

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22686050

研究課題名（和文）環境浄化に関わる未培養微生物を生きのまま選択的に回収する技術の創成

研究課題名（英文）Development and application of a novel capture method for living uncultured microorganisms.

研究代表者

関口 勇地 (SEKIGUCHI YUJI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：20313570

研究成果の概要（和文）：Gemmatimonas 属細菌等を利用し、本微生物群に対して特異的に結合するペプチドリガンドをファージ・ディスプレイ法で選別することが可能であった。またそれを利用し Gemmatimonas 菌体を生きのまま特異的に回収することが可能であることが示された。メタン回収型廃水処理プロセスに存在する未培養微生物群を標的とした選択的回収システムを構築することを試みた。各種未培養微生物細胞の高濃度、高純度取得の試みを実施した。また、その過程で得られた新規微生物については、その生理学的、遺伝学的特徴を調査し、新種記載を行った。

研究成果の概要（英文）：Gemmatimonas aurantiaca was used as one of the model fastidious microbes, and was subjected to FISH detection, cell collection with flow cytometry, and subsequent selection of peptides that specifically bind to cells of G. aurantiaca, resulting in the successful selection of specific peptides to the cells as well as in the successful separation of living G. aurantiaca cells from mock mixed microbial consortia. The developed method was then applied to various uncultured microorganisms in methanogenic wastewater treatment processes, targeting important yet-to-be cultured organisms in such systems. The developed method was successfully used for some of the cells, resulting in cultivation of new anaerobes. Physiological characterizations of these anaerobes give insight into the functions of these organisms in their habitat ecosystems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2012年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学

キーワード：環境技術・微生物・土木環境システム・水質汚濁・土壤汚染防止・浄化

## 1. 研究開始当初の背景

環境工学（環境バイオテクノロジー）分野

においては、生物学的廃水・廃棄物処理やバイオレメディエーションなど、微生物の持つ

多彩な機能を利用した環境浄化技術が活用されているが、人智はまだその微生物群を自在に制御する技術を見出していない。生物学的廃水処理プロセスにおいては、糸状性微生物の異常増殖によるバルキングや突発的な処理効率の悪化など、微生物群集構造の変化に起因する処理性能の悪化が見られるが、その現象についての包括的な理解と制御は未だ困難である。また、バイオレメディエーションにおいては、適切な浄化微生物を選択し、処理の元位置においてその活性化等を行う必要があるが、その適切な制御や維持はむずかしい。今後の環境バイオテクノロジー分野での技術革新を進めるにあたり、これらの課題の克服は極めて重要である。本課題を克服するためには、環境バイオテクノロジー分野で活用されている微生物群に関する基礎的知見の蓄積が不可欠である。

しかしながら、地球上の生物種はおよそ100万種といわれている一方、これまでに学術的に記述されている微生物（原核微生物）の種類はわずか7,000種程度にすぎない。これは微生物学研究の歴史が他の生物学にくらべて浅いという理由のみならず、分離培養がきわめて困難な微生物種が相当数にのぼることに起因している。近年16S rRNA 遺伝子などを利用した分子遺伝学的微生物検出・同定技術の発達により、自然環境中に生息する多様かつ膨大な数の微生物の99.9%以上は人為的に培養できず、その機能もまったく不明であることが明らかになってきた。現時点では、少なくとも80門（phylum）以上の細菌の存在が遺伝子情報として確認されているものの、培養された微生物を含まない門が約7割を占めている。現在、ゲノム情報から未培養微生物群の実体を解明する試みがなされているものの、個々の微生物群の実体と機能を直接的かつ明確に明らかにする上で、対象微生物群の分離・培養は避けて通れない。そのため、難培養微生物を培養するための培養技術における技術革新が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、難培養微生物群の培養を可能にするための新規技術を創成し、その開発技術を環境工学分野で活用されている難培養微生物群に適用することにより、その機能を解明することを目的とする。具体的には、16S rRNA を標的とした Fluorescence in situ hybridization 法とコンビナトリアル・バイオエンジニアリング技術を組み合わせ、特定の微生物群のみを「生きたまま」選択的に回収する新規技術の開発を行う。また、本技術を嫌気性廃水処理汚泥の未培養（難培養）バルキング原因微生物群に適用し、その機能を解明することを目標とした。

## 3. 研究の方法

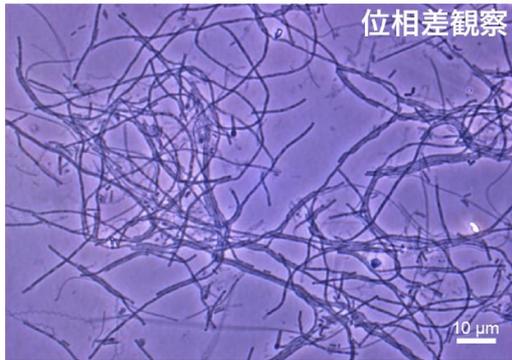
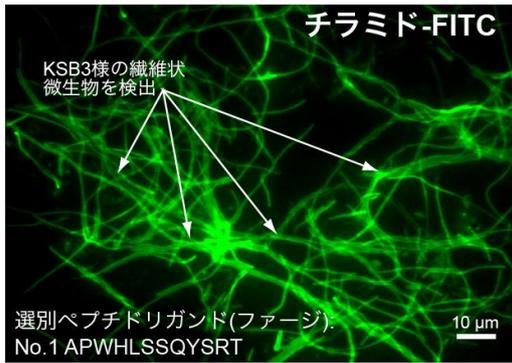
本項目では、これまでに培養されていない様々な系統の微生物群を環境浄化プロセスの複合微生物群から選択的に「分離・回収」するための新技術を開発する。回収技術では、[1] 16S rRNA 配列を標的とした蛍光標識 DNA プローブによる FISH 法を使用して未知微生物を蛍光標識し、[2] フローサイトメータ等でその蛍光標識菌体を選択的に回収する（この際細胞は完全に死滅している）。その後、[3] 回収された菌体表面に対し多様なペプチドライブラリを有するファージを用いたファージ・ディスプレイ法を適用し、回収された菌体に特異的に結合するペプチド配列を選択する。最終的には、[4] そのペプチドを特定微生物に対する「釣り針」として利用することによって、特定の菌体のみを微生物試料から生きたまま回収する。本項目では[1]～[4]の操作を可能とする技術開発を行ない、最終的には環境中に数多く存在しているにも関わらず分離培養に成功していない系統的に新規な微生物を培養するための初期材料（標的とする微生物を高純度で含む微生物試料）を提供し、その後の純粋培養化を支援する技術の開発を実施した。

## 4. 研究成果

平成22年度は、難培養微生物の典型的な例である *Gemmatimonas* 属細菌と KSB3 門細菌（活性汚泥、嫌気性汚泥に存在）を利用し、本微生物群に対して特異的に結合するペプチドリガンドを、M13 ファージを用いたファージ・ディスプレイ法で選別することを試みた。その結果、両細菌に対して特異性があると推定されるペプチドを選別することができる技術を確立することができた。

得られたペプチドを利用し、活性のある複合微生物群集から特定の微生物を生きたまま回収する技術の検討を行った。磁気ビーズ得られたペプチドを固定し、磁気を利用して特定微生物菌体を回収するなどの方法により、*Gemmatimonas* 菌体を生きたまま特異的に回収することが可能であることが示された。

*Gemmatimonas* 属細菌と KSB3 門細菌を対象とし、標的細菌に特異的な DNA プローブ（16S rRNA を標的）を作成、FISH 法とフローサイトメータを組み合わせ、本微生物を複合微生物群集中から選択的に回収する技術を確立した。以上の検討を通じ、ファージ・ディスプレイ法による菌体特異的ペプチドの選択と、それを利用した微生物の回収技術に関する基礎的検討と、その基盤技術の確立を行った。

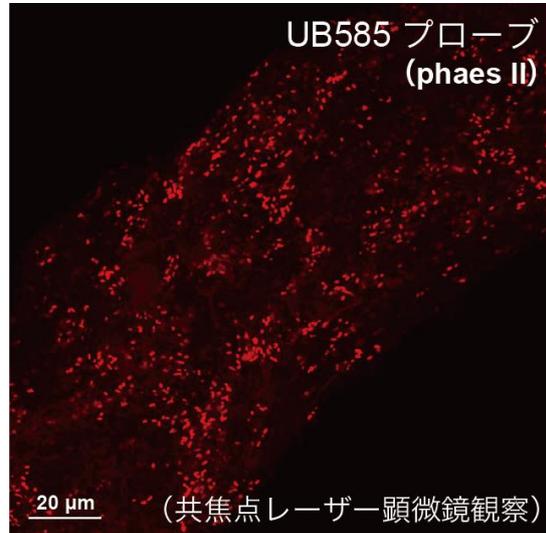


KSB3を含む汚泥に対して適用

図1 KSB3細菌に対して選別したペプチドによるKSB3細菌細胞の検出

平成23年度は、平成22年度で開発した微生物回収技術を利用し、メタン回収型廃水処理プロセス（嫌気性廃水処理プロセス）に存在する未培養微生物群を標的とした選択的回収システムを構築することを試みた。特にバルキング原因微生物、難培養細菌およびアーキア群について、その16S rRNAを標的としたFluorescence in situ hybridization (FISH)用プローブの情報をまとめ、必要なプローブを設計、作製した。具体的には、バルキング原因微生物についてその分子遺伝的特徴を把握するため、バルキング汚泥を対象とした16S rRNA遺伝子のパイロシーケンシングを実施し、原因微生物の特定を進めた。また、バルキング原因微生物と推定された3種の微生物群（*Verrucomicrobia*や*Bacterioides*に属する未培養細菌群）をFISH法で検出するためのDNAプローブを設計、作製し、それらの細胞を蛍光染色する方法を確立した。さらに、前年度に引き続きペプチドを利用した菌体回収技術に関する基礎的検討を行い、本手法を利用して実際の未培養微生物群を培養可能にするための検討を実施した。具体的には、嫌気性廃水処理汚泥への分子系統学的解析からその存在が予見されている、系統学的に新規で処理プロセスにおいて重要な未培養系統群（バルキング原因微生物など）に対して本手法を適用し、それぞれに特異的なペプチドの選定後、ペプチド

リガンドを利用した各微生物細胞の高濃度、高純度取得を試みた。その結果、新規な細菌を複数種類所得することに成功した。所得、分離した株については、新種記載のための解析を実施し、その一部について論文発表を行った。



UB585 プローブ: OTU380を含むクレードを標的の5'-CCCCTGACTTACCAATCCGC-3', 20mer  
図2 嫌気性廃水処理汚泥に存在する未培養*Bacterioides*細菌のFISH検出

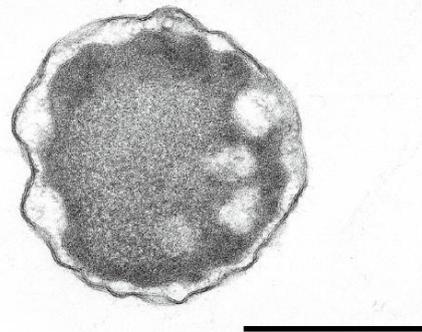
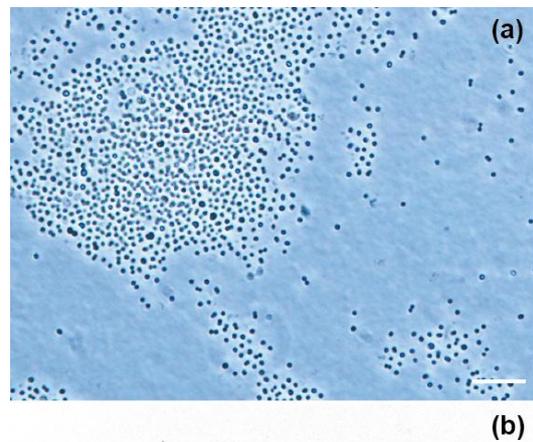


図3 本研究で分離した新規微生物の一例。”*Oligosphaeria*”綱に属する新規細菌、(a)位相差顕微鏡写真（バーは10 μm）、(b)電子顕

顕微鏡写真（バーは0.5 μm）

平成 24 年度は、開発した微生物回収技術を利用し、平成 23 年度に引き続きメタン回収型廃水処理プロセス（嫌気性廃水処理プロセス）に存在する未培養微生物群を標的とした選択的回収システムを構築することを試みた。平成 23 年度に特定したバルキング原因微生物（*Verrucomicrobia* や *Bacteroides* に属する未培養細菌群）、また、嫌気性廃水処理汚泥で検出される *Nitrospira*、*Synergistetes* 門未培養細菌群を対象とし、ペプチドを利用した菌体回収技術を適用した。その結果、これらの微生物群に対して選択的に結合するペプチドを選別した。ペプチドリガンドを利用した各微生物細胞の高濃度、高純度取得を試みた結果、新規な細菌を複数種類所得することに成功した。分離された細菌群は新種記載のための解析を実施した。

#### 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 3 件）

- ① 邱 艶 玲、関口 勇地、*Oligosphaera ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, carbohydrate-fermenting bacterium isolated from methanogenic sludge, and description of *Oligosphaeria* classis nov. in the phylum *Lentisphaerae*, Int J Syst Evol Microbiol.、査読有、2013、63、533-539
- ② 成 廣 隆、関口 勇地、Quantitative detection of previously characterized syntrophic bacteria in anaerobic wastewater treatment systems by sequence-specific rRNA cleavage method, Water Research、査読有、46、2012、2167-2175
- ③ 成 廣 隆、関口 勇地、Oligonucleotide probes for environmental monitoring of methanogenic archaea、Microbiol Biotechnology、査読有、4、2011、585-602

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 黒田恭平、関口 勇地、Cultivation and characterization of anaerobes relevant to sludge bulking in methanogenic wastewater treatment system、日本微生物生態学会、2012 年 09 月 20 日、豊橋技術科学大学（愛知県）
- ② 黒田恭平、関口 勇地、嫌気性廃水処理汚泥のバルキングに関与する複合微生物群の分子遺伝学的解析および培養、土木学

会新潟会研究調査発表会、2011 年 11 月 22 日、ハイブ長岡（新潟県）

- ③ 井口晃徳、関口 勇地、下水処理 UASB プロセスの汚泥内微生物群集構造解析と高頻度に検出される未培養微生物群の検出、日本微生物生態学会大会、2011 年 10 月 8 日、京都大学（京都府）
- ④ 関口 勇地、Ecophysiology of formerly uncultured fastidious Chloroflexi and *Lentisphaerae* in natural and biotechnological systems、International Union of Microbiological Societies 2011、2011 年 9 月 6 日、札幌コンベンションセンター（北海道）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

関口 勇地 (SEKIGUCHI YUJI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：20313570