

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：31302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289184

研究課題名(和文) バイオオーグメンテーション有効化に向けた環境浄化細菌の生残性向上に関する基盤確立

研究課題名(英文) Development of core technologies for improving existence of bacteria released to the environment to attain an efficient bio-augmentation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：バイオオーグメンテーションの有効化に向けて、自然環境下でも生残性を持つ環境浄化細菌の育種を試みた。具体的には高いトリクロロエチレン(TCE)分解能を有する細菌への抗原生動物活性を有するピオラセインの産生能の付与を検討した。トランスポゾンを利用して、ピオラセイン合成遺伝子群を、対象の細菌の染色体上に導入した。ピオラセイン合成遺伝子群が導入された形質転換体は、ピオラセインの産生により、青紫色を呈した。得られた形質転換体を使って、鞭毛虫による捕食実験を行った結果、捕食回避能を有することが明らかとなった。また、TCE分解能を測定した結果、親株のTCE分解能は維持された。

研究成果の概要(英文)：Development of core technologies for efficient bio-augmentation treatment was examined. As a main technology, introduction of violacein-producing genes, vioABCDE, to two types of *Cupriavidus* sp. bacteria, that had strong TCE degradability, were examined to confer antiprotozoal property. The genes of vioABCDE were integrated into chromosome DNA of *Cupriavidus* sp. bacteria by using a Tn5 transposon vector. Colonies of transconjugants showed violet color due to violacein production. Transconjugants that showed deeper violet color were selected among transconjugants. Two selected transconjugants that derived from each parent strain were shown to avoid predation by a flagellate, *Spumella*. These transconjugants also maintained their original TCE degradability derived from their parent strain.

研究分野：環境保全工学

キーワード：バイオオーグメンテーション 環境浄化細菌 捕食 トリクロロエチレン ピオラセイン 原生動物 鞭毛虫

1. 研究開始当初の背景

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、研究手法として適していることが示され(生物膜中の繊毛虫の研究: Appl. Environ. Microbiol. Vol.75, p5261, 2009)、新たな転換期を迎えている。

環境工学分野では分解能を有する細菌に関しては研究例が多いが、原生動物の分子生物学的な研究例は極めて少ない。一方、微生物生態学の分野では原生動物の自然環境下での分布や18S rRNA遺伝子の多様性解析等の研究が2002年頃より進められており、近年では、細菌の16S rRNA遺伝子同様に、クローン解析、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 解析、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)解析も開始され、それらの技術が利用可能であることが示されている

2. 研究の目的

環境分野で、特別な分解能力を有する細菌の利用は「バイオオーグメンテーション」として知られ、大きなポテンシャルを持つ技術である。特定細菌としては「自然細菌」は勿論、「遺伝子組換え細菌」の利用も技術的には可能である。しかしながら、これら特定細菌が、その能力を発揮し浄化へとつながった例は殆ど無い。これは、自然界に放出された特定細菌が、放出時の個体数を維持できず、急激に減少することによる。これまでの我々の解析から、主な理由は原生動物による捕食であることが解ってきている。環境浄化細菌に関する従来の研究は、その多くが純粋あるいは集積系での分解能の解析に焦点が当てられてきた。本研究では、原生動物による捕食現象を明らかにすると共に、その回避法を確立し、浄化現場での有効活用を目的に技術基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 自然界からの原生動物の単離

原生動物の採取・単離にはこれまでに確立している「捕食による集積・希釈」の手順で単離を行なう。被食細菌は環境浄化に利用された実績のある複数の細菌を利用する。河川水、湖沼水、地下水等からサンプルを取得し、捕食試験を行う。集積した捕食原生動物は、希釈法により純化した上で、生育条件等、基本的な特徴を把握する。

(2) 分子生物学的な解析手法の開発

捕食現象を詳細に解析するためには、被食細菌を何らかの方法でラベル化する必要がある。そこで、Tn5トランスポゾンベクターを使って蛍光タンパク質遺伝子の導入、発現を検討した。蛍光タンパク質としては、緑色のGreen Fluorescent Protein (GFP) と赤色のRed Fluorescent Protein (RFP) を利用した。まず、これらの蛍光タンパク質遺伝子を細菌の染色体上に組込むためTn5トランスポゾンベクターを基に遺伝子を導入する系を構築した。その上で、Cellレベルの検出に必要な発現の強さについて検討を行った。また、蛍光タンパク質遺伝子の発現が細菌の性状や原生動物による捕食挙動に与える影響についても評価した。さらに、同一の細菌に対して2色の蛍光タンパク質遺伝子をそれぞれ導入し、捕食回避に有効と思われる変異について2色を利用した比較実験を行った。

(3) 環境浄化細菌への捕食回避能の付与

ピオラセインは青紫色の天然色素であり、*Chromobacterium violaceum*をはじめとする複数種のグラム陰性細菌によって生産される。ピオラセインは抗原生動物活性を有することが知られており、ここでは、この抗原生動物活性に着目した。本研究では、実際の環境浄化細菌であるトリクロロエチレン(TCE)分解細菌へのピオラセイン合成能の付与を検討した。これまでに、この様な、捕食回避能が付与された環境浄化細菌の開発に関しては報告例がない。それゆえ、TCE分解能と捕食回避能を合わせ持つ分解細菌が育種できれば、将来的には、その様な細菌の利用を前提とした、新しい浄化プロセスの構築も可能となる。

4. 研究成果

(1) 自然界からの原生動物の単離

本研究では、自然環境下から、捕食実験により、優占化した以下の4種類の鞭毛虫を単離した。これら鞭毛虫は、製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) に寄託し、誰でも入手できる状況にある。

Ochromonas sp. TGPH2: NBRC 111011

Goniomonas sp. TGKH7: NBRC 111012

Bodo sp. TGKH8: NBRC 111013

Spumella sp. TGKK2: NBRC 111014

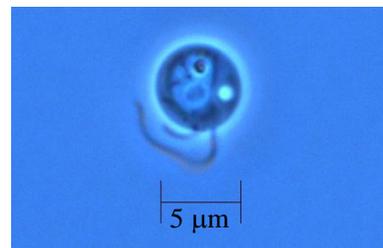


図1 *Spumella* sp. TGKK2 の顕微鏡写真

NBRCへの原生動物の寄託は我々が初めてであり、本研究の大きな成果である。また、

これらの鞭毛虫は多様な細菌種を捕食できる能力がある(NBRC の HP 上には"Graze various kinds of bacteria"と記載されている)。

(2) 分子生物学的な解析手法の開発

導入した蛍光タンパク質遺伝子は、赤色 RFP の tdTomato および緑色 GFP の ZsGreen である。これらの遺伝子の発現によって生産された蛍光タンパク質は、それぞれが干渉することなく、Cell レベルでの検出を可能にした。また、生産された蛍光タンパク質は 1 ヶ月間の長期保存したサンプルでも、明瞭に検出できることが示された。それゆえ、ある程度の期間が必要な、リアクターや土壌カラム等の装置内での挙動解析においても利用可能と判断できる。以下の図 2 は、A: 位相差による全細菌, B: tdTomato タンパク質含有細菌, C: ZsGreen タンパク質含有細菌, D: B と C の重ね合わせ、の写真である。2 種類の蛍光タンパク質が別々に観察できることが分かる。

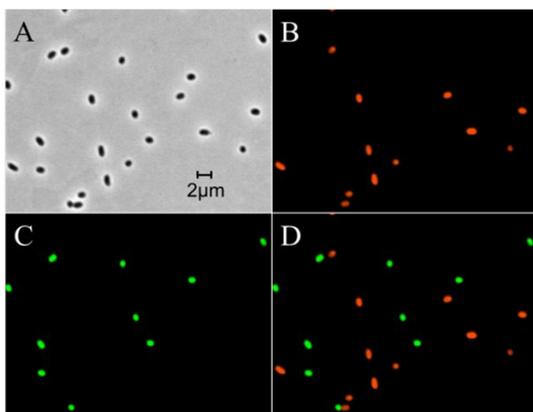


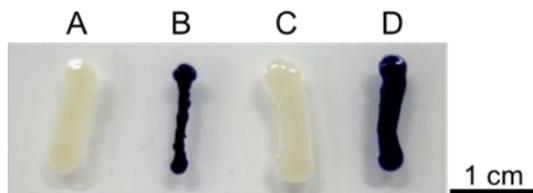
図 2 蛍光タンパク質生産菌株の顕微鏡写真

また、蛍光タンパク質遺伝子が導入された菌株は、菌体内で蛍光タンパク質を生産するが、その生産が細菌の基本的な特性や、捕食される場合の挙動に影響をおよぼすことは好ましくない。そこで、増殖速度、吸光度と細菌数の関係、*Spumella* sp. TGKK2 による捕食の収率、捕食速度について、野生株との比較検討を行った。その結果、どの項目に関しても大きな差異はなかった。それゆえ、蛍光タンパク質の生産が捕食挙動解析に与える影響は極めて小さく、野生株と同等に捕食試験に利用できると判断した。

(3) 環境浄化細菌への捕食回避能の付与

トランスポゾンベクターを利用して、TCE を構成的に分解する能力を有する *Cupriavidus* sp. KN1-TAC および TW2-P にピオラセイン合成遺伝子群 *vioABCDE* を導入した。両株を受容菌として利用した接合試験において、最終的に Transconjugant 選出用の最少培地に、青紫色のコロニーが出現した。個々の接合実験で得られた、各 4 株の Transconjugant を LB 寒天培地上で純化し、そ

れらの中で最も濃い青紫色の菌株を選出し、それぞれ、*Cupriavidus* sp. KN1-TACV および TW2-PV とした。以下が、これら菌株の LB 寒天培地上での生育写真である。



(A: KN1-TAC 株, B: KN1-TACV 株, C: TW2-P 株, D: TW2-PV 株)

図 3 ピオラセイン合成能を獲得した菌株

捕食実験では、A と C の親株はどちらも添加された原生動物 *Spumella* sp. TGKK2 によって速やかに捕食された。一方、B および D のピオラセイン合成能を付与された菌株は、本原生動物の捕食を回避できる能力を示し、残存した。また、ピオラセインの産生が行われても、元来の高い TCE 分解能は維持され、さらに、1 週間の捕食試験後も分解能の低下は観察されず、安定した TCE 分解能を保持した。以下が、TCE 分解能の評価実験結果である。

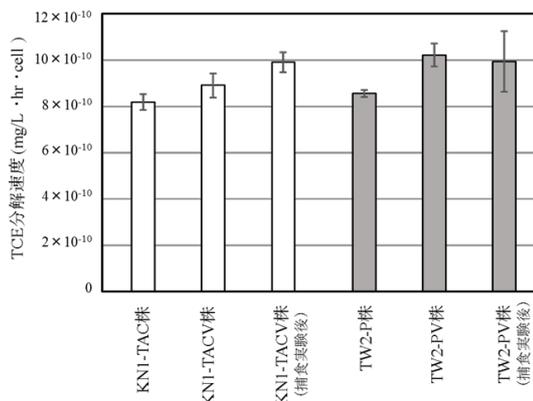


図 4 ピオラセイン合成能を有する菌株の捕食実験前後の TCE 分解能評価

本研究の成果である「捕食回避能が付与された環境浄化細菌の開発」に関しては、国内外で報告例はない。今後は、より浄化現場に近い条件で TCE 連続分解試験を行い、分解能と捕食回避能を合わせ持つ環境浄化細菌の利用を前提とした、新たな浄化プロセスの構築を念頭に、実用性の検証を進めていきたい。

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, 加藤俊明, 石川廣大, 柴崎純一: 原生動物の捕食回避を目的とした TCE 分

解細菌へのビオラセイン合成遺伝子群の導入, 土木学会論文集G (環境), 査読あり, Vol. 72, pp.39-46 (2017)
<http://doi.org/10.2208/jscejer.73.39>

(2) 中村寛治, 渡辺健幸: 蛍光タンパク質をレポーターとしたフェノールヒドロキシラーゼの TCE 分解能評価, 土木学会論文集G (環境), 査読あり, Vol. 72, pp. 275-283 (2016)
http://doi.org/10.2208/jscejer.72.III_275

(3) 中村寛治, 渡辺健幸: 原生動物の捕食挙動解析を目的とした被食細菌への蛍光タンパク質遺伝子の導入, 土木学会論文集G (環境), 査読あり, Vol. 71, pp.143-151 (2015)
<http://doi.org/10.2208/jscejer.71.143>

(4) 中村寛治: 環境への放出細菌は特定の原生動物に捕食される - *Spumella* 属の鞭毛虫の細菌捕食者としての優位性 -, 化学と生物, 査読あり, Vol.52, pp.354-355 (2014)
<http://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.52.354>

(5) 中村寛治, 渡辺健幸: 緑色蛍光タンパク質によるトリクロロエチレン分解細菌のラベル化, 土木学会論文集G (環境), 査読あり, Vol. 70, pp.11-17 (2014)
<http://doi.org/10.2208/jscejer.70.11>

(6) 中村寛治, 渡邊暁, 成田賢人: 原生動物の捕食回避を目的としたビオラセイン合成遺伝子群の取得および発現, 土木学会論文集G (環境), 査読あり, pp.III_535- 542 (2014)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 前項の(2)は学会発表を伴う。
第 53 回 環境工学研究フォーラム, 北九州国際会議場, 2016 年 12 月 6 日~8 日

(2) 加藤俊明, 中村寛治: *Cupriavidus nector* KT1 によるビオラセイン合成遺伝子の発現および原生動物による捕食の回避, 第 53 回 環境工学研究フォーラム, 北九州国際会議場, 2016 年 12 月 6 日~8 日

(3) 前項の(6)は学会発表を伴う。
第 51 回 環境工学研究フォーラム, 山梨大学, 2014 年 12 月 20 日~22 日

〔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

中村 寛治 (NAKAMURA, Kanji)
東北学院大学・工学部・教授
研究者番号: 90382655

(2) 研究分担者研究分担者

宮内 啓介 (MIYAUCHI, Keisuke)
東北学院大学・工学部・教授
研究者番号: 20324014