

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：31302

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360216

研究課題名（和文） 特定微生物利用のための原生動物の挙動解析

研究課題名（英文） Analysis of protozoa in the natural environment for bioaugmentation

研究代表者

中村 寛治（NAKAMURA KANJI）

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号：90382655

研究成果の概要（和文）：土壌浄化などの分野で「Bioaugmentation」として実施される特定微生物の利用は、多くのケースで放出微生物の著しい減少が起き、成功に至らないことが多い。本研究では、主たる原因が自然環境中に生息する原生動物、Stramenopiles, Chrysophyceae（黄金色藻綱）に分類される鞭毛虫であることを明らかにした。また、複数の原生動物を単離し、捕食実験を行い、その捕食対象細菌がきわめて広いことを証明した。

研究成果の概要（英文）："Bioaugmentation" is a method to use a special microorganism for soil cleanup. However, microorganisms introduced to a contaminated site decrease rapidly in many cases. In this research, we found out that the decrease was caused by protozoa existing in the natural environment. Most of protozoa that we have found were flagellates that were classified to Chrysophyceae, Stramenopiles. Several flagellates were isolated and they were found to ingest various kinds of bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：環境浄化・バイオオーグメンテーション・捕食

1. 研究開始当初の背景

(1) 環境工学分野では原生動物は捕食者として位置づけられ、活性汚泥の良好な運転には欠かせない存在として古くから知られている。研究は主として顕微鏡観察によるものが多く、活性汚泥中の原生動物の写真は数多く発表されている。しかしながら、顕微鏡による分類は観察者のスキルが要求されると共に、その精度には限界がある。近年、原生動物の18S rRNA遺伝子等を利用した分子生物

学的な解析の方がより高精度であり、研究方法として適していることが示されていた。

(2) 本研究では、この新しい解析手法を導入して、バイオオーグメンテーションの適用時に起きる、導入微生物の減少の問題に関して機構解明を行うこととした。

2. 研究の目的

(1) 自然環境中に生息する捕食者の分布を主として水系を対象に調査する。

(2) 複数の被食細菌を利用して細菌捕食性原生動物を単離する。

(3) 原生動物の挙動を調査・把握するため原生動物の定量法を確立する。

(4) 単離した原生動物を利用して「被食者－捕食者」の特異性を把握する。

(5) 特定の細菌に捕食回避能を付与する手段を確立する。

3. 研究の方法

(1) 自然環境中の捕食者の分布調査

4種類の細菌を利用して捕食実験を行い、河川、湖沼、地下水・湧水、土壌に生息する原生動物の種類を18S rRNA 遺伝子により明らかにする。

(2) 細菌捕食性原生動物の単離

捕食実験により出現した原生動物を、被食者である細菌によって集積した上で、希釈法によって純化、単離する。また、それらの生育可能条件を精査する。

(3) 原生動物の定量法の確立

定量には Real-Time PCR を利用する。18S rRNA 遺伝子の塩基配列データからデザインし原生動物の分類別に定量できるようにする。また、細胞数と18S rRNA 遺伝子数の関係を求め、遺伝子数から原生動物数を算出できるようにする。

(4) 被食者－捕食者の特異性把握

1種類の細菌（被食者）によって得られた原生動物が、他の種類の被食者に対して、どのような捕食挙動を示すかを比較検討し、その相互特異性を把握する。

(5) 捕食回避手段の確立

細菌が算出する代謝産物（例えばピオラセイン）により、原生動物の捕食がコントロールできるか否かを検討する。

4. 研究成果

(1) 自然環境中の捕食者の分布調査

広瀬川河川水に被食者として4種類の細菌、*Cupriavidus necator* KT1、*Pseudomonas aeruginosa* PA01、*Bacillus subtilis* 168、*Rhodococcus erythropolis* IAM 1399、を添加したが、どの細菌でも出現、優占化した原生動物は、主として Chrysophyceae に属する鞭

毛虫であった。

年間を通して広瀬川河川水に被食者として *C. necator* KT1 を添加し、出現する原生動物を調査した結果、Chrysophyceae に属する鞭毛虫が主であり、季節による変動は見られなかった。

また、異なる環境サンプルとして、湧水、地下水、土壌を使い、被食者として *C. necator* KT1 を添加して出現する原生動物を調査した場合も、主に Chrysophyceae に属する鞭毛虫が出現し、様々な環境に広く生息していることが明らかとなった。

Chrysophyceae の中でも、3種類の18S rRNA 遺伝子 Clone Type は、高い頻度で出現し、幅広い捕食性を示した。それゆえ、様々な環境で、Chrysophyceae に属する鞭毛虫が存在し、環境中に放出される特定細菌の捕食者として、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(2) 細菌捕食性原生動物の単離

被食者の細菌の培養には、LB培地を利用して、コロニーを植種後、200 rpm、30°Cで一晩振とう培養を行った。その後、無機塩類を含む培地 (NSY-IB) で2回洗浄 (11,100×g, 5 min, 4°Cで集菌し、上澄みを捨て、NSY-IBに懸濁) し、最終的にNSY-IBに懸濁、一晩180 rpm、20°Cで振とう培養した後、使用した。

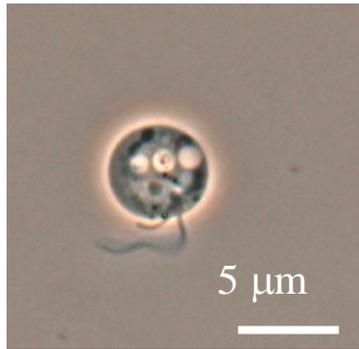
捕食実験では、試験管に採水した環境水 5 mL に細菌懸濁液を添加し、吸光度計にて600 nmでの吸光度 (A_{600}) が約0.2になるように調整した。その後、本試験管を180 rpm、20°Cで振とう培養し、吸光度の値が初期値の20%以下になった時点で培養を終了した。

サンプル中で優占化した捕食性原生動物を希釈法によって純化するため、NSY-IBを使ってサンプル原液から10倍段階希釈液（希釈倍率は $10^{-1} \sim 10^{-6}$ とした）を作成した。希釈原生動物含有液 0.1 mL を上記のように調整した5 mL 細菌懸濁液 (A_{600} =約0.2) に添加した。

希釈段階毎に3本を用意し、180rpm、20°Cで振とう培養を行った。その後、濁度が低下した最大希釈域の培養液を選出した。選出した培養液は再び希釈操作を行った。希釈による純化は合計3回繰返し、原生動物を単離した。本手法の適用によって複数の原生動物の単離に成功した。

以下に、今回その大多数を占めた Chrysophyceae に属する鞭毛虫の位相差顕微鏡写真を示す。

本鞭毛虫は、2種類の異なる鞭毛を有し、本鞭毛を利用して、被食者となる細菌を捕獲する。



(3) 原生動物の定量法の確立

捕食実験による原生動物の増加を確認するため、全 18S rRNA 遺伝子を標的に qPCR (quantitative real-time PCR) 法による定量を検討した。プライマーペアは Ek-SSU-412f (5' -GCA GCA GGC GCG YAA ATT-3', Y=C:T) と Ek-SSU-546r (5' -GCG GCT GCT GGC ACC AG-3') を利用した。

本プライマーペアは過去に取得した環境水由来の 18S rRNA 遺伝子クローンの共通配列から設計されている。測定には LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic 社製) を使用し、増幅された DNA を SYBR Green で検出する方法を選択した。運転条件は以下のように設定した。初期変性; 95°C, 1 分, 温度変化 20°C/秒 (これは設定温度への変化速度を表す) に続き、PCR 増幅は第 1 段階; 95°C, 10 秒, 温度変化 20°C/秒、第 2 段階; 60°C, 5 秒, 温度変化 20°C/秒、第 3 段階; 72°C, 6 秒, 温度変化 20°C/秒を 45 サイクル繰り返した。

サンプル 2 μL に対して 0.5 U の Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ製) を使用し、SYBR Green I (×10,000 concentrate in DMSO, Cambrex 社製) を蒸留水で 1/5,000 に希釈したものを 0.6 μL 添加した。また、終濃度で、プライマー 0.5 μM, dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM, BSA 250 mg/L になるように添加し、蒸留水を加えて反応液の全容量を 20 μL とした。

本手法の適用によって再現性良く、18S rRNA 遺伝子の定量が行えるようになった。

(4) 被食者-捕食者の特異性把握

以下に、単離した 7 種類の鞭毛虫の捕食特異性を検討した結果を示す。どの鞭毛虫も、試験に利用したグラム陰性 3 種類、グラム陽性細菌 2 種類、合計 5 種類のうち 4 種類以上の被食細菌を捕食できた。

また、3 種類の鞭毛虫に関しては、全ての被食細菌を捕食できた。このことから、自然環境中に生息する原生動物、鞭毛虫は、幅広い捕食性を有していることが明らかとなった。

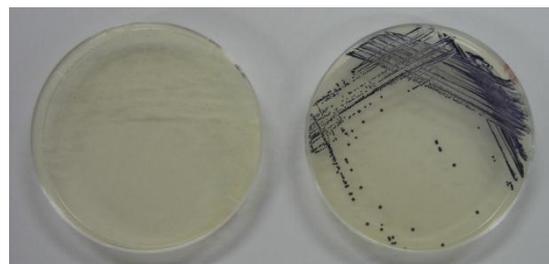
原生動物	単離被食細菌	被食細菌				
		Cn_KT1	Re_1399	Pa_PA01	Bm_1884	Ec_JM109
Ptz-HP2	Pa_PA01	○	×	○	○	○
Ptz-HP8	Pa_PA01	×	○	○	○	○
Ptz-HK6	Cn_KT1	○	○	○	○	○
Ptz-HK7	Cn_KT1	○	×	○	○	○
Ptz-HK8	Cn_KT1	○	×	○	○	○
Ptz-KK1	Cn_KT1	○	○	○	○	○
Ptz-KK2	Cn_KT1	○	○	○	○	○
		○ : 捕食可 × : 捕食不可				
Cn_KT1:		<i>Cupriavidus necator</i> KT1				
Re_1399:		<i>Rhodococcus erythropolis</i> IAM 1399				
Pa_PA01:		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01				
Bm_1884:		<i>Bacillus megaterium</i> de Bary 1884				
Ec_JM109:		<i>Escherichia coli</i> JM109				

(5) 捕食回避手段の確立

今後、捕食挙動の解析および回避策を検討する中で、捕食回避因子を取得することは大きな意味を有する。

そこで、これまでに捕食回避能の報告がある、*Chromobacterium violaceum* の中で、JCM1249 株を選出し、その効果を確認した。

本菌株よりピオラセイン合成遺伝子である *vioABCDE* を取得し、pBR322 系のプラスミドベクターに導入し、*trp* プロモータ下で発現させた。宿主は *E. coli* JM109 を利用した。以下に、作成した組換え体(右側)を示す。左側は *E. coli* JM109 である。



本結果で明らかのように、大腸菌でのピオラセイン合成遺伝子の発現に成功した。本組換え体を利用して、捕食実験を行ったところ、(4) で示した単離原生動物に対して、捕食を回避できることが明らかとなった。

ピオラセインの合成は、必須アミノ酸のトリプトファン 2 分子を元に合成される。つまり、トリプトファンを合成する能力を有していれば、多くのケースで発現は可能と考えられる。

また、上図のビオラセイン合成遺伝子を組み込んだ大腸菌では、生産されたビオラセインによって、その増殖速度が大きく阻害されることは無かった。

このことから、ビオラセイン遺伝子を、対象とする環境浄化細菌に導入、発現することは原理的には困難でなく、有効な捕食回避法として利用できる可能性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① 中村寛治, 須藤真志: 自然環境中に生息する細菌捕食性原生動物の解析, 土木学会論文集G (環境), 査読あり, Vol.68, 31-40 (2012)
- ② Ikeda-Ohtsubo W, Miyahara M, Kim SW, Yamada T, Matsuoka M, Watanabe A, Fushinobu S, Wakagi T, Shoun H, Miyauchi K, Endo G.: Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2, 査読あり, J Biosci Bioeng. Sep18. pii: S1389-1723 (2012)
- ③ 須藤真志, 中村寛治: 広瀬川河川水からの *Bacillus* 属細菌捕食性原生動物の単離および解析, 環境工学研究論文集, 査読あり, Vol. 47, 85-91 (2010)

[学会発表] (計6件)

- ① K. Nakamura, Analysis of indigenous protozoa in a river that graze foreign bacteria introduced, IBS 2010 The 14th International Biotechnology Symposium, 2010. 9. 14, Palacongressi, Rimini - Italy.
- ② K. Nakamura, Analysis of indigenous protozoa in the natural environment, 111th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2011. 5. 22, New Orleans Convention Center, Louisiana, USA
- ③ 渡辺健幸・中村寛治, トリクロロエチレン分解能を有する細菌への蛍光遺伝子の導入および検出, 平成24年度土木学会東北支部技術研究発表会, 2012. 3. 9, 東北大学 川内キャンパス

[図書] (計1件)

- ① 中村寛治, 他 (共著), シー・エム・シー出版, バイオ活用による汚染・廃水の新処理法, 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他] ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 寛治 (NAKAMURA KANJI)

東北学院大学・工学部・環境建設工学科

研究者番号: 90382655

(2) 研究分担者

遠藤 銀朗 (ENDO GINRO)

東北学院大学・工学部・環境建設工学科

研究者番号: 80194033

宮内 啓介 (MIYAUCHI KEISUKE)

東北学院大学・工学部・環境建設工学科

研究者番号: 20324014