

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23710086  
 研究課題名（和文） 汚染物質分解微生物の特定のための群集アイソトープアレイ法の開発と応用  
 研究課題名（英文） Development and Application of Community Isotope Arrays for Characterization of Active Microorganisms Degrading Environmental Pollutants  
 研究代表者  
 Dieter Turlousse（ディーター トゥールース）  
 東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員  
 研究者番号：00598485

## 研究成果の概要（和文）：

有害化学物質による環境汚染は、人間の健康に大きな影響を及ぼしうる。微生物を用いて有害物質を無害なものに変換する技術はバイオレメディエーションとして知られており、こうした環境汚染に立ち向かう方法として有用である。より効率的なバイオレメディエーション法の開発に役立てるため、環境中で対象物質の分解を行う微生物を特定する新規な手法の開発を行った。開発された手法は高い感度と特異性を持つことが示され、さまざまな環境における分解者を特定することが可能であることがわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

Pollution of the environment with toxic chemicals poses a major risk to human health. Known as bioremediation, the utilization of microorganism that convert toxic chemicals to harmless endproducts provides a promising strategy to combat environmental pollution. To aid in the development of more effective bioremediation products and strategies, we developed a novel technique to identify key biodegradative microorganisms in the environment. The developed technique was shown to be highly sensitive and specific and can be readily applied to identify biodegraders in many different environments.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：アイソトープアレイ、DNA アレイ、フェノール分解細菌

## 1. 研究開始当初の背景

芳香族炭化水素類などの有害化学物質は、我が国をはじめ工業化された多くの国において人の健康に影響を及ぼしうるような環境汚染を起している。特定の分解能をもつ微生物による生物学的浄化法は、汚染された環境や廃水の処理において経済的で効率的な

方法である。しかしながら、実際に汚染された環境や廃水処理の現場において、特に嫌気条件下において、活性を持つ微生物についての知見がまだまだ不足していることが、こうした処理法の導入の足かせとなっている。これらの微生物についての知識は、その存在量や環境変化に対するレスポンスをモニターし、また新たに効率的な浄化法を開発してい

くために必要である。培養によらない手法でこうした微生物の同定を行うには、安定同位体プローブ (Stable Isotope Probing, SIP) 法や、microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization (MAR-FISH)法など、同位体標識基質を用いた方法と分子生物学的解析手法を組み合わせた方法がある。これらの手法は多くの研究において用いられてきているものの、より高い感度と特異性をもたせつつ、未知の微生物を検出できるようにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の全体の目的は、芳香族炭化水素類をはじめとする有害物質の無酸素/嫌気条件における分解についての知見を深め、より効率的なバイオレメディエーションや廃水処理の戦略を得ることにある。より具体的には、我々は新規な基質と微生物種を結びつける技術、community isotope array (CIArray) 法を開発し、実際の環境に近い環境で対象物質の分解活性を持つ微生物を同定することを目的とした。CIArray 法について簡単に述べると、微生物群集、つまり対象となる試料を放射性同位体( $^{14}\text{C}$ )標識した基質で培養し、 $^{14}\text{C}$  標識された微生物群集の DNA を、対象試料から作成した 40-kbp の fosmid クローンからなるプローブのアレイにハイブリダイズさせ、検出されたプローブの塩基配列から  $^{14}\text{C}$  を同化した微生物を同定する方法である。本研究期間においては、CIArray 法の開発と検証、および代謝機能と種の特定を行うための既往の標準的な手法である DNA-SIP 法と比較した。続いて、連携研究者である栗栖太氏の研究室で所有する嫌気ベンゼン分解微生物集積培養系において、ベンゼン分解微生物と目される微生物の単細胞分離と、その塩基配列解読を行うことができるか、解析のフローについて検討を行った。

## 3. 研究の方法

CIArray 法の開発と検証においては、以下の項目を実施した：1) CIArray の構築とハイブリダイゼーションについての標準的な操

作手順の開発、2) CIArray 法を用いた実際の環境に近い環境条件での対象物質分解微生物の特定、3) CIArray 法をの感度と特異性の評価。このうち2)と3)については、図1に示した流れで研究を実施した。試料は  $^{14}\text{C}$ - および  $^{13}\text{C}$ -標識した基質でそれぞれ同時に培養し、 $^{14}\text{C}$ - および  $^{13}\text{C}$ -基質を同化した微生物を CIArray 法と DNA-SIP 法で同定した。CIArray 法による結果を検証するため、fosmid クローンにより特異的に検出された DNA について、定量リアルタイム PCR 法を用い、SIP 法において比重ごとに分離された画分を解析、定量した。このことにより、CIArray 法の検証を行うのみならず、DNA-SIP 法と感度の比較も行った。

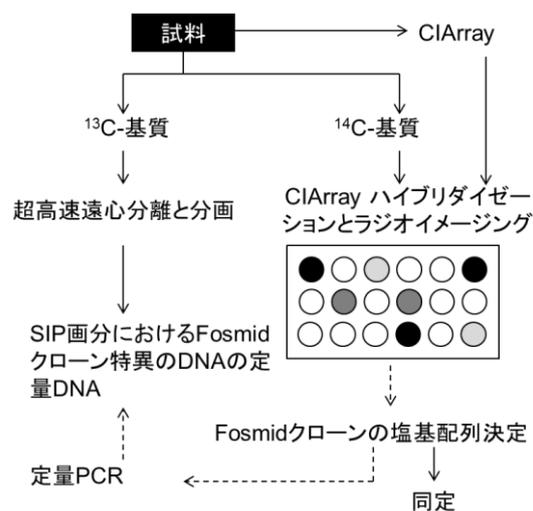


図1. CIArray 法の開発と研究における研究戦略の模式図

## 4. 研究成果

CIArray 法で必要となる様々な手法 (たとえば、高分子 DNA の抽出や fosmid クローニング法など) を開発したのち、我々は提案した手法を、人工安水廃水処理を行う循環式硝化脱窒法における無酸素フェノール分解微生物の同定に用いた。まず、実験室規模の循環式硝化脱窒法による人工安水処理装置から採取した活性汚泥を用い、fosmid クローンを 96 クローン作製し、試料特異的な CIArray を調製した。フェノール分解微生物を基質を用いて標識するため、硝酸還元条件下で  $^{14}\text{C}$ -

標識フェノールと活性汚泥試料を培養した。また並行して、DNA-SIPを行うため、 $^{13}\text{C}$ -標識フェノールおよび非標識フェノールを用いた培養系も設定した。 $^{14}\text{C}$ -標識フェノールを加えた試料から抽出した DNA と CIArray をハイブリダイズさせたのち、陽性を示したクローンといくつかの陰性を示したクローンについて、同定を行うとともに fosmid クローン特異的な定量 PCR を行うため塩基配列を解読した。

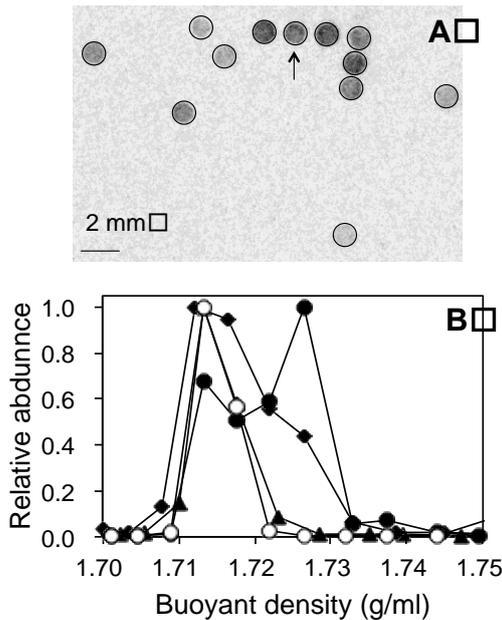


図 2. (A) CIArray のオートラジオグラフ。13 mg/L  $^{14}\text{C}$ -フェノールと 12 mg/L 非標識フェノールを添加した活性汚泥から抽出した DNA とハイブリダイズさせた CIArray. (B) SIP 法により比重で分離した画分における fosmid クローン #07 (上図中、矢印で示したもの) の相対量。 $^{13}\text{C}$ -フェノール培養系：▲：1 日目 (30 mg/L 相当量で培養されたもの)、◆：2 日目 (180 mg/L)、●：3 日目 (330 mg/L)。 $^{12}\text{C}$ -フェノール培養系：○：3 日目 (330 mg/L)。

図 2 A に示すように、CIArray に対するハイブリダイゼーションとラジオイメージングを行うことで、12 プローブ (fosmid クローン) において陽性シグナルが得られた。すべての配列は部分配列の解読とデータベースとの照合により、Gammaproteobacteria に属する微生物であるということがわかった。

DNA-SIP 法により、CIArray にて陽性のシグナルがみられた fosmid クローンのみで、SIP の重画分に  $^{13}\text{C}$ -標識の DNA が見られたことから、CIArray が特異的に同位体標識した基質を取り込んだ微生物を検出していることが検証できた。さらに重要なことに、この解析により、SIP 法では DNA の重画分へのシフトが見られないフェノール濃度でも CIArray 法では検出が可能であったことから、CIArray が DNA-SIP 法より感度が高いことが示された (図 2 B)。また、SIP 法による重画分の 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリ解析により 2 つの新規な海洋性

Gammaproteobacteria が主たるフェノール分解微生物だと検出されたことも、CIArray 法による結果の信頼性を示す結果であった。これらの結果から、本研究により CIArray 法が対象物質の分解に代謝活性を持つ微生物の特異的高感度な検出法として、有効であることが示された。さらに本研究では、硝酸イオンを利用してフェノールを分解するこれまでに知られていない海洋性

Gammaproteobacteria の存在が示され、フェノール分解脱窒細菌についての知見を深めるものとなった。その優れた感度から、CIArray 法は幅広い基質や環境に適用することができるかと期待され、バイオレメディエーションや生物学的廃水処理においてカギとなる微生物の同定に威力を発揮するツールとなりえると考えている。

さらに、汚染物質分解微生物を特定しその機能を解析する手法として、単細胞選別技術を用いた単細胞の分取と、分取された細胞の遺伝子解析についての検討を行った。対象とした微生物は、土壌に由来する集積培養微生物系で、メタン生成条件でのベンゼン分解との関連が強いとして報告されている微生物 Hasda-A である (Sakai et al. 2009; J Biosci Bioeng 108(6))。Hasda-A はこれまでに分離培養が試みられてはいるが成功しておらず、いまだにその代謝能ははっきりしていない。

まずはじめに、研究室で所有する 5 種類のメタン生成ベンゼン分解集積培養系について、Hasda-A の菌数を、全細菌、全古細菌とともにリアルタイム PCR 法により定量し存在割合を求めた。その結果、古細菌の菌数

は最近の菌数に比べて1ケタ少なく、Hasda-Aの存在割合は全細菌+全古細菌数に対し0.2-2.6%であった。このことから、最大の存在割合を示した試料を用い、ランダムに細胞を分取した場合にHasda-Aの単細胞が獲得できる確率を求めた。その結果、96%以上の成功確率でHasda-Aの単細胞が獲得できることがわかった。

この結果を受けて、実際に単細胞ソーティング技術を用い、Hasda-Aの単細胞分取を試みた。単細胞ソーティングにおいては、フローサイトメトリー技術を応用し、レーザー光を当てた場合に透過光や散乱光、また蛍光を計測し、その特徴から大きさや粒子内構造等を推定し、対象とする粒子の特徴を持つ粒子を選別し、分取する。対象試料にはHasda-Aをはじめとする微生物細胞のほか、土壌粒子が多く含まれており、土壌粒子が細胞分取の効率を下げる可能性が十分に考えられる。よって、土壌粒子を可能な限り含まない試料を作成する必要がある。本研究では前処理法として、超音波分散処理と遠心分離の組み合わせを検討した。

異なる前処理法の試料について、実際の嫌気ベンゼン分解集積培養系において、微生物細胞を効率的に分取できるか検討した。これ以降の検討には、単細胞ソーティング装置が必要となる。そこで、米国Bigelow海洋科学研究所に委託して実施した。その結果、超音波分散処理を行った試料において、良好な細胞分取が可能であることが明らかとなった。

引き続き、分取された試料に対して16S rRNA標的のPCRを行い、ソートされた試料が微生物細胞を含むか、検証した。その結果、ソートした315区画のうち、72区画には1細胞もなく、残り243区画には1以上の細胞が得られていることがわかった。よって、ポワソン分布を仮定すると、これらのうち106区画に1細胞のみが含まれていると考えられる。もともとのHasda-Aの存在割合は約3%であったことから、3区画にHasda-Aの単細胞が分取できていると推定できた。

本研究により、以下の成果が得られ、環境汚染を浄化するための知識を向上することに貢献することができた。

- (1) 対象物質を分解する微生物について、高感度で特異的な検出手法を開発した。
- (2) 単細胞ソート技術により、嫌気ベンゼン分解微生物集積培養系におけるベンゼン分解微生物のゲノム情報を得ることが可能であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

Dieter M. Turlousse, Futoshi Kurisu, Tomohiro Tobino, Hiroaki Furumai, Sensitive and substrate-specific detection of metabolically active microorganisms in natural microbial consortia using community isotope arrays, FEMS Microbiology Letters, 342, 70-75, 2013. DOI: 10.1111/1574-6968.12112

[学会発表] (計 1件)

Dieter M. Turlousse, Futoshi Kurisu, Tomohiro Tobino, Hiroaki Furumai, Community isotope arrays for sensitive resolution of substrate-species linkages in natural microbial communities, International Symposium on Microbial Ecology (ISME-14), Copenhagen, Denmark, 2012.8.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

ディーター トゥールース (Dieter Turlousse)

東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員  
研究者番号：00598485