

細菌の生態的特性の進化的安定性について

建設省土木研究所 中島敏幸

1. はじめに

排水処理系に、例えば遺伝子組換え体のような改良微生物をもちいて目的に応じた制御をしようとする場合、まず技術的に問題となるのは、どのような生理的、遺伝的、また生態的特性をもった生物であればそれが達成されるのかという事であろう。微生物群集中には、同種及び他種の様々な生物個体との間に、共通の資源を取り合う競争(exploitation competition)や代謝産物を介した干渉型競争(interference competition)、捕食者との相互作用(predator-prey interactions)、共生関係(symbiotic relationships)などの生物的相互作用(biotic interactions)が存在する。また、これらの相互作用は同時に各構成種(component species)の個体に淘汰圧をかけるために、長い時間幅では、個体群の遺伝的組成にも影響を及ぼすだろう。従って、このような複雑な相互作用系において特定の微生物の個体群密度或いは群集全体を制御したり、またそれらの遺伝的組成を管理するには、微生物個体群や群集についての多くの問題を解決しなければならない。例えば、ある有用な遺伝的性質或いは働きをもった微生物をある微生物群集に投入した場合に、そこでのさまざまな生物的相互作用下で存続しなければならない(生態学的安定性)という問題、また生態学的に安定に存在したとしても、更に長い時間幅では、同種の"有用な性質を失った変異個体"との間の種内競争が生じうるが、この変異体に駆逐されてはならない(進化的安定性)という問題も生じる。従って、このような観点から、"有用"とは、生理、生化学的特性のみでなく、生態及び遺伝的特性をも含んだ意味での"有用"な性質とみなした上で、改良微生物の排水処理系への適用を研究していかなければならない。本研究では、とくに後者の問題に焦点を当て、種内競争下における微生物個体群の生態学的特性の遺伝的变化及びその安定性に関して、実験個体群を用い、細菌個体群の種内競争下での生態的特性の変化は、十分な時間さえあればいくらかでも適応度を高める方向へ変化し得るのか、また、一つの生態学的特性の変化は他の生態学的特性の変化にどのような相関をもっているか、という2点に関して解析を試みた。

2. 1 実験材料

実験に用いる細菌を選ぶにあたっては、既存の排水処理システム中で優先化している細菌種にこだわらず、遺伝学的、生態学的実験に適した種、株名のはっきりした材料として、腸内細菌科(Enterobacteriaceae)に属する、*Escherichia vulneris* JCM1688、*Escherichia blattae* JCM1650、*Enterobacter cloacae* JCM1232、*Enterobacter aerogenes* JCM1235、*Citrobacter freundii* IF012681、*Citrobacter freundii* IF013539、*Citrobacter freundii* IF013545を用いた。

上記の3属、5種、7株を用いて種内競争系の長期培養及びこれにおける各個体群の生態的特性(比増殖率及び分散性)及び生理、生化学的特性の変化を調べ、(1)それらの特性の変化に限界値があるのか、あるとすればその値に、属或いは、種、株によって差があるか、また(2)選択圧がかかっている制限基質への適応が他の基質に対する特性にどのような影響を及ぼすか(どのような相関があるか)という点に関して調べた。

2. 2 長期連続植え継ぎ培養実験

平板培地上で純粋化した各株を試験管中のグルコースと無機塩からなる培地(以後、T培地)へ一白金耳接種し培養し、これを本株とした。長期培養は、繰り返し数を多くできる利点から連続植え継ぎ培養(serial transfer)により行なった。ここでの希釈率は、1/100である。本株を0.1mlとり試

試験管中のT培地に接種し、24時間の静置培養をした。この後、試験管ミキサーによる攪拌と、上下の攪拌を完全にするためにピペットによる上下の攪拌をした後、次の培地へ0.1 ml接種した。この培養と植え継ぎの操作を70回（即ち70日間）繰り返した。この長期植え継ぎ培養実験をそれぞれ三回行なった。各培養系の途中の回の培養サンプルをそのままの状態ですべて5℃で保存し、細菌個体群の比増殖率（specific growth rate）及び分散性の変化、及び生化学的性状を調べた。それぞれの株について、培養は、次に示す比増殖率測定のための培養を含め、全て30℃の恒温槽中で、静置条件で行なった。

2. 3 比増殖率測定方法

細菌個体群の増殖率の測定は、目的に応じ、以下に示す二つの方法のうち一方より求めた。（1）平板法による方法； 測定する細菌の浮遊液を0.1～0.2 mlとり、これをT培地に接種し培養する（前培養）。この個体群が対数増殖期にある時に、これを取り、増殖率測定用のT培地に細菌密度が $10^3 \sim 10^4$ /mlになるように希釈し、4本の測定用培地に接種した。接種後、4時間をおき初めの細菌生菌数の測定を平板法により行なった。次に、7時間後に2回目の測定、更に10時間後に3回目の測定をした。以上によりえられた細菌密度の自然対数の時間に対する傾き、即ち比増殖率を3点の値の回帰直線より求めた。4つの繰り返し測定実験から得られた増殖率値の平均値とその標準偏差を求めた。

（2）吸光度（550 nm）による方法； セルブロック温度調節可能な自記分光光度計（6連セルボジショナ付島津分光光度計 UV-160）を用い、目的とする細菌をシリコ栓をしたガラスセル中で静置培養し、その光学的細菌密度を20分間隔でモニターした。得られた増殖カーブから対数直線部の測定値を選び、連続した7～15点の測定値より時間に対する回帰直線の傾きを求めた。3～4の繰り返し測定実験から求めた増殖率値の平均値と標準偏差を求めた。高い測定精度が必要な場合にこの方法を用いた。

2. 4 細菌個体群の分散性の測定

定常期に達した細菌の培養液を、細菌密度が定常期密度の1/1000になるようにとり、10 mlのT培地の入った試験管に接種し、これを静置培養する。個体群が定常期に達したら図3に示すように試験管中の培養液の上部中間部分より2.5 mlをピペットで静かにとり550 nmでの吸光度を測定した。次に残りの7.5 mlの部分を試験管ミキサーで均一に攪拌した後同様に吸光度を測定した。前者の濃度を後者の濃度で割った比を分散性指標とした。細菌個体群が均一に分散していればこの値は1である。この指標値測定を4回繰り返しその平均値と標準偏差を求めた。

3. 結果

各株についての細菌個体群の比増殖率の変化を調べた結果、どの株も植え継ぎ回数とともに比増殖率が高まり、やがてプラトウに達していることがわかった。このプラトウのレベル（値）が細菌の種（或いは株）によって異なっていることが推察されたので、この点に関し、測定精度のよい吸光度による測定方法によって比増殖率を求め、各株についてこの値を比較した。この結果より解ったことは、種によってプラトウ値が異なるばかりか、*C. freundii*に見られるように同種で異なる株間で値が異なっていることである。

グルコースを制限基質として長期培養した個体群をグルコース以外の基質即ち、マルトースとフルクトースでの比増殖率を調べた。*E. blattae*においては、グルコースでの比増殖率の増加に伴いマルトースとフルクトースにおいても比増殖率が高まっているが、マルトースでは植え継ぎ回数40から50にかけ逆に下がったことである。しかし、フルクトースでは50回でも下がってはいなかった。

各株についての細菌個体群の分散性の変化を調べた結果、低い分散性の個体群の分散性が次第に高まっていく変化が見られた。*C. freundii* IF012681, *C. freundii* IF013539, *C. freundii* IF013545, *E. vulneris*の本株の値は低い分散性を示した。これは観察によれば、これ等の細菌はフロックを形成するために試験管の下部に沈降しやすいことによるものであった。分散性指標値が高く変化するにつれ、フ

ロッキュレーションの度合いが小さいことが観察された。なお、*E. blattae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*の本株はフロックを形成しなかった。

4. 考察

制限基質への適応はより高い比増殖率をもたらすので、このような変異体が次第にその個体群中に頻度を増すであろう。また、低い分散性、つまりフロックを形成した状態では、細菌細胞が互いに接近し互いの間に共通の資源を取り合う競争や代謝産物を介した干渉型の競争が強いであろうが、これに対し分散型の変異体はこのような種内競争を回避しやすいのでそこでの増加率が相対的に高く、このために次第に個体群中に頻度を増していったのであろう。

本実験における細菌の世代の経過は、長期植え継ぎ培養系での希釈率から推定すると、70回の植え継ぎで約465世代である。このような長い世代の経過によって、そこでの制限基質に適応した変異体や競争をより回避しやすい分散性という形質をもった変異体が出現し増加して次第にその頻度を増していったと考えることは可能であろう。結果で見たように、細菌個体群の特性はその置かれた諸条件のなかで長い時間を通して次第に変化した。しかしながら、これ等の変化は際限なく続くのではなく、次第に頭打ちになり止まった。このような、変異体の出現が十分起こり得る時間幅においてその値が安定することはどのような機構によるのかをゲノムの遺伝情報の構造の観点から、現在実験的に検討中であり、詳細は後の報告に委ねるが、このような実験結果を次のように見ることは可能であろう。即ち、長い世代の経過する培養系において、様々な変異体が出現してはその系においてより適応度の高い個体が次第にその頻度を増し、最終的にその細菌個体群は、その中の任意の個体から点突然変異によって生じるいかなる変異体もその個体より適応度が高くない（この意味で進化的に安定な）状態に到達したと考える。

更に興味深いことに、このプラトウのレベルが種（株）によって異なっていたことである。*E. blattae*は、始め（本株）は *C. freundii* IFO13545 より比増殖率が高いが、のちに後者の方が高くなっていることが解る（右図）。安定に達した個体群の適応度の値がまったく同じ基質や環境であっても種によってその値が異なるということは、比増殖率の増加の限界値は、例えば物理化学的な限界ではなく、その種（株）固有のなにかであろうということを裏づけている。

また、*E. blattae*のグルコースとマルトースでの比増殖率の変化についての結果に示されているように1つの量的形質の増加

が他の量的形質を減少させるような、量的形質間の負の相関を示す例が見られた。このような相関の構造も種によって異なるのではないかと推測される。最後に、処理系への適用を考えるにあたっては、細菌の特性は遺伝的に変化し得ること、そしてその変化の限界は種や株によって異なり得ることから、どのような微生物を使うことが好ましいかは、対象とする細菌についての一時点の情報だけでは不十分である事を注意すべきであろう。また、先に述べた意味での進化的な安定性のより深い理解は、遺伝子組換え微生物のリアクター中での安定した生存や活性を達成するうえでも重要であろう。

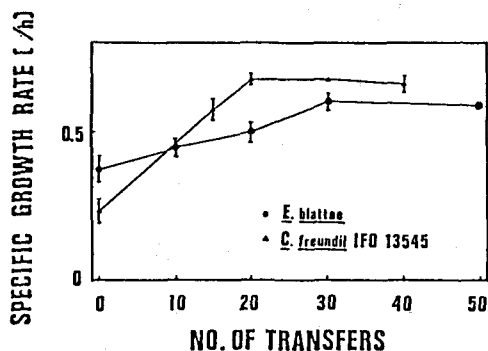


図 *E. blattae* と *C. freundii* IFO13545 の比増殖率の変化