

サーカディアンリズムを持つ非光合成微生物の探索

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 微生物新機能開発学 住谷 恵理子

1. 背景と目的

一般的に微生物の分離や培養は実験室内の恒常環境下で行われている。しかし自然環境中では様々な要素が常に変動しており、微生物の多くは環境変動への適応力を備えていると考えられる。一日周期の環境変動はその最たるものであり、実際ほとんどの真核生物で約 24 時間周期の体内リズム（サーカディアンリズム）の存在が確認されている。一方、原核生物においては光をエネルギー源として利用する一部の微生物でサーカディアンリズムの存在が確認されているが、非光合成細菌においては明確な実証はなされていない。光以外にも多くの環境で温度、また植物根圏や動物体内では有機物や酸素濃度などが日周変動することを考慮すると、暗所に生きる非光合成微生物にもサーカディアンリズムを持つことのメリットがあるはずである。また光合成細菌のサーカディアンリズムの中心遺伝子 (*kaiC*) が非光合成細菌にも広く保存されているという知見も、この仮説を支持する。本研究では、ウキクサ根圏と森林土壌の微生物群集を対象に、それぞれ光、温度を変動要因とし、恒常条件・日周変動条件・非日周変動条件で集積培養をおこない、サーカディアンリズムを有する微生物の探索をした。

2. 方法・結果

1) 異なる光照射サイクルによるウキクサ根圏微生物群集の集積培養 植物は光照射下でのみ根から酸素・有機物を放出するため、光照射条件の変動は根圏の微生物生育環境にも大きな影響を及ぼす。北海道大学ポプラ並木横にある池に自生するウキクサから根圏微生物を回収し無菌ウキクサに接種後、異なる光照射サイクル条件 (7, 12, 17 時間ごと明暗サイクル・恒常光条件) で培養した。ウキクサの生育は微生物の有無、光照射条件によって有意な差は見られなかった。3回の継代培養後に DNA を抽出し、PCR-DGGE 法により根圏微生物群集構造を解析した。その結果、12 時間ごとの明暗サイクル条件でのみ特異的に検出されるバンドが見出された。しかしウキクサの葉緑体由来のバンドの影響が大きく菌種の同定には至らなかったため、現在パイロシーケンス法により更なる解析をおこなっている。

2) 異なる温度サイクルによる土壌微生物群集の集積培養 酢酸を唯一炭素源とした培地に大学構内の林から採取した土壌を微生物源として接種し、好気条件下、異なる温度サイクル条件 (7, 12, 17 時間ごとの 10°C/20°C サイクル・10°C または 20°C 恒常条件) で集積培養をおこなった。3回の継代培養後に DNA を抽出しクローンライブラリー法により微生物群集構造を解析した結果、恒常条件と変動条件では微生物群集構造が大きく異なっていた。12 時間ごとの温度サイクル条件でのみ検出された種 (*Bordetella* sp.), 全条件で検出されるが特に 7, 12 時間ごとの短時間の温度サイクル条件で優占化した種 (*Pseudomonas* sp.), 恒常条件や 17 時間ごとの長時間の温度サイクルでのみ検出された種 (*Caedibacter* sp.) などがみられ、微生物種によって (日周) 環境変動への適応性が異なる。またゲノムデータベース解析の結果、*Bordetella* 属や *Pseudomonas* 属の中には *kaiC* 遺伝子を持つものが複数確認され、サーカディアンリズムが機能している可能性が示唆された。今後これらの微生物を純粋分離し、詳細な解析をおこなうことでサーカディアンリズムの存在が実証できるのではないかと期待される。