

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660069

研究課題名(和文) 蛍光顕微マニピュレーションによる複合系からの液体分離培養法の確立

研究課題名(英文) Development of Liquid Isolation protocol of microorganisms in a mixed culture system by using fluoro-micromanipulator

研究代表者

酒井 謙二 (Sakai, Kenji)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50205704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光顕微マニピュレーターを用いて、固体平板培地を用いた分離培養法では取得が難しい微生物を、液系のみで効率良く純粋分離するための手法を確立することを目的とした。まず、キャピラリー、プレート、オイルなどについて選択し、ドロップレットの配置、洗浄方法、生細胞の蛍光染色剤による判別法の導入、移植後の増殖観察法などについて最適化を行った。その結果、1細胞の分離に要する時間の短縮、マイクロコロニーの形成率向上が得られた。本法を用いて、超高温コンポストの集積培養液から液系分離を試み、既知の微生物と形態が大きく異なる高度好熱菌、および既知の常温性細菌と系統的に近い高度好熱菌などの純化に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, efficient liquid isolation protocol of not-yet isolated bacteria using fluoro-micromanipulator was developed. Type of capillary, plate, and oil as well as position of droplet, washing, and application of FDA (reagent for detecting viable cells), observation of micro-colonies were optimized. As a result, two types of interesting microorganisms showing extreme-thermophilicity were successfully purified from high-temperature compost.

研究分野：土壤環境微生物学

キーワード：蛍光顕微マニピュレーター 難培養微生物 高度好熱菌

## 1. 研究開始当初の背景

自然生態系の微生物のみならず、開放系で行われる排水や廃棄物処理プロセスは複合微生物系で働いており、その多くは現在も難培養微生物である。実際に、下水汚泥の高温コンポスト化やヒト尿尿の液肥化微生物の分析を通じて、そのほとんどは、16S rRNA 遺伝子解析などでその分子系統学的な分類位置が推定されるのみで、従来の微生物純化技術によっては分離培養困難な微生物が複合系の大多数を占める場合もある。その結果、廃棄物・排水処理の微生物系は、依然ブラックボックスとしての間接制御を余儀なくされており、有効な複合微生物系の再構成や機能改良は難しく、それらの新規遺伝子資源もほとんど未利用・未開拓である。

表 微生物が分離培養困難な推定理由

- (i) 生育速度が著しく遅い
- (ii) 寒天上でコロニーを形成しない
- (iii) 生育に一定以上の細胞濃度を必要とする
- (iv) 低細胞数レベルで静止期を迎えてしまう
- (v) 他の微生物が生産する生育因子を必要とする
- (vi) 種間水素伝達を行い共生している
- (vii) 昆虫や動物などに共生する
- (viii) そもそも環境中で非優占的である

自然界に存在する微生物が分離培養困難である理由が鎌形によって考察されているが(上表)、これらのうち、人的に作られた複合微生物系で重要な存在意義がある微生物は(i)~(vi)である。これらの多くは、単細胞レベルでの操作ができれば、種々の工夫を加えることができ、分離源に近似した組成の液系で増殖可能な条件を整えることができるはずである。

## 2. 研究の目的

本研究では、液体培養系のみで独立再構成系を構築し、これを Simplified Community (SC) として扱い、利用/育種を行うための鍵技術である、顕微蛍光マニピュレーション-分離培養法に絞って方法を確立する。

従って、これら複合微生物系の最小単位の取り扱い技術を体系的に研究し、我が国のオリジナルな微生物利用基盤技術群として世界に先駆けて展開することが重要であり、我々はそれに挑戦したい。

## 3. 研究の方法

### 3-1 各種集積培養

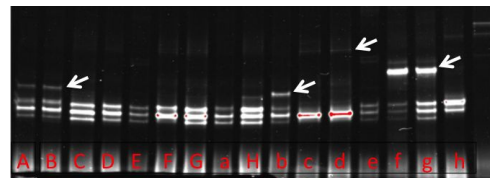
超高温コンポストの原料である下水終末処理場から排出された余剰汚泥の嫌気性消

化による脱水汚泥を原料とした 75 度 C で好/嫌気、コンポストやコンポスト抽出液の有無等の条件を変えて各種集積を行った複合微生物系を準備した。これらを材料にまず、変成剤濃度勾配電気泳動法(DGGE)を用いて集積される主要細菌を観察した後、分取可能なバンドのシーケンスから細菌種を推定した。蛍光基質を用いた活性染色、代謝活性を形態変化として検出する DVC(Direct Viable Count)をセルソーティングに適用し、活性と安定性を指標に、準 SC の粗分画と再構成を行う。

### 3-2 顕微蛍光マニピュレーション法の確立

新規に導入された顕微蛍光マニピュレーションシステムを用いて、効率的な一細胞分離-液滴培養、微小コロニー観察の手順と、キャピラリー、プレート、オイルなどのディスプレイ、試薬等について最適化を検討した。

### 3-3 液系純化細菌の確認と形質検討



3.で取得した単細胞分離に供した試料について、純化の成否を顕微鏡観察、継代による形態の均一性、などを検討した。

## 4. 研究成果

### 4-1 高度好熱菌の集積培養

試験材料として、まず、75 度 汚泥添加 CYS 培地にて安定に継代可能な高度好熱菌群を用いた(下図)。

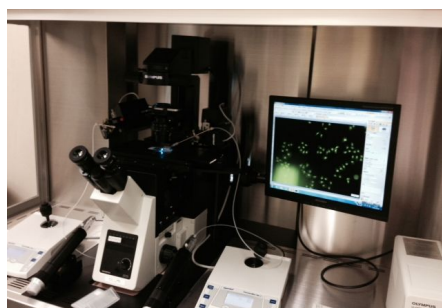
これらは異なる培養条件で得られた準 SC の例であるが、16S rRNA 遺伝子増幅フラグメントの DGGE 解析から、数種の菌株から構成される複合系であり、矢印を示したバンドの DNA 塩基配列は、それらが既知の細菌種(属)から大きく離れている未分離菌/新菌種であることを示唆していた。また、集積方法により高度好熱性細菌からなる群集構造が変化することが明らかとなった。

### 4-2 顕微蛍光マニピュレーション法の確立

これとは別に、既知分離株を用いて顕微蛍光マニピュレータによる細菌の液系分離法における使用器具および手順の最適化を行った。

まず、キャピラリー、プレート、オイルなどについて選択し、ドロップレットの配置、洗

浄方法，生細胞の蛍光染色剤による判別法の導入，移植後の増殖観察法などについて最適化を行った．その結果，細菌と不純物の判別が可能になり，1細胞の分離に要する時間の短縮，マイクロコロニーの形成率向上が得られた．



4-3 次に、消化汚泥を分離源とし、汚泥添加嫌気条件で培養した集積培養液を用いて、生細胞を標的とする蛍光染色剤を利用した顕微蛍光観察による液系分離を行った。その結果、数種の出発試料からの1細胞分離に成功し、増殖と継代性を確認できた。

それらの分離株の16S rRNA 遺伝子シーケンス解析の結果、新種の細菌である可能性が示唆された。また、完全嫌気培養下での液系分離によりさらに難培養高度好熱菌を分離できる可能性が示唆された。

## 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 7 件)

- 1). Thermotolerant *Bacillus kokeshiformis* sp. nov. isolated from marine animal resources compost, Pramod Poudel, 宮本浩邦、宮本久、奥川友紀、田代幸寛、酒井謙二\*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 第 64 巻, 第 8 号, pp. 2668–2674, 2014 年
- 2). Pyrosequencing analysis of microbial community and foodborne bacteria on restaurant cutting boards collected in Seri Kembangan, Malaysia and their correlation with grades of food premises, Noor-Azira Abdul-Mutalib, Syafinaz Amin Nordin, Malina Osman, 石田夏美, 田代康介, 酒

井謙二, 田代幸寛, 前田憲成、白井義人\*, International Journal of Food Microbiology, 第 200 巻, pp. 57–65, 2015 年

- 3). Discrimination among individuals using terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacteria derived from forensic evidence, 西英二、田代幸寛、酒井謙二\*, International Journal of Legal Medicine, 第 129 巻, 第 3 号, pp. 425–433, 2015 年
- 4). Unique hyper-thermal composting process in Kagoshima City forms distinct bacterial community structures, 田代幸寛、田畑華絵、板原明日香、清水なつき、田代康介、酒井謙二\*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 印刷中 (doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.04.006)
- 5). The prevalence of foodborne pathogenic bacteria on cutting boards and their ecological relationship with background biota, Noor-Azira Abdul-Mutalib, Syafinaz Amin Nordin, Malina Osman, Ahmad Muhaimin Roslan, 石田夏美、酒井謙二、田代幸寛、田代康介、前田憲成、白井義人\*, AIMS Microbiology, 印刷中
- 6). Simultaneous production of L-lactic acid with high optical activity and a soil amendment with food waste that demonstrates plant growth promoting activity, Vichien Kitpreechavanich, 早水ありさ、Anfal Talek、Clament Fui Seung Chin、田代幸寛、酒井謙二\*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 第 122 巻, 第 1 号, pp. 105–110, 2016 年
- 7). Novel pH control strategy for efficient production of optically active L-lactic acid from kitchen refuse using a mixed culture system, 田代幸寛、井ノ口翔太、Pramod Poudel、奥川友紀、宮本浩邦、宮本久、酒井謙二\*, Bioresource Technology, 第 216 巻, pp. 52–59, 2016 年

〔学会発表〕(計 10 件)

藤本遼、奥川友紀、田代幸寛、酒井謙二、難培養高度好熱菌の顕微蛍光マニピュレータによる分離

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：デンプンから生分解性プラスチック原料のL型乳酸を高効率に生産可能な好熱菌資材、並びにL型乳酸の製造方法  
発明者：酒井謙二、田代幸寛、プラマド ポウデル、宮本浩邦、宮本久  
番号：特願 2014-194405  
出願年月日：2015年9月4日特許出願  
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/dobi/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

酒井謙二 (Kenji Sakai)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：50205704

##### (2)研究分担者

( なし )

##### (3)連携研究者

( なし )