

## 論文の内容の要旨

論文題目 哺乳類腸内におけるバクテリアの窒素固定能に関する実験的研究  
(An experimental study of bacterial nitrogen fixation in the mammalian gut)

氏名 岩瀬 忠行

酸素や炭素、水素と同様に、窒素は生物の成長と維持に重要な元素である。窒素自体は地球上に豊富に存在するものの、その多くは生物の利用できない不活性な分子状窒素である。それゆえ、他の元素に比べて利用可能な窒素はしばしば不足する。またこの不足は生物の成長を制限する要因となりうる。

窒素固定細菌は、生物学的に不活性な分子状窒素をアンモニウムへと変換し、さらにはアミノ酸へと変換することで、窒素の枯渇した環境においても生育できることが知られている。ダイズやレンゲ、クローバー等のマメ科植物は、窒素固定細菌と共生することで、窒素源の乏しい荒地でも旺盛に生育することができる。近年、マメ科植物以外の植物、例えばサトウキビを含むイネ科植物やサツマイモなども、窒素固定細菌と共生関係にあることが報告されている。また窒素固定細菌は、植物だけではなく昆虫の腸内にも生息しており、その宿主と共生関係にあることが知られている。具体的には、シロアリやエルサレム甲虫(木材を主食)、フナクイムシ(木材を主食とする海産性の二枚貝)、そしてハキリアリ(葉・菌類を主食)が宿主となりうる。さらに、貧栄養な海洋に生息するサンゴ内部に生息する窒素固定細菌の存在も報告されている。窒素固定細菌との共生は、宿主の新たなニッチの形成や獲得につながるものと考えられる。

これまでに広く知られている窒素固定細菌として、シアノバクテリア、リゾビウム、*Azotobacter* spp.、*Bacillus* spp.、*Clostridium* spp.、*Klebsiella* spp.などがあげられる。リゾビウムは根粒菌とも称され、マメ科植物との寄生関係については深く研究されている。自由生活を行う細菌である *Klebsiella* spp.についても研究が行われており、*Klebsiella*の一部には窒素固定能を有するものが存在し、イネ科植物の根や昆虫の腸内で窒素固定を行うことが報告されている。

*Klebsiella*は腸内細菌科に属するグラム陰性の通性嫌気性細菌であり、その生育範囲

の広く、土壌や植物の根、昆虫の腸内に加えて、ヒトを含む哺乳類の腸内からも分離される。これらの知見は、窒素固定能を有する *Klebsiella* 等の窒素固定細菌が、哺乳類の腸内においても窒素固定を行いうる可能性を示唆するように思われる。しかしながら、*Klebsiella* が哺乳類の腸内において窒素固定を行うかどうかは分かっていない。またヒトを含む哺乳類由来 *Klebsiella* 株について、窒素固定に関する系統だった解析はなされておらず、不明瞭な部分が多い。

そこで第一に、これらの菌株から抽出したゲノム DNA を用いて、窒素固定遺伝子の保有について検討することとした。一般に、窒素固定細菌のスクリーニングを行う際、窒素固定酵素遺伝子 *nifH* の有無を PCR によって調べられる。本研究において *nifH* の有無調べたところ、約 50% の株 (21 株中 10 株) が *nifH* 遺伝子陽性であった。

*nifH* 陽性株による窒素固定が、生物学的窒素固定 (窒素固定酵素を介した窒素固定) であることを確認するためには、窒素固定酵素をコードする窒素固定遺伝子を破壊した株を作成する必要がある。様々な遺伝子破壊株作成法が知られているが、本研究ではグラム陰性細菌に適用される遺伝子破壊法を用いることとした。本法を用いる際の条件は、対象とする菌株がアンピシリンおよびカナマイシン等の薬剤に感受性を有していることである。そこで、*nifH* 遺伝子陽性株の薬剤耐性を調べたところ、*Klebsiella* sp. JKp 株が *nifH* 陽性かつ両薬剤に対して感受性であったため、これを供試菌株として選定した。

Wanner 法を用いた変異株の作成では、破壊する窒素固定酵素遺伝子の上下流の塩基配列を明らかにする必要がある。そこで、標的の塩基配列を PCR を用いたダイレクトシーケンス法により明らかにした。また、窒素固定酵素をコードする遺伝子の他に、窒素固定酵素の発現や制御に関連すると考えられる多数の遺伝子がクラスターを形成してゲノムに存在していることが知られている。今回、供試菌株の窒素固定遺伝子クラスター (*nif* cluster) を形成する窒素固定関連遺伝子群の全塩基配列の決定も併せて行った。その結果、本菌株の *nif* cluster の全長は 21,731 bp、20 の遺伝子から構成されていることが判明した。これらの遺伝子の機能については不明なものも多いが、その多くは窒素固定酵素の成熟や発現調節に関与しているとされる。中でも、*nifH* 遺伝子、*nifD* 遺伝子ならびに *nifK* 遺伝子は、窒素固定酵素を構成する重要な遺伝子であり、窒素固定に必須である。そこで、本菌株のこれらの窒素固定遺伝子において、偽遺伝子化しているものがあるかどうかを検討した。その結果、点変異等による終始コドンの出現は見られず、また遺伝子の断片化も見られなかった。

これらの情報を基に、遺伝子破壊法の一つである Wanner 法を用いて窒素固定遺伝子

を欠損させた変異株 (*nifHD* 破壊株) を作成した。変異株は、標的遺伝子の欠損を PCR ならびにシーケンスにより確認した。RT-PCR を行ったところ、供試菌株は窒素固定遺伝子 *nifH* を発現していることが確認された。また、窒素固定によって発生する水素ガスを検出することで、供試菌株 (野生株) の窒素固定能について検討を行った。変異株を用いた処理区では水素ガスの発生は見られなかったが、野生株では時間の経過とともに水素ガスの発生量は増大した。次に、供試菌株における窒素固定の役割を検討するため、野生株と変異株を無窒素培地で一定期間培養し、その生存率を算出した。野生株と変異株を無窒素培地に  $10^9$  個となるよう接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 4 日間嫌気条件にて培養したのち、LB 寒天培地に播種し生菌数を計測したところ、野生株の無窒素培地中における生存率は変異株に比べて約 100 であった。これらの結果から、供試菌株が窒素固定能を有していることが確認された。

次に、マウス腸内での窒素固定細菌の働きについて検討を行った。第一に、供試菌株がマウス腸内に定着するかどうか、またマウス腸内で窒素固定遺伝子を発現するかどうかを検討した。ゾンデを用いて菌 ( $10^5$  CFU/mouse) をマウスに経口投与し、4 日間飼育した。経口的に糞便を回収し、コロニーカウンティング法により菌が定着できているかどうかについて検討した。その結果、安定して糞便から窒素固定細菌を回収することができた。このことから、本菌株は、マウス腸内に安定的に定着できる菌であると判断した。次に、腸内での窒素固定遺伝子の発現を解析した。回収した腸内容物から total RNA を抽出精製し、RT-PCR を行ったところ、マウス腸内における窒素固定遺伝子の発現が確認された。また、嫌気環境下で回収した腸内容物をクロラムフェニコール含有無窒素培地に置き、新規のタンパク質が産生されない条件かつ嫌気条件下で  $^{15}\text{N}_2$  に暴露させたところ、腸内容物に  $^{15}\text{N}$  が取り込まれていることが、elemental analysis-isotope ratio mass spectrometry (EA-IRMS) を用いた分析により明らかになった。

最後に、窒素固定細菌を有するマウスを  $^{15}\text{N}_2$  を満たしたチャンバーで飼育し、窒素固定細菌によって腸内で固定された窒素が、マウスの体組織に取り込まれるかどうかを検討した。窒素固定細菌を投与したマウスを  $^{15}\text{N}_2$  を満たした特型チャンバーで 3 日間飼育した後、腸内容物と、毛、肝臓、腸管を回収し、EA-IRMS を用いて  $^{15}\text{N}_2$  の取り込みについて検討したところ、腸内容物、肝臓および腸管において有意に  $^{15}\text{N}$  が取り込まれていることが判明した。

以上の結果から、マウス腸内において窒素固定能を有する *Klebsiella* が固定した窒素を宿主が取り込むことが  $^{15}\text{N}_2$  を用いた実験によって示された。

