

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640118

研究課題名(和文)原生動物との共培養下で分離可能となる難培養性細菌の探索

研究課題名(英文) Exploration of unculturable bacteria which can be isolated under the co-incubation of protozoa

研究代表者

多羅尾 光徳 (Tarao, Mitsunori)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60282802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の捕食者である原生動物が細胞外に分泌する物質(PECEs)をシグナル因子・増殖促進因子として利用する細菌が存在するとの仮説の下に研究を行った。モデル原生動物のセン毛虫 *Tetrahymena thermophila* 由来のPECEsを用い、二つの手法で研究を行った結果、次の成果を得た。(1)PECEsを含む液体培地にて淡水細菌群集を培養し、群集構造の経時変化を観察した。その結果、PECEsは細菌群集構造の安定化に寄与する作用がある可能性が示された。(2)PECEsを含む寒天平板培地にて淡水細菌群集を培養した結果、PECEs存在下においてのみ増殖しコロニーを形成する細菌の分離培養に成功した。

研究成果の概要(英文)：This study hypothesised that some bacteria utilise protozoan extracellular exudates (PECEs), as signal factors or growth promotion factors. By using PECEs derived from ciliate *Tetrahymena thermophila*, as a model protozoa, two outcomes were obtained. (1) Bacterial communities of freshwater were incubated in the liquid medium with PECEs, and the community structure was analysed sequentially. As a result, it is suggested that PECEs contribute to stabilise bacterial community structure. (2) Bacterial communities of freshwater were incubated on the agar plate with PECEs. As a result, some bacterial strains which formed colonies only on the agar plate with PECEs were isolated. The isolates did not form colonies on the agar plate without PECEs. These results suggest that some bacterial strains in natural environments are stimulated their growth or metabolic activities by PECEs.

研究分野：環境微生物学

キーワード：微生物保全 生物多様性 微生物多様性 異種間相互作用 原生動物 細菌群集構造

### 1. 研究開始当初の背景

自然界の細菌は高等生物(植物・動物)とは比べてはるかに多様性に富んでおり、古細菌とともに生物多様性の圧倒的な割合を占めている。しかしながら、自然界の細菌種の90%以上は既存の培養条件ではいまだ分離・培養できない「難培養性細菌」である(Colwell & Grimes, 2000)。ゲノム解析の手法が驚異的なまでに発達し、培養法に依存しない解析が可能となった今日においても、細菌の多様性や生態・機能を解明するためには、難培養性細菌を分離・培養することが不可欠であり、そのための新規手法の開発が求められる。

近年、注目されているのが、他の微生物との共培養を利用する手法である。細菌のなかには、他の細菌あるいは藻類との共培養下において、それら微生物が分泌する物質をシグナルあるいは増殖促進因子として利用し、増殖や生残が促進されるものが存在する(例えば, Ueda *et al.*, 2010)。この手法を用いて難培養性細菌を分離・培養した例がいくつか報告されている(例えば, Mayali *et al.*, 2008; Ueda *et al.*, 2010)。いっぽう、細菌の捕食者である原生動物(ペン毛虫・セン毛虫・アメーバ)との共培養下において増殖や生残が促進される例も、環境細菌(Corno & Jürgens, 2006; Tarao *et al.*, 2008)や、病原細菌(例えば, Fields, 1996)で報告されつつある。この理由として、(1)原生動物に捕食されやすい細菌種がその数を減らすことにより、空いたニッチを、捕食されにくい細菌種が占める、(2)原生動物の細胞外分泌物質(protozoan extracellular exudates, PECEs)が細菌の増殖・生残を促進した、のふたつの仮説がたてられる。一つ目の仮説についてはこれまで多くの研究が行われ、その有効性が検証されてきた。しかし、二つ目の仮説を直接明らかにした報告例はこれまでのところきわめて限られている。PECEsにより増殖・生残が促進される細菌種が存在すれば、PECEsを用いた難培養性細菌を分離・培養する方法を新たに提案できることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、(1)難培養性細菌のなかには PECEs をシグナル因子あるいは増殖促進因子として利用するものがあるとの仮説を検証すること、(2)PECEs を利用した難培養性細菌の新たな分離・培養手法を確立するための基礎的な情報を得ることの、2つを目的とした。具体的には以下の2つのアプローチで研究を進めた。

①細菌群集構造が PECEs の暴露により影響を受けるかを検討する。PECEs により増殖・生残性が促進される細菌が存在すれば、それら細菌が集積し、細菌群集構造が変化すると予想される。すなわち、PECEs により増殖・生残性が促進される細菌の存在が間接的に支持される。

②PECEs を含む平板寒天培地を用いて細菌

を分離する。PECEs による増殖促進の効果を直接証明するため、PECEs を含む平板寒天培地上で細菌群集を培養し、形成されるコロニー数を、PECEs を含まない平板寒天培地と比較する。また、PECEs により難培養性細菌が分離・培養できることを期待して、コロニーを形成した細菌を分離する。さらに、分離した細菌の系統解析、および PECEs に対する代謝反応等を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)PECEs に暴露した細菌群集の群集構造の変化

細菌群集には東京農工大学農学部キャンパス(東京都府中市)構内の親水池より採取した試水を孔径 0.8  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過して原生動物を除去したのち、さらに有機物を 25 mg C L<sup>-1</sup> 含む無機塩培地にて前培養したものをを用いた。原生動物には無菌のセン毛虫 *Tetrahymena thermophila* inbred B をを用いた。

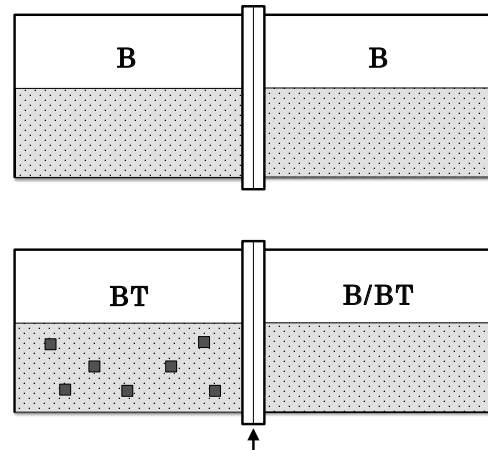


図 1. 二槽培養器の模式図。矢印で示した縦細線部がメンブレンフィルターを示す。網掛け部が培地と細菌群集を、■が *T. thermophila* をそれぞれ示す。B, BT, B/BT は本文を参照。

*T. thermophila* による細菌の捕食を除外しつつ細菌を PECEs に暴露する装置として、中央を孔径 0.1  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで隔離した二槽培養器(図 1)を用いた。原生動物や細菌はこのメンブレンフィルターを通過しないが、PECEs を含む溶解成分は通過する。培養系を3種類設定した。すなわち、細菌群集のみの系(培養系 B)、細菌群集と *T. thermophila* の混合培養系(培養系 BT)、および細菌群集をメンブレンフィルターで隔離しながら培養系 BT と培養する系(B/BT)であった。各培養系につき5連、用意した。暗所 25°Cにて、好気条件を保つためときどき緩やかに振とうしながら静置培養した。培養中、それぞれの培養系から培養液を適宜、採取した。培養液から細菌 DNA を抽出し、PCR 法にて 16S rDNA 領域を増幅した。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法により、増幅した DNA を塩基配列の違いに基づいて分離した。得られたゲルを画像解析し、各バンドが

停止した位置の変性剤濃度、および各バンドの輝度からクラスター解析を行った。クラスター解析には統計解析ソフトウェア R を用いた。細菌密度を LIVE/DEAD 法にて生細胞と死細胞に区別しながら計数した。

## (2) PECEs 含有寒天平板培地を用いた細菌の分離

無菌の *T. thermophila* をペプトン (0.3 g L<sup>-1</sup>), 粉末酵母エキス (0.15 g L<sup>-1</sup>), グルコース (0.15 g L<sup>-1</sup>) を含む無機塩培地にて暗所 25°C で 10 日間培養した後、孔径 5 μm のメンブレンフィルターでろ過した。このろ液に滅菌した精製寒天末を 15 g L<sup>-1</sup> となるように添加し、PECEs が熱感受性である可能性も考慮して湯煎して融解した。これを滅菌したシャーレに分注し、冷却固化したものを PECEs 有り平板寒天培地とした。対照として、*T. thermophila* を培養しない培地で作成した平板寒天培地を、PECEs 無し平板寒天培地として用意した。

これら平板培地に、湖沼・河川から採取した試水を塗抹し、暗所 25°C で培養しながら、出現したコロニー数の経時変化を観察した。PECEs 有り平板寒天培地および PECEs 無し平板寒天培地よりランダムにコロニーを釣菌して細菌を分離した。分離した細菌を 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析を行った。また、分離した細菌を PECEs 無し平板寒天培地に塗抹し、コロニーを形成するか、観察した。さらに、PECEs を含む、または含まない液体培地にて、分離した細菌を培養し、増殖の様子を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) PECEs に暴露された細菌群集の群集構造

細菌密度は全ての培養系において初期密度の 5 × 10<sup>6</sup> cell mL<sup>-1</sup> から、培養 4 日目までには約 1 × 10<sup>7</sup> cell mL<sup>-1</sup> まで上昇した。それにとともに、培養系 BT では *T. thermophila* の細胞密度も上昇した。その後、細菌密度は培養期間の経過に伴い低下し、培養 10 日目には培養系 B, BT, B/BT においてそれぞれ 5 × 10<sup>6</sup> cell mL<sup>-1</sup>, 6 × 10<sup>6</sup> cell mL<sup>-1</sup>, 8 × 10<sup>6</sup> cell mL<sup>-1</sup> に低下した。

DGGE 法で解析した細菌群集構造は、培養系 B, BT, および B/BT の間で、それぞれ異なる変動を示した。培養系 B の細菌群集は、培養 6 日目 (図 2 の 6\_B1~6\_B2) まで大きく変動することなく、培養開始時の細菌群集 (B0-1~B0-5) と同じクラスターに含まれた。しかし、その後、群集構造が変化し、培養 10 日目 (10\_B1~10\_B5) には培養開始時から離れた位置にクラスターを形成した。培養系 BT では群集構造が培養時間の経過にしたがい大きく変化し、培養開始時 (B0-1~B0-5) とは異なるクラスターを形成した (6\_BT1~6\_BT5, および 10\_BT1~10\_BT5)。培養系 B/BT では 5 連のうち 1 つを除いて細菌の群集構造が培養期間中、大きく変動することがなく、

培養 10 日目 (10\_B/BT2 を除く 10\_B/BT1~10\_B/BT5) においても、培養開始時 (B0-1~B0-5) や、培養 6 日目の培養系 B と近い位置にクラスターを形成した。

DGGE の電気泳動ゲルにおいて、培養 10 日目の B/BT に特異的に出現したふたつのバンドの 16S rDNA の塩基配列を決定した。その結果、土壌細菌の一種、*Roseateles terrae* および *Caulobacter vibrioides* ともっとも高い相同性を示した。

Cluster dendrogram with AU/BP values (%)

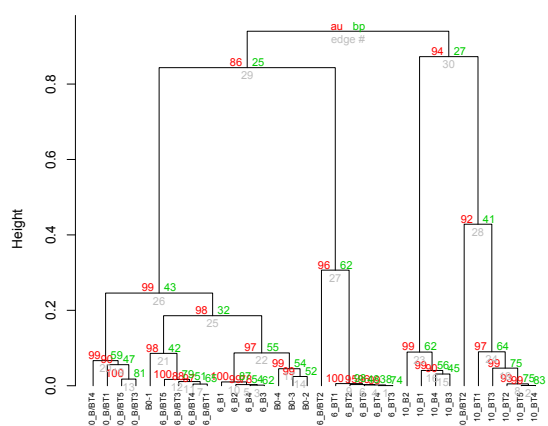


図 2. 細菌群集を図 1 の B, BT および B/BT で培養したときの、細菌群集構造のクラスター解析。先頭の数字は培養日数、B, BT, B/BT は培養系を、末尾の数字は 5 連の反復培養の番号をそれぞれ示す。B0 は培養開始時の細菌群集を示す。ノード上の赤字は AU テストの *p* 値 (% 値) を、緑字はブートストラップ値 (反復数 1000 回の % 値) をそれぞれ示す。

以上の結果から、培養系 B ではいったん増加した細菌が死滅するとき、種ごとに生残性が異なるため、培養 10 日目には群集構造が培養初期と大きく異なると考えられる。また、培養系 BT では細菌密度の増加に伴い *T. thermophila* が細菌種を選択的に捕食し、その結果、細菌群集構造が大きく変動したと考えられる。いっぽう、培養系 B/BT は培養系 B および BT と比較して細菌密度の低下の程度が低く、細菌群集構造の変動の程度も低かった。このことは、培養系 BT に含まれる溶存物質 (*T. thermophila* の PECEs) が、培養系 B/BT における細菌群集構造の安定性に寄与していることを示唆する。すなわち、PECEs により増殖・生残が促進される細菌が存在することを間接的に支持する結果が得られたと考えられる。

### (2) PECEs 含有寒天平板培地を用いた細菌の分離

試水 12 試料のうち、PECEs 有り平板寒天培地のほうがコロニー数が多かった (*t*-test, *p* < 0.05) 場合 (図 3) が 2 例、少なかった場合 (*p* < 0.05) が 2 例、それぞれ観察された。このことから、PECEs によってコロニー形成が促進される細菌と、阻害される細菌のあることが示された。

PECEs 有り平板寒天培地上に形成されたコ

ロニーより、4 菌株を分離した。このうち 1 株は *Sediminicoccus rosea* と、1 株は *Flavobacterium johnsoniae* と、2 株は *Herminiimonas arsenicoxydans* と、それぞれ 16S rDNA の塩基配列において 96%以上の高い相同性を有した。これらの既知の細菌種に関する生理的・生態的性質を文献およびデータベースに記載されている情報から得、原生動物との関わりを検討した。しかし、捕食耐性や共生関係など、原生動物との関連を示す性質に関する情報は得られなかった。また、難培養性細菌とされる細菌を分離するには至らなかった。

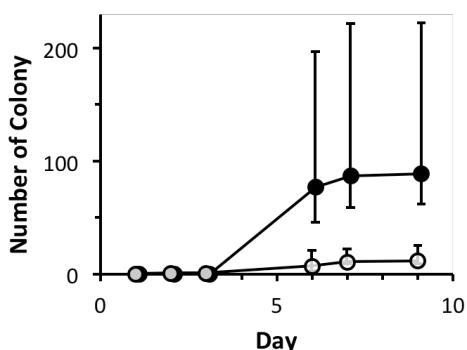


図 3. 東京農工大学府中キャンパス内の親水池より採取した細菌群集を PECEs 有り (●) または無し (○) 平板寒天培地に塗抹したときのコロニー数の経時変化。エラーバーは最大値と最小値を示す (n=3)。

*Sediminicoccus rosea* と高い相同性を示した細菌 KR-5-D 株は、PECEs 無し平板寒天培地上にコロニーを形成しなかった。また、PECEs を含む液体培地で培養すると、赤色を呈したフロックを形成した (図 4)。いっぽう、PECEs を含まない液体培地においては、赤色を呈さず、フロックも形成しなかった。すなわち、PECEs により KR-5-D 株の生理活性が変化することが明らかとなった。KR-5-D 株が PECEs に対してこのような反応を示す理由として、原生動物による捕食を回避するため、PECEs をシグナルとして感知している可能性が考えられた。

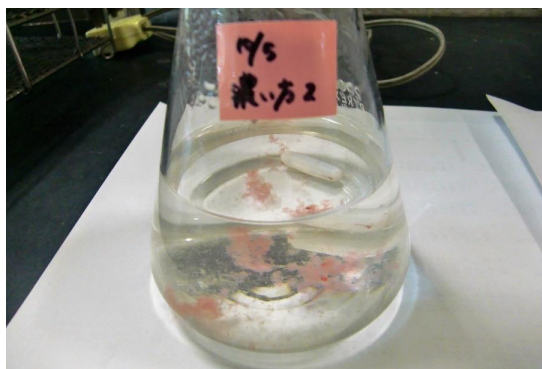


図 4. PECEs を含む液体培地にて細菌 KR-5-D 株を培養したときに形成されたフロック

以上をまとめると、本研究から得られた成果は以下のとおりである。

①PECEs が特定の細菌の増殖・生残を促進す

る可能性のあることが示された。

②PECEs によりコロニー形成能を促進される細菌を分離することに成功した。この手法を発展させることで難培養性細菌の分離・培養技術の開発につなげることが期待できる。

③PECEs により生理活性を変化させる細菌が存在することが明らかとなった。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① Tarao, M., M. Shinohara, H. Nagano, J. Kudoh and Y. Mizuuchi, N<sub>2</sub>O emission by denitrifying bacteria isolated from freshwater environments by using a medium with low nitrate, The 7th Japan-Taiwan-Korea International Symposium on Microbial Ecology, 亀城プラザ (茨城県土浦市), 2015 年 10 月.

② 濱部 惇, 多羅尾 光徳, 細菌群集構造に原生動物の捕食と細胞外分泌物が及ぼす影響, 環境微生物系合同大会 2014, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市), 2014 年 10 月.

③ Tarao, M. and K. Okayama, Effect of composition of microbial community on susceptibility of a chlorophenol-degrading bacterium to copper ion, 15th International Society for Microbial Ecology, Seoul, Republic of Korea, 2014 年 8 月.

④ Sasaki, M., D. Komatsu., H. Kobayashi and M. Tarao, Comparative studies of colony formation of freshwater bacteria on agar plate with or without protozoan culture solution, 15th International Society for Microbial Ecology, Seoul, Republic of Korea, 2014 年 8 月.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

多羅尾 光徳 (TARAO MITSUNORI)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 60282802