受賞総説

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 76, No. 2, pp. 102~113, 2002]

新規微生物現象の解明と応用に関する研究

(2001 年度農芸化学会功績賞受賞)

緒方 靖 哉

(九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門)

Key words: bacteriophage control; bacterial lysis; pock formation; spore formation; bio-deposition of silica

発酵などの産業にとって、生産に支障を来す微生物現象の原因究明と、その対策は危機管理上の最重要課題である。しかも、これらの微生物現象には、新規あるいは特異性のある有用な微生物機能も見いだされる。筆者らは、現実には生産異常をもたらした未解明の微生物現象を究明し、得られた成果を、生産への対応策のみならず基礎ならびに応用分野の研究に活用した。本稿は、これらの経緯と結果を下記の4項にまとめたものである。しかし、記述内容が雑ばくなるのは否めないもので、関連する文献を挙げておいた。ご参照いただければ幸いである。

1. ファージ汚染と防除対策に関する研究

バクテリオファージ（以下ファージ）の汚染はさまざまな発酵産業の生産プロセスで発生し、しばしば多大な被害をもたらしてきた^{1)~4)}。しかし、今日、ファージ汚染の問題は近代設備と施設を有する企業では、予防対策を中心とする有効なファージ汚染対策が採られ、深刻な被害は回避できるようになった^{1)~4)}。一方、チーズ、乳酸飲料、ワイン、醤油などの原料の殺菌を十分に行えない発酵や開放系の発酵ではファージ汚染を免れるのは難しく、ファージ汚染はなお大きな問題である。増産に伴う工場の拡張工事の際には、雑菌汚染と同じくファージ汚染の危険性が非常に高くなる。また、遺伝子操作で育種した大腸菌などの単一種・株を使用している発酵では重大な汚染に陥りやすい。有効な汚染対策の開発を目指した研究は今日も重要な課題になっている⁵⁾。

筆者らは、アセトン・ブタノール発酵、アミノ酸発酵、乳酸菌利用発酵などのファージ汚染を系統的に追究し、発酵タンクに侵入したファージの多くは、工場周辺に生息する菌群で増幅したファージであることを明らかにするとともに、発

酵環境の整備を中心とした汚染対策を提示した^{1)~4)}。さらに、活性汚泥の浄化機能低下^{4)~6)}と西南暖地型サイレージの発酵品質低下^{7)~9)}の要因に、ファージ感染による優占菌種・株の死滅と続く他菌種・株への交代がかかわっていることを見だし、多種多様の菌種・株が活動している環境でのファージ発生と汚染状況を明らかにした。特に、サイレージ発酵では、ファージ汚染に続く雑菌・腐敗菌の繁殖によって著しいサイレージの品質低下が起こることを示した。これらのファージ発生による菌種・株交代現象の知見に加えて、人為的に特定の菌株を土壌にばらまき続けた場合に、該菌株に感染するファージが短期間のうちに出現することを実証して^{4), 10)}、自然界における菌群の変動に及ぼすファージのかかわりの重要性を推断した。

ファージの感染は、まず細胞表層のレセプターへの吸着、つづく細胞内へのファージゲノムの侵入、さらにファージゲノムの複製とファージ構成タンパク質の合成、ファージ粒子の構築、溶菌過程を経て、娘ファージが細胞外への放出されるステップからなる (Fig. 1(A))¹¹⁾。ファージ感染の各ステップで対応する細菌側の防御機能があり、感染を阻止するが、ファージ側もこれらの細菌の生体防御に対して実に巧妙な対抗手段をとって感染に成功する^{5), 12)}。従来からファージ汚染に対しては、細胞表層にあるファージレセプターに変化の生じたファージ耐性株 (bacteriophage-insensitive mutant strains, BIMS) が利用されている。多くの乳酸菌利用発酵では、前述の特殊性からファージ系列の異なる複数の BIMS や複数の別種・株を用意し、ローテーションを組んで使用する方法 (phage defense rotation strategy) によって、ファージ汚染を主に回避してきた^{5), 11)}。近年、細菌の有するあらゆるファージ耐性機能を相互に利用して、積極的にファージ汚染に立ち向かおうとする研究が乳酸菌利用発酵分野で展開されている。特に、ファージ増殖を阻害するプラスミドの利用の有効性が指摘され、注目を集めている⁵⁾。その多くはプラスミド支配の制限酵素や不稔感染 (abortive infection, Abi 機構) の要因になる Abi タンパク質を利用する研究である。

サイレージ乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* NGR10101 株はファージ耐性に作用するプラスミド pLKS を有している

Novel microbial phenomena and functions: Mechanisms and application

Seiya OGATA (Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University)

Fig. 1. Schematic Model of Phage Resistance.

(A) Generalized phage infection cycle and phage resistance, modified with permission from Dr. T.R. Klaenhammer; copyright Humana Press Inc.¹¹⁾

(B) Phage resistance of *Lactobacillus plantarum* NGRI0101.^{5), 13)} Phage and plasmid pLKS may share similarities in factors required for the replication of DNA.

The nucleotide sequence of pLKS is deposited in databases under accession number AB035265.

る¹³⁾。pLKSには既知のファージ耐性遺伝子との相同性を見いだすことができないので、その耐性機構は新規のAbiか、もしくはPer (phage-encoded resistance) 機構に類似するpLKSの複製起点oriとファージori間の干渉や拮抗作用による阻害機構の可能性が推測される (Fig. 1(B))^{13), 14)}。Per機構はファージDNAの一部を利用したファージ耐性システムであり、アンチセンスRNA利用によるファージ防御システムと同じく利用技術の確立が待たれる。ファージori領域を組込んだ多コピープラスミドベクターを有する形質転換菌に感染したファージは、Per機構でDNA複製が不可能になる⁵⁾。本システムに、ファージ感染が引き金となって遺伝子発現が誘導されるプロモーターを入れ、ファージ感染で爆発的にプラスミドを増殖させる改良型が作製されている。さらに、これに制限酵素遺伝子を組入れたものは、ファージの感染で発現する多量の制限酵素によって宿主細胞を死滅させるので、少数の細胞内だけのファージ感染の被害に止まり、全体のファージ汚染が防御できる致死カセットになる。*L. plantarum* pLKSプラスミドはこのようなファージ制御システム (phage-trigger cell suicide) 作製の核になりうるプラスミドとして期待できる。このシステムにナイシンのようなバクテリオシン遺伝子をさらに組み合わせると、ファージ感染後に起こる雑菌繁殖の対策になると考えられる⁵⁾。筆者らはサイレージ乳酸菌から新規バクテリオシンの生産遺伝子をもつプラスミドを分離しており^{15), 16)}、その利用開発を進めている。

この間、多種多様のファージを分離したほか、ファージ尾部様バクテリオシン^{3), 17)}、溶原性ファージを用いた遺伝子クローニング^{18), 19)}、分類の難しい乳酸菌のファージタイピン

グ^{20), 21)}、ファージのコードする溶菌酵素 (phage lysin; endolysin)²²⁾などの究明や利用開発を行った。特に、ファージlysinsは、作用様式が多様多様なので、市販の溶菌酵素の種類が少なかった70・80年代、未知の細胞壁構造の解析や新規にプロトプラストの作製を試みる際に有力な手段になった。先に見つけやすいファージを探して、そのlysinsなどの機能を利用する急がば回れの方式は現在でも通用すると思える。最近注目されているファージの利用として、ファージとそのlysinsを治療の難しい細菌感染症へ利用するphage therapyの報告が増えていることを記して本項を終る。

2. 溶菌現象、溶菌酵素、および細胞表層に関する研究

細菌の溶菌現象は古くから知られていたが、溶菌は種々の要因で起こること、細胞表層の成分や構造に関する知見がなければ、溶菌過程の解析が難しいことなどから、70年代には、系統立った研究は余り行われていなかった。特に、嫌気性の*Clostridium*属細菌では、下記するautolysisのような、この属の細菌に比較的普遍的に起こる溶菌現象が存在しているにもかかわらず、溶菌に関する研究は全くなかった。この未知分野の溶菌現象を追究するため、細胞壁を中心に細胞表層の解析も同時に進めた。

1. Autolysis, Autolysin, Autoplast

糖度を高くして培養する高濃度仕込みや生理食塩水中で溶菌が起こる現象をアセトン・ブタノール生産性の*Clostridium*属細菌 (*C. saccharoperbutylacetonicum* など) で追究した^{23)~26)}。これらの菌は0.2~0.5 M sucroseやNaClが存在すると、細胞壁の自己溶解が起こる。溶菌は活発に増殖を

している対数増殖期の細胞で最も著しく、定常期の細胞ではほとんど起こらない。細胞分裂が進行中の細胞では中央部分の細胞壁で溶解が始まり、細胞分裂が完了したばかりの細胞では dechain した方の先端の細胞壁で溶解が始まる。両溶菌ともに、tetracycline などのタンパク質合成阻害剤で増殖を阻害された細胞では溶菌は起こらず、また autolysis の阻害剤として知られている薬剤 (formalin, PCMB, 重金属イオン) により強く阻止される^{24), 25)}。

この両 autolysis の溶菌経過と溶菌に及ぼす自己融解酵素 autolysin (主活性 muramidase)²⁷⁾ の作用を詳細に解析し、溶菌機構を明らかにした。すなわち、autolysin は細胞分裂に伴う正常な細胞壁伸長合成のための細胞壁の部分分解を行っているが、本溶菌現象では、sucrose や NaCl によって細胞に原形質分離が起こり、細胞壁と細胞膜間が離れたため、細胞壁構成ユニットの挿入・補給ができず、一方的に autolysin による分解反応だけが進行して溶菌になったと結論した (Fig. 2)²⁸⁾。

Sucrose による溶菌 (sucrose-induced autolysis) では細胞は最終的にプロトプラストになるが、NaCl による溶菌 (Na^+ -induced autolysis) では Na^+ の塩溶 (salting-in) 作用によって細胞膜も溶解し、細胞は崩壊してしまう。NaCl による細胞膜溶解は 5 mM 以上の Mg^{2+} で抑制され、逆に微量のキレート剤で促進される²³⁾。Sucrose-induced autolysis で形成されるプロトプラスト (autoplast) は、タンパク質・核酸の合成能やファージ・プラスミドの増殖能を維持している²⁹⁾。本 autolysis は誘起剤が保護剤をも兼ねる穏和なプロ

Fig. 2. Schematic Representation of the Process of Sucrose-induced Autolysis in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC13564).

Decomposition of the cell wall begins at the middle of cell.²⁸⁾ The illustrated process is also applicable to the cell in which the cell wall is initially decomposed at the pole.

トプラスト調製法として利用価値があり、細胞膜の分離と化学組成の決定に³⁰⁾、またプロトプラスト形質転換法や DNA 分離法に活用できた³¹⁾。また、0.35 M sucrose を入れて培養する方法は、放線菌のプロトプラスト形成などの遺伝子操作にも応用されている。

2. ファージ尾部様バクテリオシンの産生に伴う溶菌現象

ファージの産生に伴う細胞溶解を、ファージ尾部様バクテリオシン clostocin O の産生を例にして、その endolysin (muramidase) の性状と生成過程、宿主 autolysin のかわり、さらに細胞壁の組成と構造などから解析した^{3), 22), 32)}。この実験系は、ファージ感染細胞よりも、mitomycin C (MC) で clostocin O 産生を全細胞で同調的に誘発できるメリット

Fig. 3. Cell Wall Synthesis and Protoplast Formation Activity during the Induction Period of Clostocin O Lysogen, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC13564).

After mitomycin C (MC) treatment, the cells harvested by centrifugation were suspended in fresh medium prewarmed to 30°C at the time indicated by the arrow, and the incubation was continued at 30°C. Maximum activities of autolysin, clostocin O lysin and clostocin O are 0.3, 12, and 256 units, respectively.^{17), 33)}

The cell wall synthesis activity was measured by incorporation of [^{14}C]D-Ala and [^{14}C]GlcNAc into the hot TCA-insoluble fractions and by sensitivity to penicillin G. The protoplast formation activity was measured by counting the number of intact protoplasts formed under the optical microscope and cross-checked by optical density change measurements. The protoplasts were prepared by treating cells with 0.35 M sucrose solution for 60 min, see Fig. 2.

Table. Fe and Mg Contents in the Cell, Cell Wall Peptidoglycan, Cell Wall Polysaccharide, and Protoplasmic Membrane in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*

Metal	Whole cell	Cell wall	Peptidoglycan ($\mu\text{g/g}$ dry wt.)	Polysaccharide	Protoplasmic membrane
Fe	880	593	935	20	660
Mg	2240	173	22	202	4410

All materials used were prepared from cells cultivated for 9 h.

Metals were determined by atomic adsorption spectrophotometrical analysis.

Fig. 4. Selective Accumulation of Iron Ion into the Cell Wall during Growth of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC13564).

Fe ion was removed from the culture medium by the cells throughout the log phase.³⁴⁾ Egression of Fe was due to the lysis of spore-forming cells, because strain N1-4 starts to form spores from the early stationary phase. The accumulation of Fe into the cell wall was closely related to the removal of Fe ion from the culture medium until the late stage of the log phase (about 15 h: It is difficult to prepare the cell wall from cells cultivated for over 15 h, because of the difficulty in disrupting the cells).

Increased accumulation of Fe into cell wall is closely related to cell growth with the increased production of butanol. The selective and vigorous accumulation of Fe in the cell wall is due to the Fe binding activity of the peptidoglycan moiety of the cell wall (see Table), and this is the first step in its transport into the protoplasmic membrane and protoplasm.

がある。また当時、ファージやバクテリオシン産生に伴う溶菌の研究はほとんど見られず、不明な点の多かった分野であった。

C. saccharoperbutylacetonicum を MC で処理すると、大腸菌の T4 ファージの尾部形態を示す clostocin O (125×22

nm; 緑膿菌の pyocin R に類似) の産生放出を伴う溶菌が誘発される (Fig. 3)^{3), 17)}. MC 処理後約 180 分目に成熟溶菌 (mature lysis) が始まる。その際、clostocin O 粒子の合成は 150 分で完了しているが、細胞壁の合成は粒子合成完了後も継続していることを放射線同位元素化合物の細胞壁への取込みから確認した。また、誘発後の細胞壁合成の持続は penicillin による細胞壁伸長の停止が増殖のどの時期でも起こることからも明らかになった。なお、細胞壁合成のための細胞壁の部分分解には clostocin O-lysin が autolysin の代わりに機能していることを、penicillin に対する溶菌感受性が autolysin 活性の低下期に一時的に低くなるが、clostocin O-lysin の生成量の増加につれて高まることから判明した。

成熟溶菌を起こす主因子は、clostocin O-lysin であるが、この合成が完了していなくても、成熟溶菌に必要な酵素量の 10% 以上が生成されておれば、タンパク質合成阻害物質添加によって早期溶菌 (premature lysis) が誘起される^{3), 22), 33)}. この早期溶菌については、タンパク質合成が阻害されることで、MC 誘発後もタンパク質合成系に依存して継続していた細胞壁合成に異常が起こり、少量の clostocin O-lysin による細胞壁分解反応のみが顕化して急激な早期の溶菌になると推定している。これらの結果から、ファージ尾部様バクテリオシン産生やファージの感染に伴う溶菌の開始は細胞壁合成速度と細胞壁分解速度の不均衡に依存することが明確になった。

3. 細胞壁への Fe イオンの特異的集積

溶菌酵素の研究と併せて *Clostridium* 属細菌の細胞壁の組成・構造を解析したところ³²⁾, Fe イオンが細胞壁、特にペプチドグリカンに集積しているのを見いだした (Table)³⁴⁾. 細胞膜にも細胞壁に次いで多く集積する。ブタノール発酵には Fe イオンは必須であるので、培地に添加されるが、Fe 量 (約 0.05 mM) は Mg (約 1 mM) に比べると 1/20 である。にもかかわらず、Mg イオンは細胞壁には Fe イオンほどは集積せずに、細胞膜に多量集積する。Fig. 4 はブタノール生産と Fe イオンの関係を示している³⁴⁾. 菌の増殖が進み、培地中の Fe イオンが細胞側へ移行して、細胞壁ペプチドグリカンに集積し始める時期にブタノールの生成が活発化する。ブタノール生成には細胞膜と細胞内に移行したものが直接関与し、細胞壁は Fe イオンの選択的集積と保持に機能すると

推定している。これらの結果は、ブタノールの生成時期に対応して Fe イオンが特異的にペプチドグリカン層に多量蓄積することを示す、細胞表面の機能に関する興味深い知見を提供したもので、また細菌の合目性をも暗示させる。

ついで、この細胞壁に集積している Fe イオンが autolysin, clostocin O-lysin, HM7 phage-lysin (amidase)³⁵⁾ などの酵素活性に強く影響を及ぼすことを、fradiomycin (FRM, neomycin) などのアミノ配糖体抗生物質の溶菌酵素阻害作用から明らかにした^{22), 36)}。細胞壁中の Fe は 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の FRM で約 50% 除去されるが、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に上げててもこの除去率はほとんど変わらずに、多量の Fe が細胞壁に残存する。ところが、Mg の方は 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 10% 程度除去され、FRM の濃度に比例して除去率は上がり、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではほぼ完全に除去される。FRM はこれらの溶菌酵素活性に対し、低濃度では促進的に、高濃度では阻害的に作用する。Cu と Zn イオンも、Fe イオンと同様に酵素活性を阻害するが、細胞壁における含有量は非常に少なく、FRM によって完全に除去される。したがって、高濃度 FRM の酵素活性阻害作用は、FRM のキレート作用で除去されないで多量に残存する細胞壁中の Fe イオンによる酵素阻害に起因し、一方、低濃度 FRM の促進作用は Fe, Cu, Zn イオンの酵素活性阻害作用に対する、細胞壁中の残存 Mg イオンの抑制効果によると推定した。

3. 放線菌の孢子形成異常に関する研究

Streptomyces 属放線菌は、カビに匹敵する複雑な形態分化

を行う特性や抗生物質などの多種多様な二次代謝特性を有する生物学上あるいは産業上極めて重要な菌群である。形態分化の最終段階では、多彩な色と豊かな色調の孢子の形成が見られる。放線菌を使用する発酵では孢子をスターターにしているので、孢子形成は発酵現場にとっても関心が高い。

1. 自然誘発性 pock 形成現象

Streptomyces 属放線菌には孢子の欠失した菌叢を生じる進行性の異常現象が普遍的に見られる。かつて本現象は放線菌の生理病とも、一種のフェージ感染現象とも言われていた。その発生は生産現場にとって培養や菌株保存に支障を来すことから、原因をチオストレプトン生産菌 *S. azureus* や *S. laurentii* などを用いて追究した。詳細は最近の拙著³⁷⁾をご参照いただきたい。

本現象は、*S. coelicolor* や *S. lividans* の雌雄異株間で接合性プラスミドの転移に伴って生じる“pock”と呼ばれる接合致死現象³⁸⁾ (以下 C pock と略) と類似しているが、単一菌株内で自然発生的に生じる、その特性から“spontaneously developing pock” (以下 S pock と略) と名づけた³⁷⁾ (命名の経緯については別の拙著の中にも記している^{39), 40)}。S pock の研究は *S. azureus* と *S. endus* (現在名 *S. hygroscopicus*) を用いて始めた^{41), 42)}。 *S. azureus* 野生型株 PK0 では組込み性の環状プラスミド pSA1 が S pock 形成に関与しており、染色体組込み配列 (pSA1^{int}) から遊離型になると S pock が発生する^{37), 43)} (Fig. 5 左下)。UV 処理は S pock の発生を促進する⁴⁴⁾。S pock の発生した菌叢で固体培養を続

Fig. 5. Properties of *Streptomyces azureus* Wild-type Strain PK0 (ATCC14921) and Its Derivatives Concerning Pock Formation.

The diagram is drawn according to results from refs. 41 and 43–45.

The left at the bottom shows a giant colony with spontaneously developing pocks (S pocks) which appeared during serial subcultures of normal (healthy) culture, and also shows a schematic diagram of lateral view of the S pock.

On the right is confluent lawn with conjugative pocks (C pocks) formed through two type strains, a donor and a recipient for conjugative plasmid transfer. Also shown is a schematic diagram of the lateral view of C pock.

Fig. 6. Properties of *Streptomyces laurentii* Wild-type Strain P0 (ATCC31255) and Its Derivatives Concerning Pock Formation.

The diagram is drawn according to results from refs. 46 and 47.

けると pock の数は継代ごとに増し、気菌糸と孢子形成ができなくなり、最終的には基底菌糸のみが生育する菌叢になる。S pock は感染性であるが、発生によって菌は死滅してしまうことはない。

野生型 PK0 株から、プラスミド (pSA1 の多コピー体 pSA1.1) を多数もつ変異株 PK100 (雄株)、さらに pSA1 と pSA1^{int} 両方を欠落した変異株 PK100C (雌株) が派生した⁴⁵⁾。この pK100 雄株を PK100C 雌株の多量と一緒にプレートすると、雄株のコロニーに接して生育する雌株には気菌糸と孢子形成に障害が起こる。生育障害ゾーン内の多くの細胞には pSA1.1 が伝播しており、この障害斑の性状は C pock と同じになる⁴⁵⁾ (Fig. 5 右下)。雌雄ヘテロ菌株間で起こる C pock には中心に donor 雄株のコロニーが見られるが、ホモ型菌糸内で生じる S pock では中心の菌糸の生育は強く障害され、溶菌が起こっている^{37), 40), 44)}。

S. laurentii には、pock 形成に関与する環状プラスミド pSLS (16 kb) がその pSLS^{int} から遊離化するのを抑制する、線状の接合性プラスミド pSLL (93 kb) が存在する^{46), 47)} (Fig. 6)。線状の pSLL は液体培養中では欠落しないが、固体培養中に欠落する。固体培養での継代で、線状プラスミド pSLL が欠落すると、環状の pSLS が遊離化して、S pock が発生する。また、環状 pSLS が多数存在して、孢子ができなくなった菌に線状 pSLL を接合導入させると、孢子形成が回復する。つまり、線状プラスミドには、pock 形成に関与する pSLS の染色体配列からの遊離化を抑制するばかりか、環状 pSLS の孢子形成障害を抑制する作用もあることを示唆している^{37), 47)}。最近、*S. azureus* にも線状プラスミドが存在すること⁴⁹⁾を再確認しており、線状プラスミドは、S pock 発生の防止に、また pock プラスミドが形態分化に関連して組み込み配列から遊離化するメカニズムを明らかにする有力な鍵になると期待される。

S. azureus の場合、孢子形成障害の主要因は、接合・組み込み性プラスミド pSA1 に座位する *spi* (accession No. S58719) と名づけた遺伝子にあることを、pSA1 の多コピー

Fig. 7. Genetic and Physical Map of the Conjugative and Integrative Plasmid pSA1.1 from *Streptomyces azureus* PK100.

spi, sporulation inhibition gene (*kil* locus) and intermycelial transfer; *spdSA*, *SB*, *SC*, and *SD*, spread function for intramycelial plasmid transfer; *rep*, gene encoding initiation protein for σ -type replication; *ori*, plus and minus origins; *praSA*, plasmid replication activation; *impSB*, inhibition of maintenance of plasmid or enhancement of ImpSA repression activity; *impSA*, gene encoding repressor for *kil* locus or *kil* override gene; *xis*, site-specific excisionase gene; *int*, site-specific integrase gene; *attP*, attachment site for site-specific integration.

The nucleotide sequence of pSA1.1 is deposited in databases under accession number AB010724.

変異体 pSA1.1 について遺伝子破壊実験で明らかにした⁵⁰⁾ (Fig. 7)^{37), 48)}。ついで、*spi* はプラスミドの菌糸間伝達遺伝子 *tra* として機能することを示すと同時に、当時機能の不明であった *B. subtilis* の孢子形成に関与する遺伝子 *spoIIIE* の産物とホモログであることを他に先駆けて指摘した。併せて、下記する *spi* の孢子形成障害作用の仮説を提出した⁵⁰⁾。これ

らの成果は *spoIIIE* の DNA 転移・分配機能の解明^{51), 52)} に寄与したと自負している。その後, *spoIIIE* 類似遺伝子が放線菌ゲノムにも実際に存在することを証明して⁵³⁾, *spi* の孢子形成阻害作用は, 類似遺伝子産物間の拮抗作用により, 菌の娘染色体 DNA が孢子細胞へ移行できなくなったことに起因すると結論した (Fig. 8(A))³⁷⁾。したがって, 本現象は, 放線

菌を固体培地で継代培養する過程で, 宿主染色体組込み配列から遊離・増幅したプラスミドが, その *spi* すなわち *tra* の菌糸間伝達機能と *spi* の下流にある *spd* 遺伝子群の菌糸内伝達機能によって隣接する細胞や菌糸に, 同種プラスミドの組込み配列の有無にかかわらず次々と伝播し, それらの孢子形成を阻害し, 菌叢上の阻害範囲を進行的に拡大させる現象で

Fig. 8. Schematic Diagram for Phenomenon of Spontaneously Developing Pocks (S Pocks) with the Conjugative Transfer of Plasmid pSA1 and the Action of Bacitracin in *Streptomyces azureus*.

(A) Inside view. The free form of conjugative plasmid, which has an episomal feature, participates in S pock formation. Excision of the plasmid from its chromosomal integrated sequence, that is promoted by *int* and *xis* genes of the plasmid is considered to be morphological differentiation-associated as the processes occurred only on solid cultures. The S pock-appearance examined was always accompanied by production of phage or defective phage particles. It is considered that free forms of plasmid (pSA1) may promote excision of the integrated phage replicon. The lysis of hyphae would be due to phage endolysin that acted at the last stage of phage multiplication. These events only occurred in aerial and sporulating hyphae. Expansion of the lysis or a retarded growth zone was promoted by *spi/tra* and *spd* gene products of the plasmid. The plasmid could transfer to recipient mycelia, with or without its integrated sequence. The abundant products of *spi/tra* gene cause competitive inhibition of *spoIIIE*-like gene products, owing to functional similarities of both genes: Both proteins have a mononucleotide binding site which binds ATP and utilizes the free energy of ATP hydrolysis to drive DNA transfer; they also show the features of putative transmembranes.³⁷⁾

Plasmid pSA1.1 of *S. azureus* replicates by a rolling-circle mechanisms (σ -type replication). DNA-binding proteins (histone-like proteins) are considered to play important roles in replication of plasmids.⁵⁹⁾ The *hup* and *hup2* genes encode histone-like proteins (see Fig. 9).

Antibiotic bacitracin (BC) inhibited pock formation, and stimulated aerial mycelial growth and sporulation.³⁷⁾ The stimulatory effect by BC seems to be closely correlated with the inhibition of pock formation induced by the conjugative plasmid. BC induced the synthesis of two cell membrane proteins, 32 and 38 kDa proteins: The latter is an ABC transporter protein, which would suppress the inhibitory action of BC on bacteria; the former is unidentified, but would stimulate translocation of the *Streptomyces* chromosomal DNA into the nascent cell or prespore and the adjacent hypha and on the contrary inhibit that of the plasmid DNA.

(B) Outside view. The filled hypha or cells, which have free plasmids, conjugate to neighboring hypha during growth or another hypha through transplantation.

あると説明できる。また、感染が進行しているスポットの菌糸を移植のためなどでかき混ぜたりすると、遊離化しているプラスミドをもった菌糸が他所へ飛び火し、感染スポット (pock) の数を急激に増加させることになる (Fig. 8(B))³⁷⁾。本 S pock 現象の中には、*S. azureus* などに見られる溶菌を伴うものがある。この溶菌の要因は、pock プラスミドの組込み配列が切り出されるときに coexisicion される、同じ菌糸

染色体上に座位するファージあるいは不完全ファージの複製に伴って産生される endolysin の作用^{37), 44)} による (Fig. 8(A))。 *S. azureus* の S pock の中心部に、C pock に比して明瞭なコロニーがないのはこの溶菌によるものである。

一方、本 pock 発生対策としては、液内培養菌糸ではプラスミドの組込み配列の遊離化と伝播が起こらない特性を利用して、固体培養での継代に、適宜に液体培養を組入れる一時的な pock 発生回避・回復法の開発に成功した^{37), 40)~42)}。固体培養でかなりの数の S pock が発生していても、これから釣った菌体を液体培養で数回継代して、増殖した液内菌体を固体培地上に移植することで完全に回復できる。本方法は、菌株性状の変異に留意する必要がなく、性状に偏りのない菌

Fig. 9. Location of *hup* and *hup2* Genes Encoding Histone-like Proteins on a Genetic and Physical Map of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Chromosome. The *hup* (accession No. AB001381) and *hup2* (accession No. AB032557) genes were cloned from *Streptomyces lividans* TK 24 chromosome^{56), 57)}. They correspond to coding sequences of genes SCE59.09c and SC1C2.37 in the Sanger Centre *S. coelicolor* genome sequence database (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/S-coelicolor>), respectively. There is another histone-like protein gene (SC4A 10.08 c) in the database. The *hup* homolog is widely distributed to *Streptomyces* species, including *S. azureus*.⁵⁶⁾

The map of *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome is reprinted with permission from Dr. D. A. Hopwood; copyright Blackwell Sciences Ltd.⁵⁸⁾

Fig. 10. Derivation of Purine Auxotrophic Mutants and Their Lysogens with an Altered Spore Color in *Streptomyces azureus*. A purine auxotroph Ade2 with pale purple spores and a derivative Ade21 with yellowish orange spores were obtained from wild-type strain PK0 of *Streptomyces azureus* ATCC14921, which has bluish green spores. The changed color or pigmentation in the mutants was limited to the spores. They accumulated AIR (5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole) due to the lack of AIR carboxylase activity.⁶⁰⁾ The lysogenization of mutant Ade21 by a temperate phage SAT1 changed the phenotypic characters in spore color or purine auxotrophy to those of the wild-type PK0 or the parent Ade2.⁶¹⁾ The two characters underwent reverse mutation at the same time by lysogenization. NTG, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanine.

Fig. 11. Schematic Diagram of Function of MinDSA in *Streptomyces azureus*.

The *minDSA* (accession No. AB004855.2) and its defective Δ *minDSA* were cloned into multi-copy vector pMCP5, respectively.⁶²⁾ A transformant BalA2 formed large numbers of short mycelium with branching in the liquid medium. This features of BalA2 may be due to the abundant MinDSA produced. Another transformant BalA1 formed long mycelium with no or poor branching. The abundant Δ MinDSA produced may cause competitive inhibition of MinDSA. Both strains hardly formed spores in solid culture and pellets in liquid culture.

population を確実に維持できるので、企業や菌株保存機関で採用されてきた。なお、液体培養の際に、少量の acriflavin や acridine orange を加えておくと、回復は促進される。この効果は、遊離化しているプラスミドの欠落促進作用による。さらに、*S. azureus* では、上記の孢子高生産株 PK100C は、プラスミドとその組み込み配列が完全に除去されており、また抗生物質生産性に変化のない菌株として特許化された。

この間、Fig. 7 に示している *S. azureus* pSA1.1 プラスミド上の全遺伝子を解明する^{37), 48), 54)} とともに、組み込みやターゲティングベクターへの開発を図った¹⁹⁾。さらに、pSA1.1 プラスミドは 1 本鎖中間体を形成する σ 型の複製をすることが、*S. lividans* を宿主にした場合に 1 本鎖 DNA が多量蓄積することから明らかになった⁵⁵⁾。ついで、この 1 本鎖

DNA に結合する 2 種類のヒストン様タンパク質を *S. lividans* から放線菌で初めて分離した。先に分離した HSI1 とその遺伝子 *hup* は典型的な細菌 HU 型ヒストン様タンパク質の性質を示している⁵⁶⁾。他方の HSI2 とその遺伝子 *hup2* は、*hup* を破壊した変異株から得られたもので、前半分は細菌 HU 型モチーフからなり、後半は真核生物のヒストン H1 型のモチーフからなっている⁵⁷⁾。Fig. 9 には両遺伝子をゲノム解析の進んでいる *S. coelicolor* のゲノムマップ⁵⁸⁾ の上に当てはめている。結核菌からも細菌型と真核生物型の両モチーフをもつヒストン様タンパク質として、HLP_{Mt} が報告されているが⁵⁹⁾、その機能はまだ明らかにされていない。HSI2 は HSI1 の代わりに機能できると推定したが⁵⁷⁾、正常細胞でのそれぞれの発現条件や本来の役割分担には非常に興味がひかれる。今後の放線菌におけるヒストン様タンパク質の機能解析から、大腸菌や枯草菌では得られていないあらたな知見が得られると期待している。

2. 孢子形成異常にかかわる孢子色変異, *minD* 様遺伝子, および促進化合物

次の孢子形成にかかわる諸現象は S pock 現象の解明のために必要な変異株、遺伝子、化合物を検索した際に見いだしたものである。

S. azureus 野生型株は青緑色の孢子を形成するが、AIR (5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole) carboxylase を欠損し、AIR を多量に蓄積するプリン要求性変異株は、孢子色が薄紫さらにサーモンピンク色になること、またこれらの形質はフェージ変換を受けることを明らかにした (Fig. 10)^{60), 61)}。本研究は単一菌株から生じる明瞭な孢子色変化を示した最初の例である。

S. azureus で分離された枯草菌のセプタ形成にかかわる遺伝子 *minD* に類似する遺伝子 *minDSA* とその C 末端側を約 300 塩基対欠失した変異体 Δ *minDSA* について⁶²⁾、それらの高発現に対応する形態変化を検討した (Fig. 11)。 *minDSA* を多コピーベクター (pMCP5; 約 100 コピー) で発現させると遺伝子産物の過剰生産によってか、細胞分裂と分枝が促進され、形質転換株は短い菌糸になる。 Δ *minDSA* の過剰発現では *minDSA* 産物の作用を拮抗阻害するためか、転換株は細胞分裂や分枝が非常に少ない長い菌糸になる。両転換株は固体培地上では気菌糸の発育が悪く、孢子形成はほとんどできない。液内菌糸は、野生型株のペレットに比べ、前者では菌糸が短くてからみつがができず、非常に小さなペレットになり、後者では菌糸が長くてからみつがが甘く、ペレットになりにくい。低コピーベクター (pRES18Km, 5-10 コピー) を用いた形質転換株は両者とも高発現株と野生型株との中間の性状を呈した。これらの結果は、*minDSA* が細胞分裂および菌糸の分岐の際のセプタ形成に関与し、液内培養でのペレット形成のみならず、固体培養では気菌糸・孢子形成にかかわることを示している。

Fig. 12. Photograph of the Silica Scale and Photomicrograph of a Polished Thin Section of Silica Scale.

- (A) Silica scale was formed on a copper plate for 40 days in geothermal hot water at $85 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 7.2.⁶⁵⁾
 (B) Rod-shaped bacteria were observed with the colloidal silica particles.

Fig. 13. Production of Silica-induced Protein (Sip) of *Thermus thermophilus* TMY.

Silica was added to a 9-h growing culture at the final concentration of 600 ppm. The cell envelope proteins of each cultures were applied to 10% SDS-PAGE.

抗生物質 bacitracin は、*S. azureus* や *S. laurentii* の S pock 形成を抑制し、さらに菌糸生育と孢子形成促進作用を示した⁶³⁾。その効果は pock プラスミド保有株の方が非保有株より大であった。*S. azureus* では、C pock 形成も抑制した。Bacitracin は *S. azureus* で 2 種の膜タンパク質 (約 32

と 38 kDa) の産生を誘起した。後者は抗生物質耐性の要因として機能する ABC トランスポーターであり、前者は、まだ明確にされてないが、菌染色体 DNA の分配には促進的に、プラスミド DNA の菌糸間および菌糸内伝播には抑制的に作用するタンパク質と推測している (Fig. 8(A)).

4. 好熱菌のシリカ鉱物形成促進作用

シリカ鉱物 (シリカスケール) は地熱水湧出地帯で産出されるが、地熱発電所の熱水を循環させるパイプラインなどの設備にも短期間に多量沈着し、発電に支障をきたしている⁶⁴⁾。高濃度のシリカが溶存している 100°C 以下の湧出熱水系でのシリカスケールの沈着速度は非常に速く、また電子顕微鏡観察で微生物様の構造体や珪化された細菌類の痕跡が確認されたことから⁶⁵⁾、シリカ鉱物化現象に、熱水系に生息する好熱菌が関与していると想定した。これを踏まえ、地熱発電所の熱水中 ($85 \pm 2^\circ\text{C}$) に銅板のテストピースを沈め、これに沈着するシリカスケールの形成過程を解析した (Fig. 12)⁶⁵⁾。シリカスケールから DNA を抽出し、スケール生成量と DNA 含量 (環境ゲノム) の経時的変化を検した結果、対数的に形成されるスケール量に比例して DNA 量が増加した。熱水の温度が 88°C を超える高い時には、シリカスケールより抽出される DNA 含量は少なくなり、シリカスケールの付着速度が遅くなる。これらの結果から、好熱菌が熱水に溶存しているシリカの急速な鉱物化に関与することを初めて示唆し、環境ゲノムを解析して、シリカスケール中の菌相が主に *Hydrogenobacter* 属と *Thermus* 属の細菌からなることを明らかにした⁶⁵⁾。

シリカスケールから分離した優占菌 *Thermus thermophilus* に属する菌株 TMY を用い、メタ珪酸ナトリウムを溶解

させた培地を用いた *in vitro* 培養系で、高純度非結晶質のシリカスケールが生成することを証明した。TMY 株はポリマーシリカの濃度が 400 ppm を超えた過飽和存在する場合、多少の生育阻害を受けるが、対数増殖期の後期頃から過飽和分のポリマーシリカを短時間に著しく沈殿させる⁶⁶⁾。このシリカ沈殿に対応して、沈殿反応に重要な作用をしていると推測される、過飽和シリカにより誘導産生されるタンパク質 Sip (silica-induced protein) が細胞表面画分に検出される (Fig. 13)⁶⁷⁾。Sip の産生はポリシリカの存在下では対数増殖初期から産生が始まり、対数増殖期の菌体で顕著になるが、非存在下ではほとんど検出できない。Fig. 13 に示すように、対数増殖初中期の菌体に過飽和のシリカを添加した場合の Sip 産生は約 1 時間後に顕著になり、時間経過に伴いその量は増加する。Sip は分子量約 35 kDa、等電点 pI 9.5 と推定され、N 末端はブロックされている。内部部分アミノ酸配列などから、新規のタンパク質と推測している。Sip 遺伝子の解析がまだ終わっていないが、Sip とその遺伝子は特異的なタンパク質の知見を提供するのみならず、微生物作用によるシリカ鉱物形成機構およびその制御機構の解明などに役に立つと推察される。本研究は、また地熱水環境下におけるシリカシンタ形成などのバイオミネラライゼーションの研究や地球微生物学をはじめ、地質学や環境科学などの分野においても多大な関心がもたれている^{68), 69)}。

本研究は主として九州大学農学部（現在、農学研究院）の発酵学教室および微生物遺伝子工学教室で行われたものである。長年にわたり啓発していただいている恩師本江元吉先生（九州大学名誉教授）をはじめ林田晋策先生（九州大学名誉教授）、村田 晃先生（佐賀大学名誉教授）、ならびに諸先輩に厚く御礼申し上げる。また、多大なご助言・ご協力をいただいた九州大学大学院農学研究院教授古川謙介博士、同教授山崎信行博士（現名誉教授）、同工学研究院教授井澤英二博士、鳥取大学教授和泉好計博士、大桃定洋博士（農林水産省）、Hans-W. Ackermann 先生（Canada の Laval 大学教授）、[※]David Perlman 先生（元 USA の Wisconsin 大学教授）、父 [※]緒方勇士郎博士（元福岡大学教授）に深甚なる敬意を表する。

本研究の成果は九州大学大学院農学研究院の土居克実博士、吉野貞蔵博士をはじめ多数の共同研究者のたゆまぬ努力の結果得られたもので、心から謝意を表すとともに、本賞受賞の栄誉をともに分かち合いたいと思う次第である。M. Ohara 氏に英文校閲を受けた。

- 1) 本江元吉, 村田 晃, 緒方靖哉: 発酵とバクテリオファージ。発酵と微生物 II (相田浩, 植村定治郎編), 朝倉書店, 1970, pp. 1-108.
- 2) M. Hongo, T. Oki, and S. Ogata: "Phage Contamination and Control," in "The Microbial Production of Amino Acids," ed. by Y. Yamada, S. Kinoshita, T. Tsunoda, and K. Aida, Kodansha Ltd., John Wiley & Sons, 1972, pp. 67-90.
- 3) S. Ogata and M. Hongo: "Bacteriophage of the Genus

- Clostridium*," in "Advances in Applied Microbiology," Vol. 25, ed. by D. Perlman, Academic Press Inc., 1979, pp. 177-193.
- 4) S. Ogata: *Biotechnol. Bioengin.*, **22** (Suppl. 1), 177-193 (1979).
- 5) 緒方靖哉, 江口智子, 土居克実: ウイルス, **50**, 17-26 (2000).
- 6) S. Ogata, H. Miyamoto, and S. Hayashida: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **26**, 97-108 (1980).
- 7) 金重尚子, 張 曄, 西山加奈子, 土居克実, 田中 治, 大桃定洋, 緒方靖哉: 農化, **68**, 1219-1221 (1994).
- 8) O. Tanaka, S. Ohmomo, N. Kaneshige, Y. Zong, K. Nishiyama, K. Doi, and S. Ogata: *Bull. Natl. Grassl. Res. Inst.*, No. **51**, 31-39 (1995).
- 9) 土居克実, 田中 治, 大桃定洋, 緒方靖哉: 生物工学, **74**, 294-297 (1996).
- 10) S. Ogata, H. Suenaga, and S. Hayashida: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 201-204 (1985).
- 11) P. K. Dinsmore and T. R. Klaenhammer: *Mol. Biotechnol.*, **4**, 297-314 (1995).
- 12) 緒方靖哉, 吉野貞蔵, 太田一良, 水光正仁: 微生物の生体防御。生物生産と生体防御 (村上浩紀, 緒方靖哉, 松山宣明, 河原畑勇, 矢野友紀編), コロナ社, 1995, pp. 1-44.
- 13) T. Eguchi, K. Doi, K. Nishiyama, S. Ohmomo, and S. Ogata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 751-756 (2000).
- 14) 土居克実, 江口智子, 島 純, 西山 孝, 大桃定洋, 緒方靖哉: 生物工学, **79**, 177-179 (2001).
- 15) 土居克実, 江口智子, 崔 聖賢, 大桃定洋, 緒方靖哉: 生物工学, **77**, 472-474 (2001).
- 16) T. Eguchi, K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, S.-H. Choi, K. Doi, S. Ohmomo, and S. Ogata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 247-253 (2001).
- 17) S. Ogata, O. Mihara, Y. Ikeda, and M. Hongo: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1413-1421 (1972).
- 18) S. Ogata, H. Suenaga, Y.-K. Miyoshi, and S. Hayashida: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, 405-409 (1984).
- 19) 緒方靖哉, 土居克実, 太田一良: 微生物の遺伝子ターゲティング。遺伝子ターゲティングの基礎と応用 (緒方靖哉, 村上浩紀編), コロナ社, 1995, pp. 1-38.
- 20) 土居克実, 江口智子, 田中 治, 森 勝美, 大桃定洋, 緒方靖哉: 生物工学, **75**, 361-363 (1997).
- 21) 土居克実, 緒方靖哉: 乳酸菌学会誌, **10**, 72-89 (2000).
- 22) 緒方靖哉: バクテリオファージの溶菌酵素。溶菌酵素 (船津勝, 鶴大典編), 講談社, 1977, pp. 129-151.
- 23) S. Ogata and M. Hongo: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 151-161 (1973).
- 24) S. Ogata and M. Hongo: *J. Gen. Microbiol.*, **81**, 315-323 (1974).
- 25) S. Ogata, K.-H. Choi, and M. Hongo: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1247-1254 (1975).
- 26) 緒方靖哉: 農化, **50**, R69-R77 (1976).
- 27) S. Yoshino, S. Ogata, and S. Hayashida: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1243-1248 (1982).
- 28) S. Ogata, K.-H. Choi, and M. Hongo: *Microbiol. Immunol.*, **24**, 393-400 (1980).
- 29) 緒方靖哉, 崔 慶浩, 本江元吉: 農化, **54**, 753-759 (1980).
- 30) S. Ogata, S. Yoshino, Y. Okuma, and S. Hayashida: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **28**, 193-301 (1982).
- 31) S. Yoshino, S. Ogata, and S. Hayashida: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 249-259 (1984).
- 32) S. Ogata, Y. Tahara, and M. Hongo: *J. Gen. Appl. Microbiol.*,

- 21, 65-74 (1975).
- 33) S. Ogata, K.-H. Choi, Y. Ikeda, and M. Hongo: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 153-168 (1974).
- 34) S. Ogata, K. Fujino, S. Yoshino, S. Hayashida, and K. Yuita: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 101-109 (1986).
- 35) S. Ogata, Y. Tahara, and M. Hongo: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 763-768 (1974).
- 36) S. Ogata, A. Umeda, and M. Hongo: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 169-177 (1974).
- 37) S. Ogata: *Actinomycetol.*, **15**, 40-49 (2001).
- 38) D. A. Hopwood and T. Kieser: "Conjugative Plasmids of *Streptomyces*," in "Bacterial Conjugation," ed. by D. B. Clewell, Plenum Press, 1993, pp. 293-311.
- 39) 緒方靖哉: 醸造協会, **86**, 763 (1991).
- 40) 緒方靖哉: 防菌防黴, **19**, 405-412 (1991).
- 41) S. Ogata, S. Yoshino, H. Suenaga, K. Aoyama, N. Kitajima and S. Hayashida: *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 135-141 (1981).
- 42) S. Ogata, H. Suenaga, and S. Hayashida: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1182-1187 (1982).
- 43) K. Doi, M. C. Saeki, Y. Ono, and S. Ogata: *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 237-243 (1995).
- 44) 緒方靖哉: 放線菌研究会会報, **No. 40**, 5-11 (1982).
- 45) Y.-K. Miyoshi, S. Ogata, and S. Hayashida: *J. Bacteriol.*, **168**, 452-454 (1986).
- 46) C.-K. Iramina, M. Kitahara, K. Doi, and S. Ogata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1040-1043 (1995).
- 47) C.-K. Iramina, M. Kitahara, K. Doi, and S. Ogata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1469-1473 (1997).
- 48) 土居克美, 横山英之, 緒方靖哉: 生物工学, **76**, 66-71 (1998).
- 49) S. Ogata, Y. Koyama, Y. Sakaki, and S. Hayashida: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2127-2129 (1983).
- 50) T. Tomura, H. Kishino, K. Doi, T. Hara, S. Kuhara, and S. Ogata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 438-443 (1993).
- 51) L. J. Wu, P. J. Lewis, R. Allmansberger, P. M. Hauser, and J. Errington: *Genes Dev.*, **9**, 1316-1326 (1995).
- 52) J. Bath, L. J. Wu, J. Errington, and J. C. Wang: *Science*, **290**, 995-997 (2000).
- 53) K. Doi, Y. Ono, E. Yokoyama, Y. Tukagoe, and S. Ogata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1597-1600 (1998).
- 54) E. Yokoyama, Y. Matsuzaki, K. Doi, and S. Ogata: *FEMS Microbiol. Lett.*, **169**, 103-109 (1998).
- 55) E. Yokoyama, K. Doi, M. Kimura, and S. Ogata: *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 1970-1200 (1996).
- 56) E. Yokoyama, K. Doi, and S. Ogata: *Biochim. Biophys. Acta*, **1353**, 103-106 (1997).
- 57) E. Yokoyama, K. Doi, M. Kimura, and S. Ogata: *Res. Microbiol.*, **152**, 717-723 (2001).
- 58) M. Redenbach, H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, and D. A. Hopwood: *Mol. Microbiol.*, **21**, 77-96 (1996).
- 59) 横山英之, 緒方靖哉: 化学と生物, **38**, 804-810 (2000).
- 60) S. Yamada, S. Hayashida, and S. Ogata: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 575-577 (1990).
- 61) S. Yamada, S. Hayashida, and S. Ogata: "Trends in Actinomycetology in Japan" ed. by Y. Koyama, Society for Actinomycetes Japan, 1989, pp. 111-114.
- 62) T. Nishiyama, H. Sakemi, H. Sumi, S. Tokunaga, K. Doi, and S. Ogata: *FEMS Microbiol. Lett.*, **190**, 133-139 (2000).
- 63) S. Ogata, H. Matsubara, Y. Tawara, S. Tokunaga, and T. Hara: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 652-654 (1992).
- 64) 稲垣史生, 緒方靖哉: バイオサイエンスとインダストリー, **157**, 104-105 (1999).
- 65) F. Inagaki, S. Hayashi, K. Doi, Y. Motomura, E. Izawa, and S. Ogata: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **24**, 41-48 (1997).
- 66) F. Inagaki, T. Yokoyama, K. Doi, E. Izawa, and S. Ogata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1271-1272 (1998).
- 67) 稲垣史生, 緒方靖哉: 長瀬科学技術振興財団研究報告集 1999 年度版, 第 11 巻, 2000, pp. 91-99.
- 68) 稲垣史生, 緒方靖哉: バイオサイエンスとインダストリー, **157**, 79-80 (1999).
- 69) F. Inagaki, Y. Motomura, K. Doi, S. Taguchi, E. Izawa, D. R. Lowe, and S. Ogata: *Microb. Environ.*, **16**, 125-130 (2001).

プロフィール

緒方靖哉 おがた・せいや

九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門

〈略歴〉 昭和 44 年九州大学農学部農芸化学科発酵学講座助手

昭和 52 年九州大学農学部農芸化学科発酵学講座助教授

昭和 53 年米国ウイスクンシン大学薬学部研究員

昭和 62 年九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究

センター微生物遺伝子分野教授

平成 12 年九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門

遺伝子資源開発学講座微生物遺伝子工学分野教授

〈研究テーマ〉 発酵生産プロセスにおけるバクテリオファージの汚染と防御, 細菌の溶菌と溶菌酵素, 放線菌のボック形成および胞子形成異常に関与する諸要因と遺伝子, 乳酸菌の育種, 微生物によるシリカ鉱物化作用

〈趣味〉 昆虫採集と研究 (カミキリムシ主体の甲虫類, “農化の養老” を目指している), 音楽鑑賞等