

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12238

研究課題名(和文) 貪食作用を強化した繊毛虫を用いた排水浄化効率の改善

研究課題名(英文) Improvement of the sewage purifying method using ciliates having an improved phagocytosis by genetic modification.

研究代表者

堀 学 (HORI, MANABU)

山口大学・創成科学研究科・准教授

研究者番号：00253138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：排水の浄化効率を向上させるため、繊毛虫の繊毛運動を促進して微小なゴミや細菌を貪欲に捕食する系統を確立することを目的として本研究を行った。その結果、テトラヒメナのrsp16オルソログ遺伝子とHSP40 family 遺伝子を破壊することで遊泳速度が1.3倍、食胞形成能が1.5倍以上に上昇した系統を確立できた。この系統を用いて汚染水の浄化能力を調べたところ、野生型細胞よりも、汚染水の濁度を有意に早く低下させることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To improve waste water cleaning method, we attempted to generate the genetically modified ciliates that eat a large quantity of bacteria and debris in waste water. In previous experiment, we succeeded in generating mutant Paramecium that form a lot of food vacuoles by rsp4 or rsp16 gene silencing. Therefore, we tried to generate rsp4 or rsp16 mutant using other ciliates which inhabit in the sewage treatment plant. As a result, we could generate mutant Tetrahymena which form a lot of food vacuoles by rsp16 and HSP40 family gene disruption. In the mutant Tetrahymena, termed the fast strain, food vacuole formation is 1.5 times more and swimming speed is 1.3 times faster, compared with wildtype cells. When wild type cells and fast strain cultured in artificial waste water, fast strain could reduce the turbidity (OD) earlier than wildtype cell.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：繊毛虫 排水 テトラヒメナ

1. 研究開始当初の背景

生活排水を分解する生物は、排水処理施設の生物反応槽に生息する細菌や繊毛虫を中心とした微生物群である。特に中心的な役割を果たしているのが、ツリガネムシ、コルポーダ、テトラヒメナなどの数種類の繊毛虫である。排水処理場において、生活排水はこれらの微生物に“食わせる”という原始的な方法で処理している。今後の生活排水の増加などに対して最も単純な解決方法は、微生物にもっと“食欲に食わせる(貪食)”ことで、排水浄化能力を向上させることである。

ヒメゾウリムシでは、繊毛タンパク質 RSP4 や 16 オルソログ遺伝子の発現を抑制すると、遊泳速度が 1.5 倍以上に上昇し、食胞形成能も 1.5 倍以上に増加するという結果を既に得られている。

そこで、同様に繊毛タンパク質の遺伝子に変異を起こし、遊泳速度だけでなく食胞形成能高い繊毛虫を作成し、排水の浄化効率を改善することを発案した。

2. 研究の目的

排水の有機物を処理するうえで重要な細菌、繊毛虫の内、細菌の“食う”量は、菌数で比較的簡単にコントロールできる。しかし、応用生物学的基盤の少ない繊毛虫の能力をいかに制御し、どこまで“貪食能力”を向上させることができるかが重要な鍵になると考えられる。そこで本研究では、排水処理場の生物反応槽に生息する繊毛虫を用いて、その繊毛運動を促進するような遺伝子変異を導入し、微小なゴミや細菌を食欲に捕食する“大食漢”の系統を確立し、大掛かりな装置を必要としない排水の浄化効率の改善を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒメゾウリムシでは、繊毛タンパク質 RSP4、や 16 オルソログ遺伝子の発現を抑制すると、遊泳速度も食胞形成能も上昇する。そこで、3種の繊毛虫 テトラヒメナ、コルポーダ、ツリガネムシに、RNAi で RSP4 や 16 オルソログ遺伝子の発現を抑制し、食胞形成能が高くなる系統を確立する。

RNAi によって食胞形成能が高くなることが確認できた系に関しては、遺伝子破壊を行い、安定して増殖する系統を確立する。その後、正常細胞と有機物分解能力の違いを解析し、より効果的な系統の選択を行う。

4. 研究成果

(1) テトラヒメナ、コルポーダ、ツリガネムシを用いて、繊毛打頻度が高く、食胞形成能の高い突然変異系統を確立することを目的に

本研究を行った。しかし、コルポーダ、ツリガネムシは、培養が困難であること、RNAi (遺伝子抑制法) が確立されていなかったことなどから、食胞形成能の高い系統を確立することはできなかった。

テトラヒメナでは、野生型細胞の RSP4 オルソログ遺伝子、或は、RSP16 オルソログ遺伝子の発現を抑制することで、遊泳速度が上昇した系統を確立することができた。しかし、それぞれ単独の遺伝子の抑制だけでは、遊泳速度が 1.2 倍程度にまで上昇するものの、食胞形成能は有意に上昇しなかった。

そこで、テトラヒメナ野生型細胞の大核 RSP16 オルソログ遺伝子と HSP40 family 遺伝子の両方を破壊した遺伝子変異系統を作成した。この系統は、排水の pH である pH6-7 の範囲で安定に増殖し、野生型細胞に比べて定期的に遊泳速度が速く、増殖の定常期では、遊泳速度が 1.3 倍以上に上昇する(表 1)。また、パルスチェイスによる食胞形成能を計測したところ、開始直後には大きな差がないものの、30 分以降は野生型細胞の 1.5 倍以上の食胞を形成した(図 1)。この系統を fast 系統と名付け、浄化能力に関するテストを行った。

表 1 野生型と fast 系統の形質

	fast	野生型
平均遊泳速度 ($\mu\text{m/s}$)	420 \pm 45	542 \pm 38*
細胞分裂速度 (回/cell)	4.3 \pm 1.0	4.4 \pm 1.2

* 平均値 \pm 標準偏差

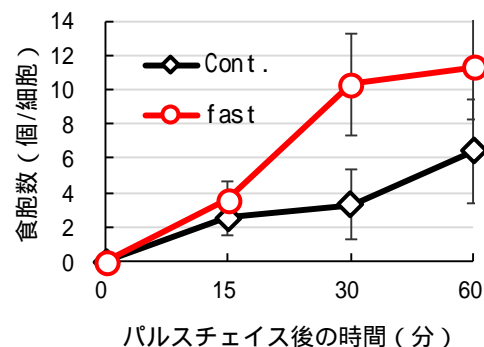


図 1 食胞形成能の比較

(2) 有機物を含む水溶液として、0.1%(w/v) ペプトン、0.05%(w/v) 大豆レシチン、0.1%(w/v) 小麦若葉抽出液を水道水に溶解し、大腸菌とクレブシラを植菌後、37 で 10^{6-8} cells/ml 程度まで増殖させたものを人工汚染水として用いた。人工汚染水を約 20

まで冷却後，テトラヒメナの野生型細胞，又は，fast 系統を初期細胞数が 10^{2-3} cells/ml となるように加え，経時的に濁度，一般生菌数，pH，テトラヒメナの細胞密度を計測した。

今回の実験では，人工汚染水の濁度を OD0.1 ~ 1.5 の範囲で行ったが，人工汚染水に加える野生型細胞と fast 系統の初期の細胞密度がほぼ同じであれば，fast 系統は必ず濁度を早く低下させ，その差は目視でもわかるほどであった（図 2）。

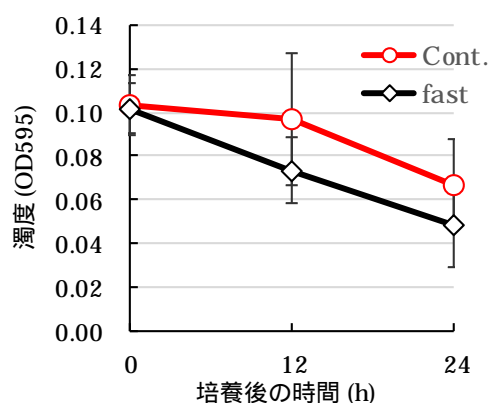


図 2 培養時間と濁度の変化

Note: テトラヒメナが存在するので，濁度は 0.05 以下にはならない。

また，今回の実験条件下では，テトラヒメナの初期細胞密度を 10^3 cells/ml 以上にすることで，fast 系統と野生型細胞の差がより明瞭となり，fast 系統ならば，OD が 1.0 以上ある条件でも，24 時間以内に OD 0.2 程度（高密度のテトラヒメを遠心で除去すれば OD 0.01 になる）にまで低下させることができた。

しかし，人工汚染水中の一般生菌数は，テトラヒメナを加えて 24 ~ 48 時間後では，1/10 ~ 1/100 にしか低下しておらず，野生型と fast 系統の間に，細菌の捕食数に有意な差はなかった（表 2）。

表 2 細胞密度と一般生菌数の関係

	培養時間	細胞密度 ($\times 10^3$ cells/ml)	一般生菌数 ($\times 10^5$ cells/ml)
野生型	0h	1.3 ± 0.5	45.8 ± 39.1**
	24h	17.6 ± 3.0	4.3 ± 2.1
fast	0h	1.1 ± 0.1	45.8 ± 39.1
	24h	19.1 ± 5.1	2.2 ± 1.4

* 平均値 ± 標準偏差

これらの結果は，fast 系統の遊泳速度が速いため，多量の食胞を形成するだけでなく，移動能力が高いことも影響して，効果的に有機物を浄化したと考えられる。一方で，一般生菌数に差が見られなかった理由は，細菌は fast 系統に活発に捕食されているが，それで

も 10^5 オーダーで生存し，増殖を続けているため，培養が 24 ~ 48 時間では，野生型細胞と比べて明瞭な差が生じなかったのだと考えられる。

(3) 結論

rsp16 と HSP40 family 遺伝子を破壊することで，テトラヒメナの遊泳速度を上昇させ，食胞形成数を増加させることに成功した。そして，食胞数の増加した（貪食能力の高い）fast 系統は，人工汚水中の有機物を，野生型細胞に比べて効率的に除去することができた。また，細菌は，排水処理施設において繊毛虫とともに有機物の分解に重要な役割を担っているが，fast 系統は野生型と比べても，細菌叢には大きな影響を与えないことがわかった。これらのことから，fast 系統は排水処理施設においても，排水を効率的に浄化できる可能性があると考えられる。

今後の課題

テトラヒメナはホルマリンなどの有機溶媒や界面活性剤には極端に耐性が低い。実際に排水処理施設で利用するためには，これらの物質に対しても，ある程度の耐性が必要と考えられる。テトラヒメナやゾウリムシは，単細胞生物であるため，極低濃度のものから徐々に濃度を上げていくことで有機溶剤や界面活性剤に耐性示す細胞が比較的早く得られる可能性が高い。今後は，fast 系統を有機溶剤や界面活性剤含む水溶液中でスクリーニングにかけ，実際の利用により適した系統を確立していきたいと考えている。

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 2 件)

M. Ishida, M. Hori, Improved isolation method to establish axenic strains of *Paramecium*. , The Japanese Journal of Protozoology, 査読有, 50 巻, 2017, <http://doi.org/10.18980/jjprotozool.JJP16-05>

Y. Sogame, M. Hori, T. Matsuoka, EF-1 silencing by feeding RNAi suppresses resting cyst formation in *Colpoda cucullus* Nag-1 strain., Invertebrate Survival Journal, 査読有, 13 巻, 2016, 89-93.

〔学会発表〕(計 3 件)

M. Hori, " Regulation of ciliary motility in *Paramecium*" , Symposium " De la biologie des cils aux maladies génétiques ciliaires ", 2017 年 2 月 28 日, CNRS, I2BC (Gif-sur-Yvette, Essonne, France)

堀 学・石田 正樹・富永 貴志,「ゾウリムシ繊毛打の非対称性を生み出す分子機構の解析」,日本生物物理学会第 8 回中四国支部大会,2016 年 5 月 28-29 日,高松テルサ(香川県,高松市)

岩楯好昭・堀 学,「ゾウリムシ繊毛運動とメタクロール波の伝達」,第 33 回エアロ・アクアバイオメカニズム学会(招待講演),2015 年 9 月 3 日,鳥取大学(鳥取県,鳥取市)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀 学 (HORI, Manabu)
山口大学・大学院創成科学研究科・准教授
研究者番号:00253138

(2)連携研究者

富永 貴志 (TOMINAGA, Takashi)
徳島文理大学・神経科学研究所・准教授
研究者番号:20344046

石田 正樹 (ISHIDA, Masaki)
奈良教育大学・教育学部・教授
研究者番号:60293768

藤原 勇 (FUJIWARA, Isamu)
山口大学・大学研究推進機構・准教授
研究者番号:40190087

(3)研究協力者

Jean Cohen (COHEN, Jean)
CNRS・I2BC・Director

France Koll (KOLL, France)
CNRS・I2BC・Researcher