様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　１９　日現在

機関番号：　８２７０６
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2013～2016
課題番号：　２５４５０１２２

研究課題名（和文）化学合成生物の細胞内共生菌の分離培養

研究課題名（英文）Isolation of intracellular symbiotic bacteria of chemotroph.

研究代表者
能木　裕一（NOGI, Yuichi）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術副主幹

研究者番号：７０３９９５５９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：今まで困難であった細胞内外共生菌の分離方法を確立した。それにより、ハオリムシ（深海生物）の細胞内外の共生微生物の分離・培養を行った。細胞内共生菌を生きたまま効率よく分離するのに微弱電流を用いた。分離した菌がハオリムシの細胞内共生菌である確認は16SrRNA遺伝子で行った。また、細胞外共生菌として分離した株の多くは新種であった。これらの内Ruegeria属、Sulfitobacter属、Planktotalea属の新種について同定を行った。本研究で用いた微弱電流による吸着分離法が今後の難培養微生物を培養するための一つの手段になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have established a method for isolating intracellular or extracellular symbiotic bacteria that was difficult until now. As a result, we isolated and cultivated intracellular and extracellular symbiotic microorganisms of tubeworm (deep sea organism). Weak electric current was used to efficiently isolate intracellular symbiotic bacteria alive. Confirmation that the isolated bacteria are symbiotic intracellular symbiotic cells of tubeworm was performed with the 16S rRNA gene. Furthermore, many of the strains isolated as extracellular symbiotic bacteria were novel species. Of these, we identified new species of genus Ruegeria, Sulfitobacter and Planktotalea. The adsorptive isolation method based on the weak current used in this study was considered to be one means for culturing difficult-to-cultivate microorganisms in the future.

研究分野：　微生物

キーワード：　共生菌　ハオリムシ　難培養微生物

１．研究開始当初の背景

地上の生態系では植物が光合成を行い、生産した有機物を動物が栄養源としている。太陽光の届かない深海には、太陽光により生産された栄養となる生物の死骸や排泄物などは深海に到達する前に大部分が消費されてしまう。そのため、深海のバイオマスは低い。しかし、地中に染みこんだ硫化水素、水素、メタン、CO_2が湧き出している熱水や冷湧水噴出地帯ではバイオマスは非常に高い。それはこれらを利用する化学合成独立栄養細菌により、シロウリガイやハオリムシ等の化学合成生物群集が生息しているためである。その中で、ハオリムシは1969年にカリフォルニア沖で発見され、続いて世界各地の熱水噴出孔、**冷湧水帯でも発見された化学合成生物として古くから知られている生物である。**ハオリムシは、鰓にあたる部分とキチン質とタンパク質の堅い棲管と呼ばれる殻で包まれている栄養体（棲体）が基本構造の、シンプルな生物である。幼体のときは、口、肛門などの消化器官を持っているが、共生菌の獲得と同時にそれらのアポトーシスが始まり、成体はそれらを一切持たない閉鎖型になる。

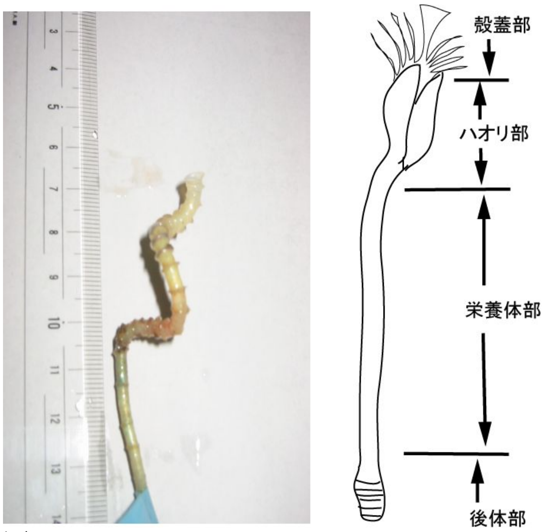

図１サツマハオリムシ

ハオリムシは栄養体細胞内に、10兆個/gの化学合成細菌（硫黄酸化細菌）を飼っており、鰓から得た無機化合物を供給し、細菌の代謝物から栄養を得ている。共生菌は幼生時に外部環境から皮膚を介して水平伝幡により獲得することがわかっている。共生菌は遺伝子解析によりγプロテオバクテリアであることが確認されている。ハオリムシの一種は現在飼育可能である。この事から共生菌の分離培養が内外で試みられているが未だ成功していない。

従来、微生物を分離するためには微生物が付着した固形物を生理食塩水や培養液にホモジナイズするなどの方法で微生物を強制的に剥がし分離を行っていた。しかし、この方法では立体構造に潜り込むような形で付着している微生物を剥がすことは困難で有った。小山ら（特願2011-10693）の方法は微生物が付着したサンプルの側で微弱電流を流すことにより、その電極に微生物が集まる事を見いだした。この方法は電気泳動による微生物の移動ではなく、より弱い微弱電流を用いることに特徴が有り、電気泳動と異なり、死んだ微生物は電極に集まることは無い。微生物毎に異なった電流値に反応し電極に吸着する。この電極から吸着した微生物以外をバッファーで洗浄し、新鮮なバッファー中に電極を移し、流す電流値と向きを変えることによりバッファー中に吸着した菌を温和に拡散させる。この方法を用いる事で今まで困難とされていた共生菌の単離が行えると考えた。

２．研究の目的

今まで分離・培養できなかったハオリムシ（深海生物）の細胞内共生微生物の純粋分離する事を第一の目的とし、その他の未分離の共生菌についても単離し、培養法の確立することである。将来的には、この分離・培養手法を発展させ従来の技術では困難とされていた、他の化学合成生物の細胞内共生菌やカイメンの共生菌など難培養微生物の単離・培養法へと発展出来ればと考えた。

また、ハオリムシは幼生時には自ら口や消化管を使って栄養摂取をするが、成熟に伴い細胞内共生菌を外部から得て、これらを細胞内器官のように利用して栄養摂取をしている。これは真核生物がミトコンドリアを獲得しやがて細胞内器官とした現象と似ている。ハオリムシがどの様に共生菌を獲得し、細胞内器官とするかが分かれば生物進化の解明にもつながると考えた。

３．研究の方法

海洋研究開発機構所有の深海調査機器（しんかい6500、ハイパードルフィン）を使用し、潜航地点は相模湾冷湧水化学合成生物群集（1,100m）、鹿児島湾「たぎり」噴気帯化学合成生物群集（100m）からハオリムシを採取した。直ぐに分離に使用する物は船上で4℃の水槽で一時的に保存した。鹿児島湾から採取したハオリムシは1-2週間程度の短期間で有れば比較的飼育が容易で、共生菌も維持されたままの状態を保てた。それ以上の長期飼育は専門知識と設備を必要とするため、直ちに使用しない物は-80℃で凍結保存した。相模湾のハオリムシは鹿児島湾の物より大きく飼育が困難なため、採取後2日以内に使用しない分は、採取直後に液体窒素で凍結し保存した。

共生菌の分離はハオリムシをクリーンベンチ内で生体を傷つけないように注意しながら殻から取り出した。採取地点の水温などを考慮し、ハオリムシ、前処理液、バッファーなど全て温度が 10℃を超えないように冷却しながら使用した。前処理として細胞内共生菌以外を取り除くため、取り出した生体を70%アルコール溶液に浸漬後、抗生物質の入ったバッファーに浸漬した。次にバッファーに浸漬しアルコールや抗生物質を除いた。前処理をした生体の内、共生菌の多いルート部分を選びメスで細かく切断した。切片を集め、バッファー中で押しつぶすようにして細胞を破壊し懸濁液を作製した。この懸濁液から微弱電流を用いた細菌分離法を使用し共生菌を生きたまま電極に吸着し、洗浄操作後に吸着微生物をバッファー中に脱離し、遠心分離により回収した。分離細菌に関しては 16SrRNA 遺伝子解析により既存の共生菌データとクローニングにより得られた共生菌のデータ等と比較する事により、目的の共生菌であることを確認した。この分離株について各種培地、培養条件にて至適培養条件の検討を行った。また、前処理条件などの違いから分離出来た細胞内共生菌以外の菌に関しても単離を行い各種同定試験も行った。

４．研究成果

微弱電流を用いた細菌分離法を使用し共生菌を生きたまま回収する事に成功した。分離細菌に関しては 16SrRNA 遺伝子解析により既存の共生菌データとクローニングにより得られた共生菌のデータ等と比較し目的の共生菌であることを確認した（図 2）。

前処理溶液の濃度と浸漬時間がその後に大きく影響することが分かった。前処理条件の違いにより、細胞外の菌を完璧に殺す様な強い処理をした場合は分離した菌は生きていても増殖しない場合や弱い処理のため細胞外の菌がその後の懸濁液に含まれる場合も有った。最適条件で処理を行い細胞内の共生菌を増殖可能状態で取り出すことに成功した。この分離株について各種培地、培養条件にて至適培養条件の検討を行った。その結果、血清と増殖因子を添加した 2 種類の培地・培養条件で、初期培養に成功し菌の増殖が確認された。しかし、気相の構成比や硫化水素の添加方法など培養条件は非常に繊細で僅かな違いでも増殖させることが出来なくなる事が分かった。

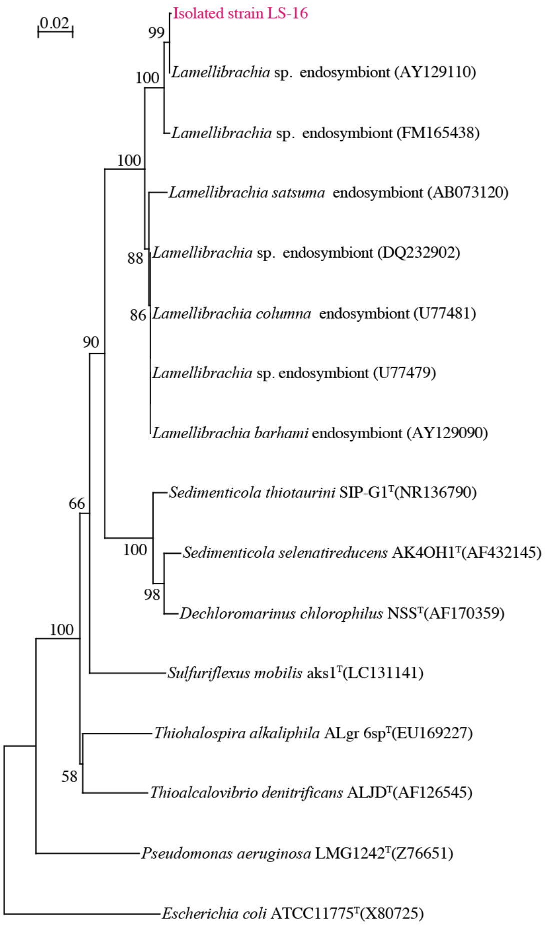

図 2.　単離した細胞内共生菌と既知の共生菌クローンの 16SrRNA 遺伝子解析による系統樹

細胞内の共生菌分離を行う際の前処理条件が弱い条件で幾つか菌が分離出来た。これら分離細菌に関しては 16SrRNA 遺伝子解析により既存菌株のデータとクローニングにより得られた共生菌のデータ等と比較し目的の共生菌では無いが、新属または新種と予想された。これらの菌は一般的な培養条件で生育する物が多かったが、分離株 JAM119 株はαプロテオバクテリアの *Planktotalea* 属に近縁な新属新種で、*Planktotalea* 属の株は特別な培養条件を必要とするが、JAM119 株は特別な培養条件を必要としなかった（図 3）。

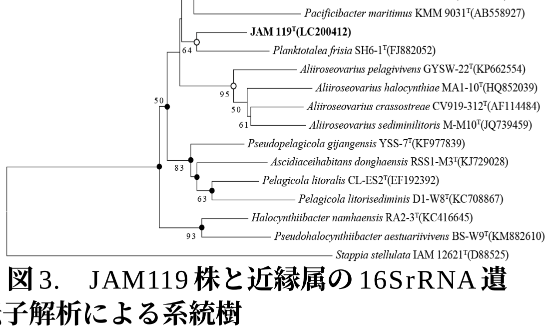

図 3.　JAM119 株と近縁属の 16SrRNA 遺伝子解析による系統樹

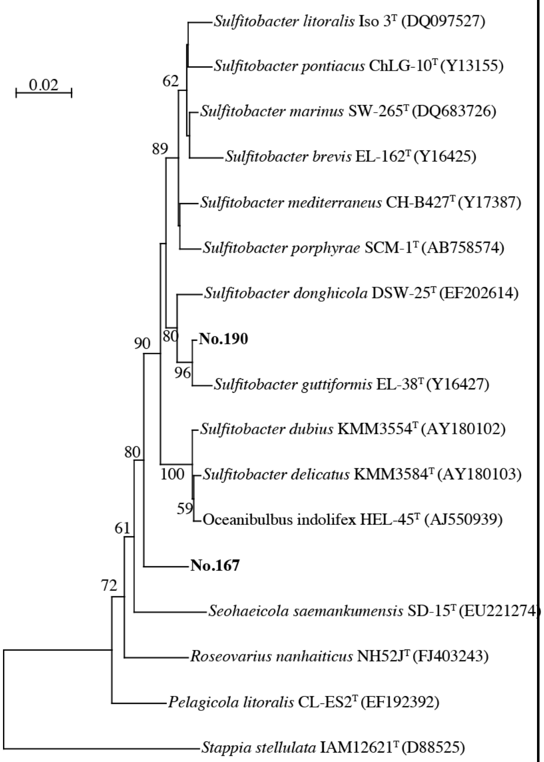

図 4.　JAM167 株 JAM190 株と *Sulfitobacter* 属近縁種の 16SrRNA 遺伝子解析による系統樹

これ以外に JAM167 株と JAM190 株の 2 株はαプロテオバクテリアの *Sulfitobacter* 属に属する新種 (図 4)、JAM202 株はαプロテオバクテリアの *Ruegeria* 属近縁の新属新種と推定された(図 5)。

今回の細菌分離に用いた微弱電流を用いて電極に吸着させる方法は放線菌などで胞子からの発芽率が十倍以上良好に成る事が分かっている。また VNC(viable but non-culturable)状態に成っていた菌をカタラーゼ処理する事で培養可能になった例があるように、細胞内共生菌に関しても微弱電流を用いた分離法の影響で VNC 状態に成っていた菌に微弱電流が何らかの作用が働き増殖能を復活させた可能性がある。本研究で用いた分離法が今後の難培養微生物を培養するための一つの手段になると考えられた。

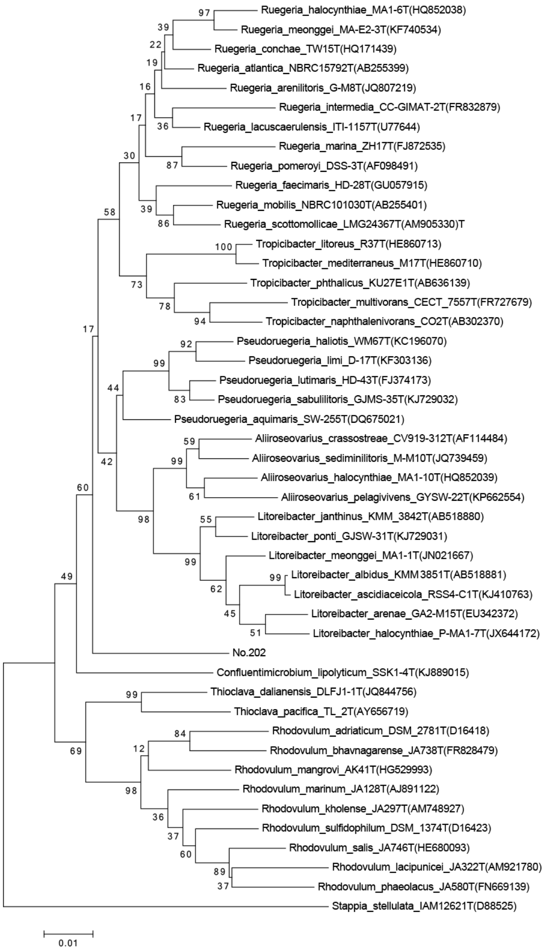

図 5.JAM202 株とαプロテオバクテリアの *Ruegeria* 属など Rhodobacteraceae ファミリーの近縁種の 16SrRNA 遺伝子解析による系統樹

５．主な発表論文等

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

能木　裕一（NOGI, Yuichi）
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術副主幹
研究者番号：70399559

(4)研究協力者

小山　純弘（KOYAMA, Sumihiro）
国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性分野・主任研究員