consistency of them were rather soft and butyrous at 1–2 weeks of incubation period. During prolonged incubation, the aggregates turned to have tougher consistency and be coloured in dark-brown. They often migrated into the agar gel matrix from the surface, sometimes reached to the bottom of the plate. Myxospore-like optically refractive, spherical to ellipsoidal cells,  $0.5\text{--}0.7 \mu\text{m}$  in diameter, are found in them. Mesophilic bacterium, no growth occurs above  $40^\circ\text{C}$  or below  $15^\circ\text{C}$ . NaCl concentration range for the growth is between 0.0–2.0% (w/v), with an optimum at 0.2–1.0%. No growth in higher NaCl concentration than 2.5% (w/v). It requires both  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  for the growth, and does not grow in VY/2 agar for terrestrial myxobacteria. The optimum growth pH range is between pH 7.0–7.5. No growth below pH 5.5 or above pH 8.5. Oxidase was positive but catalase was negative. Colonies are Congo-red-negative. Aerobic. It decomposes live *E.coli* cells, but does not lyse autoclaved yeast cells. Caseinase and gelatinase are positive. The strain is rather oligotrophic, and grows in CY/6-S75-15 medium but not in CY/3-S75-15. Does not utilize nitrate as nitrogen source. Amylase is negative or weakly positive: starch is sometimes weakly hydrolyzed but soluble starch is not. Xylanase is weak. Does not degrade filter papers. It sometimes cleaves the agar gel matrix within the swarm area, but does not completely liquefy agar gel. Tween 80 lipase and DNAase are negative. The major cellular fatty acids are iso-C<sub>15:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub> and iso-C<sub>17:0</sub>. Contains small amount of C<sub>20:4</sub> $\omega$ 6,9,12,15c (arachidonic acid), but eicosapentanoic acid was not detected. Small amount of anteiso acids (anteiso-C<sub>15:0</sub>, anteiso-C<sub>17:0</sub>) and iso-C<sub>19:0</sub> are present. It lacks hydroxylated acids. The type strain is SYR-2<sup>T</sup> (= NBRC 104351<sup>T</sup> = DSM 21377<sup>T</sup>), isolated from a mud sample collected from a marsh alongside the Yoshino River (*Yoshinogawa*), Tokushima Prefecture, Shikoku, Japan.

#### **3.4.6 OTU-4 に対する新属・新種 *Paraliomyxa miuraensis* の提唱**

OTU-4 に属する SMH-27-4<sup>T</sup> 株についても、上記の 3 つの OTU 同様、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析の結果や分類学的な性質の検討結果から、新属新種に包括させることが妥当と考えられた。SMH-27-4<sup>T</sup> 株は *Pseudenhygromyxa salsuginis* SYR-2<sup>T</sup> 株 (OTU-3) 同様、汽水性粘液細菌としての特徴を有する。すなわち、生育 NaCl 濃度範囲

は 0-3% (w/v) で食塩無添加でも生育するが、至適は 0.5-1.5% (w/v) である。また、海水に近い NaCl 濃度では生育速度が低下し、3.5%以上ではまったく生えなくなる。キノン型は、ほかの3つの OTU のいずれとも異なる MK-8 であり、この点ではむしろ陸生粘液細菌や *Haliangium* 属と似た性質を示した。

そこで、SMH-27-4<sup>T</sup> 株 (OTU-4) に対し、新属・新種名 *Paraliomyxa miuraensis* gen. nov., sp. nov. を提唱する。属名の接頭語である *paralia* は「沿岸や海岸線」の意であり、*Paraliomyxa* で「沿岸に生息する粘液細菌」の意味になる。また、種形容名は「三浦地方」を意味する。本菌株は、分離学的に新規であるばかりではなく、第 5 章に述べるように、新規環状デプシペプチドであるミウラエナミドの生産菌としても、特筆すべき特徴を有している。

### 新属・新種の記載

#### **Description of *Paraliomyxa* gen. nov.**

*Paraliomyxa* [Paralio.myxa. Gr. adj. *paralio* growing or living in coastal environment, Gr. fem. n. *myxa* slime; N. L. fem. n. *Paraliomyxa* slime of coastal habitat, that means coastal myxobacteria]. Cells are rod-shaped, move by gliding and form swarms on agar media. Fruiting body (FB)-like structures and myxospore-like optically refractive cells are formed. Mesophilic bacterium which grows between 18–40°C. Requires lower concentration of NaCl than the average seawater level for the growth. Grows at neutral pH range. The fatty acid profile is characterized by major amount of BCFAs and minor amount of SCFAs, when cultured in N0.5-S20-10 liquid medium. PUFAs are not found among cellular FAs. The major cellular quinone is MK-8. The DNA G + C content of the type strain of the type species is 69-70 mol %. As shown by 16S rRNA gene sequence analysis, the genus belongs to the suborder *Nannocystineae*, the order *Myxococcales*, the class *Deltaproteobacteria*. The phylogenetic position of the genus is distantly related to the genus *Enhygromyxa* and the genus *Plesiocystis*. The type species is *Paraliomyxa miuraensis*.

#### **Description of *Paraliomyxa miuraensis* sp. nov.**

Cells are gliding rods, measuring 0.5–0.8 × 2.0–5.0 μm. In addition to the characteristics reported above in the genus description, type strain was found to produce the novel antifungal depsipeptides: miuraenamides. The strain required very low concentration of NaCl for the growth. No distinct fruiting body was observed for the strain. The major cellular quinone was MK-8, and the major cellular fatty acid components were iso acids (iso-C15:0 and iso-C17:0). Long chain PUFAs (poly unsaturated fatty acids) and hydroxy fatty acids were not detected. Caseinase was detected, but amylase was not. On the basis of phylogenetic, chemotaxonomic

and physiological data, *Paraliomyxa miuraensis* gen. nov., sp. nov. is proposed. Mesophilic bacterium, no growth occurs above 40 °C or below 15°C. NaCl concentration range for the growth is between 0.0–3.0% (w/v), with an optimum at 0.5–1.5 %. No growth in higher NaCl concentration than 3.5% (w/v). It requires both Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> for the growth, and does not grow in VY/2 agar for terrestrial myxobacteria. The optimum growth pH range is between pH 7.0–7.5. No growth below pH 5.5 or above pH 8.5. Oxidase was positive but catalase was weak or negative. Colonies are Congo-red-negative. Aerobic. It decomposes live *E.coli* cells, but does not lyse autoclaved yeast cells. Caseinase and gelatinase are positive. The strain is rather oligotrophic, and grows in CY/6-S75-15 medium but not in CY/3-S75-15. Does not utilize nitrate as nitrogen source. Amylase is negative. Does not degrade filter papers. It sometimes cleaves the agar gel matrix within the swarm area, but does not completely liquefy agar gel. Tween 80 lipase and DNAase are negative. The major cellular fatty acids are iso-C<sub>15:0</sub> (29.5%) and iso-C<sub>17:0</sub> (33.5%). iso-C<sub>15:1</sub> (8.0%) and iso-C<sub>16:0</sub> (3.3%) were also detected. It lacks anteiso-acids, long chain PUFAs (poly unsaturated fatty acids) and hydroxylated acids. The type strain is SMH-27-4<sup>T</sup>.

## 第4章 温泉環境由来の新規粘液細菌の探索

### 4.1 はじめに

第3章に述べたように、ナノシステイス亜目 (suborder *Nannocystineae*)、ナノシステイス科 (family *Nannocystaceae*) に属する新規な粘液細菌が、日本各地の海岸や河口などの水圏や土壌環境に普遍的に分布することが本研究で明らかになった。それらの菌株に共通した生理的特徴は、NaCl の要求性である。塩分濃度への生育応答は菌株ごとに多様であり、それぞれ海洋性あるいは汽水性の性質を示したが、生育温度の点ではどの分離株も常温性であった。これらの菌株の分離操作を常温 (27-30°C) で行ったことから、それ自体は妥当な結果と思われるが、一部の海洋性粘液細菌は、分離環境からは予想外はかなり高温側でも生育可能である。たとえば、先行研究で得られたコフレリア科 (family *Kofleriaceae*) の海洋性粘液細菌 *Haliangium tepidum* は、常温の海草堆積物から分離されたが、45°C で生育する (Fudou *et al.*, 2002)。また、ナノシステイス科の海洋性粘液細菌の分離株 SYM-1 は、常温の波打ち際の砂から分離されたが、45°C で生育可能である。陸生粘液細菌についても高温で生育可能な例が知られ、土壌由来菌株 *Myxococcus* sp. GT-7 株の最高生育温度は 48°C と報告された (Gerth and Müller, 2005)。以上の例から、45°C 付近の高温側で生育できる粘液細菌は、土壌や海岸などの常温環境にも広く分布することが示唆される。海岸の砂地や陸地の土壌表層は常温環境だが、夏季の日光直射下で 45°C 付近になる部分もあると推定され、その温度で生存可能な菌株が生息すると考えられる。このような「高温性」の粘液細菌が自然界には広く分布ことが推定されたので、著者らは 45°C よりさらに高温の 50°C で生育可能で、分類学的に新規な高温性粘液細菌の探索を試みることにした。

高温性微生物の分離源として、従来は温泉や堆肥あるいは砂漠土壌などから探索が行われてきた。堆肥や土壌環境中では、発酵微生物相の遷移や気象状況の変動に伴う温度変化が著しく、一定の高温状態が維持されるのは一時的である。他方で、温泉環境中では、一定の高温状態が長期間にわたり保持されており、高温環境に適応した固有微生物群が生息すると考えられる。これを支持する知見として、非培養的手法による微生物群集構造解析により、温泉環境に固有の新規な分類群に属する多様な微生物群が温泉中に生息することが示されている (Hugenholtz *et al.*, 1998)。温泉環境における細菌捕食性微生物の研究例は少数はあるが (Baumgartner *et al.*, 2003)、粘液細菌に関する知見はきわめて少ない。海底熱水噴出孔においては、粘液細菌の分布を示唆する非培養的手法に基づいた報告はある (Moyer *et al.*, 1995)。一方、温泉からの粘液細菌の分離例についてはこれまで報告がない。

## 4.2 実験材料および方法

### 4.2.1 温泉試料

温泉からの粘液細菌の探索に供した試料を表 4-1 に示す。北海道から九州に至る日本各地の温泉から、1999 年 12 月-2000 年 3 月の 4 ヶ月間に 141 試料を採集した。採集地の水温は、低温側は常温域の 40°C 以下から、高温側は 80°C 以上の範囲にあった。泉水の pH は酸性の 2.0 から弱アルカリ性の 8.0 の範囲にあり、大部分の採集地点の泉水は中性だった。塩分 (NaCl) 濃度は陸域温泉では 0.0-1.0% (w/v)、海岸温泉では海水に近い 2.5-3.0% だった。泉水試料は約 500 mL を吸引フィルター濾過し、用いたフィルターを約 5×5 mm の矩形に滅菌解剖刀で切り取り、細菌溶解性の粘液細菌の分離用培地の線状塗抹菌体の端に置き、分離操作に供した (第 3 章の分離操作を参照)。フィルターは G-V Durapore Membrane 濾過器 (容積 500 mL、孔径 0.2 μm、滅菌済) を使用した。

表 4-1. 温泉試料の採集地点の一覧

番号	採集場所 (都府県)	物理化学的性状			試料数	試料の種類 (数)
		温度 (°C)	pH	NaCl% (w/v)		
I	温泉の浴槽、八戸 (青森)	40 - 50	7.0 - 8.0	0.8 - 0.9	1	水(1)
II	温泉の浴槽、那須塩原 (栃木)	40 - 50	6.0 - 7.0	0.0	1	水(1)
III-1	走り湯 (自噴温泉)、熱海 (神奈川県)	63 - 70	6.0 - 7.0	0.3 - 0.5	11	水(3), 砂(4), 石膏沈殿物(4)
III-2	七湯、熱海 (神奈川県) 源泉: I-VII	50 - 74	6.0 - 7.0	0.1 - 0.4	20	水(7), バイオマット(3), 泥(5), 落ち葉(5)
IV-1	源泉: I, 伊豆・熱川 (静岡県)	75 - 80	7.0 - 7.2	0.1 - 0.2	11	水(1), 砂(5), 石膏沈殿物(5)
IV-2	島見湯, 伊豆・熱川 (静岡県)	45 - 50	7.0 - 7.1	0.2 - 0.3	8	水(1), バイオマット(2), 砂(2), 石膏沈殿物(3)
IV-3	海岸の湯溜り, 伊豆・熱川	45 - 60	7.0 - 7.1	0.1 - 0.2	14	水 (3), 落ち葉 (4), 泥 (4), 硫黄沈殿物 (3)
IV-4	源泉: II, 伊豆・熱川	50 - 60	7.0 - 8.0	0.1 - 0.2	12	水(2), バイオマット(2), 泥(3), 落ち葉 (3), 木片 (2)
V-1	浴槽, 伊豆・下賀茂温泉	40 - 50	7.5 - 8.0	0.4 - 0.5	1	水(1)
V-2	源泉: I, 伊豆・下賀茂温泉	85 - 88	8.0 - 8.1	1.0 - 1.2	1	水(1)
V-3	源泉: II-IV, 伊豆・下賀茂温泉	50 - 60	7.0 - 8.0	Not determined	12	バイオマット (3), 泥 (5), 石膏沈殿物 (4)
V-4	源泉: V, 伊豆・下賀茂温泉	55 - 60	7.3 - 7.4	1.0 - 1.1	6	バイオマット (2), 泥 (2), 硫黄沈殿物 (2)
V-5	源泉: VI, 伊豆・下賀茂温泉	55 - 75	7.3 - 7.4	0.8 - 0.9	8	水(1), 砂(2), 泥(2), 落ち葉(3)
V-6	温水流し溝, 伊豆・下賀茂温泉	50 - 70	6.0 - 7.0	0.0	5	泥 (2), 落ち葉 (3)
VI-1	温泉の浴槽, 箱根・湯元 (神奈川県)	40 - 50	8.3 - 8.4	0.1 - 0.2	3	水 (1), バイオマット (2)
VI-2	蒸気排出口, 箱根・強羅	45 - 50	7.0 - 8.0	0.0	6	バイオマット (3), 泥 (3)
VI-3	源泉: I, 箱根・大涌谷	50 - 55	2.8 - 3.0	0.0	1	水 (1)
VI-4	源泉: II, 箱根・大涌谷	45 - 48	2.0 - 3.0	0.0	9	水 (1), 泥 (3), 落ち葉 (3), 硫黄沈殿物 (2)
VII	源泉, 武雄温泉 (佐賀)	45 - 50	8.5 - 8.6	0.0 - 0.1	3	水 (3)
VIII	源泉: 十勝・吹上 (北海道)	40 - 50	2.0 - 3.0	0.0	3	水(1), 砂(1), 硫黄沈殿物 (1)
IX	海岸温泉: 湯の浜, 指宿 (鹿児島)	40 - 50	8.0 - 8.2	2.5 - 3.0	4	水 (1), 砂 (3)

温泉沈殿物やバイオマット試料からの分離操作は、海洋性や汽水性の粘液細菌の場合と基本的には同様の手順で行なった。試料は採集後 5 日以内に分離操作に供した。採集地点の温度は、通常のアルコール温度計と非接触温度計 OPTEX PT-5LD “THERMO-HUNTER®” を用いて測定した、NaCl 濃度は HORIBA COMPACT SALT METER C-121 により測定した。試料の pH は現地において pH 試験紙で確認後、持ち帰った泉水試料の pH を、HORIBA pH METER F-22 で再び測定した。

#### 4.2.2 溶菌性粘液細菌の分離および培養用培地

海洋性や汽水性粘液細菌の場合と同様に、温泉環境由来試料についても、細菌溶解性およびセルロース分解性の粘液細菌の分離を試みた。細菌溶解性菌株の分離培地は、各採集地点の水質に応じ、塩分濃度や pH を調整した。溶菌性菌株の集積培養のために、寒天培地上には餌として大腸菌生菌体を線状に 2 本平行に塗抹した。

##### 1) 海岸温泉由来の粘液細菌の分離培地・S100-20 寒天

海岸温泉からの探索に使用した。人工海水基礎培地 (SWS) (第 3 章、表 3-2) に NaCl を添加し、S100-20 寒天とした (表 4-2)。

##### 2) 陸上淡水温泉由来の粘液細菌の分離培地・WCX 寒天

陸上の淡水温泉からの探索に使用した。土壌由来の細菌溶解性の粘液細菌の分離用培地 (Reichenbach and Dworkin, 1992) と同一組成に調製し、大腸菌生菌体を線状に塗抹し、Ec-WCX 寒天培地とした (表 4-3)。

##### 3) 陸上淡水温泉由来の粘液細菌の分離培地・HS 寒天

少量の塩分あるいは無機塩を含む陸域温泉の試料に使用した (表 4-4)。

##### 4) 陸上塩水温泉由来の粘液細菌の分離培地・1/2S100-20 寒天

塩分を含む陸域温泉の試料に用いた (表 4-5)。

##### 5) 陸上淡水温泉由来の粘液細菌の分離培地・GG 培地

酸性 pH 域 (pH 3.0 以下) では寒天が固化しないためゲランガム培地を調製し、酸性の陸域温泉由来の試料に使用した (表 4-6)。他の中性の培地と同様に、表面に大腸菌生菌体を線状に塗抹した。調製のさいは、ゲルおよび他の成分は別々にオートクレーブ殺菌し、混合後に直ちに平板に分注した。無機塩培地成分は、滅菌前に希硫酸で pH 2.0 に調整した。なお、この培地の滅菌、固化後の pH は 3.0 であった。

表 4-2. S100-20 寒天培地の組成 (pH 7.5)

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
人工海水基礎培地 S100 (SWS)	1000 (mL)
NaCl	20.0
Bacto Agar	15.0

表 4-3. WCX 寒天培地の組成

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0
Bacto Agar	15.0

脱イオン水に上記の成分を添加, 1N KOH で pH 7.2 に調整.

表 4-4. HS 寒天培地の組成

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
NaCl	2.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0
KCl	0.5
微量元素溶液	1.0 ml
Bacto Agar	15.0

脱イオン水に上記の成分を添加, 1N KOH で pH 7.2 に調整.

表 4-5. 1/2S100-20 寒天培地の組成

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
SWS	500 (mL)
脱イオン水	500 (mL)
NaCl	10.0
Bacto Agar	15.0

上記の成分を混合し, 1N NaOH で pH 7.2 に調整.

表 4-6. GG 培地培地の組成 (pH 3.0)

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
KCl	0.1
微量元素溶液	0.1 ml
Phytigel(*)	6.0

(\*) Phytigel (gellan gum, Sigma-Aldrich, USA)

#### 4.2.3 セルロース分解性粘液細菌の分離用培地

陸生セルロース分解性粘液細菌の分離用の ST21 培地 (Reichenbach and Dworkin, 1992) に改変を加えた (表 4-7)。寒天面に濾紙を載せ、中央に少量の試料を置き、セルロース分解性菌株の分離を試みた (第 3 章、§ 3.2.4.2) 参照)。

表 4-7. 改変 ST-21 寒天培地の組成

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
微量元素溶液	0.2 ml
HEPES	2.0
Bacto Agar	15.0

脱イオン水に上記の成分を添加，1N KOH で pH 7.2 に調整。

#### 4.2.4 未純化培養物の保存用培地

粘液細菌の分離用培地の表面に試料を置き、しばらく保温後に粘液細菌様のコロニー (swarm) が出現した場合には、以下の培地上に植えついで、純化および保存を試みた。

##### 1) 海岸温泉由来の未純化培養物の保存培地

S100-20 寒天の表面に大腸菌菌体を線状か円形斑状 (径 2-3 cm) に塗抹した培地を用いた。

##### 2) 陸上温泉由来の未純化培養物の保存培地

酵母菌体寒天 (VY/2 寒天) (表 4-8) や、1/3 CY 寒天 (表 4-9) (Reichenbach and Dworkin, 1992) も使用した。これらの培地の pH は、1N KOH で pH 7.2 に調整した。

表 4-8. VY/2 寒天の組成

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0
酵母湿菌体	5.0
Bacto Agar	15.0

表 4-9. 1/3CY 寒天の組成

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
Bacto Casitone	1.0
Bacto Yeast Extract	0.3
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
Bacto Agar	15.0

#### 4.2.5 温泉由来培養物の生育温度検討用培地

粘液細菌を含むと考えられた温泉由来の培養物について、生育温度範囲や至適温度を検討した。その際には、前出の Ec-WCX (表 4-3、陸生菌用) および Ec-S100-20 寒天培地 (表 4-2) を用いた。

#### 4.2.6 粘液細菌に混在する滑走性細菌用の培地

温泉由来粘液細菌の混在菌は、前出の 1/3CY 寒天培地 (陸生菌用) あるいは 1/3CY-S100-20 寒天培地 (第 3 章、表 3-6) で培養した。

#### 4.2.7 粘液細菌様培養物からの DNA 抽出

温泉由来の粘液細菌様培養物は純化できなかったため、液体培養による菌体調製は行わなかった。それに替え、寒天培地上の粘液細菌様のコロニー (swarm) 内の膜状菌体から粗 DNA を抽出し、そこから 16S rRNA 遺伝子を増幅したアンプリコンを系統解析に供した。まず S100-20 寒天培地や WCX 寒天培地に生育した swarm 内から、菌膜の菌体の部分を、寒天片の混入が可能な限り少なくなるよう注意深く切り出し、DNA 抽出キット (Blood & Cell culture DNA Midi Kit; Qiagen, CA, USA) により DNA 試料を調製した。

#### 4.2.8 16S rRNA 遺伝子の PCR およびクローンライブラリーの構築

PCR には細菌のユニバーサルプライマー、および粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に特異的な PCR プライマーを設計して用いた (表 4-10)。特異的プライマーの設計においては、Ribosomal RNA Database Project II [RDP II] (Cole *et al.*, 2014) からダウンロードした既知粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の多重アライメントデータに基づき、粘液細菌間で相同性が高い領域を探し出した。その結果、大腸菌 16S rRNA のポジション 252-270 および 296-313 に相当する領域の正向きプライマーを設計し (表 4-10)、カスタム合成 (TAKARA Bio、大津) を行なった。これらのプライマーを用い、以下の三段階の手順で nested PCR を行った。最初の PCR には、細菌のユニバーサル・プライマーセットである 27f/1492r を用いた。増幅した PCR 産物は、Microcon-PCR キット (Millipore, MA, USA) で精製した。二段目の PCR では、粘液細菌に特異的な正向きプライマー Myxo1f とユニバーサルプライマー 1492r を使用した。最初の PCR 産物、および精製された二段目の PCR 産物を合わせ、Myxo2f/1492r を用いた三段目の反応の鋳型として使用した。PCR はすべて ExTaq DNA polymerase kit を用い、反応液 50  $\mu$ L 当たり、鋳型 DNA, 1.0  $\mu$ L、各プライマー、0.4 pmol  $\mu$ L<sup>-1</sup> を添加して行なった。反応条件は、一段目と二段目で、94°C-1 分→ 50°C-1 分→ 72°C-1.5 分、の反応を 25 サイクル行い、最後に伸長後反応を 72°C-5.5 分間で行った。三段目の反応は、94°C-1 分→ 68°C-2.5 分→ 72°C-5.5 分とした。反応産物を QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) で精製し、pGEM-T Vector Plasmid

kit (Promega, WI, USA) を用いて、添付マニュアルどおり大腸菌コンピテント細胞に導入し、blue/white selection を行なってクローンライブラリーを構築した。

表 4-10. PCR に用いた 16S rRNA 遺伝子増幅用プライマーの塩基配列

名称	方向	位置*	塩基配列 (5'-3')
27f	forward	8-27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492r	reverse	1492-1510	GGCTACCTTGTTACGACTT
Myxo1f	forward	252-270	GCGKCSATCAGCTAGTT
Myxo2f	forward	296-313	AMGACSGTAGCTGGTCT

\* *Escherichia coli* 16S rRNA 遺伝子上の位置。

#### 4.2.9 RFLP 解析と塩基配列解読

想定された約 1.2 kbp の DNA 断片の挿入の有無は、ユニバーサル・プライマー、21M13f および M13RV を用いた PCR 増幅反応により判定した。増幅された挿入 DNA 断片は、制限酵素 *Sau3AI*, *HaeIII* および *HhaI* (Takara Bio) による制限酵素断片多型性 (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) 解析に供試した。2%アガロースゲル電気泳動パターンから得られる RFLP の結果に基づいて、クローンを操作的分類単位 (OTU) に群別した。塩基配列の決定の際には、ABI Prism BigDye Terminator cycle Sequencing Ready Reaction kit によるシーケンス反応を行い、ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) により解析した。シーケンス反応用プライマーは既報 (Ohkuma *et al.*, 1999) のものを使用した。

#### 4.2.10 分子系統解析

系統樹作成用の 16S rRNA 遺伝子配列情報は、GenBank 塩基配列データベースおよび RDP II から取得し、Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) によりアライメント (alignment) を決め、その信頼度はマニュアルで検証した。配列間の距離行列は、PHYLP ver.3.5c package (Felsenstein, 1989) のプログラム“DNADIST”の中の Kimura の two-parameter model (Kimura, 1980) により計算した。近隣結合法 (neighbor-joining method, NJ) の系統樹は、package 中のプログラム“NEIGHBOR”により距離行列をもとに作成した。プログラム“SEQBOOT”によりブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) による系統樹作成を 100 回繰り返し、それをもとにプログラム“CONSENSE”により妥当性ある系統樹を作成した。また、Clustal W により alignment を決めた上で、MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) により別途 NJ 系統樹、および最尤法 (maximum likelihood method, ML) による系統樹を作成した。温泉由来の粘液細菌に随伴する滑走性細菌の系統解析は、16S rRNA 遺伝子配列の約 500 塩基の部分に関して、株式会社テクノスルガラボ (静岡) に依頼して実施した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 温泉由来粘液細菌の分布

表 4-1 に示した温泉由来試料を、大腸菌生菌体を塗抹した平板培地上に置き、暗所で 50°C にて 2-4 週間保温・培養したところ、表 4-11 に示したように、粘液細菌様の溶菌性コロニー（swarm）が出現した。供試した 141 試料の内、27 試料から細菌溶解性 swarm の出現を確認し、出現率 19%であった。これらの swarm は、塗抹菌体を溶解しながら浅い陥没部を形成した（図 4-1A, C）。

表 4-11. 温泉由来試料からの粘液細菌様培養株の出現状況

採集地点*	試料（出現数/試料数）	集積用培地	粘液細菌様の培養物の名称：由来試料
II	水（1/1）	Ec-WCX	-
III-1	石膏沈殿物（1/4）	Ec-HS	-
III-2	暗緑色バイオマット（2/3）	Ec-WCX	-
IV-2	暗緑色バイオマット（2/2）	Ec-WCX	AT-3：バイオマット
IV-3	落ち葉（2/4）	Ec-WCX	-
IV-4	暗緑色バイオマット（1/2） 泥（1/3）	Ec-WCX	AT-1：バイオマット
V-1	水（1/1）	Ec-1/2S100-20	-
V-3	暗緑色バイオマット（2/3） 泥（2/5）	Ec-WCX	-
V-4	暗緑色バイオマット（1/2） 泥（1/2）	Ec-1/2S100-20	-
V-5	落ち葉（1/3）	Ec-1/2S100-20	-
V-6	落ち葉（1/3）	Ec-WCX	-
VI-1	暗緑色バイオマット（2/2） 水（1/1）	Ec-WCX	YU-2：バイオマット
VI-2	緑色バイオマット（3/3）	Ec-WCX	-
VII	水（1/3）	Ec-WCX	-
IX	海岸温泉の砂（1/3）	Ec-S100-20	SIB-1：海岸の砂

\*採集地点を以下に示す（表 4-1 も参照）。II.那須塩原・温泉浴槽、III-1.熱海・走り湯、III-2.熱海・七湯、IV-2.伊豆熱川・島見湯、IV-3.伊豆熱川・海岸湯溜り、IV-4.伊豆熱川・源泉 II、V-1.伊豆下賀茂温泉・温泉浴槽、V-3.伊豆下賀茂温泉・源泉 II-IV、V-4.伊豆下賀茂温泉・源泉 V、V-5.伊豆下賀茂温泉・源泉 VI、V-6.伊豆下賀茂温泉・温水流出口溝、VI-1.箱根湯本・温泉浴槽、VI-2.箱根強羅・蒸気排出口、VII.武雄温泉（佐賀）・源泉、IX.指宿（鹿児島）・海岸温泉。

表 4-11 に示すように、swarm の出現が最も高頻度だったのはバイオマットで、17 試料中 13 試料から出現した（出現率 76%）。他の試料の swarm 出現率は、泉水試料 13%、泥試料 13%、落葉試料 19%、石膏沈殿物試料 5%、および海岸温泉の砂試料 33%であった。55-60°C では滑走細菌は出現したが、細菌溶解性の粘液細菌様の swarm 形成菌株は認められなかった。

#### 4.3.2 温泉由来粘液細菌の集積と培養性状

温泉由来試料から swarm 形成菌株の分離操作を繰り返し、4 つの集積培養物、AT-1、AT-3、YU-2 および SIB-1 を得た。しかし、この 4 培養物には粘液細菌とは異なる非溶菌性の滑走細菌が混在しており、そのために純化は困難だった。分離用寒天培地（Ec-WCX および Ec-S100-20）において、混在する滑走細菌は粘液細菌より生育が速く、swarm の外側の寒天面に速やかに広がり薄い菌膜を形成した。たとえば、50°C で 5 日間の培養後には、滑走性混在菌の菌膜がシャーレ側壁に達する場合もあった。また分離用培地上で、混在菌の菌膜は無色で肉眼による識別が困難であり、そのために swarm 外縁からの移植操作の繰り返しによる粘液細菌の純化は困難であった。しかし、swarm 外縁部分を寒天小片ごと採取して新しい分離用培地へ移植した際には、寒天片の周囲に再び swarm が形成され、その外側に滑走性混在菌の菌膜状コロニーが形成された（図 4-4B, C）。このような現象は植え継ぎを数回の反復後も見られた。

以上のように、粘液細菌様の swarm 形成性培養物からは、粘液細菌は純化できなかったが、植え継ぎによる寒天培地上での培養による保存は可能だった。混在する滑走性細菌を純化し、生育温度を調べたところ、常温から 60°C 付近まで生育可能だった。これに対し、表 4-14 に示すように、粘液細菌様培養物は常温（28-30°C）での生育は比較的に遅く、また 52°C 以上で生育しないため、生育温度差による両者の分別培養は困難だった。

伊豆・熱川温泉の源泉（泉温 45-50°C）由来の暗緑色バイオマットから得た粘液細菌様の未純化培養物、AT-1 および AT-3 は生育に食塩を要求せず、淡水性もしくは陸生菌の特徴を示した。箱根湯本の露天風呂の温泉湧出口（泉温 45-50°C）付近のコンクリート壁面から採取した、暗緑色バイオマット由来の未純化培養物 YU-2 も淡水性もしくは陸生の性質を示した。一方、鹿児島県、指宿の海岸温泉の砂（泉温 45-50°C）から得た未純化培養物 SIB-1 は、海洋性細菌の性質を示し、人工海水（S100-20）添加培地で生育したが、陸生菌用培地では生育しなかった。これらの培養物について、抗生物質や界面活性剤の添加による粘液細菌の純化手法（Reichenbach and Dworkin, 1992）も試みたが、粘液細菌の純粋培養株は得られなかった。

得られたすべての培養物は溶菌性であり、周囲に拡大する浅く陥没したコロニー、swarm を形成した。陸生の *Chondromyces* 属や海洋性の *Haliangium* 属など一部の粘液細菌にみられる、特徴的な膜状のコロニーは形成しなかった。これらの 4 培養物のうち、

陸生もしくは淡水性の性質を示した AT-1、AT-3 および YU-2 は、Ec-WCX 寒天、VY2 寒天や 1/3CY 寒天上で浅いクレーター状の swarm を形成し、外見上は互いに類似していた。

培養物 AT-3 は、VY2 寒天や 1/3CY 寒天上で、深さ 0.5–1.0 mm の陥没性 swarm を形成した (図 4-1C)。AT-3 を 1/3CY 寒天上で 1 か月間培養した際は、図 4-1C に白い矢印で示したように、円形 swarm の端からさらに半円状あるいは舌状の陥没部が出現した。このような外見上の特徴は、第 3 章で報告した海洋性の *Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> 株とも似ていた。粘液細菌の分類学では、子実体の形態的特徴が分類上重要な指標とされてきたが、温泉由来の培養物に関しては、45–50°C において子実体形成は確認できなかった。AT-3 では、50°C で 1 ヶ月間培養後の 1/3CY 寒天上の swarm 内部 (図 4-1C、点線の四角内) に、比較的大型の桿菌 (幅 0.5–0.8 μm、長さ 1.5–5.0 μm、図 4-2D に矢印で示す) が存在した。AT-3 の swarm の外側の部分 (図 4-1C : 実線の四角内) には、不規則に屈曲した糸状細胞が観察された (図 4-2F に矢印で示す)。

海洋性細菌の性質を示した培養物 SIB-1 は、Ec-S100-20 寒天培地上で浅いクレーター状の swarm を形成した (図 4-1A)。しかし、海洋性粘液細菌用の他の寒天培地である VY2-S100-20 や 1/3CY-S100-20 へ移植した際は、SIB-1 の swarm は形成されず、一方で混在する滑走性細菌は旺盛に生育してきた。培養株 SIB-1 を Ec-S100-20 寒天上で 2 ヶ月間培養すると、swarm 内の寒天ゲル表面に無数の小孔が形成された (図 4-1B)。陸生粘液細菌 *Nannocystis exedens* について、このような小孔の形成が既に報告されている (Reichenbach 1989)。さらに培養物 SIB-1 では、swarm の内側に生じた小孔の下側の寒天質中に、直径 20–50 μm の細胞塊が多数形成され (図 4-2C)、これらの細胞塊中には、直径 0.5–1.0 μm の球形から楕円体形の細胞が確認された。この細胞塊は不完全な子実体もしくは子実体様の構造物で、内部の細胞は粘液胞子の可能性もあるが、詳細は未確認である。*Nannocystis* 属細菌の子実体に観察されたような細胞塊の外側を覆う被膜 (Reichenbach, 2005) は、粘液細菌様培養物 SIB-1 には観察されなかった。SIB-1 の細胞形態について、Ec-S100-20 寒天上の swarm 内 (図 4-1A の点線内側) の細胞を観察した結果、桿菌 (0.5–0.7×2.0–4.0 μm、図 4-2A) および糸状細胞 (0.5–0.7×40–100 μm、図 4-2B) が観察され、糸状細菌は swarm の外側にも生育した (図 4-2B)。

培養物 AT-1 では、1/3CY 寒天上の swarm 内に大型桿菌 (0.8–1.5×3.0–8.0 μm)、より小型の桿菌 (0.5–0.8×2.0–4.0 μm)、および細長い糸状の細菌 (0.1–0.2×3.0–10 μm) が観察された (写真未表示)。

培養物 YU-2 では、1/3CY 寒天上の swarm 内に桿菌 (0.5–0.8 μm×1.0–3.0 μm) が観察された (写真未表示)。培養株 AT-3 および YU-2 とともに、swarm の外側の寒天培地上では、内側に見られた様な桿菌は認められなかった。このように各培養物中の細胞形態は、swarm の内外で異なっていた。これらの培養物中の swarm 内部の桿菌が粘液細菌で、糸

状細菌が混在する滑走性細菌と推定される。

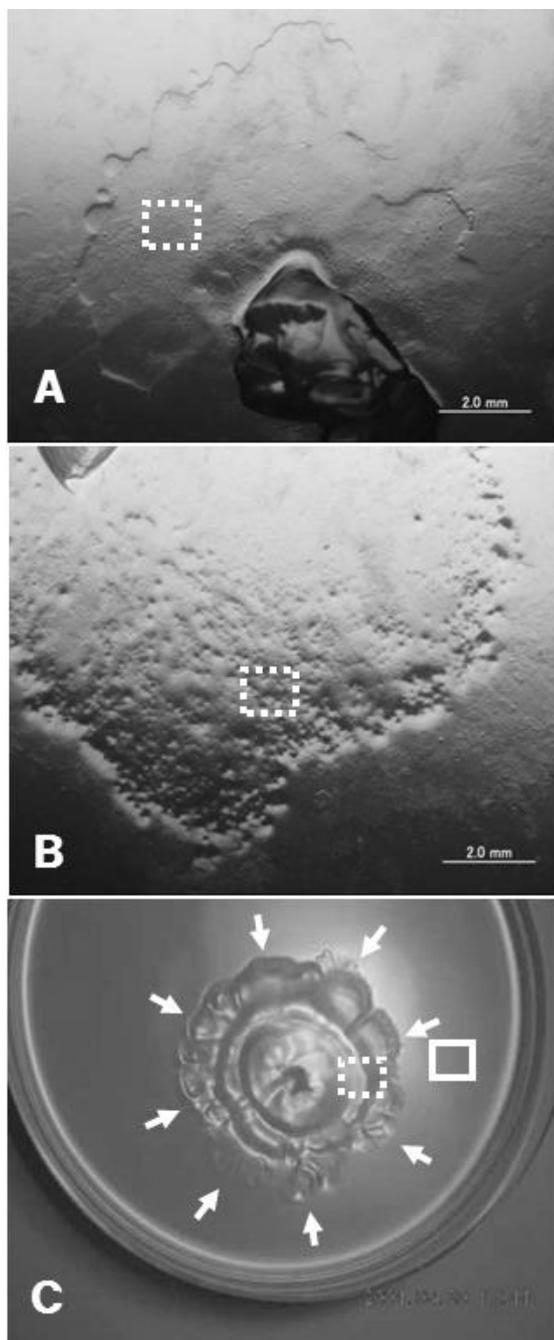


図 4-1. 温泉由来の粘液細菌様培養物の swarm. A, 培養物 SIB-1 (Ec-S100-20 寒天, 50°C, 3 週間生育, bar=2 mm); B, 培養物 SIB-1 (Ec-S100-20 寒天, 50°, 2 ヶ月間生育, bar=2 mm); C, 培養物 AT-3 (1/3CY 寒天, 50°C, 1 ヶ月間生育).

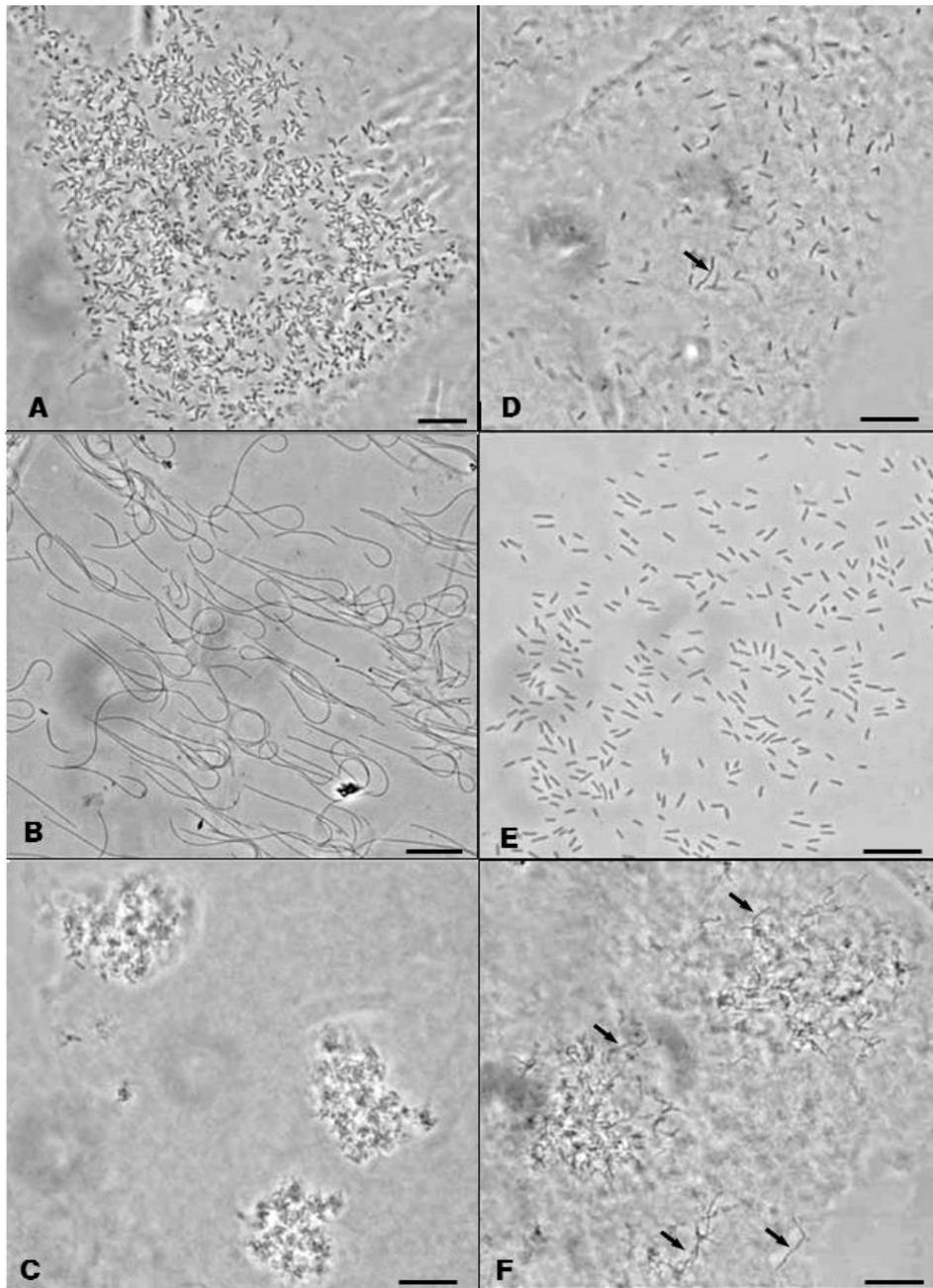


図 4-2.粘液細菌様培養物 SIB-1 (A-C) および AT-3 (D-F) の細胞の位相差顕微鏡像. A, 培養物 SIB-1 の swarm 内側の細胞 (Ec-S100-20 寒天, 50°C, 3 週間生育); B, 同培養物から分離された滑走細菌 *Thermonema rossianum* SIB-1C (§ 4.3.5) の細胞; C, 同培養物の swarm 内の細胞塊 (Ec-S100-20 寒天, 50°C, 2 月間生育); D, 培養物 AT-3 の swarm 内の細胞 (1/3CY 寒天, 50°C, 1 ヶ月間生育); E, 同培養物の Swarm 内の細胞 (1/3CY 寒天, 50°C, 10 日間生育); F, 同培養物の Swarm 外の細胞 (1/3CY 寒天, 50°C, 1 ヶ月間生育). Bar=10  $\mu$  m.

#### 4.3.3 温泉由来粘液細菌様培養物の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析

上記のように温泉環境から、粘液細菌様の 4 つの集積培養物を得たが、いずれも粘液細菌の純粋分離は困難であった。そこで、これらの培養物から 16S rRNA 遺伝子クローンのライブラリーを構築し、クローン解析により系統分類学的位置を評価することにした。培養物 SIB-1、AT-1 および AT-3 について、粘液細菌に特異的なプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅し、アンプリコンのライブラリーを構築した。

各ライブラリーから得たクローンの RFLP 解析の結果から、培養物 SIB-1 は 9 グループ、培養株物 AT-1 は 8 グループ、および培養物 AT-3 は 9 グループに、それぞれ類別が可能であった。各系統群 (OTU) の代表的クローンについて部分塩基配列を決定した結果、2 つのグループは明らかに粘液細菌と異なる配列で、残りの 24 グループは粘液細菌に由来すると推定された。それらの配列を RDPII-Similarity Matrix により比較し、再グルーピングしたところ、SIB-1 は 2 グループ、AT-1 は 3 グループ、および AT-3 は 4 グループの計 9 グループにまとめることが可能であった。各グループの代表的な 1 クローンを選び、その全塩基配列を決定し、RDPII-Chimera Check によりキメラと疑われる配列を除外し、最終的に SIB-1 から 1 クローン (SIBN-17)、AT-1 から 2 クローン (AT1-01、AT1-02)、および AT-3 から 3 クローン (AT3-01、AT3-03、AT3-09) の計 6 クローンを選別し全配列を決定した。これら 6 クローンの BLAST による相同性解析結果を表 4-12 に示す。また、データベースから得られる既知粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子配列とともに作成した NJ 系統樹を図 4-3 に、ML 系統樹を図 4-4 に示す。

温泉由来の粘液細菌様培養物の 6 クローンは、系統的にナノシスティス亜目 (*Nannocystineae*) およびソランギウム亜目 (*Sorangineae*) の両方にまたがって存在した。先に示した、コロニー (swarm) の形態的な特徴も、それらの亜目に属する既知の粘液細菌と類似していた。しかし、NJ 法と ML 法による系統樹上では、系統的位置が異なるクローンが認められた。すなわち、海洋性細菌の性質を示した培養物 SIB-1 由来のクローン SIBN-17 は、*Sandaracinu amylolyticus* (Mohr *et al.*, 2012) を最類縁としてクラスターを形成したが、このクラスターは NJ 法では、ソランギウム亜目に、ML 法では、ナノシスティス亜目に包括された。表 4-12 に示すように、最類縁といえどもクローン SIBN-17 と *Sandaracinu amylolyticus* との相同性はそれほど高くなく (88%)、これらが形成するクラスターも上記の二つの亜目から深い分岐を示しているため、むしろ独立の亜目として分類されるべきかもしれない。淡水性菌株の培養物 AT-1 や AT-3 からは、系統が異なる複数のクローンが検出された。AT-1 の 2 クローンの一つ AT1-01 は、ソランギウム亜目に属し、近年に報告された *Phaselicystis flava* SBKo001 (Garcia *et al.* 2009) を最類縁 (相同値 95%) としてクラスターを形成した。他方の AT1-02 は、陸上温泉由来であるが、海洋性粘液細菌 *Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> との相同性値が 99% であり、系統樹上で、AT1-02 と SHK-1<sup>T</sup> 株は互いに近傍に位置した。培養物 AT-3 の 3 クローン (AT3-

01、AT-03 および AT-09) はそれぞれ異なる系統に位置し、AT3-01 はソランギウム亜目に、AT3-03 と AT3-09 は *N* ナノシスティス亜目に属した。AT3-09 は先の AT1-02 と同様、海洋性の *Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> の近くに位置した。AT3-01 は、近年に粘液細菌の新属新種として報告された *Labilithrix luteola* B00002<sup>T</sup> 株 (Yamamoto *et al.*, 2014) と比較的に近縁 (95% 相同性) であった。AT3-03 は *Kofleria* 属との類縁性が示唆されたが、類似度は 92% と低い値であり、新属新種でしかも新科の粘液細菌に相当すると考えられた。

表 4-12. 粘液細菌様培養物由来の粘液細菌クローンの BLAST 相同性検索結果

クローン名 (DDBJ 登録番号)	最類縁配列 (BLAST 検索)	データベース 登録番号	Similarity (%)
SIBN-17 (AB246769)	<i>Sandaracinus amyloiticus</i> NOSO4T	HQ540311	88
	Myxobacterium AT1-02	AB246767	88
	<i>Enhygromyxa salina</i> SHK-1 <sup>T</sup>	KP306731	88
AT1-01 (AB246771)	<i>Phaselicystis flava</i> SBKo001 <sup>T</sup>	EU545827	95
	<i>Polyangium spumosum</i> PI sm5 <sup>T</sup>	GU207881	95
	<i>Polyangium fumosum</i> PI fu5 <sup>T</sup>	GU207879	95
AT1-02 (AB246767)	<i>Enhygromyxa salina</i> SHK-1 <sup>T</sup>	KP306731	99
	<i>Enhygromyxa salina</i> SMK-1-3	AB097591	99
	<i>Enhygromyxa salina</i> SWB 006	HM769729	99
AT3-01 (AB246772)	<i>Labilithrix luteola</i> B00002 <sup>T</sup>	AB847449	95
	<i>Sorangineae</i> bacterium 706	JF719608	95
	<i>Sorangineae</i> bacterium SBSr006	GU249613	93
AT3-03 (AB246770)	<i>Kofleria flava</i> DSM 14620	HF543825	92
	Delta proteobacterium LWH25	KC854864	91
	<i>Haliangium tepidum</i> SMP-10 <sup>T</sup>	AB062751	
AT3-09 (AB246768)	<i>Enhygromyxa salina</i> SHK-1 <sup>T</sup>	KP306731	99
	<i>Enhygromyxa salina</i> SMK-1-3	AB097591	99
	<i>Enhygromyxa salina</i> SWB 006	HM769729	99

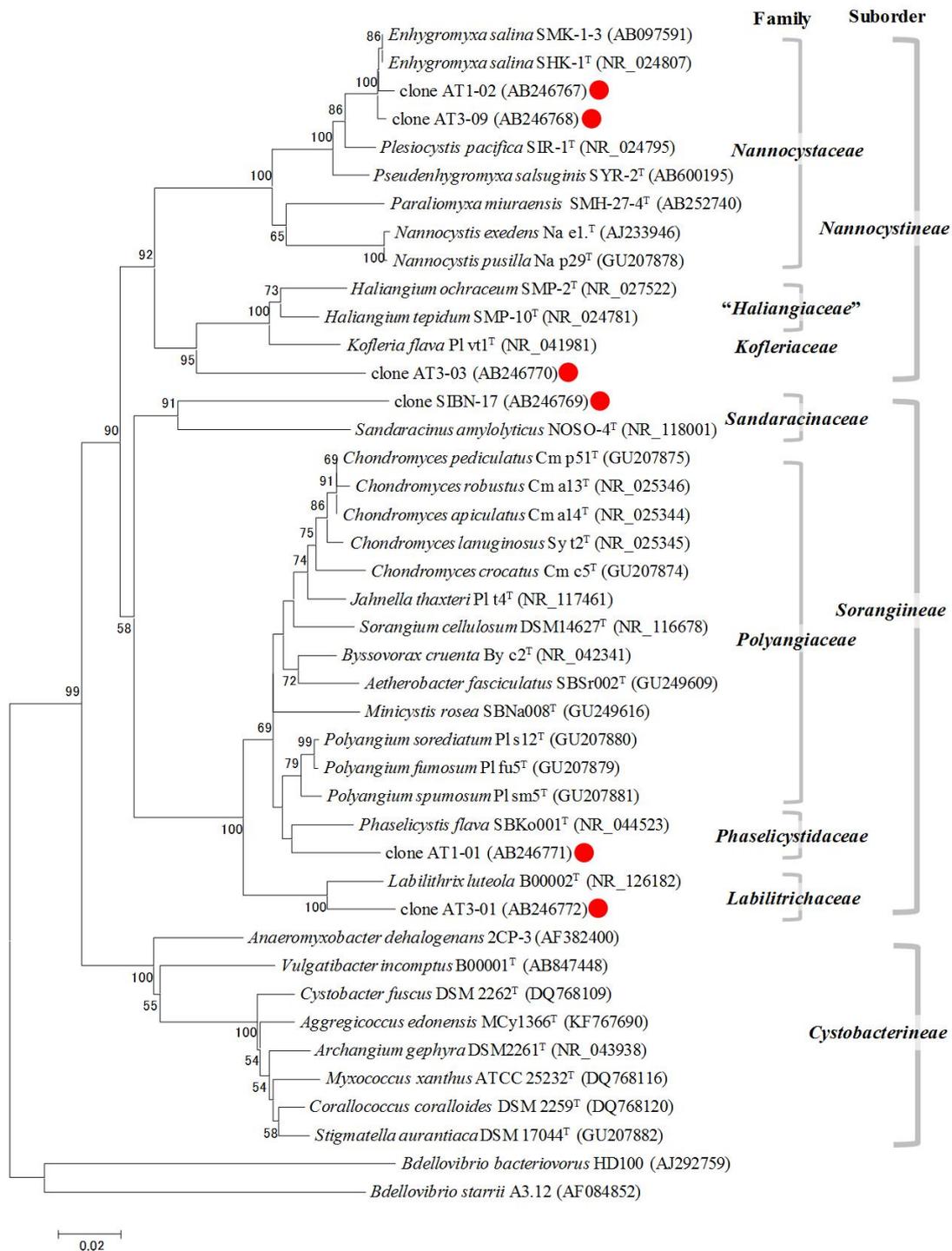


図 4-3. 温泉由来の粘液細菌クローンの近隣結合 (NJ) 系統樹. 温泉由来クローンは赤丸で示す. Reichenbach (2005) の分類体系に従い, 粘液細菌の亜目: *Nannocystineae*, *Sorangiineae* および *Cystobacterineae* を右側に示す. 科の分類は, それぞれの文献に従った (本文中に示す). *Bdellovibrio starrii* A3.12 (AF084852) および *Bdv.bacteriovorus* HD100 (AJ292759) の配列を外群とした. 各分岐点の数値は, 1,000 回抽出による bootstrap 値 ( $\geq 500$  のみを表示). bar = 2% 塩基置換.

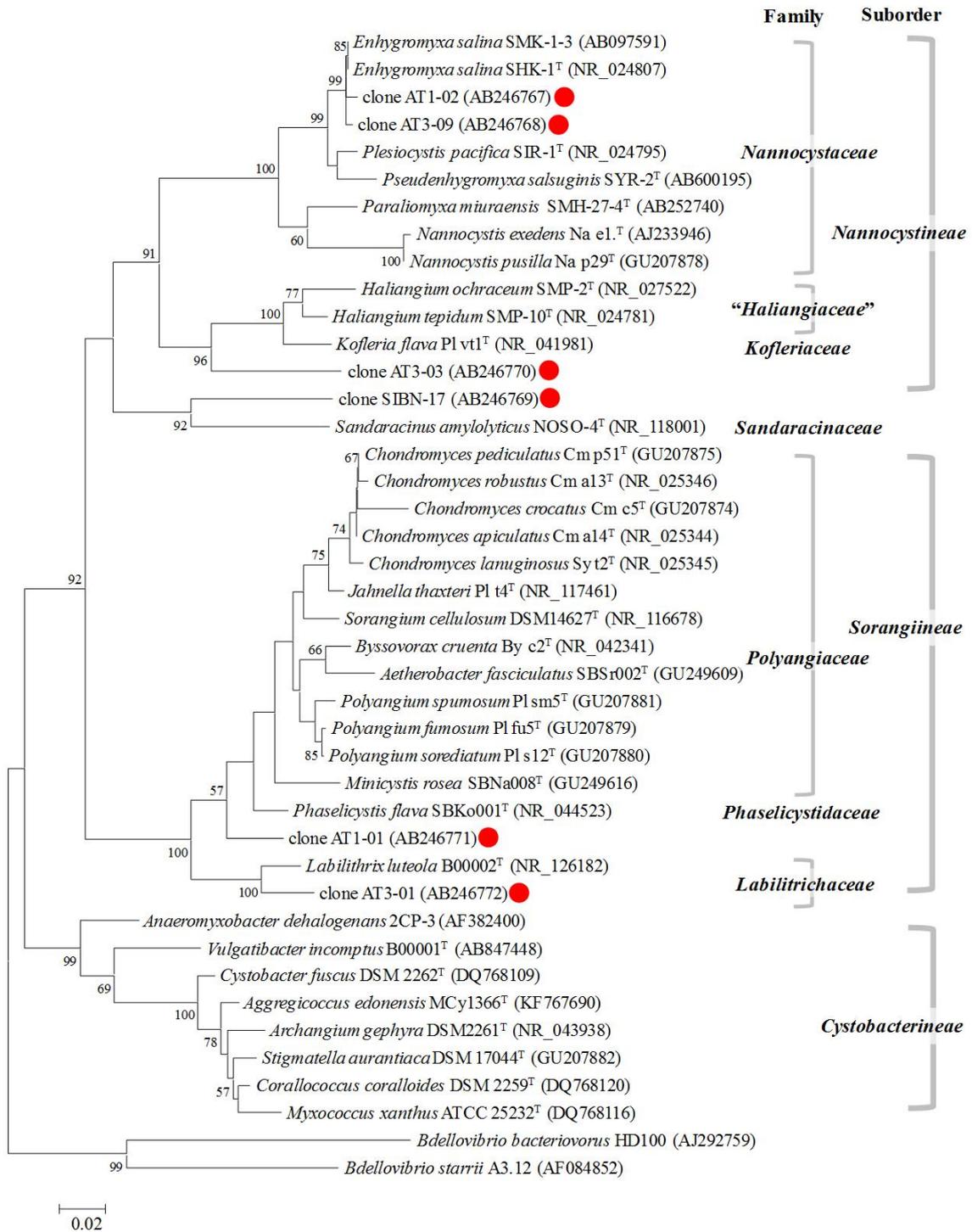


図 4-4. 温泉由来の粘液細菌クローンの最尤法 (ML) 系統樹. 温泉由来クローンは赤丸で示す. 粘液細菌の亜目, 科の分類, 温泉由来培養物の赤丸印, 外群とした菌株の配列, bootstrap 値および下端の bar は, 図 4-3 と同じ.

#### 4.3.4 温泉由来粘液細菌様培養物の生育温度特性

生育温度については、表 4-13 に示すように、温泉由来の粘液細菌様の未純化培養物は、対照株とした粘液細菌よりも高温で生育し、最適生育温度は 45-50°C だった。しかし至適温度域においても、温泉環境に由来した 4 培養物の生育速度は、既知の海洋性や陸生の常温性粘液細菌に比べて遅く、コロニーの拡大速度は、それらと比較し約 1/10-1/2 であった。陸生や海洋性の既知の粘液細菌では、比較的の生育の早い菌株を 28-30°C で培養した際には、swarm の外縁は約 1 週間でシャーレ（直径 9 cm）の側壁に達した。一方、培養物 AT-3 は、至適温度範囲の 45-50°C で 1 ヶ月間の培養後も、Ec-WCX 培地上の swarm の直径は約 1 cm であったが（表 4-14）、それに対し、1/3CY 培地上での生育は比較的早く、swarm の径は 4-5 cm となった。51-52°C 以上の温度でコロニーの拡大速度は低下し、4 培養物とも 52°C 以上で生育しなかった。これらの菌株はいずれも、55°C に 7 日間置いた後に 45-50°C に戻しても生育せず、55°C に置いたことにより死滅したと推定された。他方で、室温（27-30°C）より低温では、温泉由来の 4 培養株の生育は遅くなるかもしくは停止した。

本研究で得た海洋性および汽水性の粘液細菌や、既知の陸生粘液細菌の生育至適温度は、多くの場合は、表 4-13 に示すように、25-30°C 付近の常温だった。しかし、近年には比較的の高温で生育する粘液細菌の菌株も見いだされた。たとえば、土壌由来の粘液細菌 *Myxococcus* sp.GT-7 株は、生育最適温度 42-44°C、最高温度 48°C と報告された（Gerth and Müller, 2005）。温泉由来の粘液細菌様培養物は、GT-7 株より生育温度が高く、最適温度範囲は 45-50°C、最高生育温度は 50°C だった。50°C で生育可能な温泉環境由来の粘液細菌の報告は、本研究の事例が最初である。どの培養物も嫌気条件下では生育しなかった。また、ろ紙分解活性や、VY/2 寒天培地中での酵母菌体の溶菌斑（lytic zone）形成は見られなかった。

なお、温泉由来の粘液細菌様培養物の保存について、swarm 部分の寒天片の 12%（w/v）グリセロール中での -80°C での凍結保存を試みた。グリセロール・ストックを作製し、1 週間の凍結保管後に、融解、寒天培地への再接種を行ったところ、粘液細菌様の swarm の出現は確認できなかった。他方で、混在する滑走細菌は旺盛に生育したため、培養物中の粘液細菌様菌株の凍結保存は困難であった。

表 4-13. 温泉由来の粘液細菌様培養物および対照の粘液細菌の生育温度

粘液細菌の名称 菌種・菌株・クローン	分離源：採集地点	分類学上の位置 suborder (亜目)	生育温度 (°C)	
			範囲	至適
温泉由来の未純化培養クローン				
SIB-1	海岸温泉の砂：指宿	不明	37-51	45-50
AT-3	バイオマット：伊豆熱川	不明	30-50	45-50
本研究における分離株				
<i>Enhygromyxa salina</i> SHK-1 <sup>T</sup>	海岸の泥：サロマ湖	<i>Nannocystineae</i>	5-30	20-30
SHK-4	塩生湿地の泥：春国岱	<i>Nannocystineae</i>	5-27	18-20
SHK-11	海岸の泥：厚岸湖	<i>Nannocystineae</i>	5-28	20-25
<i>Paraliomyxa miuraensis</i> SMH-27-4 <sup>T</sup>	海岸土壌：三浦半島	<i>Nannocystineae</i>	18-40	30-34
SYM-1	海岸の砂：伊豆半島	<i>Nannocystineae</i>	20-45	37-40
SIS-1	マンゴローブ樹皮：石垣島	<i>Nannocystineae</i>	15-37	30-34
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1 <sup>T</sup>	海草：西表島	<i>Nannocystineae</i>	20-37	25-30
SIS-2	海岸の砂：石垣島	<i>Nannocystineae</i>	18-34	28-30
先行研究における分離株				
<i>Haliangium ochraceum</i> SMP-2 <sup>T</sup>	海藻：三浦半島	<i>Nannocystineae</i>	15-40	30-37
<i>Haliangium tepidum</i> SMP-10 <sup>T</sup>	海草：三浦半島	<i>Nannocystineae</i>	25-45	40-45
<i>Sorangium cellulosum</i> IS-1	土壌：横浜市	<i>Sorangiineae</i>	15-40	28-30
<i>Sorangium cellulosum</i> YA-2	土壌：横浜市	<i>Sorangiineae</i>	20-40	37-40
<i>Chondromyces apiculatus</i> HT-1	ヤギの糞：波照間島	<i>Sorangiineae</i>	15-30	25-30
既知菌株				
<i>Sorangium cellulosum</i> ATCC 25532	土壌：ミズーリ州	<i>Sorangiineae</i>	15-40	28-30
<i>Sorangium cellulosum</i> ATCC 25569	土壌：コスタリカ	<i>Sorangiineae</i>	20-44	37-40
<i>Sorangium cellulosum</i> ATCC 29610	土壌	<i>Sorangiineae</i>	15-37	28-30
<i>Nannocystis exedens</i> DSM 71 <sup>T</sup>	砂漠土壌：アリゾナ州	<i>Nannocystineae</i>	20-42	30-40
<i>Nannocystis exedens</i> ATCC 35989	ヤギの糞：イスラエル	<i>Nannocystineae</i>	15-37	25-30
<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM436 <sup>T</sup>	腐朽木：アメリカ	<i>Sorangiineae</i>	15-30	25-30
<i>Myxococcus xanthus</i> ATCC 25232 <sup>T</sup>	土壌	<i>Cystobacterineae</i>	20-37	28-30
<i>Archangium gephyra</i> ATCC 25201 <sup>T</sup>	土壌：カナダ	<i>Cystobacterineae</i>	20-40	20-30
<i>Cystobacter fuscus</i> ATCC 25194 <sup>T</sup>	土壌：カナダ	<i>Cystobacterineae</i>	20-40	28-30
<i>Stigmatella aurantiaca</i> ATCC 25190 <sup>T</sup>	樹皮	<i>Cystobacterineae</i>	15-37	34-37
<i>Myxococcus</i> sp. GT-7(*)	土壌	<i>Cystobacterineae</i>	30-48	42-44

(\*)データは文献 (Gerth and Müller, 2005) に準拠する.

表 4-14. 温泉由来の粘液細菌様培養物の各温度における生育\*

培養物名	各温度 (°C)での swarm の直径 (mm)						
	(°C)	25	30	40	45	50	52
SIB-1	(mm)	0	0	8- 9	10-11	12-13	0
AT-3	(mm)	0	1- 2	4- 5	6- 7	6- 7	0

\*各培養株を1ヶ月間の培養後に swarm の直径を測定した。培養物 SIB-1 は Ec-S100-20 培地、培養物 AT-3 は Ec-WCX 培地でそれぞれ培養した。接種に用いた寒天片の直径(3 mm)は、各 swarm の直径から差し引いた。

#### 4.3.5 粘液細菌様培養株に混在する滑走性細菌の分類学的性質

温泉由来の粘液細菌様の4培養物には、いずれも滑走性細菌が混在していた。これら混在菌について、それぞれの培養物名を冠し、SIB-1C、AT-1C、AT-3C、および YU-2C と名付けた。これらの混在菌はすべて、粘液細菌様培養物の生育温度上限の50°Cよりも、さらに高温域の55-60°Cまで生育可能だった。

16S rRNA 遺伝子配列による分子系統学的解析の結果、海岸温泉由来の混在菌 SIB-1C は、高温性の滑走細菌 *Thermonema rossianum* (Tenreiro *et al.*, 1997) に対し99.9%の相同性を示した。また、栄養細胞の形態や、海洋性細菌としての生理的性質、および生育温度範囲なども、*T.rossianum* の分類学的記載とよく一致した。陸上温泉由来の混在菌、AT-1C、AT-3C および YU-2C は3株ともに、16S rRNA 遺伝子配列の系統解析から、*Caldimonas manganoxidans* JCM 10698<sup>T</sup> (Takeda *et al.*, 2002) に対し99.9%の相同性が示された。これら3株は、大腸菌の生菌体およびオートクレーブ処理菌体とともに溶解せず、また寒天面に薄膜状に広がって生育したが、浅く陥没した粘液細菌様の拡散性コロニー (swarm) は形成しなかった。培養物 AT-3 を寒天培地で培養の際に、swarm の外側の寒天上に観察された糸状の細菌 (図 4-2F) は、細胞の形態的特徴からは、*C. manganoxidans* (桿菌) とは異なる細菌と考えられる。なお、*Caldimonas manganoxidans* は温泉由来のマンガニ酸化細菌で (Takeda *et al.*, 1998; 2002)、生分解性プラスチック原料であるポリ(3-ヒドロキシ酪酸) (poly[3-hydroxybutyrate]) の分解活性を示し、温泉環境由来の藍藻バイオマットから分離された。

#### 4.4 考察

温泉環境からの微生物の探索は、長年にわたって行われてきたが、粘液細菌の分離例はこれまでなかった。また温泉バイオマットの非培養的菌叢解析についても、粘液細菌の存在が示唆された例はわずかである (Moyer *et al.*, 1995)。表 4-11 に示すように、粘液細菌様の swarm 形成細菌を含む培養物は、日本各地の陸上および海岸温泉の試料から出現した。表 4-12 に示すように、これらの中で少なくとも、熱川、指宿の試料由来の培養物については、粘液細菌を含むことが示された。このように、本研究では純粋分離には至らなかったものの、温泉環境における粘液細菌の分布を世界で初めて明らかにした。

従来は、温泉中の粘液細菌の存在が見落とされてきたと思われ、その原因は以下の二つと推測される。一つは、温泉環境には粘液細菌が広く分布するが、粘液細菌は陸棲の常温菌という従来の常識があり、そのため元々探索の範囲外に置かれていたことが考えられる。二つめは、粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅・検出に際し、粘液細菌を特異的に検出するためのプライマーを用いる必要があると考えられるが、従来の研究例では、細菌を網羅的に検出するプライマーがもっぱら用いられ、菌数が少ない粘液細菌の検出には至らなかったことが挙げられる。今回、温泉から確実に粘液細菌を検出するために、まず寒天培地上で大腸菌菌体を餌として、あらかじめ高温で集積培養を行ない、粘液細菌の菌数を増加させた。つぎに、特異的プライマーを用いた PCR 反応により、集積培養した粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子断片を増幅した。これらの操作によって、温泉環境に生息する粘液細菌が検出可能になったと考えられる。しかしながら、集積培養は場合によっては、1 か月間の培養時間を要するため、効率的な方法ではない。また、PCR は未分離の粘液細菌が対象であるため、3 段階の PCR 増幅のうち、後半の 2 段階には特異的なプライマーを設計して用いた。そのため、通常の菌叢解析と比較し、多くの時間と労力を要する手法となっているが、粘液細菌のように増殖が遅く、純化困難な菌の場合には、このようなアプローチに一定の有効性はあると考える。

粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いる方法は土壌試料にも適用され、その有効性が確認されている (Wu *et al.*, 2005)。Wu らは集積培養を行わず、中国・山東省済南市の市街地の土壌から抽出した DNA 試料について、粘液細菌 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅した。とくにシストバクター亜目の粘液細菌に関し、詳細な系統解析を実施した。その結果、市街地の一般的な土壌試料からも、複数系統の新属相当の粘液細菌に由来すると考えられる 16S rRNA 遺伝子配列が検出された。同様なアプローチを温泉環境の試料に適用した場合に、同様の結果が得られるかは興味深い点である。

今回示したように温泉試料ごとの、swarm 形成細菌の出現頻度については、バイオマット試料からの出現頻度が比較的高かった。この理由を、次のように推察する。マット

中の微小環境は、光合成細菌もしくは藻類の群体や多糖などに覆われているため、栄養源枯渇や乾燥、あるいは原生動物による捕食等から保護された独特の生態系が保持されている。温泉中の一次生産者の光合成微生物（Hanada, 2003）、それらが生産する多糖や有機酸を利用する細菌群、さらにそれらを捕食する粘液細菌等の捕食性微生物、という三者がバイオマット中に共存すると考えられる。粘液細菌はマット中の捕食者の一員として、微生物群集構造を維持する上で一定の役割を果たしていると思われる。粘液細菌は多くの場合、溶菌酵素や多糖分解酵素により、生体高分子基質を分解し栄養源としている。マット環境はそのような粘液細菌にとり、微生物由来の高分子や菌体が容易に得られる好適な生息場所と考えられる。本研究の結果から、藍色細菌や緑色光合成細菌（あるいは真核藻類）、マンガン酸化細菌、粘液細菌、およびその他の滑走性細菌、などのような多種類の微生物から構成されるバイオマットが、日本の温泉環境中に広く分布していると推定される。このように多様な微生物の共生あるいは共存によって、藍色細菌などの菌体から成るマット状構造が形成・維持され、その中の菌叢が安定に保持されていると考えられる。

温泉由来の粘液細菌については、前述のように、他の滑走性細菌の混在のために純化できず、個々の菌株の生理的性質や、これらの微生物間の共生などの関係性については、本研究では解明できていない。しかし、粘液細菌は高分子基質分解性の溶菌性細菌なので、他の滑走細菌が生産する多糖やタンパク質、さらには、細胞自体などを基質として利用していると推定される。温泉からの培養株の場合は、混在する滑走細菌が、swarm中で生存していることが確認されたので、両者間の関係は単純な「捕食と被捕食」の図式では説明できず、むしろ一種の共生の状態が成立している可能性もある。たとえば、粘液細菌と他の細菌との間の共生的関係について、土壌由来の粘液細菌 *Chondromyces crocatus* に混在していた、*Sphingobacterium* に類似した滑走性細菌の報告がある。この場合は、それぞれ一方の菌株が単独で生育できず、両者を混合培養した場合に生育が確認された。この結果から、2株の細菌は互いに依存しあう共生状態と推定された（Jacobi *et al.*, 1997）。

温泉からの粘液細菌様培養株の場合は、少なくとも混在する滑走細菌（SIB-1C、AT-1C、AT-3 および YU-2C）は純粋培養が可能だった。したがって、温泉由来の粘液細菌と随伴細菌の間には真の共生関係はないが、粘液細菌にとっては随伴細菌の存在が生育に必要と考えられる。図 4-4 に示すように、温泉由来の粘液細菌を植え継いだ際には、混在する滑走性細菌の方が先行して、移植片の周囲の寒天面を薄膜状に拡がりながら生育した（A）。その後しばらく（2-3日以上）時間が経過後、粘液細菌様のswarmが、先に薄膜状に生育した菌膜を溶解しながら生育する様子が観察された（B-C）。この際には、混在する滑走性細菌がすべて溶解・捕食されたのではなく、粘液細菌のswarm中に一部が生残したと考えられる。このような関係が成立する過程で、粘液細菌由来の二次

代謝産物が一種の信号物質として、滑走性細菌の生育の制御に関与したかもしれない。温泉由来の粘液細菌様培養株については、抗菌活性は検出されなかったが微量の二次代謝物を生産している可能性もあり、この点は今後の検討を要する。二次代謝産物は土壌環境中と同様に温泉環境においても、原生動物などの捕食圧から粘液細菌を防衛する役割をも演じているかもしれない。マットを構成する藍色細菌や真核藻類なども二次代謝産物を生産している可能性があるが (Welker and von Döhren, 2006)、温泉由来の藍藻が生産する二次代謝産物について報告は無く、この点の解明に向けた今後の研究が待たれる。

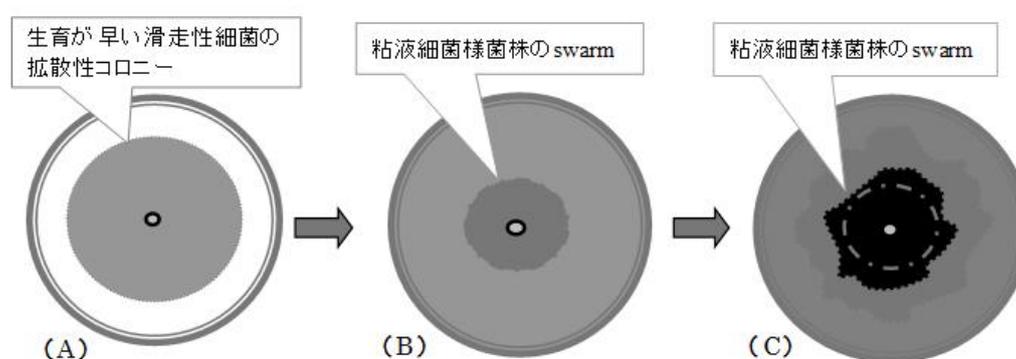


図 4-4. 温泉由来の粘液細菌様培養株の swarm 形成の模式図

温泉由来の粘液細菌様の培養物、SIB-1、AT-1、AT-3 および YU-2 について、溶菌性コロニー (swarm) の内側にのみ観察された桿菌は、分子系統学的解析の結果から、粘液細菌と推定された。これらの桿菌は、生育温度の特徴という点では、表 4-14 に示したように、微 (あるいは中等度) 高温性菌 (moderately thermophilic bacteria) の性質を示し、45-50°C の比較的狭い温度範囲にある温泉環境に特異的に適応した粘液細菌群と考えられる。本研究では、55°C 以上の高温で生育する粘液細菌の存在は確認できなかったが、この点は今後も検討すべき課題と考える。生育温度以外の他の生理的性質については、温泉由来の粘液細菌様培養物は未純化のため、正確な記載は困難だが、他の粘液細菌と同様に細菌溶解性の化学従属栄養細菌と考えられる。

本研究で得た粘液細菌様の培養物に含まれる粘液細菌のクローンは、分類学上は、ナノシステイス亜目およびソランギウム亜目に帰属することが示され、シストバクター亜目に属するクローンは検出されなかった。しかし前述のように、この亜目に属する陸生粘液細菌として、48°C で生育する分離株 *Myxococcus* sp. GT-7 も報告されている (Gerth and Müller, 2005)。したがって、本研究では見出せなかったが、温泉環境においても、ミクソコックス科 (*Myxococcaceae*) の粘液細菌が生息する可能性があると考えられる。

海岸由来の培養物 SIB-1 に由来する粘液細菌のクローンである SIBN-17 については、既知の粘液細菌の配列との相同性が低く、粘液細菌目内における系統的帰属が困難であった。すなわち、表 4-12 に示した BLAST 相同性検索によって、SIBN-17 に対し最近縁としてヒットした *Sandaracinus amylolyticus* NOSO4 株および *Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> 株との相同性値はいずれも 88% と比較的に低い値であった。近年に、陸生粘液細菌の新科として提唱された、パセリキュステイス科 (*Phaselicystidaceae*) およびサンダラキヌス科 (*Sandaracinaceae*) について、各科の新属・新種の基準菌株、*Phaselicystis flava* および *Sandaracinus amylolyticus* の既知粘液細菌との相同性値は、94% と 89% だった (Garcia *et al.* 2009; Mohr *et al.* 2012)。クローン SIBN-17 の場合は、これらの例と比較し、最近縁の粘液細菌との相同性値が 88% とさらに低い値だったので、科以上のレベルでの新規な高次分類群に帰属させるのが妥当と考えられた。なお、*Phaselicystis flava* については、系統樹上の位置という点で、ソランギウム亜目のグループの菌株間に占める場所が不安定であった (図 4-3, 図 4-4)。そのため、この菌に関して新科を設けたことの妥当性については、議論の余地があると思われる。

近年、Garcia *et al.* (2010) は、粘液細菌の新属相当の分類群を既知の粘液細菌から隔てる相同性値の境界値として、94-95% を一つの目安としている。この基準に照らせば、陸上温泉由来の粘液細菌様培養物について、培養物 AT-1 に由来する 2 クローンの一つ、AT1-01 は、最近縁の陸生粘液細菌 *Phaselicystis flava* SBKo001 との相同性値は 95% であり、ソランギウム亜目の中の属レベルで新規な粘液細菌と考えられる。他方のクローン AT1-02 は、培養物 AT-3 に由来する 3 クローンの一つ、AT3-09 とともに、前述の結果 (相同性値 99%) から、第 2 章で報告した海洋性粘液細菌 *Enhygromyxa salina* と種レベルで近縁な粘液細菌であることが示唆される。また、これらの知見から、*Enhygromyxa* 属粘液細菌は塩水環境に限らず、淡水性の温泉も含む広範な水圏環境に適応し、NaCl 要求性については、多様な生理的性質を有していると推定される。培養物 AT-3 に由来する 3 クローンの他の二つ、AT3-01 および AT3-03 についても、近年の粘液細菌の新科提唱の記載 (Yamamoto *et al.*, 2014; Mohr *et al.*, 2012) を参照すれば、ともに新科に分類するのが妥当と考えられる。クローン AT3-01 は、表 4-12 や図 4-3 および図 4-4 に示したように、新属新種の粘液細菌 *Labilithrix luteola* B00002<sup>T</sup> 株と比較的に近縁で相同性値は 95% であることから、先ほどの基準に従えば、*Labilithrix* に関して提唱された新科であるラビトリクス科 (*Labilitrichaceae*) (Yamamoto *et al.*, 2014) に含まれる新属相当の粘液細菌と考えられる。これに対し、クローン AT3-03 に関しては、コフレリア科やハリアンギウム科に近縁な新科を設けるのが妥当と考えられる。

ここ数十年の間に、温泉環境中の菌叢解析の結果から、温泉環境中には多様な微生物が生息し、新門に相当する分類群も多数存在することが示唆されている (Hugenholtz *et al.*, 1998)。温泉環境の捕食性微生物についても多様な系統の微生物が報告され、好熱性

ファージ (Breitbart *et al.*, 2004; Chiura, 2002) や高温性アメーバ (Baumgartner *et al.*, 2003) も発見された。好熱性ファージは、温泉環境中の微生物進化において、属種を越えた遺伝子運搬体として、遺伝子水平伝播に関与する可能性が指摘されている (Chiura and Umitsu 2004)。これまで未分離ながら、*Bdellovibrio* 属に近縁の好熱性捕食性細菌の存在も示唆されている (Davidov and Jurkevitch, 2004)。

以上の一連の研究を通して、多様な温泉環境において、各環境に特異的に適応した性質を有すると考えられる新規な粘液細菌の存在が明らかになった。本研究では分離操作を反復後にも純化には至らなかったことを考えて、今後は、新たな純化手法として、一細胞を選択して釣菌する方法、例えば「光ピンセット法」(生田, 2005) などの新技法も試みる必要があると考えられる。加えて、温泉由来あるいは高温性粘液細菌の新規物質探索資源としての産業上の有用性を見出すことが今後の重要な課題である。高温菌の産業への応用例としては、*Thermus* 属や *Bacillus* 属細菌が耐熱性酵素の探索源として長年にわたり研究されてきており、高温性の粘液細菌も新規な耐熱性酵素の探索源として有望と思われる。

また、生育温度に関しては、温泉の菌とは対照的な性質として低温での生育に着目すると、好冷性の粘液細菌様菌株に関する記載があるが (Dawid, 2000)、この菌株は分離には至っておらず、正確な分類的位置は不明である。他方で、表 4-13 に示したように、著者らの予備的な検討結果からも、海洋性の粘液細菌のなかには、かなり低温 (0-5°C) で生育可能で、至適生育温度が 20°C 以下の菌株として、ナノシスティス科に属する菌株 SHK-4 株が得られた。今後は好冷性の粘液細菌の多様性や生態学的研究を目指した探索も視野に入れたいと考えている。

## 第 5 章 新規抗菌物質ミウラエナミドの単離と特性評価

### 5.1 はじめに

海洋性粘液細菌は、 $\text{Na}^+$  などの海水中のカチオンを生育に要求する粘液細菌であり、今回の探索によって北海道から南西諸島まで日本沿岸に広く分布することがわかった（第 3 章）。また、海洋性粘液細菌の分離株の大部分は、分子系統からはナノシスティス科 (*Nannocystaceae*) に帰属したが、既知の粘液細菌とは属レベルで異なる分類群とするのが妥当と考えられ、OTU-1 および OTU-2 に対する新属・新種としてそれぞれ *Plesiocystis pacifica*、*Enhygromyxa salina* を提唱した。一方、河口域などの汽水環境からも、 $\text{NaCl}$  添加により生育が促進されるが生育至適  $\text{NaCl}$  濃度が低い (0.5–1.0% [w/v]) 粘液細菌が分離され、海水より低塩分の水圏である汽水域に特異的に適応していると考えられる汽水性粘液細菌の存在が確実となった（第 3 章）。汽水性細菌は、“obligate halophilic brackish water bacterium”の呼称もあり (Rheinheimer, 1992)、 $\text{NaCl}$  存在下でのみ生育するか  $\text{NaCl}$  により生育促進され、その至適  $\text{NaCl}$  濃度が海水よりも低い 0.5–1.5% (w/v) の付近にある、という性質で特徴づけられる。今回の汽水性粘液細菌の分離株の中にも新規な分類群が存在し、OTU-3 および OTU-4 の分離株に対して、それぞれ新属・新種名 *Pseudenhygromyxa salsuginis*、*Paraliomyxa miuraensis* を提唱した。

第 2 章で述べたように、陸生粘液細菌、とりわけセルロース分解性の *Sorangium* 属細菌からは新規二次代謝産物が多数見いだされ、その一つ epothilone の誘導体 ixabepilone は抗がん剤として商品化された。また、先行研究では海洋性粘液細菌である *Haliangium ochraceum* SMP-2<sup>T</sup> 株、SMH-02-3 株（第 3 章で提唱した *Enhydromyxa* 属に相当[種は未同定]）、および未同定の STM-1 株から抗菌活性が見いだされた（不藤, 2002）。このうち、*Enhydromyxa* sp. SMH-02-3 株が生産する nannochelin は、陸生粘液細菌 *Nannocystis exedens* から見いだされた既知物質であった。また、STM-1 株が生産する抗菌物質については、生産量が微量のため同定できなかった。*H. ochraceum* SMP-2<sup>T</sup> 株が生産する抗真菌物質は、精製および同定に成功し、haliangicin と命名されている (Fudou *et al.*, 2001)。

本研究で得られた海洋性・汽水性粘液細菌についても、陸生粘液細菌に由来の物質とは異なる構造の新規化合物の発見が期待された。本研究では、新たに分離した 24 株および先行研究の分離株 25 株に対して、新規物質の発見のために新しいアッセイ系を適用し、新規二次代謝産物のスクリーニングを試みた。その結果、*Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株において比較的強い抗菌活性の再現性が確認され、物質の精製および構造決定に至った。本章ではこの新規物質をミウラエナミド (miuraenamides) と命名し、スクリーニング、精製、構造決定、抗菌活性確認に至る結果を記述する。

## 5.2 実験材料および方法

### 5.2.1 供試菌株

第 3 章、表 3-16「海洋性粘液細菌の分離源および分離培地」に示した海洋性および汽水性の粘液細菌の全菌株について、以下の方法で培養試料を調製し抗菌試験に供した。

### 5.2.2 抗菌物質探索用の培地および培養法

#### 1) 前培養培地

VY/2-SWS 寒天培地（第 3 章、表 3-5）を用い、海洋性粘液細菌の場合は VY/2-S75-15 もしくは-S100-20、汽水性粘液細菌の場合は VY/2-S20-10 の組成にそれぞれ調製した。ただし、これらの前培養の場合は培地に HEPES は添加しなかった。

#### 2) 海洋性粘液細菌の抗菌物質の探索・生産用培地

前培養培地と同様の酵母菌体を主成分とし、人工海水基礎培地溶液（SWS）と NaCl を含む液体培地を用いた。発酵生産物の回収のため、吸着樹脂セパビーズ SP207（三菱化学）、20 g（湿重）L<sup>-1</sup>を添加した。

表 5-1. 抗菌物質探索用 VY/2-S100-20 培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
人工海水基礎培地 S100	1000 (mL)
NaCl	20.0
Bacto Yeast Extract	0.1
HEPES	2.0
酵母湿菌体	8.0
吸着樹脂セパビーズ SP207 (三菱化学)* <sup>1</sup>	20.0

\*<sup>1</sup>セパビーズは使用前に新品を約 2 倍容のアセトンで 2 回洗浄し、さらに脱イオン水で 2 回洗浄し、ヌッチェを用いて水分を吸引除去し、乾燥を防ぐため密閉容器に入れて冷蔵庫に保管した。培地の pH は、1 N NaOH で 7.3 に調整した。人工海水基礎培地 S100 の組成は第 3 章、表 3-2 に示す。

#### 3) 汽水性粘液細菌の抗菌物質の探索・生産用培地

海洋性粘液細菌の場合と同様に、酵母菌体を主成分とした培地に、発酵生産物の回収のため、吸着樹脂セパビーズ SP207（三菱化学）、20 g（湿重）L<sup>-1</sup>を添加した。希釈した人工海水基礎培地溶液（SWS）と NaCl 10 g L<sup>-1</sup>を含む液体培地を用いた。

表 5-2. 抗菌物質探索用 VY/2-S20-10 培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
人工海水基礎培地 S100	200 (mL)
脱イオン水	800 (mL)
NaCl	10.0
Bacto Yeast Extract	0.1
HEPES	2.0
酵母湿菌体	8.0
吸着樹脂セパピーズ SP207 (三菱化学)	20.0

#### 4) 汽水性粘液細菌用のミウラエナミド生産培地

抗菌活性が見いだされた汽水性粘液細菌 *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株について、酵母菌体を主成分とし、低濃度の人工海水基礎培地溶液 (SWS) と NaCl および NaBr を含む以下の組成の VY/2-S20-1-Br 液体培地を用い、抗生物質の生産量の増量を試みた。発酵生産物の回収のために、この場合も吸着用樹脂を添加した。培地の pH は、1N NaOH で 7.3 に調整した。

表 5-3. 抗生物質生産用 VY/2-S20-1-Br 培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
人工海水基礎培地 S100	200 (mL)
脱イオン水	800 (mL)
NaCl	1.0
NaBr	7.0
Bacto Yeast Extract	0.1
HEPES	2.0
酵母湿菌体	8.0
吸着樹脂セパピーズ SP207 (三菱化学)	20.0

### 5.2.3 抗菌物質の探索および生産のための培養条件

#### 1) 前培養

VY/2-SWS 寒天培地の中央に凍結グリセロールストック保存菌を接種し、コロニー (swarm) の径が 5-7 cm に達するまで 2-3 週間にわたり 28°C で培養した。

#### 2) 本培養

探索の際には、各液体培地を 500 mL 容 Erlenmeyer フラスコに 100 mL 分注した。寒天平板培地上のコロニー周縁部の寒天ゲルを、菌体と共に径 5.0 mm の滅菌ストローで切り出して得られた円柱状の小片 10 個分の菌体を、フラスコ 1 本分の液体培地に接種した。試料の大量調製の際は、各液体培地を 2 L 容 Erlenmeyer フラスコに 500-1000 mL 分注した。平板培地 3 枚分のコロニー周縁部の寒天片を、菌体と共に滅菌スパテルで採取し、

滅菌した 250 mL 容金属製カップに移送した。滅菌した人工海水もしくは希釈人工海水を 50 mL 添加し、電動ホモジナイザー (Excel Auto Homogenizer, Nissei) で、6,000-10,000 rpm の回転数において、寒天片を無菌的に破碎してスラリーとし、フラスコ中の液体培地に接種した。28°C で 15-18 日間の旋回振とう培養 (180 rpm) を行った。

#### 5.2.4 *Phytophthora capsici* を用いた抗菌試験法

##### 1) 試料調製法

培養液から遠心分離 (2,100×g, 15 分) により、菌体と吸着樹脂を含む不溶性画分を回収した。培養液 100 mL の場合、アセトン 20 mL を回収物に加え、室温にて抽出を 2 回行い、全抽出液をロータリー・エバポレーターで減圧濃縮し、水性懸濁液 0.5-1.0 mL を得た。懸濁液をディスポーザブル・ガラス試験管に移し、遠心真空濃縮器 Savant Speed Vac SC210A (Thermo Fischer Scientific) で乾固した。乾固物を 100 μL のアセトンに溶解し、20 μL をペーパーディスク (直径 8 mm, 厚型, アドバンテック株製) に浸み込ませ、ドラフト中でアセトンを蒸発させ、以下の抗菌試験に供した。

##### 2) 抗菌活性測定法

小鹿らの方法により測定した (Ojika *et al.*, 1998; 鈴木, 2002)。被検菌 *Phytophthora capsici* は卵菌類に属する糸状菌でトウガラシ萎凋病などの原因となる植物病原菌である。この菌を表 5-4 に示した合成培地寒天培地 (Ojika *et al.*, 1998) にて 25°C で前培養し、コロニーの成長端 (すなわち外周部) から径 3 mm の寒天片を滅菌ストローで採取し、あらたに同培地上に接種し (図 5-1A)、25°C で 2 日間の培養を行った。コロニー直径が 3-4 cm に達したら、図 5-11 のように 4-6 個のペーパーディスクを被検菌のコロニー成長端から 1 cm 離れた位置に置いた。図 5-1B では簡略化し、ディスクの数を 2 個とした。さらに 1 日の培養後、ディスクとコロニー成長端の距離を測定し、対照の培地コントロール (菌を無接種の培地からの抽出物) と比較した (C)。

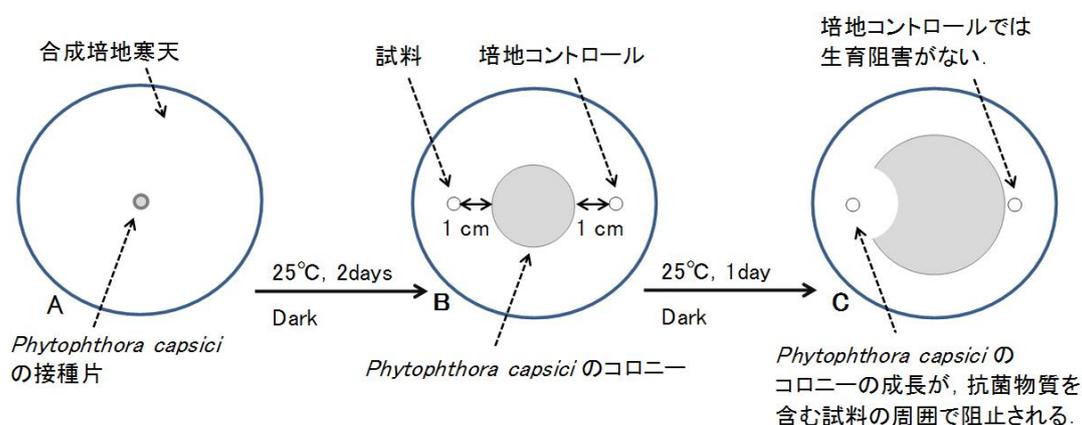


図 5-1. *Phytophthora capsici* を被検菌とした抗菌活性測定法. 鈴木 (2002) からの改変図.

表 5-4. *Phytophthora capsici* 用の合成培地

成分	添加量 (g L <sup>-1</sup> )
Sucrose	10.0
Monosodium glutamate monohydrate	1.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25
CaCl <sub>2</sub>	0.1
Agar	10.0
Thiamine HCl	1.0 (mg)
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0.088 (mg)
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.393 (mg)
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.91 (mg)
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.072 (mg)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05 (mg)
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.403 (mg)
EDTA·2Na	5.0 (mg)

脱イオン水 1L に上記の成分を添加して調製した。

#### 5.2.5 発酵産物・MA-A(1) および MA-B(2) の精製方法の概要

精製過程の概要を図 5-2 に示す。培養液から、遠心分離 (2,100×g, 15 分) により、菌体と吸着樹脂を含む不溶性画分を回収した。培養液の 5.0% 容積のアセトン回収物に加え、室温にて抽出を 2 回行ない、全抽出液をロータリー・エバポレーターで減圧濃縮し水性懸濁液を得た。この液からの酢酸エチル抽出を 50 mL にて 3 回行ない、全液を合わせて濃縮した残分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。シリカゲルは Wakogel C-300 (オープンカラム、40 g、和光純薬) を使用し、混合比が 5 : 5、4 : 6、3 : 7 および 2 : 8 のヘキサン-酢酸エチル混合液により溶離した。混合比 4 : 6 の一部、3 : 7 のすべて、および 2 : 8 の一部による溶離画分 (画分 4) を合わせ減圧濃縮した乾固物を、逆相液体クロマトグラフィーで分画した。カラムは Develosil ODS UG-5 (直径 10 mm×長さ 250 mm、ノムラケミカル、愛知) を用い、70%メタノールを流速 4 mL min<sup>-1</sup> で送液し、目的物質の溶出を波長 290 nm の紫外吸収により検出した。得られた 4 画分のうち、2 番目の画分 (画分 4-2) の乾固物を、同一条件の逆相液体クロマトグラフィーで再度分画した。得られた 8 画分のうち、6 番目の画分の乾固物 2.6 mg を MA-A (1)、7 番目の画分の乾固物 0.5 mg を MA-B (2) と名付け (図 5-3 参照)、特性評価を行なった。

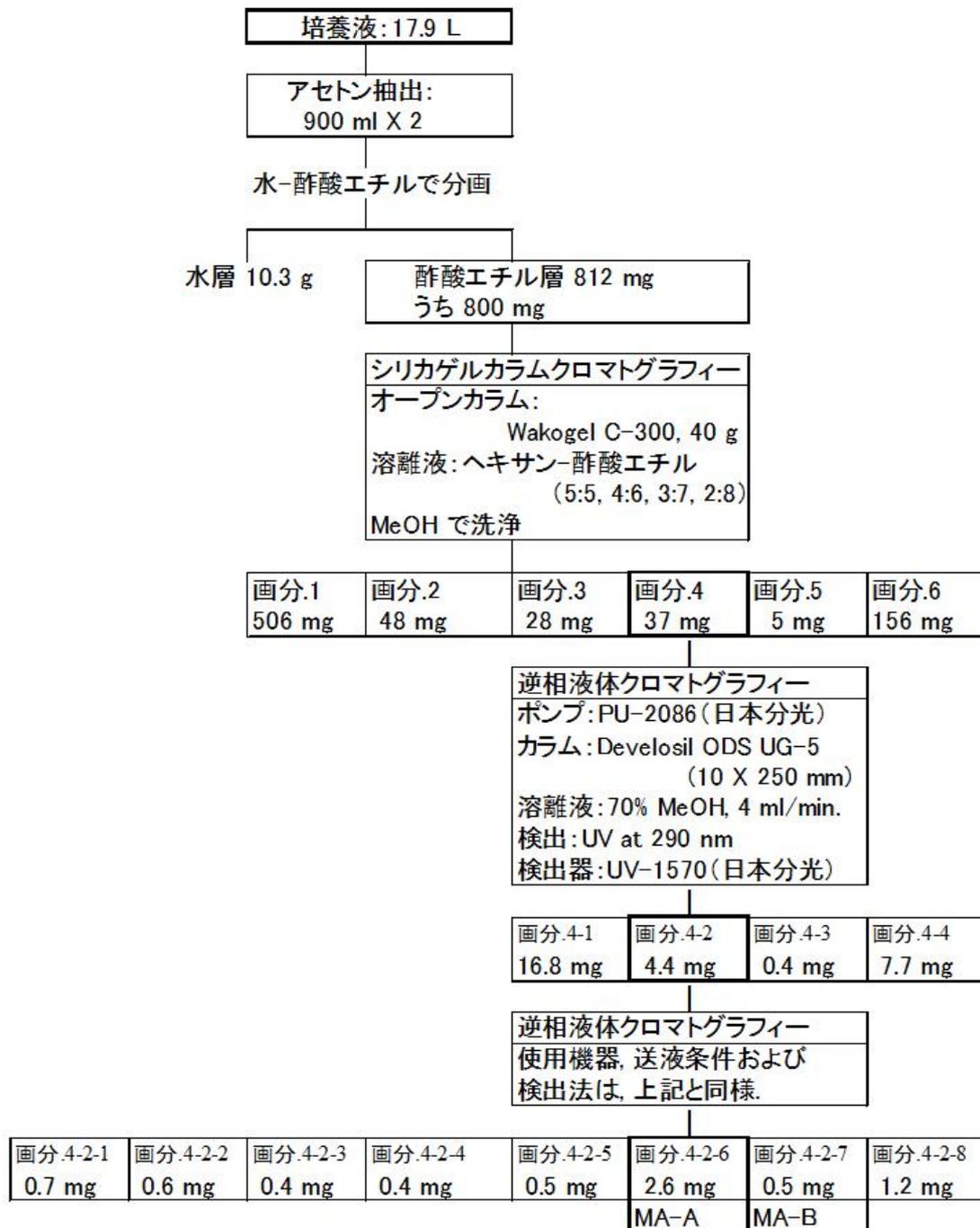


図 5-2. *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株由来の抗菌物質ミウラエナミド類の精製スキーム. 小鹿(私信)に基づく改変図.

### 5.2.6 発酵産物のクロマトグラフィーと分画

培養液から菌体と吸着樹脂を回収し、アセトン抽出した画分について、図 5-2 に示したシステムで、一回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび二回の逆相液体クロマトグラフィー (HPLC) により、ミウラエナミド類の分画精製および分析を行った。

### 5.2.7 機器分析

以下の機器による測定データ (本博士論文業績報告書、Ojika *et al.*, 2008) から生産物の化学構造を決定した。

#### 1) 質量分析 (MS)

Mariner Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, CA, USA) を用い positive ESI mode で測定した。高分解能質量分析 (HR-MS) では、アンジオテンシン I、ブラジキニンおよびニューロテンシンを含むペプチド混合物溶液を、内部標準に使用した。

#### 2) UV スペクトル

- ・使用機器：Ubest-50 型紫外・可視分光光度計 (日本分光)
- ・試料の溶媒・濃度：MeOH,  $c=5.1 \times 10^{-5}$  M
- ・測定波長：200-400 nm

#### 3) FT-IR スペクトル

- ・使用機器：FT-IR-7000S 型赤外分光光度計 (日本分光)
- ・試料：KBr 結晶上に薄膜として調製
- ・測定波数：500-4000  $\text{cm}^{-1}$  (波長、2500-20000 nm)

#### 4) NMR スペクトル

AMX2 600 (600 MHz) spectrometer (Bruker) で測定した。 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルのケミカルシフト値は、それぞれ残存クロロホルム ( $\text{CHCl}_3$ ) の  $\delta_{\text{H}}$  7.26 ppm および重クロロホルム ( $\text{CDCl}_3$ ) の  $\delta_{\text{C}}$  77.0 ppm を内部標準とし、ppm 単位で記載した。化合物の構造決定に際し、観測した二次元 NMR に関する略語を、表 5-5 に示す。

表 5-5. 二次元 NMR に関連した略語表

略称	正式名称
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ correlation spectroscopy
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ シフト相関二次元 NMR)
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ロングレンジシフト相関二次元 NMR)
NOESY	NOE correlated spectroscopy

## 5) 比旋光度

- ・使用機器：DIP-370 型デジタル旋光度計（日本分光）

### 5.2.8 化学構造決定のための MA-A(1) の誘導体の合成

*Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株の発酵生産物 MA-A(1)の化学構造を決定のため、以下のような方法で各誘導体を合成した。誘導体の合成に用いた試薬の略号は以下の表 5-6 に示す。各誘導体の構造式は、図 5-9 に示す。

表 5-6. 誘導体の合成に用いた試薬の略語表

略称	正式名称
TMSCHN <sub>2</sub>	trimethyl-silyl-diazomethane
MTPA	methoxy (trifluoromethyl) phenylacetic acid
FDLA	1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide

### 5.2.9 誘導体 10 の合成

MA-A(1) 1.9 mg (2.8 μmol)を、エタノール(0.8 mL)と NaOH (5 N, 0.4 mL)の混合液中で、窒素気相下で室温にて 24 時間、攪拌した。つぎに、混合液を飽和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (3 mL)で希釈した。塩酸を添加して得られた混合液を、酢酸エチルで抽出した。抽出液を合わせ、塩水で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水し、濃縮した。残分をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、誘導体 10 (1.0 mg, 51%) を得た。クロマトグラフィー条件は、カラム: Wako gel C-300, 2.8 g を用い、溶離は、CHCl<sub>3</sub>/メタノール混合液=9:1-8.1 の濃度勾配で行なった。

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=7.44-7.40(m, 1H), 7.35(t, *J* =7.2 Hz, 2H), 7.32-7.27(m, 3H), 7.17(d, *J* =1.4 Hz, 1H), 6.91(br d, *J* =8.4 Hz, 1H), 6.84(d, *J* =8.4 Hz, 1H), 6.49(br d, *J* =6.8 Hz, 1H), 5.22(t, *J* =8.0 Hz, 1H), 5.19-5.15(m, 1H), 4.65(quint, *J* =6.8 Hz, 1H), 3.79(sext, *J* =6.4 Hz, 1H), 3.63(s, 3H), 3.12(dd, *J* =14.8, 7.0 Hz, 1H), 2.68(dd, *J* =14.8, 9.0 Hz, 1H), 2.63(s, 3H), 2.19(t, *J* =7.2 Hz, 2H), 2.13-2.00(m, 4H), 1.70-1.64(m, 2H), 1.61(s, 3H), 1.58-1.52(m, 2H), 1.19(d, *J* =6.4 Hz, 3H), 1.03 ppm(d, *J* =6.4 Hz, 3H).

### 5.2.10 誘導体 11 の合成

誘導体 10 (1.0 mg, 1.4 μmol) をベンゼン (1.4 mL) とメタノール (0.2 mL) の混液に溶解し、ここに TMSCHN<sub>2</sub> (2 M) のジエチルエーテル溶液 (4 μL, 8 μmol) を添加した混合液を、室温で 2 時間、攪拌した。つぎに、混合液を濃縮し、HPLC で分画し、誘導体 11 (0.8 mg, 78%, *t<sub>R</sub>* =29.3 min) を無色粉末として得た。クロマトグラフィー条件は、カラム: Develosil

ODS UG-5 (10 i.d.×250 mm)を用い、溶離は、60-80% メタノール水溶液を、流速 3.0 mL で 60 分間、送液して行ない、測定波長 218 nm にて誘導体を検出した。

旋光度  $[\alpha]_D^{26} = +22$  (c=0.06 M, CHCl<sub>3</sub>); 赤外吸収 IR (KBr):  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3281, 1703, 1635, 1507, 1264, 1224, 1115, 981, 818, 757, 704, 666;

<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$ =7.37(t,  $J$ =7.2 Hz, 1H), 7.32(t,  $J$ =7.2 Hz, 2H), 7.27(d,  $J$ =7.2 Hz, 2H), 7.21(d,  $J$ =2.0 Hz, 1H), 7.14(s, 1H), 6.97(dd,  $J$ =8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.88(d,  $J$ =8.4 Hz, 1H), 6.30(d,  $J$ =6.6 Hz, 1H), 5.22(dd,  $J$ =9.0, 6.6 Hz, 1H), 5.15(t,  $J$ =6.6 Hz, 1H), 4.59(quint,  $J$ =6.9 Hz, 1H), 3.81-3.75 (m, 1H), 3.78(s, 3H), 3.52(s, 3H), 3.19(dd,  $J$ =14.4, 7.2 Hz, 1H), 2.75(dd,  $J$ =14.4, 9.6 Hz, 1H), 2.66(s, 3H), 2.14(t,  $J$ =7.2 Hz, 2H), 2.10-2.04(m, 2H), 2.02(q,  $J$ =7.2 Hz, 2H), 1.68-1.62(m, 2H), 1.60(s, 3H), 1.58-1.51(m, 2H), 1.19(d,  $J$ =6.0 Hz, 3H), 0.96 ppm(d,  $J$ =7.2 Hz, 3H).

(ESI):  $m/z$  (%) = 738.2 and 740.2 (93 and 100)  $[M+Na]^+$ ;

HRMS: C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>79</sup>BrNa の  $m/z$  計算値:738.2361、実測値: 738.2361.

#### 5.2.11 誘導体 12s の合成

メチルエステル誘導体 **11** (0.4 mg, 0.6  $\mu$ mol) は、脱水ピリジン中で、(R)-MTPA クロリド (4  $\mu$ L, 21  $\mu$ mol) と、標準的な条件で反応させた。反応液を HPLC で分画し、誘導体 **12s** (0.5 mg, 78%,  $t_R$ =10.4 min)を無色粉末として得た。クロマトグラフィー条件は、カラム: Develosil ODS UG-5 (10i.d.×250 mm) を用い、溶離は、90%メタノール水溶液を、流速 4.0 mL にて 60 分間、送液して行ない、測定波長 220 nm で誘導体を検出した。

<sup>1</sup>H NMR(主要な配座異性体 ; 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =7.71-7.67(m, 3H), 7.55-7.51(m, 2H), 7.48-7.43(m, 4H), 7.42-7.38(m, 5H), 7.35-7.31(m, 2H), 7.16(s, 1H), 7.11(dd,  $J$ =1.8, 8.4 Hz, 1H), 6.94(d,  $J$ =8.4 Hz, 1H), 6.29(d,  $J$ =6.6 Hz, 1H), 5.31(d,  $J$ =9.0, 7.2 Hz, 2H), 5.13-5.04(m, 2H), 4.56-4.50(m, 1H), 3.78, 3.72, 3.64, 3.50, 3.55, and 3.53 (s, total 12H), 3.30(dd,  $J$ =14.4, 7.2 Hz, 1H), 2.81(dd,  $J$ =14.4, 9.6 Hz, 1H), 2.65(s, 3H), 2.13-2.06(m, 2H), 2.05-1.95(m, 4H), 1.70-1.50(m, 3H), 1.70-1.64(m, 1H), 1.56(s, 3H), 1.26(d,  $J$ =6.0 Hz, 3H), 0.96 ppm(d,  $J$ =6.6, 3H).

(ESI):  $m/z$  (%) = 1148.4 and 1150.4 (13 and 18)  $[M+H]^+$ , 1170.3 and 1172.3 (90 and 100)  $[M+Na]^+$ .

#### 5.2.12 誘導体 12r の合成

メチルエステル誘導体 **11** (0.5 mg, 0.7  $\mu$ mol) は、(S)-MTPA クロリド (4  $\mu$ L, 21  $\mu$ mol) と、(R)体と同一条件下で反応させたのち、反応液を同様にして精製し、誘導体 **12r** (0.8 mg, 100%,  $t_R$ =9.95 min) を無色粉末として得た。

<sup>1</sup>H NMR (主要な配座異性体 ; 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =7.70-7.66(m, 3H), 7.55-7.51(m, 2H), 7.48-

7.44(m, 4H), 7.41-7.37(m, 5H), 7.36-7.30(m, 2H), 7.17(s, 1H), 7.11(dd,  $J=8.4, 1.8$  Hz, 1H), 6.95(d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.27(d,  $J=6.6$  Hz, 1H), 5.32(dd,  $J=9.0, 7.2$  Hz, 1H), 5.13-5.08(m, 1H), 5.03-4.98(m, 1H), 4.53(quint,  $J=6.6$  Hz, 1H), 3.78, 3.72, 3.64, 3.50, 3.55, and 3.52 (s, total 12H), 3.30(dd,  $J=14.4, 7.2$  Hz, 1H), 2.81(dd,  $J=9.6, 14.4$  Hz, 1H), 2.65(s, 3H), 2.14-2.06(m, 2H), 1.94-2.02(m, 2H), 1.93-1.85(m, 2H), 1.74-1.68(m, 1H), 1.65-1.55(m, 3H), 1.51(s, 3H), 1.34(d,  $J=6.0$  Hz, 3H), 0.97 ppm(d,  $J=6.6, 3$ H).

(ESI):  $m/z$  (%) = 1148.4 and 1150.4 (11 and 15)  $[M+H]^+$ , 1170.3 and 1172.3 (84 and 100)  $[M+Na]^+$ .

### 5.2.13 MA-A(1)の加水分解とマーフィー法による誘導體化

MA-A(1) 1.0 mg (1.5  $\mu\text{mol}$ ) を塩酸 (12 N, 1 mL) に溶解し、密閉ガラス容器中で窒素気相下、115–120°C に設定したオイルバス中で 15 時間にわたり加熱した。つぎに塩酸を窒素通気で除去し、残分を水に溶解し、ジエチルエーテルで 2 回洗った。ガラス容器に窒素を通気して水層を濃縮し、残分を凍結乾燥後、水 (150  $\mu\text{L}$ ) に再溶解した。この溶液 30  $\mu\text{L}$  に対して、 $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (1 M, 20  $\mu\text{L}$ ) と L-もしくは D-FDLA (東京化成), 1% のアセトン溶液 (30  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{mol}$ ) を添加し、混合液を 1 時間にわたり保温した。つぎに、塩酸 (1 M, 20  $\mu\text{L}$ ) を添加して反応を終了し、混合液にアセトニトリル 100  $\mu\text{L}$  を加えて希釈し、アミノ酸の L-もしくは D-FDLA 誘導體を含む溶液 200  $\mu\text{L}$  を調製した。二つの溶液の一部 (3  $\mu\text{L}$ ) を分取し、HPLC で分析した。クロマトグラフィー条件は、Develosil ODS UG-5 (4.6 $\times$ 250 mm) カラムを用い、溶離は、混合液 A の 45–50% 水溶液による 40 分間のリニア濃度勾配溶出を、流速 1 mL  $\text{min}^{-1}$  で行った。混合液 A は、トリフルオロ酢酸を 0.1% 含有する、アセトニトリル/メタノール混合液 (3:1) である。測定波長 305 nm にて誘導體を検出した。N-メチルチロシン (Bachem, Switzerland) とアラニンの FDLA 誘導體を合成し、対照の標準物質とした。

### 5.2.14 酵母ミトコンドリア画分の抽出

真核生物の酵母 *Candida rugosa* NBRC 0750 株 (表 5-15) のミトコンドリア顆粒の NADH oxidase に対する阻害活性を調べるため、Fang and Beattie (2003) および中井の方法 (中井・中井, 2011) に従い、ミトコンドリア画分を調製した。調製に用いた緩衝液を表 5-7 に示した。培養液 500 mL から 2,100 $\times$ g、5 分間の遠心分離により酵母菌体を回収した。湿重量 5 g の菌体を 50 mL の Tris- $\text{SO}_4$  緩衝液に懸濁させ、30°C の恒温槽で 90 rpm、15 分間振とうした。遠心分離により菌体を再回収し、Sorbitol/ $\text{K}^+$ -Pi 緩衝液 50 mL に懸濁させる操作を 2 回反復した。細胞のスフェロプラスト化のため、酵母菌体 1 g あたり 5 mg の Zymolyase20-T (生化学工業) を添加し、30°C の恒温槽で 90 rpm にて 45 分間の振とうを行った。この酵素反応中に 5、10、15、30 および 45 の各分時点で 20  $\mu\text{L}$  の反応液

を採取し、蒸留水で 50 倍希釈し、600 nm における吸光度の減少を測定し、細胞壁の溶解の進行状況を確認した。同時に位相差顕微鏡により酵母細胞の形状変化を観察した。反応終了後、2,100×g で 5 分間の遠心分離により菌体を回収し、Sorbitol/K<sup>+</sup>-Pi 緩衝液 50 mL に懸濁させる操作を 2 回反復したのち、2,100×g で 5 分間の遠心分離により菌体を回収した。細胞破碎用緩衝液 50 mL に 1 mM のプロテアーゼ阻害剤 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を添加し、さらに酵母菌体を懸濁させ、氷冷下で超音波処理により菌体破碎した。破碎菌体懸濁液について、2,100×g で 5 分間の遠心分離により上清を回収した。さらに 12,800×g で 5 分間、上清の遠心分離を行い、得られた沈殿を粗ミトコンドリア画分とした。この画分を、300 μL の Sorbitol リン酸緩衝液に懸濁し、2.7 mL の低張緩衝液を添加し、25,200×g で 20 分間、4°C にて上清の遠心分離を行った。得られた沈殿を 3 mL の低張緩衝液に懸濁し、氷上で 20 分間の冷却後、再び 4°C にて 25,200×g で 20 分間の遠心分離を行った。この懸濁・遠心分離の操作を 3 回反復の後、沈殿を回収しマイトプラスト (mitoplast) として呼吸阻害活性の実験に用いた。なお、マイトプラストとは粗ミトコンドリア画分から外膜と膜間隙のタンパク質を除いた画分であり、内膜由来小胞の NADH oxidase を含む。

表 5-7. 粗ミトコンドリア画分・マイトプラスト調製に用いた緩衝液

緩衝液	成分	濃度 (mM)
Tris-SO <sub>4</sub> 緩衝液 (pH 9.4)	Tris-SO <sub>4</sub>	100
	Dithiothreitol	10
Sorbitol/リン酸緩衝液 (pH 7.4)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20
	Sorbitol	1200
細胞破碎用緩衝液 (pH 7.4)	Tris-HCl	20
	Sorbitol	600
低張緩衝液 (pH 7.4)	Tris-HCl	5
	EDTA	1
	cOmplete Mini (Roche)	(10 mL に 1 錠)

#### 5.2.15 呼吸阻害活性の測定

マイトプラストを用い以下の反応溶液中にて、ミトコンドリア NADH oxidase 阻害活性を測定した。反応温度 30°C で、NADH の添加により反応を開始し、波長 340 nm における吸光度変化を 2 分間隔で測定した。試料の最終濃度は、miuraenamides A および B を 100 μM に、ポジティブ・コントロールの cystothiazole A、およびネガティブ・コントロールの amphotericin B を 10 μM にそれぞれ設定し、反応液 1 mL に 100 倍濃度 (10 および 1 mM) の各物質の MeOH 溶液 10 μL を添加した (表 5-8, 表 5-9)。

表 5-8. 酵素反応用緩衝液 (pH 7.4)

成分	濃度 (mM)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75
EDTA	1
MgCl <sub>2</sub>	1

表5-9. NADH oxidase反応液

反応液組成	添加量 (μL)
マイトプラスト (OD <sub>340</sub> =0.25)	25
NADH 溶液 (3.93 mM)	70
試料溶液 (MeOH に溶解)	10
酵素反応用緩衝液 (表 5-2)	895

#### 5.2.16 抗菌活性の測定法

##### 1) 発酵生産物の抗-*Phytophthora* 活性

さきに § 5.2.4 に示したのと同様な方法で、被検菌 *Phytophthora capsici* に対する抗菌活性を調べた。

##### 2) 各供試化合物の抗菌スペクトラム

表 5-14 に示した各被検菌に対する最少生育阻止濃度 (MIC, minimal inhibitory concentration) を、液体培地中での段階希釈法により測定した。各被検菌の液体培養では、糸状菌や酵母には 0.5% のグルコースを添加した Yeast Nitrogen Base broth (BD) を、細菌には Mueller-Hinton broth (BD) をそれぞれ用いた。各被検菌の細胞もしくは孢子数が約 10<sup>4</sup> になるよう各希釈段階の試験管に接種し、糸状菌と酵母は 25°C、細菌は 37°C で培養した。糸状菌の *Phytophthora capsici* や *Trichophyton mentagrophyte* (皮膚真菌症病原菌) は孢子形成しないため、それらを寒天培地上で生育させ、寒天小片 (約 1 mm<sup>3</sup>) を菌糸とともに接種した。糸状菌は 72 時間、酵母と細菌は 24 時間の培養の後に最小生育阻止濃度を測定した。

## 5. 結果

### 5.3.1 海洋性、汽水性粘液細菌における抗菌物質のスクリーニング

先行研究で得た菌株も含め、第3章、表3-17で示した海洋性粘液細菌51分離株の全菌株について、*Phytophthora capsici* NBRC 8386株を被験菌とした抗真菌活性試験を実施した。その結果を表5-10に示す。表5-10の脚注に示すように、(\*)を付した24菌株が本研究における分離株であり、残りの27株は先行研究（不藤, 2002）で分離したものである。表に示すようにいくつかの分離株において抗菌活性が認められたが、大部分は活性が弱く、唯一 *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup>株において強い活性が検出された。先行研究において *Haliangium ochraceum* SMP-2<sup>T</sup>株から抗菌物質 *haliangicin* が見つかるが（Fudou, 2001）、SMH-27-4<sup>T</sup>株の抗菌活性の強さは *haliangicin* に匹敵するものであった。

表5-10. 海洋性粘液細菌の抗 *Phytophthora* 抗真菌活性（次ページに続く）

菌種・菌株名	培養温度 (°C)	抗真菌活性
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1 <sup>T</sup> (*)	28	—
<i>Plesiocystis pacifica</i> SHI-1	28	—
<i>Plesiocystis</i> sp. SIS-2	28	(w)
<i>Enhygromyxa salina</i> SHK-1 <sup>T</sup> (*)	28	(w)
<i>Enhygromyxa salina</i> SKK-2	28	+
<i>Enhygromyxa salina</i> SMK-1-1	28	(w)
<i>Enhygromyxa salina</i> SMK-1-3	28	—
<i>Enhygromyxa salina</i> SMK-10 (*)	28	—
<i>Enhygromyxa salina</i> SMP-6	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SHK-4 (*)	25	(w)
<i>Enhygromyxa</i> sp. SHK-11 (*)	25	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SMP-8 (*)	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SMH-02-3	28	(w)
<i>Enhygromyxa</i> sp. SNB-1	28	(w)
<i>Enhygromyxa</i> sp. SIW-2	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SIW-3	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SNM-1	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SSJ-1	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SMK-2-1 (*)	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SMK-5-2 (*)	28	w
<i>Enhygromyxa</i> sp. SMK-9 (*)	28	+
<i>Enhygromyxa</i> sp. SYM-1 (*)	30, 37	w
<i>Enhygromyxa</i> sp. SYM-2 (*)	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SAB-1	28	—
<i>Enhygromyxa</i> sp. SIS-1	28	—

シンボル：++：強い抗真菌活性あり；+，抗真菌活性あり；—，抗真菌活性なし；w，弱い抗真菌活性あり；(w)，弱い活性（再現性なし）。SMP-3 および SKP-2 は粘液細菌ではない。(\*)を付した菌株が本研究における分離株。

表 5-10. つづき

菌種・菌株名	培養温度 (°C)	抗真菌活性
<i>Paraliomyxa miuraensis</i> SMH-27-4 <sup>T</sup> (*)	28	++
<i>Pseudenhygromyxa salsuginis</i> SYR-2 <sup>T</sup> (*)	28	—
<i>Haliangium ochraceum</i> SMP-2 <sup>T</sup>	28	++
<i>Haliangium tepidum</i> SMP-10 <sup>T</sup>	30, 37	w
<i>Haliangium</i> sp. SBP-1 (*)	28	(w)
<i>Desulfobacterales</i> bacterium SMP-3	28	—
<i>Desulfobacterales</i> bacterium SKP-2	28	—
SKK-1	28	—
SMK-1-2	28	—
SMK-2-2 (*)	28	—
SMK-3-1 (*)	28	—
SMK-3-2 (*)	28	—
SMK-3-3 (*)	28	—
SMK-4-1 (*)	28	—
SMK-4-2 (*)	28	—
SMK-5-1 (*)	28	—
SNB-2	28	—
SNB-3	28	—
SMP-4	28	—
SMH-97-3	28	—
SMP-7	28	—
STM-1	28	+
SSB-1	28	—
SYM-3 (*)	28	—
SYM-4 (*)	28	—
SYM-5 (*)	28	—

シンボル：++：強い抗真菌活性あり；+，抗真菌活性あり；—，抗真菌活性なし；w，弱い抗真菌活性あり；(w)，弱い活性（再現性なし）。(\*)を付した菌株が本研究における分離株。

### 5.3.2 新規抗真菌物質の生産と精製

上記のように、*P. miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株に抗真菌活性が認められた。また、*Enhygromyxa salina* SKK-2 株、*Enhygromyxa* sp. SMK-9 株および未同定の STM-1 株においても、抗真菌活性が見いだされたため、これら 4 株について培養液を大量（1-2 L）に調製し、物質の同定を試みた。しかし、SMH-27-4<sup>T</sup> 株以外においては、物質が不安定か、もしくは微量なため解析が困難であった。以下、同定に至った SMH-27-4<sup>T</sup> 株の新規物質について記述する。

図 5-2 に示すように、*P. miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株の培養液 17.9 L から、遠心分離（2,100×g 15 分）により、菌体と吸着樹脂を含む不溶性画分を回収した。アセトン 900 mL を回収物に加え、室温にて抽出を 2 回行い、抽出液の全量をロータリー・エバポレーターで減圧濃縮し、水性懸濁液を得た。この液からの 50 mL 酢酸エチルによる抽出を 3 回行い、全液を合わせて濃縮した残分のうち、800 mg をシリカゲルクロマトグラフィー

で分画した。ヘキサン-酢酸エチル混合液による溶離画分（画分 4）を合わせ減圧濃縮した乾固物 37 mg を、逆相液体クロマトグラフィーで分画した。得られた 4 画分のうち、2 番目の画分（画分 4-2）の乾固物 4.4 mg を、同一条件の逆相液体クロマトグラフィーで再度分画した。得られた 8 画分のうち、6 番目の画分 4-2-6 の乾固物 2.6 mg を MA-A (1)、7 番目の画分 4-2-7 の乾固物 0.5 mg を MA-B (2) と名付けた。図 5-3 に、MA-A (1) および MA-B (2) の逆相クロマトグラフィーによる溶出ピークを示す。この場合の使用機器、溶離条件および検出機器は、図 5-2 に示した逆相液体クロマトグラフィーの条件と同一である。

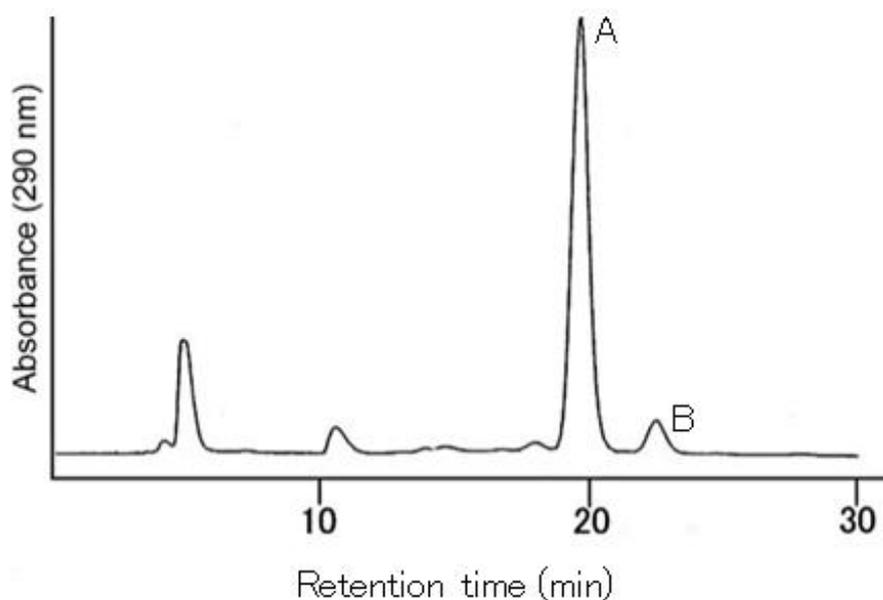


図 5-3. *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株由来の抗菌物質 MA-A (1) および MA-B (2) の逆相 HPLC 溶出パターン。ピーク A, MA-A (1); ピーク B, MA-B (2)。

### 5.3.3 新規抗真菌物質 MA-A(1)の質量分析および吸収スペクトル

新規抗真菌物質 MA-A (1) の同定に向けて質量分析を行なった。MA-A (1)は、ESI-TOF MS において、 $m/z$  684.2 および  $m/z$  686.2 にプロトン付加イオンピーク  $[M+H]^+$  が観察され、その面積比が約 1 : 1 であることから、一個の臭素原子の存在が示唆された (図 5-4)。高分解能マススペクトル (HR-MS) により、その分子式は  $C_{34}H_{43}N_3O_7^{79}Br$  であることが明らかになった。

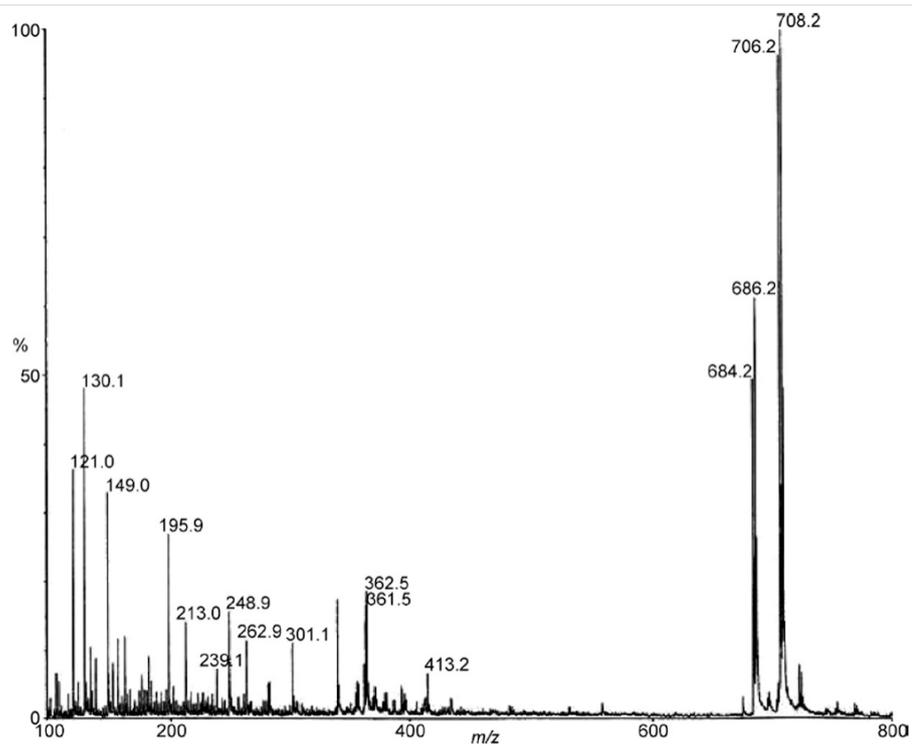


図 5-4. 新規物質 MA-A (1) の ESI-TOF-MS(+) スペクトル。

つぎに、UV スペクトルおよび IR スペクトル分析を行なった。MA-A (1) の UV スペクトルにおいては 276 nm の極大吸収ピーク (図 5-5)、IR スペクトルにおいては 1684  $\text{cm}^{-1}$  の吸収帯 (図 5-6) が得られ、不飽和カルボニル基の存在が示唆された。IR スペクトルによる 1654, 1636 および 1509  $\text{cm}^{-1}$  のアミド吸収帯の検出や、一分子当り三個の窒素原子の検出から、ペプチド結合の存在が示された。表 5-11 に MA-A (1) の物理化学的諸性質を要約する。

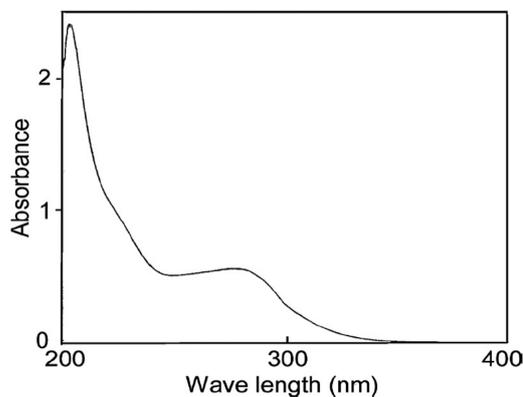


図 5-5. 新規物質 MA-A (1) の UV スペクトル [溶媒: MeOH,  $c=5.1 \times 10^{-5}$  M].

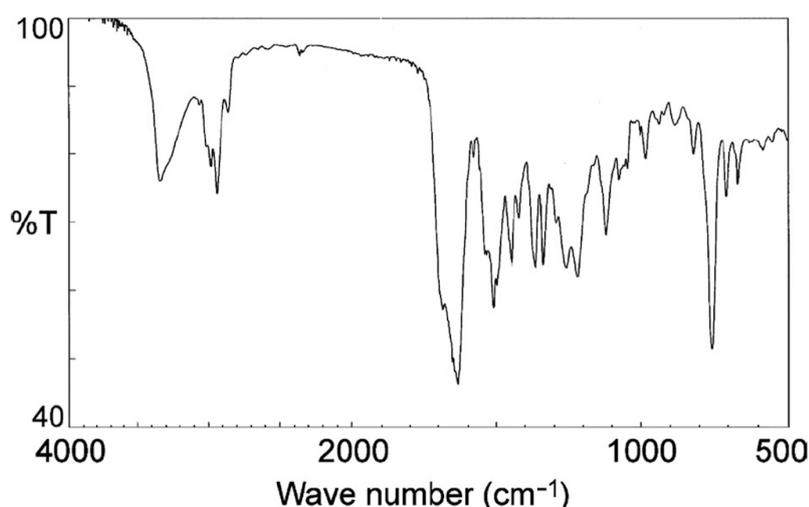


図 5-6. 新規物質 MA-A (1) の IR スペクトル (KBr 薄膜法).

表 5-11. 新規物質 MA-A (1) の物理化学的特性

パラメータ	特性
外観	白色粉末
分子式	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> Br
ESI-MS	684.2 and 686.2 (49, 60) [M+H] <sup>+</sup>
<i>m/z</i> (相対強度%)	706.2 and 708.2 (96,100) [M+Na] <sup>+</sup>
HR MS 実測値	684.2278[M+H] <sup>+</sup>
計算値	684.2279 (C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> <sup>79</sup> Br)
[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup>	+59 ( <i>c</i> 0.15, MeOH)
UV λ <sub>max</sub> <sup>MeOH</sup> nm (ε)	203 (49,000), 276 (11,000)
IR ν <sub>max</sub> (薄膜) cm <sup>-1</sup>	3336, 1684, 1654, 1636, 1509, 1256, 1217, 1119, 756
HPLC 保持時間 <sup>a</sup> (分)	16.8

<sup>a</sup> Develosil ODS UG-5 (4.6 x 250 mm), 70% MeOH, 1.0 ml/min, UV 290 nm.

### 5.3.4 新規抗真菌物質 MA-A(1) の NMR スペクトル解析

MA-A (1) の <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルを図 5-7 に示す。観測したプロトンおよびカーボンのケミカルシフト値について、HMQC によりプロトン-炭素原子間の直接結合を決定し、それに基づいて、位置ごとに表 5-12 に示す。

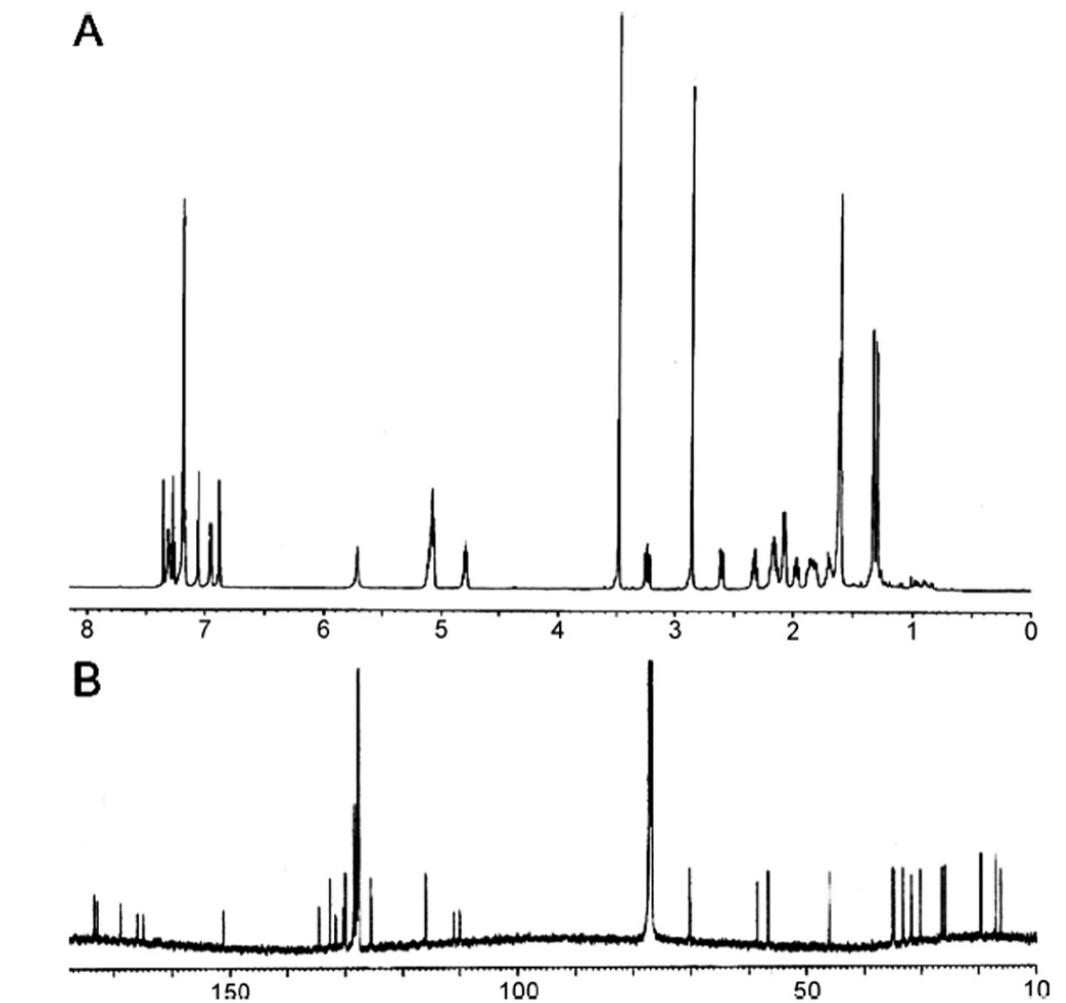


図5-7. MA-A (1) の  $\text{CDCl}_3$ 中における (A)  $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび (B)  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル

表 5-12 の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルデータにより、孤立した 3 個のメチル基、すなわち、11 位 ( $\delta$  1.60) の  $\text{CCH}_3$ 、22 位 ( $\delta$  2.86) の  $\text{NCH}_3$  ( $\text{NMe}$ ) および 14 位 ( $\delta$  3.49) の  $\text{OCH}_3$  ( $\text{OMe}$ ) の存在が示された。また、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルのケミカルシフト値から、1 位 ( $\delta$  173.4)、12 位 ( $\delta$  165.8)、21 位 ( $\delta$  168.8) および 30 位 ( $\delta$  172.8) は、カルボニル基のカーボンであることが推定された。

表 5-12. MA-A (1) の <sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルのデータ

ケミカルシフト値 (ppm)			
プロトン	δH	カーボン	δC
		1	173.4
2-H	2.32 (dt, 13.2, 8.4)	2	34.9
	2.11-2.17 (m)		
3-H	1.79-1.85 (m)	3	25.9
	1.67-1.74 (m)		
4-H	2.05-2.10 (m)	4	26.5
5-H	5.04-5.10 (m)	5	125.4
		6	134.7
7-H	2.15-2.20 (m)	7	35
	1.94-2.00 (m)		
8-H	1.84-1.90 (m)	8	33.3
	1.61-1.67 (m)		
9-H	5.09-5.13 (m)	9	70.3
10-H	1.33 (d, 6.6)	10	19.7
11-H	1.60 (s)	11	16.3
		12	165.8
13-H	-	13	111.1
		14	165.0
		15	131.7
16-H, 20-H	7.17-7.21 (m)	16, 20	128.6
17-H, 19-H	7.17-7.21 (m)	17, 19	128.2
18-H	7.29-7.33 (m)	18	130.1
		21	168.8
22-H	5.05-5.09 (m)	22	56.7
23-H	3.24 (dd, 13.2, 10.8)	23	31.8
	2.61 (dd, 13.2, 5.0)		
		24	130.4
25-H	7.28 (d, 1.5)	25	132.5
		26	110.0
		27	151.1
28-H	6.88 (d, 8.4)	28	116.1
29-H	6.96 (dd, 8.4, 1.5)	29	130.0
		30	172.8
31-H	4.79 (dq, 8.0, 6.0)	31	46.1
32-H	1.29 (d, 6.0)	32	17.2
14-O Me	3.49 (s)	14-O Me	58.6
22-N Me	2.86 (s)	22-N Me	30.2
13-NH	7.06 (s)		
31-NH	7.17-7.21 (m)		
27-OH	5.72 (s)		

<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの多重度と結合定数 (Hz) はカッコ内に示す。多重度: s(単一線), d(2重線), t(3重線), q(4重線), m(多重線), br s(ブロードな単一線)。<sup>1</sup>H-NMR [CDCl<sub>3</sub> 中, 600 MHz]; <sup>13</sup>C-NMR [CDCl<sub>3</sub> 中, 150 MHz].

次に、二次元 NMR スペクトルにより、MA-A (1) の構造解析を行った (本博士論文業績報告書、Ojika *et al.* 2008)。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトルにおいて、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(O)CH<sub>3</sub>, -CHCHCH- (ベンゼン環の一部), -CHCH<sub>2</sub>-, 1,2,4 位の 3 か所で置換されたベンゼン環、および -CH(NH)CH<sub>3</sub> の部分構造が示された (図 5-8)。大部分の部分構造は、図 5-8 において、実線の矢印で示したように、HMBC により決定した。

HMBC 相関 (図 5-8、実線矢印) について以下に述べる。プロトンおよびカーボンのケミカルシフト値は、表 5-12 および表 5-14 に示した値である。2 位 (δ 2.32, 2.11-2.17) および 31 位の NH プロトン (δ 7.17-7.21) と 1 位 (δ 173.4) のカーボンの間、11 位のメチルプロトン (δ 1.60) と 5 位 (δ 125.4)、6 位 (δ 134.7) および 7 位 (δ 35.0) のカーボンの間、9 位 (δ 5.09-5.13) のプロトンと 12 位 (δ 165.8) のカーボン、14 位の OMe のプロトン (δ 3.49) と 14 位 (δ 165.0) のカーボン、13 位の NH のプロトン (δ 7.06) および 22 位 (δ 5.05-5.09) のプロトンと 21 位 (δ 168.8) のカーボン、のそれぞれのプロトンおよびカーボンの間に相関ピークが観測された。22 位の NMe プロトン (δ 2.86) と 22 位 (δ 56.7) のカーボンの間、および、22 位 (δ 5.05-5.09)、22 位の NMe (δ 2.86)、32 位のメチル (δ 1.29)、31 位 (δ 4.79) の各プロトンと 30 位 (δ 172.8) のカーボンの間にも相関ピークが観測された。以上の HMBC 相関および、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトルにおいて示された部分構造から、MA-A (1) の環状構造が推定された。23 位 (δ 3.24, 2.61) のプロトンと、25 位 (δ 132.5) および 29 位 (δ 130.0) のカーボンとの間に相関ピークが観測された。25 位 (δ 7.28) のプロトンと 27 位 (δ 151.1) のカーボン、28 位 (δ 6.88) のプロトンと 24 位 (δ 130.4) および 26 位 (δ 110.0) のカーボンの間、27 位の OH のプロトン (δ 5.72) と 28 位 (δ 116.1) のカーボン、29 位 (δ 6.96) のプロトンと 27 位 (δ 151.1) のカーボンの間にも相関ピークが観測された。これらのデータから 23 位のカーボンに、3 か所で置換されたベンゼン環が結合していると推定された。

ベンゼン環とアルケン(C13-C14) の位置関係は、CDCl<sub>3</sub> 中の HMBC では明らかにできず、[D<sub>6</sub>]ジメチルスルフォキシド (DMSO) 中の HMBC スペクトル解析で決定した。図 5-8 において、点線の矢印で示したように、13 位の-NH プロトンと 12 および 14 位のカーボン、16 位プロトンと 14 位カーボンおよび 17 位プロトンと 15 位のカーボンとの間に相関関係が確認された。これらの結果から、MA-A (1) の平面化学構造が明らかにされた (図 5-8)。

C9 および C12 の間のエステル構造は、9 位 (δ 5.09-5.13) のプロトンのケミカルシフト値および 9 位プロトンと 12 位カーボン間の HMBC 相関から推定した。二つの二重結合、C5=C6 および C13=C14 の位置関係は、5 位プロトンと 7 位プロトンの間、および 16 と 20 位のプロトンと 13 位の-NH プロトンの間の NOESY 相関から推定した。

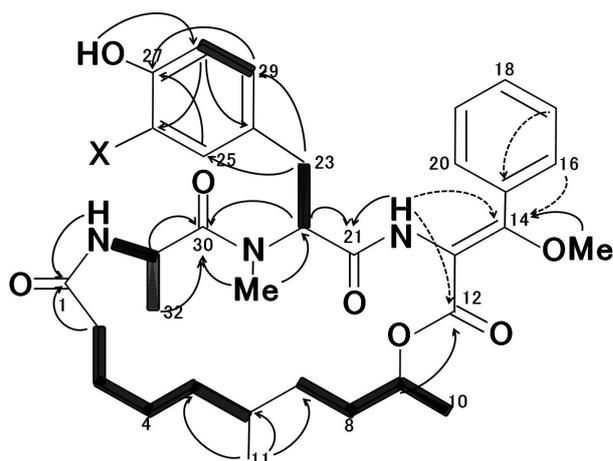


図 5-8. MA-A (1) の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY および HMBC 相関. 構造式中の X(ハロゲン原子)は Br. 黒い太線部は,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY により決定した部分構造. 矢印は  $\text{CDCl}_3$  中で測定された HMBC 相関、点線の矢印は  $[\text{D}_6]$  DMSO 中で測定された HMBC 相関.

### 5.3.5 MA-A (1) の絶対立体配置の決定および化合物の命名

次に MA-A (1) の絶対立体配置を決定した (本博士論文業績報告書、Ojika *et al.*, 2008)。X 線結晶解析に用いる結晶を得るために、アセチル化誘導体 (図 5-9, 8) や塩酸加水分解物 (図 5-14, 5; 図 5-9, 9) を調製し、結晶化を試みたが、いずれも成功しなかった。そこで、9 位の炭素については新モッシャー法 (Ohtani *et al.*, 1991)、構成アミノ酸残基の立体化学について改良マーフィー法 (Harada *et al.*, 1996) を、それぞれ適用した。すなわち、MA-A (1) のエステル部分を 2N NaOH で加水分解し、誘導体 10 を得た。誘導体 10 を  $\text{TMSCHN}_2$  によりメチル化し、メチルエステル誘導体 11 とした。誘導体 11 を (R)-もしくは (S)-MTPA-クロリドにより、対応するジエステル化誘導体 12s および 12r とした。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにより、12s および 12r 誘導体の水素原子の位置を決定した。それに基づき、新モッシャー法により、9 位炭素の絶対配置は 9S 配置であると結論した。

二つの構成アミノ酸残基の立体配置を決定するため、MA-A (1) を 12 N HCl で加水分解し、分解物の一部を L-もしくは D-FDLA と反応させ FDLA 誘導体化した。得られた反応生成物と、立体既知の標品を用い別途に調製した化合物を比較した結果、L-FDLA との反応物には、N-メチル-D-チロシンおよび L-アラニン誘導体が検出され、他方で、D-FDLA との反応物にはジアステレオマー化合物が検出された。この結果から、MA-A 中のアラニン残基は L 型、N-メチルチロシン残基は D 型と判明した。

以上の情報に基づいて、MA-A (1) の化学構造は以下の図 5-10 のように決定された。

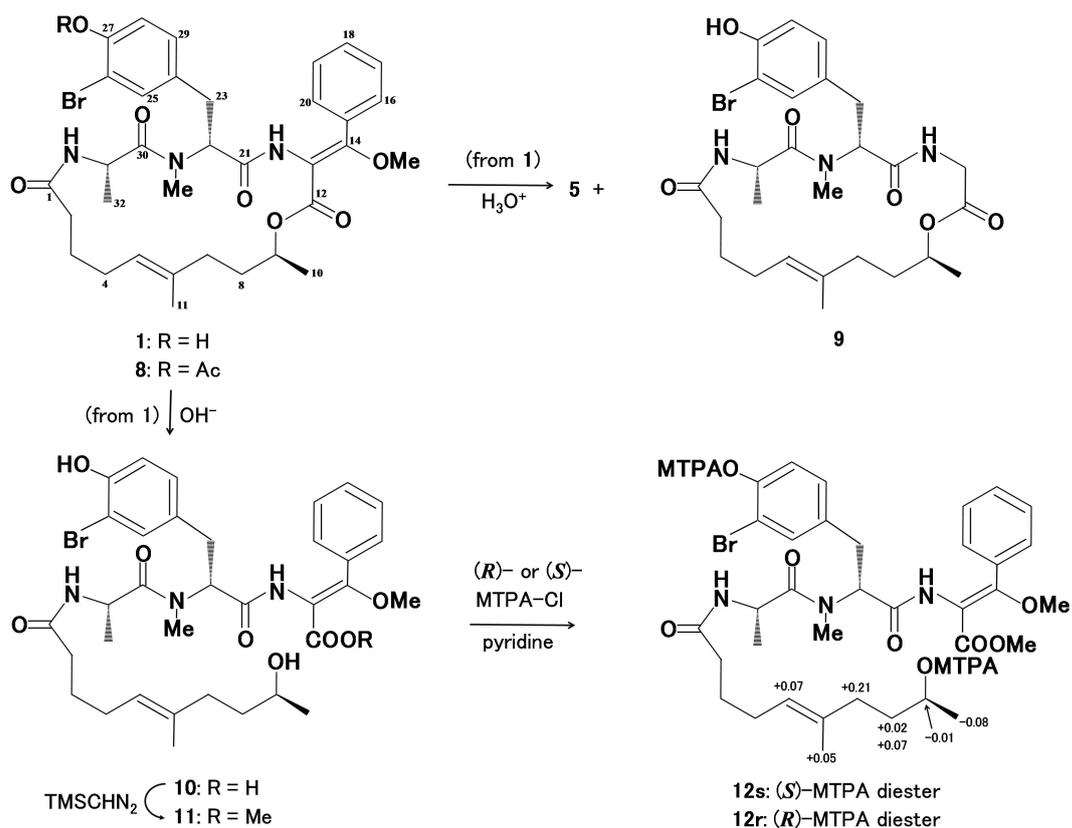


図 5-9. MA-A (1) の合成誘導体 8-12 [本博士論文業績報告書、Ojika *et al.* 2008、から改写]. MTPA エステル 12s および 12r について、 $\Delta\delta$  値 ( $\delta_{12s} - \delta_{12r}$ ) を ppm で示す.

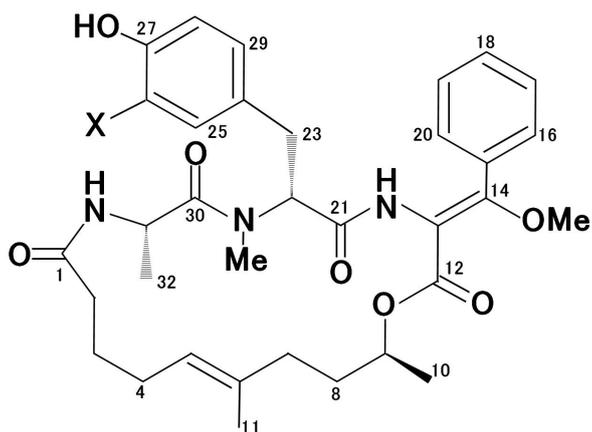


図 5-10. MA-A (1) および MA-B (2) の分子構造. MA-A (1), X=Br ; MA-B (2), X=I.

新規抗真菌物質 **MA-A (1)** の構造が決定され、しかも化合物データの特徴や文献調査から本物質が新規化合物と判明したので、化合物名を *miuraenamide* (ミウラエナミド) と命名した。この命名においては、生産菌の *Paraliomyxa miuraensis* の種名である採集地点の地名 *miura* (三浦) を語の先頭に置き、後半は、本物質が構造上の特徴として、*enamide* 基 (CO-NH-C=C) を有することを考慮した。すなわち、*miura* と *enamide* の合成語が、*miuraenamide* である。

### 5.3.6 化合物 **MA-B (2)** の構造決定

**MA-B (2)** について質量分析を行なった結果、プロトン付加イオンピーク  $[M+H]^+$  が、 $m/z$  732.2 に観察され、HR-MS により分子式は、 $C_{34}H_{43}N_3O_7I$  と推定された。**MA-B (2)** の UV および IR スペクトルについては、**MA-A (1)** とほぼ同様の位置に極大吸収ピークおよび吸収帯が検出された (表 5-13)。さらに、表 5-13 と表 5-14 に示すように、**MA-B (2)** の物理化学的特性や  $^1H$ -,  $^{13}C$ -NMR スペクトルのデータは、**MA-A (1)** とほぼ一致した。相違点として、26 位のカーボンのケミカルシフト値が、**MA-A (1)** で  $\delta$  110.0、**MA-B (2)** では  $\delta$  85.8、と大きく異なっていた。これらの機器分析データから、**MA-B (2)** は、**MA-A (1)** の 26 位の臭素原子がヨウ素原子で置換されていることが示唆された。また、本化合物が同一菌株により **MA-A (1)** と同時に生産される点から、両者が共通の生合成経路によって生産されることが推定された。従って、**MA-B (2)** の立体化学構造は、**MA-A (1)** と同一であると結論した。以上の知見に基づいて、**MA-B (2)** の構造を、**MA-A (1)** : *miuraenamide A* の臭素原子がヨウ素に置き換わった化合物と決定した。**MA-B (2)** の化合物名は *miuraenamide B* とした (図 5-10)。

表 5-13. 新規物質 **MA-A (1)** および **MA-B (2)** の物理化学的特性の比較

パラメータ	MA-A (1)	MA-B (2)
外観	白色粉末	白色粉末
分子式	$C_{34}H_{42}N_3O_7Br$	$C_{34}H_{42}N_3O_7I$
ESI-MS	684.2 and 686.2 (49, 60) $[M+H]^+$	732.2 (100) $[M+H]^+$
$m/z$ (相対強度%)	706.2 and 708.2 (96, 100) $[M+Na]^+$	754.2 (24) $[M+Na]^+$
HR MS 実測値	684.2278 $[M+H]^+$	732.2139 $[M+H]^+$
計算値	684.2279 ( $C_{34}H_{43}N_3O_7^{79}Br$ )	732.2140 ( $C_{34}H_{43}N_3O_7I$ )
$[\alpha]_D^{25}$	+59 ( $c$ 0.15, MeOH)	+30 ( $c$ 0.02, MeOH)
UV $\lambda_{max}^{MeOH}$ nm ( $\epsilon$ )	203 (49,000), 276 (11,000)	203 (53,000), 274 (11,000)
IR $\nu_{max}$ (薄膜) $cm^{-1}$	3336, 1684, 1654, 1636, 1509, 1256, 1217, 1119, 756	3336, 1683, 1636, 1507, 1261, 1217, 1119, 756
HPLC 保持時間 <sup>a</sup> (分)	16.8	19.0

<sup>a</sup> Develosil ODS UG-5 (4.6 × 250 mm), 70% MeOH, 1.0 ml/min, UV 290 nm.

表 5-14. MA-A (1) および MA-B (2) の NMR スペクトルのデータの比較

プロトン	$\delta$ H (ppm)		カーボン	$\delta$ C (ppm)	
	MA-A (1)	MA-B (2)		MA-A (1)	MA-B (2)
			1	173.4	173.4
2-H	2.32 (dt, 13.2, 8.4) 2.11-2.17 (m)	2.33 (dt, 13.8, 8.4) 2.12-2.18 (m)	2	34.9	34.9
3-H	1.79-1.85 (m) 1.67-1.74 (m)	1.79-1.85 (m) 1.67-1.74 (m)	3	25.9	25.9
4-H	2.05-2.10 (m)	2.05-2.10 (m)	4	26.5	26.5
5-H	5.04-5.10 (m)	5.05-5.11 (m)	5	125.4	125.4
			6	134.7	134.7
7-H	2.15-2.20 (m) 1.94-2.00 (m)	2.15-2.20 (m) 1.94-2.00 (m)	7	35	35
8-H	1.84-1.90 (m) 1.61-1.67 (m)	1.83-1.89 (m) 1.60-1.66 (m)	8	33.3	33.3
9-H	5.09-5.13 (m)	5.09-5.13 (m)	9	70.3	70.3
10-H	1.33 (d, 6.6)	1.33 (d, 6.6)	10	19.7	19.7
11-H	1.60 (s)	1.60 (s)	11	16.3	16.3
			12	165.8	165.8 <sup>[a]</sup>
13-H	-	-	13	111.1	n.d. <sup>[b]</sup>
			14	165.0	165.0 <sup>[a]</sup>
			15	131.7	131.7
16-H, 20-H	7.17-7.21 (m)	7.17-7.21 (m)	16, 20	128.6	128.5
17-H, 19-H	7.17-7.21 (m)	7.17-7.21 (m)	17, 19	128.2	128.3
18-H	7.29-7.33 (m)	7.29-7.33 (m)	18	130.1	130.1
			21	168.8	168.8
22-H	5.05-5.09 (m)	5.05-5.09 (m)	22	56.7	56.7
23-H	3.24 (dd, 13.2, 10.8) 2.61 (dd, 13.2, 5.0)	3.23 (dd, 13.5, 10.8) 2.60 (dd, 13.5, 5.0)	23	31.8	31.6
			24	130.4	131
25-H	7.28 (d, 1.5)	7.47 (d, 1.5)	25	132.5	138.6
			26	110.0	85.8 <sup>[a]</sup>
			27	151.1	153.6
28-H	6.88 (d, 8.4)	6.85 (d, 8.2)	28	116.1	115
29-H	6.96 (dd, 8.4, 1.5)	6.99 (dd, 8.2, 1.5)	29	130.0	131.1
			30	172.8	172.8
31-H	4.79 (dq, 8.0, 6.0)	4.79 (dq, 7.8, 6.0)	31	46.1	46.1
32-H	1.29 (d, 6.0)	1.30 (d, 6.0)	32	17.2	17.2
14-O Me	3.49 (s)	3.49 (s)	14-O Me	58.6	58.6
22-N Me	2.86 (s)	2.86 (s)	22-N Me	30.2	30.2
13-NH	7.06 (s)	7.05 (s)			
31-NH	7.17-7.21 (m)	7.17 (d, 7.8)			
27-OH	5.72 (s)	5.33 (br s)			

NMR の観測条件および観測データに関する説明は、表 5-12 に同じ。MA-B (2) の場合、物質が充分量は得られず、[a]ケミカルシフト値は、HMBC スペクトルのデータから決定。[b]観測できず。

### 5.3.7 化合物の生物学的活性

MA-A (1) および MA-B (2) の抗 *Phytophthora* 活性は、ペーパーディスク拡散法により検出した。どちらも植物病原性の卵菌類 *Phytophthora capsici* に対し最小濃度 25 ng/disk で生育を阻止した。図 5-11 に、MA-A (1) による *P.capsici* に対する生育阻止の様子を、表 5-15 に、MA-A (1) の抗菌スペクトラムおよび各試験菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC: minimum inhibitory concentration)を示す。

MA-A (1) は細菌や一部のカビ・酵母 (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Saccharomyces cerevisiae*) には抗菌性を示さず、他方で卵菌類 *Phytophthora capsici* や接合菌類 *Rhizopus oryzae* に対し比較的強い抗菌活性を示した。この結果から海岸土壌環境における SMH-27-4<sup>T</sup> 株と卵菌類との競合関係が示唆された。MA-A (1) は *Phytophthora* の生育を選択的に阻害したが、細菌の生育はほとんど阻害しなかった。他方で MA-B (2) は少量のため抗菌スペクトルは測定できなかった。

MA-B (2) では、MA-A (1) 分子中の臭素原子がヨウ素原子に置換されており (図 5-10)、化学的諸性質は MA-A (1) に似ると推定されたが、生物学的活性については微妙な差異も生じ得る。ミウラエナミドの化学構造の特徴は、ジヒドロフェニルアラニン残基中に  $\beta$ -methoxyacrylate 構造 (OMe-C=C-COO) および enamide を含む点にある (図 5-10)。 $\alpha$ -位窒素に  $\beta$ -methoxyacrylate が結合した構造を含む細菌由来代謝産物の発見は cyrmenin (Sasse *et al.*, 2003; Leibold *et al.*, 2004) に次ぐ。抗カビ活性を示すミトコンドリア呼吸鎖阻害剤としては、 $\beta$ -methoxy-acrylate 化合物が微生物代謝産物から見い出され、担子菌 *Strobilurus tenacellus* 由来の strobilurin (Sauter *et al.*, 1999)、陸生粘液細菌 *Myxococcus* 属などが生産する myxothiazole (Thierbach and Reichenbach, 1981)、陸生粘液細菌 *Cystobacter* 属由来の cystothiazole (Ojika *et al.*, 1998)、海洋性粘液細菌 *Haliangium* 属由来の haliangicin (Fudou *et al.*, 2001) がすでに報告されている。

MA-A (1) と MA-B (2) について、酵母 *Candida rugosa* 由来のマイトプラストを用い、NADH oxidase 阻害活性を測定した結果、両者とも 100  $\mu$ M の低濃度で NADH oxidase を阻害することが判明した (図 5-12)。阻害活性陽性の対照化合物とした cystothiazole A は、粘液細菌 *Cystobacter fuscus* から見い出された典型的な  $\beta$ -methoxyacrylate 化合物 (Ojika *et al.*, 1998) で、さらに低濃度の 10  $\mu$ M で NADH oxidase を完全に阻害した (図 5-12)。他方で、呼吸鎖阻害活性を示さない対照物質 amphotericin B は、強力な抗カビ活性を示すヘプタエン-マクロライド化合物だが、NADH oxidase を全く阻害しなかった。また MA-A (1) の IC<sub>50</sub> 値は 50  $\mu$ M だった。以上から、ミウラエナミド類の作用点は既知の  $\beta$ -methoxyacrylate 化合物と同様にミトコンドリア呼吸鎖にあると推定された。

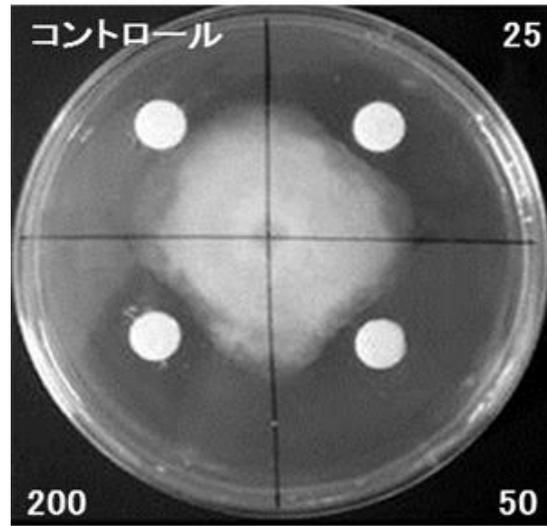


図 5-11. Miuraenamide A による糸状菌 *Phytophthora capsici* の生育阻害 [供試量: ng disk<sup>-1</sup>].

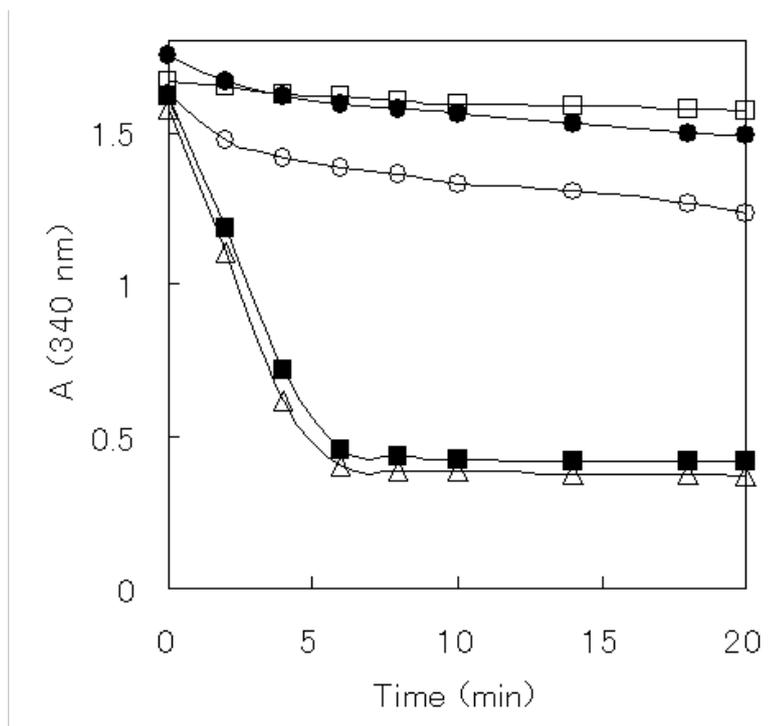


図 5-12. ミウラエナミド類および他の化合物による NADH oxidase 阻害の経時変化.

○: miuraenamide A (1) (100  $\mu$ M); ●: miuraenamide B (2) (100  $\mu$ M); □: cystothiazole A (10  $\mu$ M); ■: amphotericin B (10  $\mu$ M); △: control (メタノール).

表 5-15. Miuraenamides A の抗菌スペクトラム

被検菌		MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
糸状菌	<i>Absidia spinosa</i> NBRC 5873	12.5
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864	>50
	<i>Botrytis cinerea</i> CBS 261.71	>50
	<i>Phytophthora capsici</i> NBRC 8386	0.4
	<i>Rhizopus oryzae</i> JCM 5582	6.3
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> NBRC 7522	12.5
酵母	<i>Candida rugosa</i> NBRC 0750	12.5
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC 2376	>50
	<i>Pichia burtonii</i> NBRC 0844	25
	<i>Rhodotorula minuta</i> NBRC 0715	12.5
細菌	<i>Escherichia coli</i> NIHJ (=NBRC 14237)	>50
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	>50
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051 <sup>T</sup>	>50

表 5-16. ミウラエナミド類および誘導体の糸状菌 *Phytophthora capsici* に対する  
最小生育阻止量

Compound	Dose ( $\mu\text{g disk}^{-1}$ )
1	0.025
2	0.025
3	0.025
4	1
5	10
6	0.13
8	5
9	2
10	>50
11	50

1, miuraenamide A(Br); 2, miuraenamide B(I); 3, miuraenamide C(Cl); 4, miuraenamide D;  
5, miuraenamide E; 6, miuraenamide F. 表 5-16 に示す各化合物の構造は, 図 5-9 および図 5-14 に示す.

## 5.4 考察

### 5.4.1 海洋性・汽水性粘液細菌からの抗菌物質の検出

本研究においては、抗 *Phytophthora* 活性をアッセイ系として、新規海洋性・汽水性粘液細菌分離株の抗菌物質のスクリーニングを行なった。その結果、表 5-10 (§ 5.3.1) に示したように、抗 *Phytophthora* 抗真菌物質の検出率は、活性の強さを問わなければ、51 株中 15 株に達した。先行研究 (不藤, 2002) および本研究の結果を合わせると、51 株の海洋性粘液細菌細菌から 2 つの新規化合物が発見されたことになり、これらの比率は、従来の放線菌を中心とするスクリーニングの一般的傾向と比べても、高いと思われる。

抗 *Phytophthora* 抗真菌活性に基づいた抗菌物質の探索を行った理由は、以下の知見に根拠を置いている。すなわち、*Phytophthora* 属の糸状菌は、抗真菌アッセイに多用される *Aspergillus* 属糸状菌や *Candida* 属酵母とは細胞表層構造が異なり、細胞壁成分中にセルロースを含む一方、キチンを欠く。また細胞膜中のステロール組成が *Aspergillus* 属や *Candida* 属と異なるため、*Phytophthora* 属には既存のポリエーテル系抗生物質が作用しにくい。これらの理由から、抗 *Phytophthora* 抗真菌活性を示す物質を探索すれば、既知の抗真菌物質とは構造が異なる新規物質を見出す確率が比較的高いとされる (Tanaka *et al.*, 1995)。表 5-15 に示すように、ミウラエナミド類は *Aspergillus* 属糸状菌や酵母に対する抗菌活性が比較的に弱いことから、本研究において、ミウラエナミド類の発見に至った理由として、抗 *Phytophthora* 抗真菌活性をもとに探索を行った点は重要である。また、このようなアッセイ系の特徴と共に、海洋性粘液細菌の探索源としての独自性も、特筆すべきであると考えられる。

海洋性粘液細菌については、ポリケチド生合成系の遺伝子 (type I polyketide synthase) の検出および系統解析も行われている (本博士論文業績報告書、Komaki *et al.*, 2008)。その結果、新規性が高いと考えられる type I polyketide synthase 遺伝子の配列が、*Haliangium tepidum* SMP-10<sup>T</sup> 株からは 10 配列、本研究で同定した *Plesiocystis pacifica* SIR-1<sup>T</sup> からは 3 配列、*Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> 株からは 5 配列、*Plesiocystis* 属に近縁の SIS-2 株からは 7 配列、*Enhygromyxa* 属に近縁の SMH-02-3 株からは 7 配列、SYM-1 株からは 5 配列、がそれぞれ検出されている。新規な生合成系遺伝子の保有は、必ずしも新規物質の生産に直結しないが、潜在的な物質生産能力の一つの指標になり得ると思われる。とくに、抗真菌活性がまったく検出されなかった *Plesiocystis pacifica* SIR-1<sup>T</sup> 株についても、ポリケチド生合成系の遺伝子が見いだされた事実は、この菌株による二次代謝産物の生産の可能性を示した点で、注目に値すると思われる。本研究で得られた海洋性粘液細菌について、新規化合物の生合成に関与すると推定される遺伝子が見いだされたことから、培養条件や遺伝子発現条件などを検討すること、さらに全ゲノム解析に基づく探索を行なうことにより、新規物質が得られる可能性もあると考えられる。

近年には、*Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> 株に近縁の海洋性粘液細菌から、陸生の粘液細菌の生産物には見られなかった新規な化合物、salimabromide (Felder *et al.*, 2013a) や、enhygrolide 類および salimyxin 類 (Felder *et al.*, 2013b) が発見された (図 5-13)。これらの物質はグラム陽性細菌に対する抗菌活性が見いだされたが、抗真菌活性は報告されていない。本研究で得た *Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> 株やナノシスティス科の粘液細菌については、物質の同定に至らなかったが、表 5-10 (§ 5.3.1) に示したように抗真菌活性を示した。したがって、これらの菌株は、Felder *et al.* (2013b) が見出した物質とは異なる代謝産物を生産していた可能性もあると考えられる。

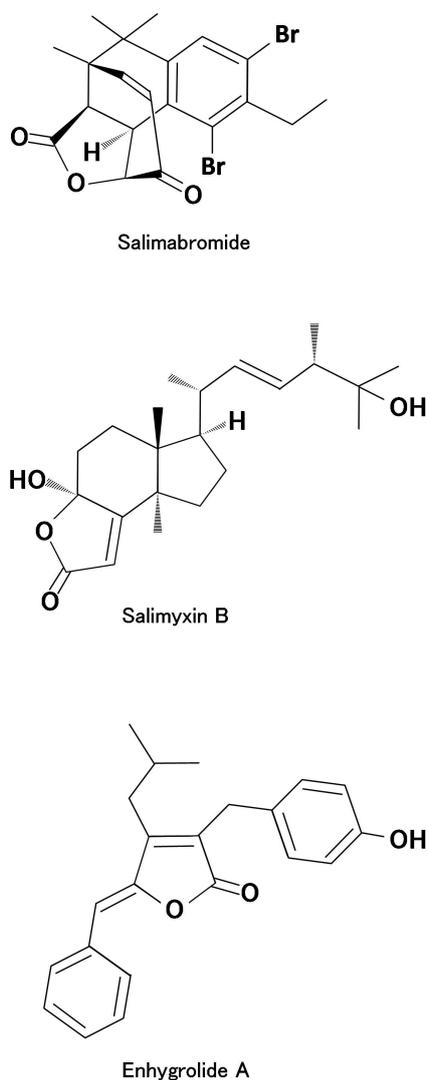


図 5-13. 近年に海洋性粘液細菌から見いだされた新規化合物. Felder *et al.* (2013a, b) が報告した新規物質の構造を示す.

#### 5.4.2 ミウラエナミド類および誘導体の生物学的活性および構造活性相関

今回、第 3 章において新属・新種として命名した汽水性粘液細菌 *Paraliomyxa miuraensis* から、新規抗菌物質ミウラエナミド類、MA-A (1) および MA-B (2) を発見した。MA-A (1) と MA-B (2) の抗 *Phytophthora* 活性の強度は同等であり（本博士論文業績報告書、Ojika *et al.* 2008）、両者の抗菌スペクトラムは似ていると思われる。しかし、前述のように分子中ハロゲン原子が MA-A (1) は臭素、MA-B (2) はヨウ素なので、両者間で生物活性が異なる可能性もあり、この点は今後の検討課題である。

ミウラエナミド類や類縁体の作用機序については、それらの立体化学構造および抗 *Phytophthora* 活性との関係から推定することができる（図 5-9、図 5-14 および表 5-16）。

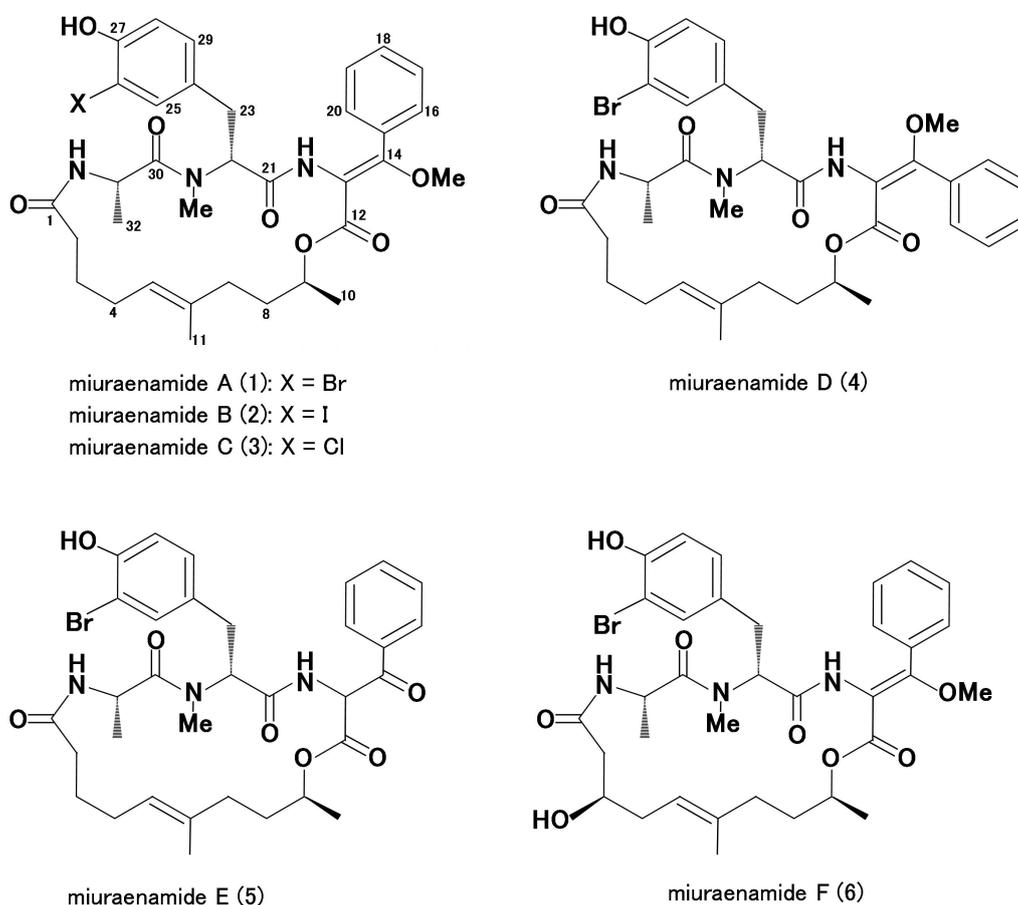


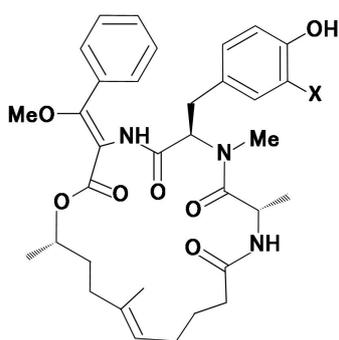
図 5-14. ミウラエナミド類の立体化学構造 本博士論文業績報告書(Ojika *et al.*, 2008)から改写. 誘導体 1-6 の構造を示す. なお, miuraenamide C は, 図 5-2 において, 画分 4-2-5 に含まれることが判明した.

表 5-16 に示すように、ミウラエナミド類 (図 5-14:1,A; 2,B; 3,C) のチロシン残基の 26 位のハロゲン原子 (Br, I, Cl) の差異は抗 *Phytophthora* 活性にまったく影響しなかった。Miuraenamide D (4) (図 5-14) においては抗菌活性が低下したので、 $\beta$ -methoxyacrylate 基の立体配置による活性への影響が大きいことが考えられる。また、miuraenamide E(5) (図 5-14) や誘導体 9 (図 5-9) の活性が低下したことから、 $\beta$ -methoxyacrylate 部分 (C12-C14) の存在が抗菌活性の発現に重要であると思われる。さらに、水酸化誘導体 miuraenamide F(6) (図 5-14) やアセチル化誘導体 8 (図 5-9) の活性低下から、polyketide 部分の構造や、peptide 部分の free phenol 基の親水性による抗菌活性への寄与が示唆される。

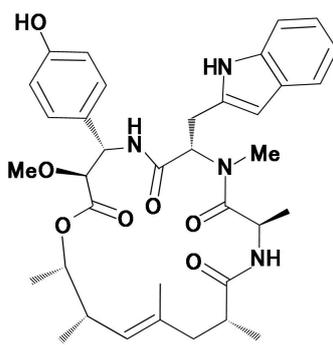
ミウラエナミドの開環誘導体である誘導体 10 や 11 (図 5-9) では、 $\beta$ -methoxyacrylate 部分が保持されていたが、活性は顕著に低下した (表 5-16)。この結果から、ミウラエナミド類の環状 macrocyclic 構造が抗菌活性にとって重要と推定される。

#### 5.4.3 ミウラエナミド類の化学構造の既知物質との比較および抗がん細胞活性

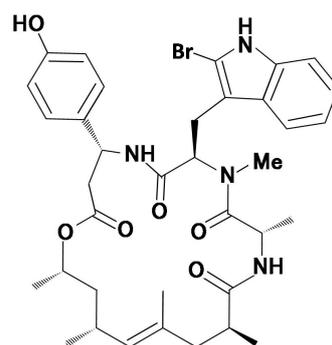
ミウラエナミド類の全体的な化学構造について、環状デプシペプチド (cyclic depsipeptides) の特徴を有する点が注目される。その理由として、ここ 20 年ほどの間に、海洋性無脊椎動物や藍色細菌 (シアノバクテリア) などに由来する類似の depsipeptides 化合物が多数報告され、それらの中から抗がん活性物質が見い出され、臨床試験が継続している事実が挙げられる (Panda *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 2001, 2002; Maroun *et al.*, 2006; Still *et al.*, 2014)。これらの中でもとくに、海綿由来の jaspilactone (jaspamide) や、構造的に jaspamide に類似した陸生粘液細菌由来の chondramide (Kunze 1995; 図 5-15) は、ミウラエナミド類と化学構造がよく似ている点で注目される。Chondramide は、粘液細菌 *Chondromyces crocatus* が生産する物質で、アクチン脱重合阻害作用を示し、抗がん剤のリード化合物などへの応用が今後に期待される (Sasse *et al.*, 1998)。したがって、ミウラエナミド類も抗腫瘍性など特異な生理活性を示す可能性があるため、本物質については、抗菌や呼吸鎖阻害以外の生物活性についても検討が加えられている。その結果、miuraenamide A については、actin filament 安定化活性が見いだされた (Sumiya *et al.*, 2011)。Actin filament 安定化剤は抗腫瘍剤として探索されてきた経緯があり、ミウラエナミド類についても、抗腫瘍活性など有用な生理活性が見い出され、医薬のリード化合物となる可能性がある。事実、最近になり、合成法により調製したミウラエナミド類を用いて、本化合物の強力な抗がん細胞活性が確認された (Karmann *et al.*, 2015)。



Miuraenamides



Chondramide A



Jasplakinolide

図 5-15. ミウラエナミド類および構造が類似した環状デプシペプチド化合物. Still *et al.* (2014) から改写.

## 第 6 章 総合考察

### 6.1 新規粘液細菌の生態

第 3 章および第 4 章で述べたように、細菌溶解性の新規な粘液細菌が海岸や温泉に広範囲に分布していることが、本研究によって初めて明らかになった。その中でもとくに、ナノシスティス (*Nannocystaceae*) 科の粘液細菌は、北海道から南西諸島にいたる日本各地の多様な海岸および汽水環境に、普遍的に分布することが示された。これらの粘液細菌は、分離用の寒天培地上では、大腸菌あるいはそのほかのグラム染色陰性細菌を餌として、細菌溶解性のコロニー、すなわち *swarm* を形成した。海洋性や汽水性粘液細菌の分離株については、純化したのちにも、細菌溶解性は保持されていた。日本各地の温泉環境、とくに温泉のバイオマットには、50°C で生育する高温性の粘液細菌が広く分布していることも本研究から初めて示唆された。温泉由来粘液細菌の場合には、純化できなかったため、正確な性質の検討は困難だった。しかし、*swarm* の成長端から、餌細菌への接種を繰り返して観察した結果から、温泉由来粘液細菌の細菌溶解性の性質も、安定して保持されていると考えられた。

土壌由来の粘液細菌は、従来から捕食性細菌とされてきた。<sup>13</sup>C-ロイシンでラベルした大腸菌細胞を試験土壌に添加し、捕食性微生物による rRNA 画分への <sup>13</sup>C-標識の取り込みを追跡した実験から、粘液細菌による菌体の捕食が立証されている (Lueders *et al.*, 2006)。この研究では、土壌中の溶菌性細菌である *Lysobacter* 属菌やバクテロイデス (*Bacteroidetes*) 門細菌による、大腸菌菌体の溶菌や捕食も確認されている。粘液細菌 *Myxococcus xanthus* のゲノム情報からも、捕食性に関与するらしい多数 (146 座) のプロテアーゼ様遺伝子や二次代謝産物 (ポリケチド) 合成系の存在、あるいはペリプラズム局在の蛋白分解酵素系などの存在が示唆されている (Goldman *et al.*, 2006)。これらの証拠から、粘液細菌は土壌環境中においては、捕食者の重要な構成員と考えられる。このような粘液細菌の捕食性は、海洋性・汽水性の粘液細菌や温泉由来粘液細菌の場合にも共有され、それぞれが生息する自然環境、すなわち海岸・河口や温泉において、実際にほかのグラム染色性陰性細菌を捕食していると類推される。なお、汽水性粘液細菌として記載した、ミウラエナミドの生産菌 *Paraliomyxa miuraensis* SMH-27-4<sup>T</sup> 株が分離された海岸土壌環境は、付近に陸生植物の生育もあることから、土壌環境とみなすことができ、この菌は土壌環境中において捕食性細菌の役割を担っていると推定される。

本研究では、新規粘液細菌を得るために、細菌捕食性粘液細菌の分離法である大腸菌菌体塗抹法 (第 3 章, § 3.2.4.1) を利用した。分離用の生き餌菌体を置いた低栄養寒天上では、人工海水培地の場合も含め、餌細菌 (大腸菌) が生存し栄養物を吸収するため、

人工基質（カゼインやペプトン）を置いた寒天上よりも低栄養状態が保持されやすいと考えられた。そのような低栄養条件下では、バクテロイデス門細菌などの生育が相対的に抑制され、粘液細菌が増殖しコロニー形成が可能だったと推定される。このような性質は、第 3 章で述べたように、粘液細菌が砂粒子表面などの低栄養環境で、他の細菌を餌として遅い生育速度で増殖している、との推定と関連づけられる。

分離法に関する結論は、生き餌のグラム染色陰性菌（大腸菌）を低栄養寒天培地に塗抹した、大腸菌菌体塗抹法が、海洋や汽水環境からの細菌捕食性粘液細菌の取得に有効であるということである。しかし、この分離法は煩雑な移植操作を伴い（第 3 章、§ 3.2.4）効率的でない、という欠点がある。この技法は、陸生粘液細菌の分離法として考案され（Singh, 1947）、以後 65 年以上にわたり粘液細菌の分離に適用され続け、ドイツの著名な粘液細菌学者 Reichenbach もこの方法を用いた（Reichenbach and Dworkin, 1992）。温泉環境からの細菌捕食性粘液細菌の探索では、大腸菌菌体塗抹法により粘液細菌様の培養物は得たが、粘液細菌と他の滑走性細菌（バクテロイデス門細菌）などの混在菌とが分かれ難かったために純化に至らず、この分離法の限界も示された。なお、ドイツの研究グループが本研究の分離法にならって、細菌捕食性の海洋性粘液細菌の分離を試みた結果、本研究で記載した *Enhygromyxa salina* に近縁の海洋性粘液細菌がオランダの海岸沈殿物、アメリカの西海岸の海岸沈殿物、およびドイツの海岸沈殿物から分離された（Schäberle *et al.*, 2010）。すなわち、この結果は、海洋性粘液細菌の分離法としての大腸菌菌体塗抹法の有効性を示すと同時に、*Enhygromyxa* 属の海洋性粘液細菌が、日本沿岸のみならず全世界の海岸環境に普遍的に分布することを示している。

第 3 章で示したように、日本各地の海岸の砂や泥などの試料から、系統上はナノシステイス科に属する細菌捕食性の海洋性粘液細菌が、比較的高頻度（8-11%）で分離された。砂粒表面の凹部は微生物の好適な住み場所であり、種々の細菌の他に硅藻なども付着した様子が走査電顕像から確認された（松田, 1991）。また、砂粒表面には海水中の多糖などの溶存有機物が吸着され、近傍に生息する微生物の栄養源となっていると推定される。砂粒子間隙には、体長 0.5-2.0 mm 以下の多様な間隙生物群として繊毛虫類、有孔虫類、線虫類やクマムシ類などが生息し、砂粒表面や間隙で増殖した微生物などを捕食する。これらの微小動物群はより大型（体長 1.0 cm 以上）の甲殻類や魚類などに捕食される。このように、基本的には低栄養環境の海岸砂層中には、細菌や原生動物さらには微小動物から大型の動物に至る食物網が形成されている。微生物群や微小動物群による砂層中での有機物の変換や移動の過程は、砂浜の海水浄化にも寄与している。この過程で、粘液細菌は捕食性微生物の一員として、*Bdellovibrio* や滑走性細菌（バクテロイデス門細菌）などとともに、一定の役割を担っていると推察されるが、その過程に関する定量的情報は無い。しかし先に示したように、砂や泥の試料からの粘液細菌の出現率は 20% 以上と高頻度であったことから、粘液細菌群は海岸環境の砂泥粒子表面、あるいは粒子

間隙の菌叢中の重要な構成員の一つと考えられる。微視的に見た場合、粘液細菌由来の粘質物が砂や泥粒子の凝集しやすさなどの物理的性状に影響を与え、細菌や他の微生物の生息場所の確保に寄与している可能性もある (Raffaelli and Hawkins, 1999)。

第 4 章に示したように、温泉環境由来の試料中では、緑色や暗緑色のバイオマット (微生物被膜) からの粘液細菌の出現頻度が比較的に高く、17 試料中 13 点から粘液細菌によると推定される溶菌性コロニー (swarm) が出現した。この結果より、粘液細菌の生息場所として、砂や泥などの固体微粒子の表面に加えてバイオマトの重要性が示唆された。温泉のバイオマトは、藍色細菌 (シアノバクテリア) やその他の光合成細菌などが固体表面に被膜構造体を形成したものであり、これらの一次生産者が、ほかの多くの微生物に栄養と住み場所を提供している。一次生産者が分泌する多糖や有機物を利用する細菌群、それらを餌とする捕食性細菌群、さらに上位捕食者の原生動物などがマット内で食物網を構成すると考えられる。粘液細菌は温泉バイオマト中の捕食性細菌群の一員として、溶菌や捕食あるいは二次代謝産物の生産などを介し、マット内の細菌群集構造の維持や、原生動物などによる捕食の忌避などに寄与すると推定される。バイオマト中の粘液細菌の分布はさまざまな水圏環境において普遍的と思われ、新規粘液細菌の探索源として、今後はバイオマトを重視すべきと考える。

粘液細菌の生態系での役割について、動物生態学の観点からも類推すると以下のようになる。肉食動物 (捕食者) と草食動物 (被食者) の間には、捕食者による被食者の個体数の調整機構がはたらくとされる。捕食者を生態系から除去すると、草食動物の個体数が過剰となり、餌となる植物の枯渇や、草食動物集団内の健康度の低下が生じ、生態系の安定度が低下する、とされる。このような捕食者は、生態系の安定性維持に重要な役割を果たすという意味で「要石 (key stone) の種」と呼ばれる (Raffaelli and Hawkins, 1999)。粘液細菌を含む捕食性細菌は、人工的な培養環境である細菌塗抹 (あるいは重層) 寒天培地上では、確かにグラム染色陰性細菌の細胞を溶解し栄養源として利用するように、土壤環境中では捕食性微生物群の一構成員である (Lueders *et al.*, 2006)。粘液細菌の生育は遅いために捕食効率は高くはないが、グラム染色陰性菌の旺盛な増殖を抑制していると推定される。それに加え、粘液細菌は真核生物に対し強い毒性を示す二次代謝産物を生産することがあり、カビ菌糸の旺盛な生育、あるいは原生動物や線虫等による捕食を抑制している可能性もある。このように、粘液細菌は環境中で微生物群集構造全体の維持に寄与するキーストン種の一つかもしれない。

## 6.2 新規粘液細菌の系統分類学的位置づけ

第 3 章に示したように、Na<sup>+</sup> などの海水中のカチオンを生育に要求する海洋性粘液細菌は、本研究によって北海道から南西諸島まで日本沿岸に広く分布することが示された。

それらの分離株の大部分は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統からはナノシステイス科に帰属したが、既知の粘液細菌とは属レベルで異なる分類群と判明した。これらの新規な海洋性粘液細菌は、系統樹上からは、7つのグループ (OTU-1 から OTU-7) に大別可能であり、各 OTU はそれぞれ新属・新種に相当すると考えられた。これらの中から、OTU-1 および OTU-2 に対する新属・新種としてそれぞれ *Plesiocystis pacifica*、*Enhygromyxa salina* を提唱した。一方、河口域などの汽水環境や海岸土壌環境からも、NaCl 添加により生育が促進されるが、生育至適 NaCl 濃度が海水よりも低い (0.5–1.0% [w/v]) 汽水性粘液細菌が分離された。それらの分離株は、先の 7 グループの中では、OTU-3 および OTU-4 に位置付けられ、それぞれに対して、新属・新種名 *Pseudenhygromyxa salsuginis*、および *Paraliomyxa miuraensis* を提唱した。

さらに、第 4 章に示したように、50°C で生育する高温性粘液細菌の探索を行い、温泉環境における新規な粘液細菌の存在を示唆する培養物を得たが、粘液細菌の純化は困難であった。それらの培養物中の粘液細菌に相当する 6 クロームは、16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析によれば、既知の陸生粘液細菌からは、種もしくは属レベル以上の隔たりがあると考えられる。

海洋性細菌と推定される培養物 SIB-1 からのクローム：SIBN-17 は、ソランギウム (*Sorangium*) 亜目もしくはナノシステイス (*Nannocystineae*) 亜目、および *Sandaracinus* 属 (Mohr *et al.*, 2012) との類縁性が示された (第 4 章, 図 4-3; 図 4-4)。このクロームは、既知の陸生粘液細菌や本研究で得た海洋性粘液細菌からは、科レベル以上の系統分類上の隔たりがあり、海洋性粘液細菌のさらなる多様性を示している。

淡水温泉由来の培養物 AT-1 については、AT-1 の 2 クロームの一つ AT1-01 は、陸生粘液細菌のソランギウム亜目との類縁性が示され (表 4-11; 図 4-3)、とくに *Phaselicystis flava* SBKo001 (Garcia *et al.*, 2009) と比較的に近縁であり、近縁の新属菌に分類されると考えられる。一方、AT1-02 は淡水の陸上温泉の由来であるが、分子系統上では *Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> とは種レベルで近縁である。淡水の陸上温泉由来の培養物：AT-3 の 3 クロームはそれぞれ異なる分類群に位置し、AT3-01 はソランギウム亜目と、AT3-03 と AT3-09 はナノシステイス亜目と比較的に近縁であった。AT3-09 は先の AT1-02 と同様、海洋性粘液細菌 *Enhygromyxa salina* SHK-1<sup>T</sup> と種レベルで近縁である (表 4-11; 図 4-3; 図 4-4)。AT3-01 は、近年に粘液細菌の新属新種として報告された *Labilithrix luteola* B00002<sup>T</sup> 株 (Yamamoto *et al.*, 2014) と比較的に近縁の新属菌として分類するのが妥当である。AT3-03 は *Kofleria* 属との類縁性が示唆されたが、類似度は 92% と低い値であり、新科に相当する粘液細菌と考えられる。

以上のように、海洋性粘液細菌および温泉由来の高温性粘液細菌の系統解析から、ナノシステイス科の粘液細菌群が、きわめて多様な生理的性質の菌株を含むことが、本研究により明らかとなった。とくに、OTU-2 に属する *Enhygromyxa salina* については、第 3

章で報告した海洋性粘液細菌のほかに、16S rRNA 遺伝子配列の系統からは同種相当であるにもかかわらず、淡水性でしかも高温性の菌株の存在が示唆された。したがって、クローン AT1-02 やクローン AT3-09 に相当する粘液細菌が今後に分離されれば、第 3 章で提唱した海洋性粘液細菌としての *Enhygromyxa salina* に関する分類学的記載を改める必要が生じるであろう。ナノシスティス科の粘液細菌としては、第 4 章に示したように、45°C までは生育できる菌株として、SYM-1 株 (OTU-7) が得られており、今後はこの近縁菌株からも、50°C で生育可能な高温性菌株が見いだされる可能性はあると考えられる。これに対して、OTU-1 に属する *Plesiocystis* 属については、本研究の探索結果からは 3 株しか得られておらず、現時点での観察によれば、常温性の海洋性粘液細菌のみから構成されるようである。

陸生の常温性粘液細菌として記載された *Phaselicystis* 属や *Labilithrix* 属あるいは *Kofleria* 属についても、本研究から、比較的近縁の粘液細菌として、50°C で生育する高温性粘液細菌を含むが示唆される。したがって、高温性の粘液細菌については、多様な属種の菌株が、今後にも新たに発見される可能性があると思われる。

近年、非培養的手法によって、環境中の粘液細菌の分布を調べる研究が行われるようになった。粘液細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に特異的な PCR プライマーを用いて海洋底泥試料中の粘液細菌の配列を増幅し、分子系統解析を行った知見が報告された (Jiang *et al.*, 2010; Brinkhoff *et al.*, 2012)。それらによれば、海洋底泥試料中には、陸生の粘液細菌とは系統的に大きく隔たった粘液細菌群が存在することが示唆されている。たとえば、沿岸底泥中の新規・未培養の粘液細菌群、MMC (exclusively marine myxobacteria cluster) は、既知の陸生の粘液細菌との類縁性について、ソランギウム亜目と比較的に近縁だったが (Brinkhoff *et al.*, 2012)、異なる新規な亜目に分類するのが妥当と考えられる。これらの知見から、本研究で取得された海洋性粘液細菌は、海洋環境に生息する、新規・未培養粘液細菌のなかの、ごく一部分を構成するに過ぎないことが明らかである。すなわち、海洋環境中の粘液細菌分類群は、まだ大部分が未分離のままであると考えられ、それらの性質についても当然ながら未知である。さらに近年は、淡水の湖沼底泥中にも固有の系統の粘液細菌が生息していることが示唆された (Li *et al.*, 2012)。それらも未分離のため、今後の研究による性質の解明が期待される。

### 6.3 医薬資源としての粘液細菌—課題と展望

粘液細菌に関しては、第 2 章に紹介したように、放線菌に比べて探索の歴史は短い、40 年ほどの間に、100 種以上の基本骨格と 350 種の構造類縁体を含む約 650 の物質が得られ、その大半は新規物質だった (Gerth *et al.*, 2003)。しかも近年に至っても、粘液細菌由来の新規物質の発見は続いている。しかし、新規医薬品の候補物質の有望な探索源

とされながら、今までに医薬として製品化された物質は、唯一 *epothilone* のみである。このように、粘液細菌の探索が期待ほどの成果を挙げていない最大の理由は、従来から研究されてきた陸生粘液細菌、あるいは本研究で分離した海洋性粘液細菌ともに、効率的な分離方法がないことによる。効率的な探索を行なう上で、分離操作に供試する試料中における粘液細菌の分布や、二次代謝産物の生産の有無、あるいはそこに生息する粘液細菌の生理的性質について、分離操作の前にあらかじめ明らかにしておく必要があると考えられる。試料の選択についても、従来のような土壌や腐った植物体、あるいは本研究で行った海岸の砂などからの探索では、得られる菌株の多様性や二次代謝産物の生産能について、一定の限界が出てくる可能性がある。

第3章で述べたような、細菌溶解性やセルロース分解性、あるいは NaCl 要求性に着目した好気性の粘液細菌の分離法のほかに、これらとは異なる代謝活性や生理的性質に基づいた分離法の開発も今後の課題である。さらに、分離株の物質生産能を効率的に正しく評価する方法も未確立であるが、第5章では、培養液からの吸着樹脂による物質の回収、溶媒による抽出および抽出液の濃縮、などの一連の手間のかかる工程をへたのちに、抗菌活性などの検討を行ったことを述べた。本研究で得たミウラエナミドの場合も、*miuraenamide A(1)* の収量は培養液 17.9 L から 2.6 mg であり、1 L あたり 0.145 mg と少ない生産量であった。従来からの、培養法により試料を調製し抗菌活性を評価する方法では、第5章に示したように、活性が再現しなくなったり、あるいは活性が検出されても生産物が微量もしくは不安定なことが原因となり、物質の同定に至らなかった場合もあった。このような結果から、新規な粘液細菌を分離しても、その菌株の潜在的な物質生産能が評価できていない、という問題点が明らかになった。

第5章の考察にも述べたように、海洋性粘液細菌についての、ポリケチド生合成系の遺伝子 (*type I polyketide synthase*) の検出および系統解析 (本博士論文業績報告書、Komaki *et al.*, 2008) からも、培養法による物質生産能の判定の限界が示された。新規性が高いと考えられる *type I polyketide synthase* 遺伝子の複数の配列が、培養法では抗菌活性が陰性の海洋性粘液細菌からも検出された。とくに、抗真菌活性がまったく検出されなかった *Plesiocystis pacifica* SIR-1<sup>T</sup> 株についても、ポリケチド生合成系の遺伝子が見いだされたことにより、この菌株による二次代謝産物の生産の可能性が示された点は特筆される。

粘液細菌の探索に伴う困難な問題点として、前節にも述べたように、環境中における粘液細菌の分布や代謝活動が明らかでないことが挙げられる。これに対しては、メタゲノムやメタトランスクリプトーム解析により、手がかりが得られることが示唆されつつある。たとえば、モデル水田環境のメタトランスクリプトーム解析 (Kim and Liesack, 2015) により、水田環境における粘液細菌の分布や代謝活動の一端が明らかになった。すなわち、表層の有酸素層にはポリアンギウム (*Polyangiaceae*) 科、ナノシスティス科

およびハリアンギウム (*Haliangiaceae*) 科の粘液細菌が生息し、二次代謝産物の生産や、硝酸・亜硝酸の還元、糖分解あるいは糖転移反応を行い、下層の嫌気層には、*Anaeromyxobacter* 属が生息し、二次代謝産物の生産は行わず、芳香族化合物の分解や糖分解あるいは糖転移反応を行うことが示されている。なお、先行研究 (不藤, 2002) において、ハリアンギウム科の粘液細菌は海洋性粘液細菌として記載されているが、この結果からは水田もしくは淡水環境における分布も示唆された点は興味深い。この知見が正しければ、水田や淡水湖沼環境もハリアンギウム科の新規粘液細菌の探索源として有望と思われる。

生理活性物質の探索源としては、ここ 20 年ほどの間に、海洋生物が注目されている (竹山・横内, 2006; 高田・松永, 2013)。とくに海綿については、クロイソカイメン由来の Halichodrin B の誘導体エリブリン (ハラヴェン) が抗がん剤としてエーザイ株式会社により商品化され、販売されている。それ以外にも抗がん剤候補とされている物質が多数あり、それらの物質のかなりの部分については、海綿に共生する "*Entotheonella*" と名付けられた細菌が生産することがメタゲノム解析で示され、これらの新規細菌について未分離であるものの新門 "*Tectomicrobia*" が提唱されている (Wilson *et al.*, 2014)。本研究の業績報告書の文献 (Oclarit *et al.*, 1994) にも示したように、海綿内部には、放線菌や藍色細菌を含む細菌、カビなど多様な微生物が共生もしくは寄生し、海綿由来の生理活性物質の一部は共生菌が生産すると推定されており、その点を実証されたことになる。本研究との関連で注目すべきは、海綿由来物質の化学構造が粘液細菌の代謝産物と類似する例があることである。第 5 章にも述べたように、海綿由来デブシペプチド jaspakinolide (jaspamide) の類似物質 chondramide が陸生粘液細菌 *Chondromyces crocatus* から得られた (Kunze, 1995)。この例は、海綿に共生した粘液細菌が jaspamide を生産した可能性を示唆した。Chondramide はアクチン脱重合阻害作用を示すので、抗癌剤リード化合物などへの応用が期待され (Sasse *et al.*, 1998)、ミウラエナミドと構造が類似している点も興味深い。アクチンは真核細胞内で最も多量に存在するタンパク質で微小繊維を構成し、細胞運動や形状保持あるいは細胞間接着や細胞質分裂など重要な生命現象や、癌の増殖や転移にも関与するため、抗癌剤の標的分子の一つとして重視されている (Tanaka *et al.*, 2006; 田中, 2007)。ほかの例としては、海綿由来の抗真菌環状ペプチド microsclerodermin 類について、陸生粘液細菌 *Jahnella* sp.などに生合成系遺伝子が見いだされた。この例からも、粘液細菌が海綿に共生し、本物質を生産している可能性が示唆された (Hoffmann *et al.*, 2013)。陸生粘液細菌 *Myxococcus* 属細菌が生産する bengamide 類も、海綿由来化合物との類似性が指摘された (Johnson *et al.*, 2012)。また近年、*Enhygromyxa* 属の海洋性粘液細菌から見いだされた salimyxin や enhygrolides (第 5 章, 図 5-13) についても、海綿由来化合物との類似性が報告された (Felder *et al.*, 2013b)。以上のような例はあるものの、2015 年 11 月の現時点において、海綿から粘液

細菌を検出もしくは分離し、培養に成功したという報告はない。本研究においても、第 3 章で述べたように、海綿を含む海岸動物から粘液細菌の分離を試みたが、混在するバクテロイデス門細菌と思われる滑走性細菌が優勢に生育し、粘液細菌は分離できなかった。今後は、新たな分離手法の導入などにより、海綿に共生する粘液細菌を分離する必要がある。

近年は、植物体内に共生する糸状菌や細菌も、二次代謝産物の生産への関与が注目されている (Zhan *et al.*, 2007; Ludwig-Müller, 2015)。植物体と粘液細菌の共生については、まったく知られていないが、非培養的な手法 (RT-PCR) によりインドの砂漠の植物 (*Lasiurus indicus*) の根から、海洋性粘液細菌 *Enhygromyxa salina* の 16S rRNA に 98.6% の相同性を有するクローン PR5 が検出された (Chowdhury *et al.*, 2009)。この報告は、前述の温泉環境における *Enhygromyxa salina* の分布を示唆する本研究の結果とともに、*Enhygromyxa* 属細菌の生息環境の予想外の多様性を示している点で注目される。

*Enhygromyxa salina* においては、新規二次代謝産物の生産能も明らかにされた (Schäberle *et al.*, 2010; Felder *et al.*, 2013a, b) ので、今後は、淡水環境や海綿、植物根圏などの新規な探索源からの *Enhygromyxa* 属細菌の分離を、試みる必要があると考える。ただし、その際に、本研究で行ったような大腸菌塗抹法では、粘液細菌の集積培養が成功しない可能性もあり、近年に注目される新しい集積培養法の導入も必要であろう。そのような新技法の一つ、いわゆる iChip を用いる方法では (Ling *et al.*, 2015)、半透膜で外界と仕切られた多数の小孔中に寒天培地を保持した長方形の板を、自然環境中に埋め込むことで、人工的な条件下では培養困難な低栄養細菌などの集積培養を行う。海綿動物や植物体内の溶液組成を再現した培養液中に iChip を浸し、一定の流速で送液すれば、大腸菌塗抹法では集積培養が困難な菌の生育が可能となるかもしれない。

粘液細菌の探索については、以上の様な探索源の選択、すなわち「どこから分離するか」という問題や集積培養の方法に加えて、効率的な分離方法や、分離菌株の物質生産能の適切な評価方法の開発、といった課題がある。分離方法について、本研究では、グラム染色陰性細菌の生き餌を用いた集積培養法に従った。しかし、この方法は第 3 章の 図 3-2 に示したように、かなりの時間と労力を要する一連の移植操作を伴うため、効率的な分離方法ではない。第 4 章で明らかのように、温泉由来の粘液細菌の場合には、このような方法での純化は成功しなかったため、異なる分離手法、例えば光ピンセット (optical tweezer) 法の導入などが必要であろう。光ピンセット法は、今日でも難培養性細菌の分離に利用されている (Nowka *et al.*, 2015)。この技法は、近年には、シングルセルゲノミクス (SCG) 解析のための微生物細胞の分取にも用いられる (モリ 2015)。フローサイトメトリーに基づいた FACS (fluorescence activated cell sorting) 法も、SCG 解析のための細胞分取法として用いられ、先の実験で海綿共生細菌 '*Tectomicrobia*' の研究にも応用された (Wilson *et al.*, 2014)。さらに環境中の未培養細菌の SCG 解析にも大規模に適用

され、多くの新知見をもたらしている (Rinke *et al.*, 2013)。これら二つの方法は、専用の高価な装置や操作技法の高度な習熟を要し、簡便な方法ではないが (モリ 2015)、粘液細菌の細胞の分取・分離に利用できそうであり、さらに SCG と組み合わせれば、遺伝情報の解析にも役立つと予想され、注目すべき技法である。

粘液細菌は概して生育速度が遅く、培養困難な菌株が多い。そのため分離あるいは培養評価以前に、ある特定の試料中の粘液細菌の分布や、さらに潜在的な二次代謝産物の生産能までも予測することができれば、従来のような非効率的な粘液細菌の探索研究に、大きな革新をもたらす可能性がある。SCG 解析は、‘*Tectomicrobia*’ の研究例でも示されたように、培養困難な環境中の微生物の二次代謝経路や代謝産物の予測にも利用できるため、粘液細菌の研究に応用すれば、探索の効率化に有用と考えられる。

さいごに、以上の様な新技法により、新規な粘液細菌が新規物質の生産能を有することが仮に判明したとしても、培養できないこともあると予想される。そのような場合の対策は既に報告された。たとえば、抗がん剤のリード化合物 *epothilone* の場合は、Kosan Biosciences, Inc. が生合成系の PKS 遺伝子群の塩基配列を決定し、*Sorangium* 属菌より培養が容易な粘液細菌 *Myxococcus xanthus* にその遺伝子群を導入し、蓄積量  $25 \text{ mg L}^{-1}$  を達成した (Julien *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2002)。また、GBF では遺伝子発現用宿主として、倍加時間が 3-4 hr 以下で *M. xanthus* より増殖が速い高温性粘液細菌 *Coralloccoccus macrosporus* GT-2 を分離した (Gerth *et al.*, 2003)。その染色体上に、陸生粘液細菌 *Stigmatella aurantiaca* 由来の *myxochromide* の生合成遺伝子群を導入し、さらに promoter 交換も行い、元株の蓄積量  $8 \text{ mg L}^{-1}$  から  $600 \text{ mg L}^{-1}$  へと増加させた (Perlova *et al.*, 2009)。本研究で得た海洋性粘液細菌の分離株の中には、 $45^{\circ}\text{C}$  でも生育する高温性のナノシステイス科の海洋性粘液細菌 SYM-1 株 (第 4 章, 表 4-13) の生育が比較的に早かったため、上記のような二次代謝産物の生合成遺伝子の導入用宿主として、今後の検討に値すると考える。本研究で見出したミウラエナミドについても、生産量は  $0.145 \text{ mg L}^{-1}$  と少なく、上記のような手法により生産量を増加させる必要がある。

他方で、放線菌の場合には、物質生産遺伝子群の発現がスカンジウムなどの希土類元素の添加により増強され、物質生産量が増えた例が報告された (Ochi and Hosaka, 2012)。また、放線菌 (*Streptomyces*) の二次代謝産物 (goadsporin) が他の放線菌の物質生産を促進したり (Onaka *et al.*, 2001)、他の細菌 (*Tsukamurella pulmonis*) との共培養により放線菌の物質生産が誘導された例も示された (Onaka *et al.*, 2011)。あるいは HDAC 阻害剤の添加により、放線菌の二次代謝産物の生産が誘導された例 (Moore *et al.*, 2012) もあり、粘液細菌の場合も同様の手法の有効性を検証する必要があるだろう。

今後は、以上の様な展望のもとで、粘液細菌の生態に関する新知見や、環境ゲノム情報の新たな解析手法、あるいは新たな分離手法の積極的な導入により、海洋環境や温泉環境、あるいは動植物体内からの新規な粘液細菌の探索を加速することが、新たな医薬

候補となるような新規物質の発見につながっていくであろう。

その一方で、本研究で一定の有効性が示された、グラム染色陰性細菌の生き餌を用いた集積培養法についても、未検討の課題があることを付言しておく。海洋性粘液細菌の探索において、集積培養には、NaCl を  $15 \text{ g L}^{-1}$  含む S75-15 寒天培地（第 3 章，表 3-3）をおもに用いた。その結果として得られた分離株の多くは、表 3-17 に示すように、至適の生育 NaCl 濃度が  $10\text{--}20 \text{ g L}^{-1}$  であった。したがって、集積培養培地の NaCl 濃度をより高い濃度、たとえば  $30\text{--}60 \text{ g L}^{-1}$  に設定すれば、より多様な菌株が分離される可能性がある。温泉環境における高温性粘液細菌の探索については、 $50^\circ\text{C}$  で集積培養を行った結果、得られた粘液細菌様培養物の生育温度上限は表 4-13 に示すように、 $50\text{--}51^\circ\text{C}$  であった。より高温の  $55\text{--}60^\circ\text{C}$  での探索は今後の課題である。生き餌として用いるグラム染色陰性細菌の菌種についても、試料採集地点に優先的に生息する菌種をあらかじめ分離してから使用することで、分離効率や分離菌株の多様性が異なってくるかもしれない。たとえば、海岸環境の場合には、大腸菌よりも *Vibrio sp.* や *Halomonas sp.* などが、生き餌としてより好適かもしれない。セルロース分解性の粘液細菌の探索については、土壌試料で有効だったろ紙分解法は、海岸や温泉に由来する試料では有用性が見いだせなかった。ろ紙以外の集積培養用の基質として、誘導体化したセルロース（カルボキシメチルセルロースなど）や海藻成分のアルギン酸、あるいは、節足動物の甲殻成分のキチン、キトサンなども有効性の検討の余地があろう。さらに、近年、次に示すように、海洋性粘液細菌の基質として、臭素化ハロアルカンやゴム質など意外な物質の資化性が示唆され、それらの物質が集積培養の基質として利用できるかもしれない。

医薬探索の本題からはそれるが、ここ数年の間に海洋性粘液細菌の研究には幾多の重要な進展が見られた。例えば、ゲノム情報の活用、いわゆる“genome-mining”の手法により、海洋性粘液細菌のゲノム情報に基づいて新規酵素が次々に発見され、*Plesiocystis pacifica* から、haloalkane dehalogenase (Hesseler *et al.*, 2011) の、*Haliangium ochraceum* からは rubber oxygenase (Birke *et al.*, 2013) の類似塩基配列が確認された。それらを *E. coli* へ導入し生産されたタンパクは、前者の場合は 1-bromobutane の脱ハロゲン化反応を、後者では天然ゴムの成分である polyisoprene の分解をそれぞれ触媒した。また、*Haliangium ochraceum* からは、機能未知の規則的構造のタンパク質が見いだされ、ナノ材料への応用が試みられている (Lassila *et al.*, 2014)。

ここまで述べてきたような粘液細菌由来の新規物質や酵素が、人類の健康と福祉や産業の新興に貢献できることを切に願って、本論文の締めくくりとしたい。

## 引用文献

1. **Abraham, E. P. and Chain, E.** (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**, 837-837.
2. **Ahn, J.-W., Jang, K.-H., Chung, S.-C., Oh, K.-B., and Shin, J.** (2008). Sorangiadenosine, a new sesquiterpene adenoside from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Org. Lett.* **10**, 1167-1169.
3. 天児和暢 (1988) 微生物学の歴史. 森良一, 天児和暢 (編), 戸田新細菌学 第 29 版, 南山堂, 東京, pp. 6-7.
4. 青井議輝, 波田徹, 常田聡 (2006). 分離培養技術の進展. 生物工学会誌 **84**, 444-447.
5. 青木正和 (2007). XDR-TB (超多剤耐性結核). 複十字 **No. 315**, 16-17.
6. **Apel, C., Barg, A., Rheinberg, A., Conrads, G., and Wagner-Döbler, I.** (2013). Dental composite materials containing carolacton inhibit biofilm growth of *Streptococcus mutans*. *Dent. Mater.* **29**, 1188-1199.
7. **Arahal, D. R., Castillo, A. M., Ludwig, W., Schleifer, K. H., and Ventosa, A.** (2002). Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the Family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 207-211.
8. **Bai, R., Verdier-Pinard, P., Gangwar, S., Stessmann, C. C., McClure, K. J., Sausville, E. A., Pettit, G. R., Bates, R. B., and Hamel, E.** (2001). Dolastatin 11, a marine depsipeptide, arrests cells at cytokinesis and induces hyperpolymerization of purified actin. *Mol. Pharmacol.* **59**, 462-469.
9. **Bai, R., Covell, D. G., Liu, C., Ghosh, A. K., and Hamel, E.** (2002). (-)-Doliculide, a new macrocyclic depsipeptide enhancer of actin assembly. *J. Biol. Chem.* **277**, 32165- 32171.
10. **Baumgartner, M., Yapi, A., Gröbner-Ferreira, R., and Stetter, K. O.** (2003). Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* n. sp., an extremely thermophilic amoeba thriving in hot springs. *Extremophiles* **7**, 267-274.
11. **Bender, H.** (1962). Untersuchungen an *Myxococcus xanthus*. I. Bildungsbedingungen, Isolierung und eigenschaften eines bakteriolytisches enzymesystems. *Arch. Mikrobiol.* **43**, 262-279.
12. **Birke, J., Röther, W., Schmitt, G., and Jendrossek, D.** (2013). Functional identification of rubber oxygenase (RoxA) in soil and marine myxobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 6391-6399.
13. **Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W.,**

- Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462.
14. **Bohnert, J. A., Schuster, S., and Kern, W. V.** (2013). Pimozide inhibits the AcrAB-TolC efflux pump in *Escherichia coli*. *Open Microbiol. J.* **7**, 83-86.
  15. **Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, A., and Béjar, V.** (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1625-1632.
  16. **Breitbart, M., Wegley, L., Leeds, S., Schoenfeld, T., and Rohwer, F.** (2004). Phage community dynamics in hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1633-1640.
  17. **Brinkhoff, T., Fischer, D., Vollmers, J., Voget, S., Beardsley, C., Thole, S., Mussmann, M., Kunze, B., Wagner-Döbler, I., Daniel, R., and Simon, M.** (2012). Biogeography and phylogenetic diversity of a cluster of exclusively marine myxobacteria. *ISME J.* **6**, 1260-1272.
  18. **Brockman, E. R.** (1967). Fruiting myxobacteria from the South Carolina coast. *J. Bacteriol.* **94**, 1253-1254.
  19. **Brooks, R. S., Blanchard, M. T., Anderson, M. L., Hall, M. R., and Scott, J. L.** (2011). Quantitative duplex TaqMan real-time polymerase chain reaction for the assessment of the etiologic agent of epizootic bovine abortion. *J. Vet. Diagn. Invest.* **23**, 1153-1159.
  20. **Bull, C. T.** (2005). Biological control of lettuce drop caused by *Sclerotinia Minor* by myxobacteria. In Proceedings of the 32nd International Conference on the Biology of the Myxobacteria, July 2005, Harrison Hot Spring, British Columbia, Canada. p. 5.
  21. **Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S., and Venter, J. C.** (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-1073.
  22. **Cass, R. T., Brooks, C. D., Havrilla, N. A., Tack, K. J., Borin, M. T., Young, D., and Bruss, J. B.** (2011). Pharmacokinetics and safety of single and multiple doses of ACHN-490 injection administered intravenously in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5874-5880.
  23. **Castro, C. N., Freitag, J., Berod, L., Lochner, M., and Sparwasser, T.** (2015). Microbe-associated immunomodulatory metabolites: Influence on T cell fate and function. *Mol. Immunol.* in press, doi: 10.1016/j.molimm.2015.07.025.
  24. **Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J.,**

- and Sanders, A. G.** (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 236, Issue 6104, 226–228. Originally published as Volume 2, Issue 6104.
25. **Chen, C. I., King, D. P., Blanchard, M.T., Hall, M. R., Aldridge, B. M., Bowen, L., and Stott, J. L.** (2007). Identification of the etiologic agent of epizootic bovine abortion in field-collected *Ornithodoros coriaceus* Koch ticks. *Vet. Microbiol.* **120**, 320-327.
  26. **Cheng, Y.-Y., Qian, Y.-K., Li, Z.-F., Wu, Z.-H., Liu, H., and Li, Y.-Z.** (2011). A novel cold-adapted lipase from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2: gene cloning, expression, and enzymatic characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 6765-6780.
  27. **Chiura, H. X.** (2002). Broad host range xenotrophic gene transfer by virus-like particles from a hot spring. *Microbes Environ.* **17**, 53-58.
  28. **Chiura, H. X. and Umitsu. M.** (2004). Isolation and characterisation of broad-host range gene transporter particles from geo-thermal vent of the Toyoha mine. *Microbes Environ.* **19**, 20-30.
  29. **Chowdhury, S. P., Schmid, M., Hartmann, A., and Tripathi, A. K.** (2009). Diversity of 16S-rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus syndicus*. *Eur. J. Soil. Biol.* **45**, 114-122.
  30. **Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R., and Tiedje, J. M.** (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **42**(Database issue), D633-642.
  31. **Collins, M. D. and Widdel, F.** (1986). Respiratory quinines of sulphate-reducing and sulphur-reducing bacteria: a systematic investigation. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**, 8-18.
  32. **Colwell, R. R. and Huq, A.** (1994). Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In Wachsmuth, I. K., Blake, P. A. and Osvik, O. (ed.), *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives, American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 117-133.
  33. **Davidov, Y. and Jurkevitch, E.** (2004). Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1439-1452.
  34. **Dawid, W.** (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 403-427.
  35. **Dömling, A. and Richter, W.** (2005). Myxobacterial epothilones and tubulysins as promising anticancer agents. *Mol. Divers.* **9**, 141-147.
  36. **Ducati, R. G., Ruffino-Netto, A., Basso, L. A and Santos, D. S.** (2006). The resumption of

- consumption- a review on tuberculosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**, 697-714.
37. **Ducry, L and Stump, B.** (2010). Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug. Chem.* **21**, 5-13.
  38. **Dworkin, M.** (1962). Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**, 250-257.
  39. **Dworkin, M.** (2000). Introduction to the Myxobacteria. *In* Brun, Y.V. and Shimkets, L.J., (ed.), Prokaryotic Development, pp. 221-242.
  40. **Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M. A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., and 87 co-authors.** (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435**, 43-57.
  41. **Fang, J. and Beattie, D. S.** (2003). External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radical. Med.* **34**, 478-488.
  42. **Felder, S., Dreisigacker, S., Kehraus, S., Neu, E., Bierbaum, G., Wright, P. R., Menche, D., Schäberle, T. F. and König, G. M.** (2013a). Salinibromide: unexpected chemistry from the obligate marine myxobacterium *Enhygromyxa salina*. *Chemistry* **19**, 9319-9324.
  43. **Felder, S., Kehraus, S., Neu, E., Bierbaum, G., Schäberle, T. F. and König, G. M.** (2013b). Salimyxins and Enhygrolides: Antibiotic, sponge-related metabolites from the obligate marine myxobacterium *Enhygromyxa salina*. *ChemBioChem* **14**, 1363-1371.
  44. **Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**, 783-791.
  45. **Felsenstein, J.** (1989). PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
  46. **Fok, W.C., Chen, Y., Bokov, A., Zhang, Y., Salmon, A. B., Diaz, V., Javors, M., Wood, W. H. 3<sup>rd</sup>, Zhang, Y., Becker, K. G., Pérez, V. I., and Richardson, A.** (2014). Mice fed rapamycin have an increase in lifespan associated with major changes in the liver transcriptome. *PLoS One*, **9**, e83988.
  47. **Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., and other 19 authors.** (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-404.
  48. **不藤亮介, 山中茂** (1992). バイオサイエンスとインダストリー **50**, 201.
  49. **不藤亮介** (2002). 海洋性粘液細菌に関する研究 —特にその分類学的性質と新規抗真菌物質 haliangicin に関して—. 名古屋大学博士論文
  50. **Garcia, R. O., Reichenbach, H., Ring, M. W. and Müller, R.** (2009). *Phaselicystis flava*

- gen. nov., sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of *Phaselicystidaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1524-1530.
51. **Garcia, R., Pistorius, D., Stadler, M. and Müller, R.** (2011). Fatty acid-related phylogeny of myxobacteria as an approach to discover polyunsaturated omega-3/6 fatty acids. *J. Bacteriol.* **193**, 1930-1942.
  52. **Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Höfle, G and Reichenbach, H.** (1994). The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria). I.Soraphen A1 $\alpha$ : fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* **47**, 23-31.
  53. **Gerth, K. and Müller, R.** (2005). Moderately thermophilic myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microbiol.* **7**, 874-880.
  54. **Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S and Müller, R.** (2003). Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biotechnol.* **106**, 233-253.
  55. **Gerth, K., Steinmetz, H., Höfle, G. and Jansen, R.** (2008). Chlorotonil A, a macrolide with a unique *gem*-dichloro-1,3-dione functionality from *Sorangium cellulosum*, So ce1525. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 600-602.
  56. **Gillespie, D. C. and Cook, F. D.** (1965). Extracellular enzymes from strains of *Sorangium*. *Can. J. Microbiol.* **11**, 109-118
  57. **Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G.** (1996). Life with 6000 genes. *Science* **546**, 563-537.
  58. **Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J., Ronning, C. M., Barbazuk, W. B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H. S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S. A., Vaudin, M., Wiegand, R. and Kaplan, H. B.** (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 15200-15205.
  59. **Gray, J. P. and Herwig, R. P.** (1996). Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4049-4059.
  60. **Guo, W. J. and Tao, W. Y.** (2008). Phoxalone, a novel macrolide from *Sorangium cellulosum*: structure identification and its anti-tumor bioactivity in vitro. *Biotechnol. Lett.* **30**,

- 349-356.
61. **Hamana, K. and Takeuchi, M.** (1998). Polyamine profiles as chemotaxonomic marker within alpha, beta, gamma, delta, and epsilon subclasses of class *Proteobacteria*: Distribution of 2-hydroxyputrescine and homospermidine. *Microbiol. Cult. Coll.* **14**, 1-14
  62. **Hamana, K., Saito, T., Okada, M., and Niitsu, M.** (2004). Polyamine distribution profiles among some members within delta-and epsilon-subclasses of *Proteobacteria*. *Microbiol. Cult. Coll.* **20**, 3-8
  63. **Han, K., Li, Z-F., Peng, R., Zhu, L-P., Zhou, T., Wang, L-G., Li, S-G., Zhang, X-B., Hu, W., Wu, Z-H., Qin, N., and Li, Y-Z.** (2013). Extraordinary expansion of a *Sorangium cellulorum* genome from an alkaline milieu. *Sci. Rep.* **3**, 2101.
  64. **Hanada, S** (2003). Filamentous anoxygenic phototrophs in hot springs. *Microbes Environ.* **18**, 51-61.
  65. **Harada, K., Fujii, K., Hayashi, K., Suzuki, M., Ikai, Y., and Oka, H.** (1996). Application of d,l-FDLA derivatization to determination of absolute configuration of constituent amino acids in peptide by advanced Marfey's method. *Tetrahedron Letters.* **37**, 3001-3004.
  66. 橋床泰之 (2014). 増えない微生物を培養する. 化学と生物 **52**, 73-75.
  67. 林孝市郎 (1985). 特定微生物の培養計数分離法. 門田元, 多賀信夫 (編), 海洋微生物研究法, 学会出版センター, 東京, pp. 69-80.
  68. **Held, J., Gebru, T., Kalesse, M., Jansen, R., Gerth, K., Müller, R., and Mordmüller, B.** (2014). Antimalarial activity of the myxobacterial macrolide chlorotonil a. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 6378-6384.
  69. **Herrmann, M., Böhlendorf, B., Irschik, H., Reichenbach, H., and Höfle, G.** (1998). Maracin and maracen: new types of ethynyl vinyl ether and  $\alpha$ -chloro divinyl ether antibiotics from *Sorangium cellulorum* with specific activity against mycobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1253-1255.
  70. **Herrmann, J., Elnakady, Y. A., Wiedmann, R. M., Ullrich, A., Rohde, M., Kazmaier, U., Vollmar, A. M. and Müller, R.** (2012). Pretubulysin: from hypothetical biosynthetic intermediate to potential lead in tumor therapy. *PLoS One* **7**, e37416.
  71. **Hesseler, M., Bogdanović, X., Hidalgo, A., Berenguer, J., Palm, G. J., Hinrichs, W., and Bornscheuer, U. T.** (2011). Cloning, functional expression, biochemical characterization, and structural analysis of a haloalkane dehalogenase from *Plesiocystis pacifica* SIR-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 1049-1060.
  72. **Hiraishi, A., Hoshino, Y., and Kitamura, H.** (1984). Isoprenoid quinone composition in the classification of *Rhodospirillaceae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, 197-210.

73. 平石明 (1995a). PCR を利用した 16S rRNA 遺伝子の解析と系統研究-1. 16S rDNA の増幅と制限酵素断片解析. 日本微生物生態学会報 **10**, 31-42.
74. 平石明 (1995b). PCR を利用した 16S rRNA 遺伝子の解析と系統研究-2. 非放射性標識シーケンシング. 日本微生物生態学会報 **10**, 81-102.
75. 平石明 (1995c). PCR を利用した 16S rRNA 遺伝子の解析と系統研究-3. パーソナルコンピュータによる系統解析. 日本微生物生態学会報 **10**, 119-136.
76. 平島義紀 (2009) 糸状菌とナノテクノロジーが融合した新規血管新生阻害剤. Dojin News No.129, 8-9.
77. Hoffmann, T., Müller, S., Nadmid, S., Garcia, R and Müller, R. (2013). Microsclerodermins from terrestrial myxobacteria: an intriguing biosynthesis likely connected to a sponge symbiont. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16904-169011.
78. Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. and Pace, N. R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**, 366-376.
79. Huntley, S., Kneip, S., Treuner-Lange, A. and Søgaard-Andersen. (2013). Complete genome sequence of *Myxococcus stipitatus* strain DSM 14675, a fruiting myxobacterium. *Genome Announc.* **1**, e00100-13.
80. Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531.
81. 生田創 (2005). 1 個の微生物を分離する技術. 生物工学会誌 **83**, 491.
82. Imshenetski, A. A. and Solntseva, L. (1936). On aerobic cellulose-decomposing bacteria (in Russian, with English summary). *Izv. Akad. Nauk SSSR Cl. Sci. Math. Natl. Ser. Biol.* 1115-1172.
83. Irschik, H., Washausen, P., Sasse, F., Fohrer, J., Huch, V., Müller, R. and Prusov, E. V. (2013). Isolation, structure elucidation, and biological activity of maltepolides: remarkable macrolides from myxobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 1-5.
84. 石田祐三郎 (2001). 海水の塩分環境と海洋細菌. 海洋微生物の分子生態学入門—生態学の基礎から分子まで—, 培風館, 東京, pp. 102-104.
85. 石田丈典, 大竹久夫, 池田宰, 諸星知広, 加藤純一 (2006) グラム陰性細菌のクォーラムブロッカー構築の試み. 生物工学会誌 **84**, 495-498.
86. 石川英司 (2012) ラパマイシン標的タンパク質 (TOR) とアンチエイジング食品開発の可能性. 生物工学会誌 **90**, 97.
87. 石川文洋, 荒木通啓, 掛谷秀昭 (2012). 天然物創薬とケモインフォマティクス. *ファルマシア* **48**, 658-662.
88. Ivanova, N., Daum, C., Lang, E., Abt, B., Kopitz, M., Saunders, E., Lapidus, A., Lucas,

- S., Del Rio., T. G., Nolan, M., and 26 co-authors.** (2010). Complete genome sequence of *Haliangium ochraceum* type strain (SMP-2T). *Stand. Genomic Sci.* **2**, 96-106.
89. **Jacobi, C. A., Assmus, B., Reichenbach, H., and Stackebrandt, E.** (1997). Molecular evidence for association between the *Sphingobacterium*-like organism “Candidatus comitans” and the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 719-723.
90. **Jahn, E.** (1924). Beiträge zur Botanischen Protistologie. I. Die Polyangiden. *Gebrüder Borntraeger, Leipzig*
91. **Jiang, D-M., Kato, C., Zhou, X-W., Wu, Z-H., Sato, T., and Li, Y-Z.** (2010). Phylogeographic separation of marine and soil myxobacteria at high levels of classification. *ISME J.* **4**, 1520-1530.
92. **Johnson, T. A., Sohn, J., Vaske, Y. M., White, K. N., Cohen, T. L., Vervoort, H. C., Tenney, K., Valeriote, F. A., Bjeldanes, L. F., and Crews, P.** (2012). Myxobacteria versus sponge-derived alkaloids: the bengamide family identified as potent immune modulating agents by scrutiny of LC-MS/ELSD libraries. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 4348-4355.
93. **Julien, B. and Shah, S.** (2002) Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**, 2772-2778.
94. **Kaichi, S., Hasegawa, K., Takaya, T., Yokoo, N., Mima, T., Kawamura, T., Morimoto, T., Ono, K., Baba, S., Doi, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., and Heike, T.** (2010). Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc. Res.* **88**, 314-323.
95. **Kaiser, D.** (2004) Signaling in myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 75-98.
96. 鎌形洋一 (2006). 難培養微生物の実体. バイオインダストリー **23(11)**, 8-14.
97. **Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., and Tabata, S.** (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* **9**, 189-197.
98. **Karmann, L., Schultz, K., Herrmann, J., Müller, R., and Kazmaier, U.** (2015). Total Syntheses and Biological Evaluation of Miuraenamides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 4502–4507.
99. **Karwowski, J. P., Sunga, G. N., Kadam, S., and McAlpine, J. B.** (1996) A method for the selective isolation of *Myxococcus* directly from soil. *J. Ind. Microbiol.* **16**, 230-236.
100. **Kato, H.** (1955). Notes on myxobacteria. I. The myxobacterial population in alpine soils. *Ecol. Rev.* **14**, 25-28.

101. **Katzenberger, I. and Kausche, G. A.** (1957) Über die Einwirkung von Substanzen aus Myxobakterien auf Viren. *Naturwissenschaften* **44**, 44-45.
102. **Khrapunovich-Baine, M., Menon, V., Yang, C. P., Northcote, P. T., Miller, J. H., Angeletti, R. H., Fiser, A., Horwitz, S. B., and Xiao, H.** (2011). Hallmarks of molecular action of microtubule stabilizing agents: effects of epothilone B, ixabepilone, peloruside A, and laulimalide on microtubule conformation. *J. Biol. Chem.* **286**, 11765-11778.
103. **Kim, Y. and Liesack, W.** (2015). Differential assemblage of functional units in paddy soil microbiomes. *PLoS One* **10**, e0122221.
104. **Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* **16**, 111-120.
105. **Kimura, N.** (2006). Metagenomics: access to unculturable microbes in the environment. *Microbes Environ.* **21**, 201-215.
106. 北川光洋, 田代悦, 井本正哉 (2014). オートファジーに挑むケミカルバイオロジー. *化学工業* **4**, 271-275.
107. 北野康 (1991). 地球の進化と海水中の化学成分. 日本海洋学会 (編), 海と地球環境, 東京大学出版会, 東京, pp. 87-96.
108. **Kopp, M., Irschik, H., Pradella, S., and Müller, R.** (2005). Production of the tubulin destabilizer disorazol in *Sorangium cellulosum*: Biosynthetic machinery and regulatory genes. *ChembioChem* **6**, 1277-1286.
109. **Krzemieniewska, H. and Krzemieniewski, S.** (1926). Miksobakterje Polski. *Acta Soc. Botan. Polon.* **4**, 1-54
110. **Krzemieniewska, H. and Krzemieniewski, S.** (1937). Die zellulosezersetzenden Myxobakterien. *Bull. Acad. Pol. Sci. Lett. Classe. Sci. Math. Nat. Sér. B(I)*, 11-31
111. 工藤俊章, 大熊盛也 (2006). 難培養微生物の利用研究の最前線: 特集にあたって. *バイオインダストリー* **23(11)**, 5-14.
112. **Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., and other 141 authors.** (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
113. **Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Höfle, G., and Reichenbach, H.** (1995). Chondramides A-D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiotic.* **48**, 1262-1266.
114. **Kunze, B., Steinmetz, H., Höfle, G., Huss, M., Wieczorek, H., and Reichenbach, H.** (2006). Cruentaren, a new antifungal salicylate-type macrolide from *Byssovorax cruenta*

- (Myxobacteria) with inhibitory effect on mitochondrial ATPase activity. Fermentation and biological properties. *J. Antibiot.* **59**, 664-668.
115. **Kunze, B., Böhlendorf B., Reichenbach, H., and Höfle, G.** (2008). Pedein A and B: production, isolation, structure elucidation and biological properties of new antifungal cyclopeptides from *Chondromyces pediculatus* (Myxobacteria). *J. Antibiot.* **61**, 18-26.
  116. **Kushner, D. J.** (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In Kushner, D. J. (ed.), *Microbial life in extreme environments*, Academic Press, New York, pp. 318-346.
  117. **Lang, E., Kroppenstedt, R. M., Sträubler, B., and Stackebrandt, E.** (2008). Reclassification of *Myxococcus flavescens* Yamanaka *et al.* 1990<sup>VP</sup> as a later synonym of *Myxococcus virescens* Thaxter 1892<sup>AL</sup>. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2607-2609.
  118. **Lassila, J. K., Bernstein, S. L., Kinney, J. N., Axen, S. D., and Kerfeld, C. A.** (2014). Assembly of robust bacterial microcompartment shells using building blocks from an organelle of unknown function. *J. Mol. Biol.* **426**, 2217-2228.
  119. **Lau, J., Frykman, S., Regentin, R., Ou, S., Tsuruta, H., and Licari, P.** (2002). Optimizing the heterologous production of epothilone D in *Myxococcus xanthus*. *Biotechnol. Bioeng.* **78**, 280-288.
  120. **Leibold, T., Sasse, F., Reichenbach, H., and Höfle, G.** (2004). Cyrmenins, novel antifungal peptides containing a nitrogen-linked  $\beta$ -methoxyacrylate pharmacophore: Isolation and structural elucidation. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 431-435.
  121. **Li, S-G., Zhou, X-W., Li, P-F., Han, K., Li, W., Li, Z-F., Wu, Z-H., and Li, Y-Z.** (2012). The existence and diversity of myxobacteria in lake mud—a previously unexplored myxobacteria habitat. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**, 587-595.
  122. **Li, X., Yu, T.-K., Kwak, J.-H., Son, B.-Y., Seo, Y., Zee, O.-P., and Ahn, J.-W.** (2008). Soraphinol C, a new free-radical scavenger from *Sorangium cellulosum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 520-522.
  123. **Ling, L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schäberle, T. F., Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., Chen, C., and Lewis, K.** (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**, 455-459.
  124. **Lok, C.** (2015). Mining the microbial dark matter. *Nature* **522**, 270-273.
  125. **Lu, J. P., Yuan, X. H., Yuan, H., Wang, W. L., Wam, B., Franzblau, S. G., and Ye, Q. Z.** (2011). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidases by bengamide derivatives. *Chem. Med. Chem.* **6**, 1041-1048.

126. Ludwig-Müller, J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol. Lett.* **37**, 1325-1334.
127. Lueders, T., Kindler, R., Miltner, A., Friedrich, M. W., and Kaestner, M. (2006). Identification of bacterial micropredators distinctively active in a soil microbial food web. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5342-5348.
128. Machida, M. Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., and other 54 authors. (2005). Genome sequence and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**, 1157-1161.
129. MacLeod, R. A. (1965). The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriol. Rev.* **29**, 9-23.
130. Maroun, J. A., Belanger, K., Seymour, L., Matthews, S., Roach, J., Dionne, J., Soulieres, D., Stewart, D., Goel, R., Charpentier, D., Goss, G., Tomiak, E., Yau, J., Jimeno, J., and Chiritescu, G. (2006). Phase I study of Aplidine in a daily X5 one-hour infusion every 3 weeks in patients with solid tumors refractory to standard therapy. A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study: NCIC CTG IND 115. *Ann. Oncol.* **17**, 1371-1378.
131. Marshall, M. J., Dohnalkova, A. C., Kennedy, D. W., Plymale, A. E., Thomas, S. H., Löffler, F. E., Sanford, R. A., Zachara, J. M., Fredrickson, J. K., and Beliaev, A. S. (2009). Electron donor-dependent radionuclide reduction and nanoparticle formation by *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C. *Environ. Microbiol.* **11**, 534-543.
132. Martinez, J. P., Hinkelmann, B., Fleta-Soriano, E., Steinmetz, H., Jansen, R., Diez, J., Frank, R., Sasse, F., and Meyerhans, A. (2013). Identification of myxobacteria-derived HIV inhibitors by a high-throughput two-step infectivity assay. *Microbial Cell. Fact.* **12**, 85.
133. 町田雅之, 浅井潔, 梅村舞子 (2013). 大規模なゲノム情報の活用. 生物工学会誌 **91**, 322-326.
134. 松田治 (1991). 海底堆積物中の微生物過程. 清水潮 (編), 海洋微生物とバイオテクノロジー, 技報堂出版, 東京, pp. 242-255.
135. 松本伯夫 (2006). 難培養微生物の新しい培養技術-電気培養法-. バイオインダストリー **23 (11)**, 21-25.
136. McCurdy, H. D. (1963). A method for the isolation of myxobacteria in pure culture. *Can. J. Microbiol.* **9**, 282-285
137. McCurdy, H. D. (1969). Studies on the taxonomy of the Myxobacteriales. I. Record of Canadian isolates and survey of methods. *Can. J. Microbiol.* **15**, 1453-1461
138. McCurdy, H. D. (1989). Order Myxococcales TCHAN, POCHON and PRÉVOT 1948, 398AL (with contributions of Brockman, E. R., Reichenbach, H., and White, D) *In* Staley, J.

- T., Bryant, M. P., Pfennig N., and Holt, J. G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol.3, Baltimore, MA: Williams and Wilkins., pp. 2139-2170.
139. Meiser, P., Bode, H. B., and Müller, R. (2006). The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 19128-19133.
140. 三浦豊和 (2006). 抗付着療法による病原細菌の撃退. *生物工学会誌* **84**, 195.
141. Mohr, K. I., Garcia, R. O., Gerth, K., Irschik, H., and Müller, R. (2012). *Sandaracinus amylolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch degrading soil myxobacterium, and the description of *Sandaracinaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 1191-1198.
142. Moore, J. M., Bradshaw, E., Seipke, R. F., Hutchings, M. I., and McArthur, M. (2012). Use and discovery of chemical elicitors that stimulate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. *Methods Enzymol.* **517**, 367-385.
143. モリテツシ (2015). 微生物のシングルセルゲノミクス研究の現状と未来. *日本微生物生態学会誌* **30**, 65-74.
144. Moyer, C. L., Dobbs, F. C., and Karl, D. M. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1555-1562.
145. Müller, S., Willett, J. W., Bahr, S. M., Darnell, C. L., Hummels, K. R., Dong, C. K., Vlamakis, H. C., and Kirby, J. R. (2013). Draft genome sequence of *Myxococcus xanthus* wild-type strain DZ2, a model organism for predation and development. *Genome Announc.* **1**, e00217-13
146. Müller, R. and Wink, J. (2014). Future potential for anti-infectives from bacteria – how to exploit biodiversity and genomic potential. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 3-13.
147. Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H. E., 2, Moran, N. A., and Hattori, M. (2006). The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science* **314**, 267.
148. 中井正人, 中井由実 (2011). 3 章 I 細胞の破碎と分画 (酵母). 岡田雅人, 宮崎香 (編), *タンパク質実験ノート (上)*, 改訂第4版, 羊土社, 東京, pp. 53-57.
149. 中嶋啓雄, 田沼靖一, 馬替純二 (2009). 乳がんの分子標的治療. *化学と生物* **47**, 382-389.
150. 中山正道, 岡野光夫 (2005). ナノ粒子を用いるドラッグデリバリーシステム. *癌と化学療法* **30**, 935-940.
151. Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., and Epstein, S. S. (2010). Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2445-2450.

152. 西口賢三, 中山二郎, 園元讓二 (2006). 腸球菌の *fsr* 制御系を標的としたクォーラムセンシング阻害剤開発. 生物工学会誌 **84**, 440-443.
153. Nowka, B., Off, S., Daims, H., and Spieck, E. (2015). Improved isolation strategies allowed the phenotypic differentiation of two *Nitrospira* strains from widespread phylogenetic lineages. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**, in press, doi:10.1093/femsec/fiu031.
154. Ochi, K. and Hosaka, T. (2012). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 87-98.
155. 大枝匡義 (2013). バイオ・抗体医薬品の展望. ファインケミカル **42(9)**, 16-23.
156. Ohkuma, M., Noda, S., and Kudo, T. (1999) Phylogenetic relationships of symbiotic methanogens in diverse termites. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**, 147-153.
157. Ohlendorf, B., Kehraus, S., and König, G. M. (2008a). Myxochromide B3, a new member of the myxochromide family of secondary metabolites. *J. Nat. Prod.* **71**, 1708-1713.
158. Ohlendorf, B., Leyers, S., Krick, A., Kehraus, S., Wiese, M., and König, G. M. (2008b). Phenylannolones A-C: biosynthesis of new secondary metabolites from the myxobacterium *Nannocystis exedens*. *ChemBioChem* **9**, 2997-3003.
159. Ohlendorf, B., Lorenzen, W., Kehraus, S., Krick, A., Bode, H. B., and König, G. M. (2009). Myxochromide A and B, unusual rhamnosides from *Myxococcus* sp. *J. Nat. Prod.* **72**, 82-86.
160. 太田邦史 (2013). エピゲノムと生命 (ブルーバックス) B-1829, 講談社, 東京, pp. 142-165.
161. Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., and Kakisawa, H. (1991). High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configuration of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4092-4096.
162. Ojika, M., Suzuki, Y., Tsukamoto, A., Sakagami, Y., Fudou, R., Yoshimura, T., and Yamanaka, S. (1998). Cystothiazoles A and B, new bithiazole-type antibiotics from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*. *J. Antibiot.* **51**, 275-281.
163. 小鹿一, 不藤亮介 (2009). 粘液細菌の生理活性物質と生合成遺伝子. ファルマシア **45**, 899-904.
164. 岡崎博司 (1970). Myxobacteria について. 醗酵協会誌 **28**, 194-203.
165. Omura, S. and Crump, A. (2004). The life and times of ivermectin—a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 984-989.
166. Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y., and Furumai, T. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in Streptomycetes. I. Purification and characterization. *J. Antibiot.* **54**, 1036-1044.
167. Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., and Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing

- bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 400-406.
168. **Onishi, N., Izaki, K., and Takahashi, H.** (1984). A macrocyclic antibiotic M-230B produced by *Myxococcus xanthus*. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **37**, 13-19.
  169. **Opperman, T. J. and Nguyen, S. T.** (2015) Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front. Microbiol.* **6**, 421.
  170. **Oßwald, C., Zaburannyi, N., Burgard, C., Hoffmann, T., Wenzel, S. C., and Müller, R.** (2014). A highly unusual polyketide synthase directs dawenol polyene biosynthesis in *Stigmatella aurantiaca*. *J. Biotechnol.* **191**, 54-63.
  171. **Oxford, A. E.** (1947). Observations concerning the growth and metabolic activities of myxococci in a simple protein-free liquid medium. *J. Bacteriol.* **53**, 129-138.
  172. **Panda, D., DeLuca, K., Williams, D., Jordan, M. A., and Wilson, L.** (1998). Antiproliferative mechanism of action of cryptophycin-52: Kinetic stabilization of microtubule dynamics by high-affinity binding to microtubule ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 9313-9318.
  173. **Pelling, A. E., Li, Y., Shi, W., and Gimzewski, J. K.** (2005). Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 6484-6489.
  174. **Perlova, O., Gerth, K., Kaiser, O., Hans, A., and Müller, R.** (2006). Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biotechnol.* **121**, 174-191.
  175. **Perlova, O., Gerth, K., Kuhlmann, S., Zhang, Y., and Müller, R.** (2009). Novel expression hosts for complex secondary metabolite megasynthetases: production of myxochromide in the thermophilic isolate *Corallocooccus macrosporus* GT-2. *Microbial. Cell Fact.* **8**, 1.
  176. **Pinoy, P. E.** (1921). Sur les Myxobacteries. *Ann. Inst. Pasteur.* **35**, 487.
  177. **Plaza, A., Garcia, R., Bifulco, G., Martinez, J. P., Hüttel, S., Sasse, F., Meyerhans, A., Stadler, M., and Müller, R.** (2012). Aetheramides A and B, potent HIV-inhibitory depsipeptides from a myxobacterium of the new genus "*Aetherobacter*". *Org. Lett.* **14**, 2854-2857.
  178. **Poza, M., Prieto-Alcedo, M., Sieiro, C., and Villa, T. G.** (2004). Cloning and expression of *clt* genes encoding milk-clotting proteases from *Myxococcus xanthus* 422. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6337-6341.
  179. **Raffaelli, D. and Hawkins, S.** (1999). *Intertidal Ecology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

180. **Reichenbach, H.** (1970). *Nannocystis exedens* gen. nov., spec. nov., a new myxobacterium of the family *Sorangiaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **70**, 119-38.
181. **Reichenbach, H.** (1989). Genus II. *Nannocystis*, In Staley, T., Bryant, M. P., Pfennig, N., and Holt, J. G. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2162-2166.
182. **Reichenbach, H.** (1999). The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol* **1**, 15-21.
183. **Reichenbach, H.** (2001). Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 149-156.
184. **Reichenbach, H.** (2005). Order VIII. *Myxococcales* Tchan, Pochon and Prévot 1948, 398<sup>AL</sup>. In Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. and Garrity, G. M., ed., *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd. Edition, Vol. 2, Part , pp. 1059-1144.
185. **Reichenbach, H. and Dworkin, M.** (1992). The myxobacteria. In Balows, A., H. G. Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (ed.), *The Prokaryotes*, 2nd edn., Springer-Verlag, Berlin, pp. 3416-3487.
186. **Reichenbach, H. and Höfle, G.** (1989). The gliding bacteria: a treasury of secondary metabolites. In Bushell, M. E. and Gräfe, E. (ed.), *Bioactive metabolites from microorganisms*, Elsevier, Amsterdam, pp. 79-100.
187. **Reichenbach, H., Lang, E., Schumann, P., and Spröer, C.** (2006). *Byssovorax cruenta* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium: rediscovery of '*Myxococcus cruentus*' Thaxter 1897. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2357-2363.
188. **Rheinheimer, G.** (1992). Environmental factors in microbial development: salinity. In Rheinheimer, G. (ed.), *Aquatic Microbiology*, 4th edn. (Translated by Walker, N. from the German edition: *Mikrobiologie der Gewässer*. Jena, BRD: Gustav Fischer Verlag.) John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 128-133, 166-169.
189. **Ringel, S. M., Greenough, R. C., Roemer, S., Connor, D., and von Strandtmann, M.** (1977). Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot.* **30**, 371-375.
190. **Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., Dodsworth, J. A., Hedlund, B. P., Tsiamis, G., Sievert, S. M., Liu, W. T., Eisen, J. A., Hallam, S. J., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Rubin, E. M., Hugenholtz, P., and Woyke, T.** (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**, 431-437.
191. **Romero-Rodríguez, A., Robledo-Casados, I., Sánchez, S.** (2015). An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1849**, 1017-39.
192. **Roper, M. M and Marshall, K. C.** (1977). Lysis of *Escherichia coli* by a marine myxobacter. *Microb. Ecol.* **3**, 167-171.

193. **Rückert, G.** (1984). Untersuchungen zum Vorkommen von Myxobakterien in von Meerwasser beeinflussten Substraten unter besonderer Berücksichtigung der Insel Helgoland. *Helgoländer Meeresunters* **38**, 179-184.
194. **Russell, N. J. and Nichols, D. S.** (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. *Microbiology* **145**, 767-779.
195. **Saito, H. and Miura, K.** (1963). Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 619-629.
196. **Saitou, N. and Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
197. **齋藤駿, 田代悦, 井本正哉** (2014). 創薬を志向した天然化合物の探索研究. 化学と生物 **52**, 466-472.
198. **Sanford, R. A., Cole, J. R., and Tiedje, J. M.** (2002). Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 893-900.
199. **坂田泰造, 吉川毅** (2000). 各種環境微生物の測定法. 石田祐三郎, 杉田治男 (編), 海洋環境アセスメントのための微生物実験法, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 98-102.
200. **Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, T. M. A. and Reichenbach, H.** (1998). The chondramides: cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1559-1563.
201. **Sasse, F., Leibold, T., Kunze, B., Höfle, G., and Reichenbach, H.** (2003). Cyrmenins, new  $\beta$ -methoxyacrylate inhibitors of the electron transport. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **56**, 827-831.
202. **Sauter, H., Steglich, W., and Anke, T.** (1999). Strobilurins: evolution of a new class of active substances. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1328-1349.
203. **Schäberle, T. F., Goralski, E., Neu, E., Erol, Ö., Hölzl, G., Dörmann, P., Bierbaum, G., and König, G. M.** (2010). Marine myxobacteria as a source of antibiotics—comparison of physiology, polyketide-type genes and antibiotic production of three new isolates of *Enhygromyxa salina*. *Mar. Drugs* **8**, 2466-2479.
204. **Schäberle, T. F., Lohr, F., Schmitz, A. and König, G. M.** (2014). Antibiotics from myxobacteria. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 953-972.
205. **Schneiker, S., Perlova, O., Kaiser, O., Gerth, K., Alici, A., Altmeyer, M. O., Bartels, D., Bekel, T., Beyer, S., Bode, E., and other 50 authors.** (2007). Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1281-1289.
206. **Schubert, C.** (2010). Matchmaking service links up researchers to wallflower drugs. *Nat. Med.* **16**, 7.

207. **Seitz, S., Buchholz, S., Schally, A. V., Weber, F., Klinkhammer-Schalke, M., Inwald, E. C., Perez, R., Rick, F. G., Szalontay, L., Hohla, F., Segerer, S., Kwok, C. W., Ortman, O., and Engel, J. B.** (2014). Triple negative breast cancers express receptors for LHRH and are potential therapeutic targets for cytotoxic LHRH-analogs, AEZS 108 and AEZS 125. *BMC Cancer*. **14**, 847.
208. 柴崎正勝, 金井求, 福田展久, 美多剛 (2006). タミフルの新合成法. 化学 **61** (7), 12-17.
209. 芝崎誠司 (2012). リウマチ治療薬のトレンド. 生物工学会誌 **90**, 96.
210. **Shimkets, L. and Woese, C. R.** (1992). A phylogenetic analysis of the myxobacteria: Basis for their classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9459-9463.
211. 下山武文, 加藤創一郎, 渡辺一哉 (2007). メタゲノムアプローチの新規手法, *J. Environ. Biotechnol.* **7**, 79-85.
212. 篠原信 (2006). 病憎んで菌を憎まず: クオラム・センシングを利用した新規な病害防止法. 化学と生物 **44**, 364-372.
213. **Singh, B. N.** (1947). Myxobacteria in soils and composts: their distribution, number and lytic action on bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **1**, 1-10.
214. **Solntzeva, L. I.** (1939). On the lysis of phytopathogenic bacteria caused by Myxobacteriales. *Mikrobiologiya* **8**, 700-705.
215. **Spröer, C., Reichenbach, H., and Stackebrandt, E.** (1999). The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1255-1262.
216. **Stanier, R., Aderberg, E., and Ingraham, J.** (1976). *The Microbial World*, 4th edition, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
217. **Steinmetz, H., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H., Höfle, G., and Jansen, R.** (2007). Thuggacins, macrolide antibiotics active against *Mycobacterium tuberculosis*: isolation from myxobacteria, structure elucidation, conformation analysis and biosynthesis. *Chemistry* **13**, 5822-5832.
218. **Steinmetz, H., Mohr, K. I., Zander, W., Jansen, R., Gerth, K., and Müller, R.** (2012). Indiacens A and B: prenyl indoles from the myxobacterium *Sandaracinus amylolyticus*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1803-1805.
219. **Still, P. C., Johnson, T. A., Theodore, C. M., Loveridge, S. T., and Crews, P.** (2014). Scrutinizing the scaffolds of marine biosynthetics from different source organisms: gram-negative cultured bacterial products enter center stage. *J. Nat. Prod.* **77**, 690-702.
220. **Sumiya, E., Shimogawa, H., Sasaki, H., Tsutsumi, M., Yoshita, K., Ojika, M., Suenaga, K., and Uesugi, M.** (2011). Cell-Morphology profiling of a natural product library identifies

- bisebromoamide and miuraenamides A as actin filament stabilizers. *ACS Chem. Biol.* **6**, 425-431.
221. 鈴木伸一 (2006). 幻の放線菌を探. *化学と生物* **44**, 163-171.
222. 鈴木芳宏 (2002). 希少微生物由来の抗真菌性物質に関する化学的研究. 名古屋大学博士論文
223. 高田健太郎, 松永茂樹 (2013). カイメン由来の多彩な二次代謝産物と共生微生物の関係. *化学と生物* **51**, 333-339.
224. Takeda, M., Y. Kamagata., Ghiorse, W. C., Hanada, S., and Koizumi, J. (2002). *Caldimonas manganoxidans* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, manganese-oxidizing thermophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 895-900.
225. Takeda, M., Koizumi, J., Yabe, K., and Adachi, K. (1998). Thermostable poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase of a thermophilic strain of *Leptothrix* sp. isolated from a hot spring. *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 375-380.
226. 竹山春子, 横内裕子 (2006). 海洋性難培養微生物からの有用遺伝子・物質の探索. *バイオインダストリー* **23**, 26-33.
227. Tamaoka, J. and Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 125-128.
228. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731-2739.
229. Tanaka, C., Tanaka, J., Bolland, R. F., Marriott, G., and Higa, T. (2006). Seragamides A-F, new actin-targeting depsipeptides from the sponge *Suberites japonicus* Thiele. *Tetrahedron* **62**, 3536-3542.
230. 田中秀夫 (2000). 第3章:発酵生産・培養工学, 第2節:発酵槽・培養装. 新名ら (編), 発酵工学・20世紀のあゆみ, 生物工学会誌 特別号.
231. 田中淳一 (2007). 海洋生物由来のアクチンを標的とする多様な分子. *化学と生物* **45**, 177-185.
232. 田中信男, 中村昭四郎 (1992). 第1章, 抗生物質とは, 抗生物質大要 (第4版), 東京大学出版会, 東京, pp. 3-4.
233. Tanaka, Y., Sugho, M., Ji, W., Iwabuchi, J., Yoshida, H. and Ōmura, S. (1995). Screening method for cellulose biosynthesis inhibitors with herbicidal activity. *J. Antibiot.* **48**, 720-724.
234. 田代悦, 井本正哉 (2009). 微生物生理活性物質のケミカルバイオロジー. *化学と生*

- 物 **47**, 193-201.
235. **Teesalu, T., Sugahara, K. N., and Ruoslahti, E.** (2013). Tumor-penetrating peptides. *Front. Oncol.* **3**, Article 216.
  236. **Teglas, M. B., Drazenovich, N. L., Stott, J., and Foley, J. E.** (2006). The geographic distribution of the putative agent of epizootic bovine abortion in the tick vector, *Ornithodoros coriaceus*. *Vet. Parasitol.* **140**, 327-333
  237. **Tenreiro, S., Nobre, M. F., Rainey, F. A., Miguel, C., and da Costa, M. S.** (1997). *Thermonema rossianum* sp. nov., a new thermophilic and slightly halophilic species from saline hot springs in Naples, Italy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 122-126.
  238. **Thaxter, R.** (1892). On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot. Gaz.* **17**, 389.
  239. **Thierbach, G. and Reichenbach, H.** (1981). Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome *b-c<sub>1</sub>* segment of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **638**, 282-289.
  240. **Thomas, S. H., Wagner, R. D., Arakaki, A. K., Skolnick, J., Kirby, J. R., Shimkets, L. J., Sanford, R. A., and Löffler, F. E.** (2008). The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-Proteobacteria. *PLoS One* **3**, e2103, 1-12.
  241. **Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
  242. 塚崎朝子 (2013). 新薬に挑んだ日本人科学者たち (ブルーバックス), 講談社, 東京, pp. 14-32.
  243. **Ueki, T. and Inouye, S.** (2006). A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in Myxobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 21-29.
  244. 上村大輔 (2012). そこに「オリジナリティー」はあるか?! 化学 **67**, 28-30.
  245. **Ververis, K., Hiong, A., Karagiannis, T. C., and Licciardi, P. V.** (2013). Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics* **7**, 47-60.
  246. 渡辺賢二, 大栗博毅, 及川英秋 (2006). 大腸菌を利用した抗腫瘍性抗生物質の *de novo* 合成. バイオテクノロジージャーナル. **11-12**, 720-723
  247. **Weissman, K. J. and Müller, R.** (2010). Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 1276-1295.
  248. **Welker, M. and von Döhren, H.** (2006). Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 530-563.
  249. **White, D. and Schairer, H. U.** (2000). Development of *Stigmatella*. In Prokaryotic Development, ed. by Brun, Y. V. and Shimkets, L. J., ASM Press, Washington DC, pp. 285-

- 294.
250. **Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. A., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Grüsemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., and Piel, J.** (2014). An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **506**, 58-62.
251. 禹濟泰, 米澤貴之, 永井和夫 (2009). 骨吸収抑制剤と骨粗しょう症. *化学と生物* **47**, 51-58.
252. **Wu, Z-H., Jiang, D-M., Li, P. and Li, Y-Z.** (2005). Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ. Microbiol.* **7**, 1602-1610.
253. **Wu, Q-Z., Sanford, R. A., and Löffler, F. E.** (2006). Uranium (VI) reduction by *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3608-3614.
254. **Xiao, Y., Wei, X., Ebright, R., and Wall, D.** (2011). Antibiotic production by myxobacteria plays a role in predation. *J. Bacteriol.* **193**, 4626-4633.
255. **Yamamoto, E., Muramatsu, H., and Nagai, K.** (2014). *Vulgatibacter incomptus* gen. nov., sp. nov. and *Labilithrix luteola* gen. nov., sp. nov., two myxobacteria isolated from soil in Yakushima Island, and the description of *Vulgatibacteraceae* fam. nov., *Labilithrichaceae* fam. nov. and *Anaeromyxobacteraceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 3360-3368.
256. **Yamamoto, H., Ezura, Y., and Kimura, T** (1982). Evaluation of biological agents affecting on the survival of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **48**, 1433-1439.
257. 山本啓之 (1983). 海水中における微生物群集の相互作用に関する研究. 北海道大学博士論文.
258. **Yamanaka, S., Fudo, R., Kawaguchi, A., and Komagata, K.** (1988). Taxonomic Significance of hydroxy fatty acids in myxobacteria with special reference to 2-hydroxy fatty acids in phospholipids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **34**, 57-66.
259. **Yamanaka, S., Kanbe, S., and Fudo, R.** (1993). Lysis of Basidiomycetous yeast, *Rhodotorula glutinis* caused by myxobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**, 419-427.
260. 吉田稔 (2002). 1.タンパク質アセチル化の制御機構に関する研究. 理研研究年報, 235
261. **Yoshii, Y.** (1926). Vorläufige untersuchungen über myxobakterien in Japan. *Sci Rep Tohoku Imp Univ* **1**, 277 (*Zitt. Biol. Abstr.* **1**, 3210)
262. 吉川昌之介 (1995). 細菌の逆襲—ヒトと細菌の生存競争. 中公新書, 東京.
263. **Zhan, Z., Burns, A. M., Liu, M.-X., Faeth, S. H., and Gunatilaka, A. A. L.** (2007). Search

- for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *J. Nat. Prod.* **70**, 227-232.
264. **Zhang, Y.-Q., Li, Y.-Z., Wang, B., Wu, Z.-H., Zhang, C.-Y., Gong, X., Qiu, Z.-J., and Zhang, Y.** (2005). Characteristics and living patterns of marine myxobacterial isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3331-3336.
265. **Zhao, W., Zhong, Y., Yuan, H., Wang, J., Zheng, H., Wang, Y., Cen, X., Xu, F., Bai, J., Han, X., Lu, G., Zhu, Y., Shao, Z., Yan, H., Li, C., Peng, N., Zhang, Z., Zhang, Y., Lin, W., Fan, Y., Qin, Z., Hu, Y., Zhu, B., Wang, S., Ding, X., and Zhao, G-P.** (2010). Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell. Res.* **20**, 1096-1108.

## 謝 辞

本論文の執筆に際し、遅筆の筆者を叱咤激励いただき、多大なご助力、有益なご助言、および厳格なご審査をいただきました、豊橋技術科学大学・環境・生命工学系平石明教授に深くお礼を申し上げます。

本論文に対し、厳格なご審査と有益なご助言をいただきました、豊橋技術科学大学・環境・生命工学系浴俊彦教授ならびに伊津野真一教授に厚くお礼を申し上げます。

本論文の審査に至るまでの原稿を懇切丁寧にご査読いただいた、元・大阪大学大学院・国際交流センターの関達治教授に深くお礼を申し上げます。

本研究を実施するに当たり、親切かつ適切なご指導・ご助言を賜りました、名古屋大学農学部応用生物科学坂神洋次教授、同大学大学院生命農学研究科教授小鹿一先生に深謝の意を表します。

本研究の立案段階から論文作成に至るまでには、山中茂信州大学繊維学部教授（元）、味の素株式会社理事（元）、および味の素株式会社の不藤亮介博士に終始ご指導・ご協力いただきました。深く感謝いたします。

粘液細菌の分類学に関しては、駒形和男東京大学名誉教授・東京農業大学客員教授に有益な助言を賜りました。厚くお礼申し上げます。

本研究の大部分は、1997年1月から2003年5月にかけて、味の素株式会社中央研究所および医薬研究所にて実施されたものであり、常にご支援とご助言をいただきました、西山徹博士、田中崇（元）顧問、三輪清志博士、鹿島信一博士、亀山俊之博士、梶浦貴之博士に感謝いたします。また、粘液細菌の同定・系統分類や培養に関して、常にご協力をいただいた同社の城嶋恭子氏に深くお礼を申し上げます。温泉由来の粘液細菌様培養物からの粘液細菌遺伝子の検出および系統解析については、ご推進いただきました十倉充範博士に深謝いたします。

さらに、研究上のご助力を頂きました、同社の小原清吉、故・大草記行、石原勝、開田健一、平賀雅子、篠崎純子、早川敦、藤井孝吉博士、佐藤誠一博士の各氏にお礼申し上げます。特に、佐藤博士からは、ミウラエナミドの化学構造決定方法の記載法について多大なご助力を賜りましたことを感謝いたします。

試料収集にご協力頂いた、萩田宏之、藤原浩、および学名の命名にご協力頂いた佐藤信彦の各氏に感謝いたします。

最後に、本論文の完成を忍耐強く見守り、支えてくれた筆者の家族、妻、娘、母に感謝いたします。

## 付録一出版論文リスト

### 1) 査読付き学術論文 (博士論文目録論文)

1. **Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Hiraishi, A., Ahn, J.-W. and Yamanaka, S.** *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 189-195 (2003).
2. **Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Tokura, M., Hiraishi, A. and Yamanaka, S.** *Enhygromyxa salina* gen. nov., sp. nov., a slightly halophilic myxobacterium isolated from the coastal areas of Japan. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 189-196 (2003).
3. **Iizuka, T., Fudou, R., Jojima, Y., Ogawa, S., Yamanaka, S., Inukai, Y and Ojika, M.** Miuraenamides A and B, novel antimicrobial cyclic depsipeptides from a new slightly halophilic myxobacterium: taxonomy, production, and biological properties. *J. Antibiot.* 59, 385-391 (2006).
4. **Iizuka, T., Tokura, M., Jojima, Y., Hiraishi, A., Yamanaka, S. & Fudou, R.** Enrichment and phylogenetic analysis of moderately thermophilic myxobacteria from hot springs in Japan. *Microbes Environ.* 21, 189-199 (2006).
5. **Iizuka, T., Jojima, Y., Hayakawa, A., Fujii, T., Yamanaka, S. and Fudou, R.** *Pseudenhygromyxa salsuginis* gen. nov., sp. nov., a myxobacterium isolated from an estuarine marsh. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1360-1369 (2013).

### 2) 業績報告書に記載の論文

1. **Furukawa, S., Katayama, N., Iizuka, T., Urabe, I. and Okada, H.** Preparation of polyethylene glycol-bound NAD and its application in a model enzyme reactor. *FEBS Lett.* 121, 239-242 (1980).
2. **Eguchi, T., Iizuka, T., Kagotani, T., Lee, J.-H., Urabe, I. and Okada, H.** Covalent linking of poly(ethyleneglycol)-bound NAD with *Thermus thermophilus* malate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 155, 415-421 (1986).
3. **Oclarit, J. M., Okada, H., Ohta, S., Kamimura, K., Yamaoka, Y., Iizuka, T., Miyashiro, S. and Ikegami, S.** Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios* 78, 7-16 (1994).
4. **Iizuka, T., Yamanaka, S., Nishiyama, T. and Hiraishi, A.** Isolation and phylogenetic analysis of aerobic copiotrophic ultramicrobacteria from urban soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.*

- 44, 75-84 (1998).
5. **Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R. and Yamanaka, S.** Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 317-322 (1998).
  6. **Fudou, R., Iizuka, T. and Yamanaka, S.** Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. 1. Fermentation and biological characteristics. *J. Antibiot.* **54**, 149-152 (2001).
  7. **Fudou, R., Jojima, Y., Iizuka, T. and Yamanaka, S.** *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**, 109-115 (2002).
  8. **Thierry, S., Macarie, H., Iizuka, T., Geißdörfer, W., Assih, E. A., Spanevello, M., Verhe, F., Thomas, P., Fudou, R., Monroy, O., Labat, M. and Ouattara, A. S.** *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2245-2255 (2004).
  9. **Ojika, M., Inukai, Y., Kito, Y., Hirata, M., Iizuka, T. and Fudou, R.** Miuraenamides: antimicrobial cyclic depsipeptides isolated from a rare and slightly halophilic myxobacterium. *Chem. Asian J.* **3**, 126-133 (2008).
  10. **Komaki, H., Fudou, R., Iizuka, T., Nakajima, D., Okazaki, K., Shibata, D., Ojika, M. and Harayama, S.** PCR detection of type I polyketide synthase genes in myxobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5571-5574 (2008).
  11. **Sahin, N., Gonzalez, J. M., Iizuka, T. and Hill, J. E.** Characterization of two aerobic ultramicrobacteria isolated from urban soil and a description of *Oxalicibacterium solurbis* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **307**, 25-29 (2010).