

新規な環境微生物の分離と遺伝資源の確保

Isolation of novel species from the environment as bio-resources

森田英利, 村上 賢, 加藤行男

麻布大学獣医学部

Hidetoshi Morita, Masaru Murakami, Yukio Kato

School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract: We isolated the Gram-positive anaerobic bacterial strains from intestines of healthy thoroughbreds as one of the environment. The two groups might be novel species belonging to genus *Lactobacillus*. Biochemical and physiological characteristics distinguished the isolates from their phylogenetic relatives. DNA-DNA reassociation experiments with *L. salivarius* and *L. aviarius* confirmed that KBL13^T represents a novel species, for which the name *Lactobacillus hayakitensis* sp. nov. is proposed. The type strain is KBL13^T (= JCM 14209^T = DSM 18933^T). The other isolates represent typical novel species of the genus *Lactobacillus*, for which the name *Lactobacillus equigenerosi* sp. nov. is proposed. The type strain is NRIC 0697^T (= JCM 14505^T = DSM 18793^T). The isolates produced spherical or oval cells, and tetrad-like cells were rarely seen. To the best of our knowledge, this is the first report of this morphological characteristic within the genus *Lactobacillus*.

1. 目的

地球上では、合成と分解により物質（元素）は環境と生体で循環しており、その循環系で重要な役割を演じているのが微生物である。今までヒトの生活環境になじみがあったり、研究対象となってきた微生物のほとんどは、20～40℃、中性付近、好気性、豊富な栄養条件下で活発に増殖するものであった。しかし、それらは地球上に存在する微生物のごく一部にすぎないことが理解され、現在、研究室で培養可能な微生物は、1～数%程度であることが判明した。したがって、環境中には、たくさんの未分離もしくは未同定の微生物が棲息しており、その機能性や代謝系においても、未知であり多種多様であることが推測される。

したがって、新菌種の発見と公的バイオリソース

センターへの菌株寄託は、バイオリソースの充実につながり、その結果、分類学・系統解析の発展、分子生物学的手法によるフローラの多様性解析のreferencesの充実、ヒト・動物・環境に役立つ機能性をもつ細菌の獲得などに貢献すると考えられる。

生物（哺乳動物）の腸内には、多くの細菌が棲息・共生しており、腸内細菌のお陰で、宿主は順調な消化吸収がなされ、免疫系が正常に機能していることが明らかとなってきた。ヒトでは、現在、60～70%の菌種が生菌分離されているが、サラブレッドなど80%以上の腸内細菌が未同定の哺乳動物もある。

本研究では、サラブレッドの消化管から、高い嫌気度を保つことを念頭においた手法で生菌を分離し、16S rRNA 遺伝子配列の解析によりグルーピング・スクリーニングし、その後、生理生化学的諸性状と

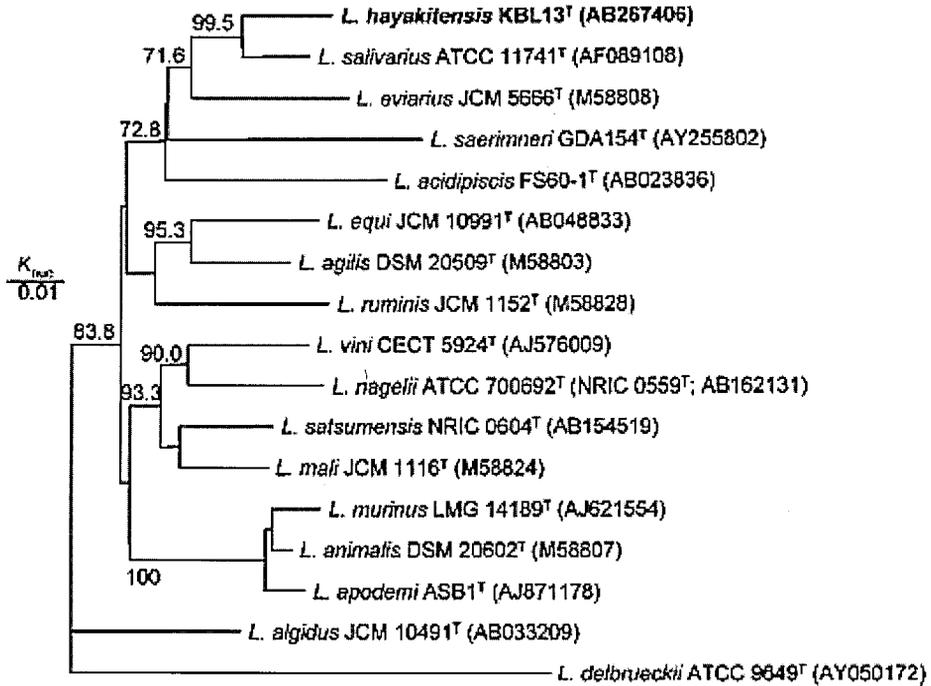


Fig. 1. Phylogenetic relationship of the isolate to the species of the *L. salivarius* phylogenetic group based on the 16S rRNA gene sequences is shown. The tree was constructed by the neighbour-joining method. *L. delbrueckii* ATCC 9649^T was used as an outgroup. Bootstrap percentages above 70.0% are given at the branching points.

DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果から、*Lactobacillus* に属する2つの新菌種の提唱を行った。

2. 方法

ウマ（サラブレッド）の排便後すぐの糞便を嫌気バックし、なるべく早く BL, BS, LBS 寒天培地に塗抹し、スチールウール法と窒素ガス置換による嫌気培養を行った。その際、アスコルビン酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウムおよびカタラーゼを添加した溶液で段階希釈し上記寒天培地に塗抹した。37℃で48時間培養後に、コロニー形状を観察しながら菌種レベルの違いで釣菌し、ABCM 液体培地で純化と継代培養し、その培養液を凍結保存（-85℃）した。

本実験では、バイオリソースへの貢献を目的としているので、継代培養できることを重要な点とし、凍結保存から復帰した菌株について16S rRNA 遺伝子の約1,500 bp の塩基配列決定を行った。その配列を用い、BLASTサーチにより新菌種候補を選択した。その後、生理生化学的諸性状、GC含量測定、細胞壁のアミノ酸組成を検討し、DNA-DNA ハイブリダ

イゼーションの結果によって、新菌種として国際微生物系統分類学雑誌（International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology）へ投稿した。

3. 結果と考察

サラブレッドの糞便から生菌分離し、純化・凍結保存した菌株について、16S rRNA 遺伝子配列によりグルーピングした。その結果、既知の菌種とは異なる2グループを確認した。その1つのグループが、*L. salivarius* や *L. aviarius* に近縁の KBL13 株と GBL13 株である。それらの16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹は、Fig. 1 に示した¹⁾。また、生理生化学的諸性状について、近縁種とは異なることが示された (Table 1)¹⁾。KBL13 株と、*L. salivarius* JCM 1231^T、JCM 1150、*L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667^T のそれぞれのゲノムに対する DNA-DNA ハイブリダイゼーションの値は、14.2%、12.1% および 7.9% であり、別菌種であることを確認した。その結果、新菌種 *Lactobacillus hayakitensis* を提唱し¹⁾、その基準株は KBL13^T (= JCM 14209^T = DSM 18933^T) とした。

もう1つのグループは NRIC 0696 株と NRIC 0697

Table 1. Physiological characteristics of strains KBL13^T and GBL13 and type strains of the closely related *Lactobacillus* species. Strains: 1, KBL13^T; 2, GBL13; 3, *L. salivarius* JCM 1231^T; 4, *L. salivarius* JCM 1150; 5, *L. aviarius* subsp. *aviarius* JCM 5666^T (Fujisawa et al. 1984); 6, *L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667^T (Fujisawa et al. 1984). +, Positive; -, negative; W, weakly positive; ND, no data available. All strains were positive for the following characteristics: fermentation of glucose, fructose, mannose, maltose, sucrose; growth in MRS broth at 37 °C and no growth in MRS broth at 15 °C. The DNA G + C contents were determined by HPLC.

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Lactic acid isomers	L	L	Mainly L	Mainly L	DL	DL
Fermentation of:						
Galactose	-	-	+	+	+	-
Rhamnose	-	-	+	-	ND	ND
Sorbitol	-	-	+	+	ND	ND
N-Acetyl-D-glucosamine	+	-	+	+	ND	ND
Amygdalin	w	w	-	-	-	-
Arbutin	+	-	-	+	ND	ND
Aesculin	+	+	-	+	+	-
Salicin	+	+	-	+	+	-
Cellobiose	+	+	-	-	+	-
Lactose	-	-	+	+	-	-
Melibiose	-	-	+	+	+	-
Trehalose	-	-	+	+	+	+
Raffinose	w	-	+	+	+	-
Gentiobiose	+	+	-	-	ND	ND
Growth on MRS medium at 45 °C	+	+	+	+	ND	ND
DNA G + C content (mol%)	34.3	34.8	34.7	ND	38.7	41.3
Peptidoglycan type	Lys-Asp	Lys-Asp	Lys-Asp	Lys-Asp	Lys-Asp	Lys-Asp

株で、*L. fermentum*, *L. gastricus*, *L. ingluviei*, *L. mucosae* に近縁であり、それらの系統樹は Fig. 2 に示した²⁾。生理生化学的諸性状については、Table 2 のとおり、上記の近縁種とは異なる性質を示した²⁾。DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果も含め、*Lactobacillus equigenersi* を提唱し、基準株は NRIC 0697^T (= JCM 14505^T = DSM 18793^T) とした。*Lactobacillus* 属の特徴の1つは、細胞形態が桿菌とされてきたが、本研究において、*Lactobacillus* 属の中に、球状あるいは楕円形の細胞形態もあることが示された (Fig. 3)²⁾。*L. gastricus* について、その新菌種提唱の論文³⁾ に細胞形態は桿状と表記されているが、*L. gastricus* の発見者と共同で、本菌種も球状あるいは楕円系の細胞形態を示すことを確認した²⁾。*Lactobacillus* 属の中に、細胞形態が球菌から楕円である菌種を初めて報告した。

本研究により新菌種の提唱を行った2菌種のもつ生体への機能性については、今後の検討事項となるが、バイオリソースの確保やこれら近縁菌種の系統解析に貢献すると考えられる。

4. 要約

我々は、“環境”の1つにあたる健全なサラブレッドの消化管から、嫌気性の高いグラム陽性細菌を分離した。16S RNA 遺伝子配列の系統解析により、その中の2つのグループは、*Lactobacillus* に属する新菌種の可能性が示唆された。1つのグループは、系統的に近縁種 *L. salivarius* や *L. aviarius* の生理生化学的諸性状が異なり、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果から、新菌種として *Lactobacillus hayakitensis* を提唱し、その基準株は KBL13^T (= JCM 14209^T = DSM 18933^T) とした。もう1つのグループは、近縁種が *L. fermentum*, *L. gastricus*, *L. ingluviei*, *L. mucosae* であり、生理生化学的諸性状、電子顕微鏡での形態観察、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果から、*Lactobacillus equigenersi* を提唱し、基準株は NRIC 0697^T (= JCM 14505^T = DSM 18793^T) とした。この菌種の細胞の形態は球菌から楕円であり、*Lactobacillus* 属では初めての細胞形態を報告した。

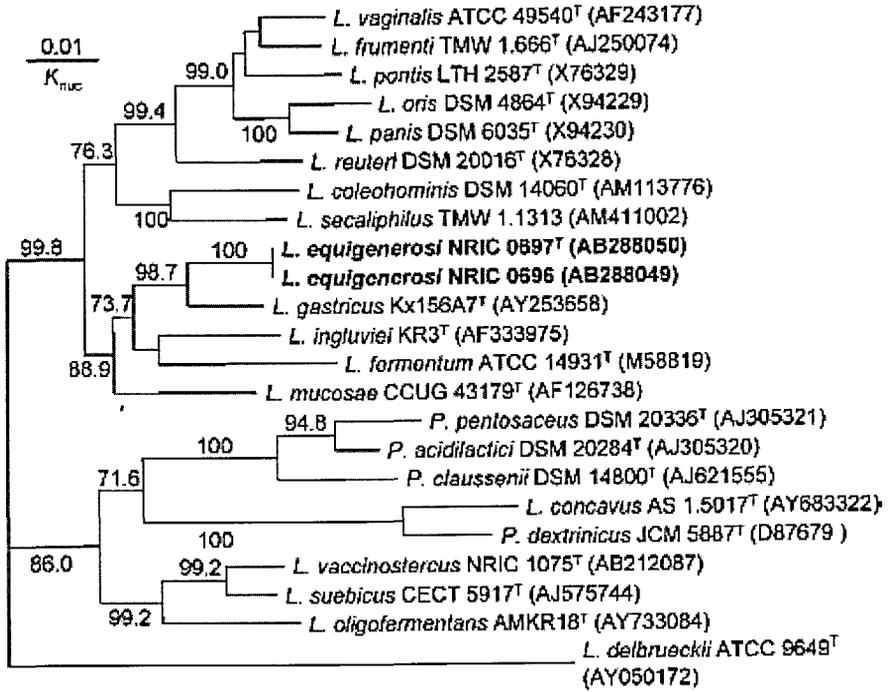


Fig. 2. Phylogenetic relationships of strains NRIC 0696 and NRIC 0697^T (*L. equigenerosi* sp. nov.) to related species based on 16S rRNA gene sequences. The tree was constructed by the neighbour-joining method. *L. delbrueckii* ATCC 9649^T was used as an outgroup. Bootstrap percentages above 70% are given at branching points. Bar, evolutionary distance (K_{nuc}) of 0.01.

Table 2. Differential characteristics between *L. equigenerosi* sp. nov. (strains NRIC 0696 and NRIC 0697^T) and closely related species

Species: 1, *L. equigenerosi* sp. nov.; 2, *L. gastricus* (unless indicated, data from Roos et al., 2005); 3, *L. fermentum* (Dellaglio et al., 2004); 4, *L. ingluviei* (Baele et al., 2003); 5, *L. mucosae* (Roos et al., 2000). +, Positive; -, negative; V, variable; W, weakly positive.

Characteristic	1	2	3	4	5
Cell morphology	Round	Round*	Rod	Rod	Rod
Acid from:					
D-Xylose	+	-	V	+	V
D-Fructose	W	+	+	+	-
Cellobiose	-	+	V	-	-
Melibiose	+	+	+	-	V
D-Salicin	-	+	-	-	-
Trehalose	-	+	V	-	-
Growth at 15/45 °C	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+
G+C content (mol%)	42	41.3	52-54	49	46.5

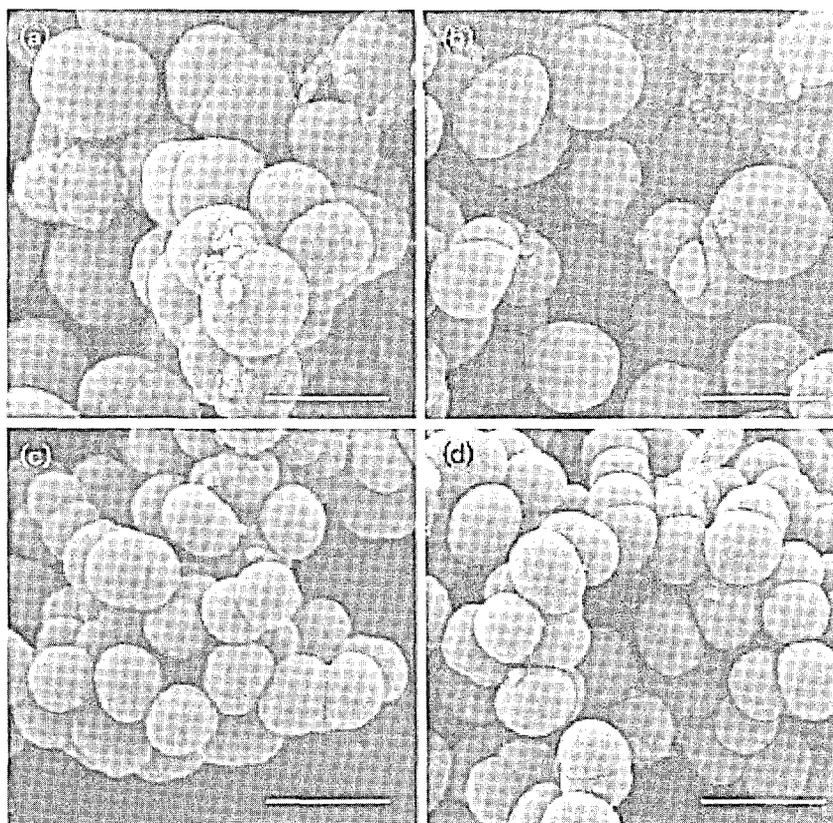


Fig. 3. Scanning electron micrographs of cells of *L. equigenersi* NRIC 0697^T (a, b) and *L. gastricus* DSM 16045^T (c, d). Bars: 1 μ m.

文 献

- 1) Morita, H., Shiratori, C., Murakami, M., Takami, H., Kato, Y., Endo, A., Nakajima, F., Takagi, M., Akita, H., Okada, S. and Masaoka, T., *Lactobacillus hayakitensis* sp. nov., isolated from intestines of healthy thoroughbreds, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2836-2839 (2007).
- 2) Endo, A., Roos, S., Satoh, E., Morita, H. and Okada, S., *Lactobacillus equigenersi* sp. nov., a coccoid species isolated from faeces of thoroughbred racehorses, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 914-918 (2008).
- 3) Roos, S., Engstrand, L. and Jonsson, H., *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 77-82 (2005).