

令和元年6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04833

研究課題名(和文)新規分離培養戦略で実現する微生物ダークマターの獲得

研究課題名(英文) Cultivation of microbial dark matter using novel isolation strategies

研究代表者

金田一 智規 (Kindaichi, Tomonori)

広島大学・工学研究科・助教

研究者番号：10379901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：Candidate division微生物群として活性汚泥中に存在するTM7、BD1-5、SR1、OD1を選定した。まずFISH法のためにプローブを設計し、TM7およびBD1-5の観察条件の最適化ができた。同じ活性汚泥に対しメタゲノム解析を行い、BD1-5の代謝機能の推定ができた。BD1-5に対してMAR-FISH法を行った結果、アミノ酸の取り込みが確認された。TM7に対しては定量PCR法を確立し、増殖可能な条件を明らかにできた。セルソーターを用いた分離培養手法には関しては難培養細菌であるアナモックス細菌の分離に成功した。微生物を捕らえる器についてはモデル微生物を用いてコンセプト実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに機能が未知であった未培養微生物群の機能が明らかになる。従来の微生物分離培養手法を凌駕する高性能で汎用性の高い分離培養手法の実用化が達成できる。未培養細菌の純粋培養系が得られ、新規単離菌株の学名提案ができる。これまで培養可能な微生物からのみ得られてきた物質・情報が飛躍的に高まるため、本研究成果の波及効果は極めて大きく、多分野(学術面・医学面・産業面など)に及ぶ。環境中の微生物の99%は未培養であり、未利用バイオリソースの開拓に貢献できる。生物界の3つのドメインの境界または共通祖先微生物などの生物の進化に関連する理解が深まる。

研究成果の概要(英文)：In this study, Candidate division microorganisms, such as TM7, BD1-5, SR1, and OD1 were selected from activated sludge samples. Specific probes for the fluorescence in situ hybridization were designed for above four groups, then probes specific for TM7 and BD1-5 were optimized. Metagenomic analysis were performed for the activated sludge sample and revealed that BD1-5 have a potential for uptake of amino acids. MAR-FISH analysis for BD1-5 also revealed the uptake of amino acids under anaerobic conditions. Specific primer set for TM7 for quantitative PCR was established. We demonstrated the optimal condition for the growth of TM7. Isolation technique using cell sorting showed separation of anammox bacteria, as model uncultivable bacteria, from the complex microbial community. We also demonstrated the concept of an innovative cultivation method that enable isolating pure culture automatically using model microorganisms.

研究分野：環境微生物生態学

キーワード：微生物ダークマター Candidate division微生物群 16S rRNA遺伝子 MAR-FISH法 新規分離培養手法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境中には分離培養され学名記載の報告はないが、16S rRNA 遺伝子に基づく系統分類では“門レベル”の分類系統群を構成する微生物群 (Candidate division 微生物群) が多く存在するといわれており、現在まで提案されている門のうち約半分は Candidate division 微生物群である (Rinke *et al.* Nature 2013)。これらの微生物群は土壌、海洋、排水処理施設など様々な環境中から検出されているものの、分離培養の報告は数例しかなく、産総研の研究グループから Gemmatimonadetes 門 (2003 年) および Armatimonadetes 門 (2011 年) の細菌の分離株が報告され、日本発の新門として登録されている。これらの分離株は生理学的特性に加えてゲノム解析による重要な情報をもたらし、微生物学の発展に大きく貢献している。これまでに Candidate division 微生物群の培養が困難な理由として次のことが考えられる。

- (1) 対象微生物群の大きさや形状がそもそも分からない。
- (2) 実際に増殖している環境を実験室の培養系で再現できていない。
- (3) 複合微生物系から目的の微生物を選択的に分離する方法が存在しない。

対象微生物群が利用可能な有機物が特定できれば、理想的な培養条件 (有機炭素源、温度、pH、好気/嫌気条件など) の構築が可能となり、Candidate division 微生物群の集積培養への道が開けると考えられる。さらに、本応募課題で提案する新規分離培養手法を適用することで、未培養微生物の単離が達成できると考えられる。本研究では、①対象微生物群の系統解析と可視化、②対象微生物群の増殖可能な有機物の特定、③対象微生物群の高濃度集積培養、④新しいコンセプトに基づく分離培養手法の 4 つのステップからなる分離培養ストラテジーを着想した。

未培養環境微生物を単離しようとする場合、できるだけ存在量の多い環境を選定することが重要である。予備的調査の結果、Candidate division 微生物群のいくつかは下水処理場の活性汚泥内に高頻度で検出されることがわかっている (Kindaichi *et al.* Proc. ASPD5 2009)。また、ある下水処理場の活性汚泥を対象とした次世代シーケンシング解析では Candidate division TM7 門が全体の 13% を占め、Candidate division SR1 および Candidate division BD1-5 も 0.5% 程度を占めることが明らかになっている (上原・金田一ら、環境微生物系学会合同大会 2014 発表)。これらの微生物群は下水中の有機物を利用して増殖していると考えられるが、微生物の形状および詳細な生理生態学的特性は不明のままである。さらに Candidate division 微生物群の培養を考えた場合、海洋や土壌環境では温度、pH などが変動しやすいのに対し、下水処理場では常時流入・流出の総有機物濃度、水温、pH 等をモニタリングしているため、活性汚泥内の Candidate division 微生物群を植種源とした方が、有機物の種類および濃度以外の培養条件を設定しやすい。

2. 研究の目的

活性汚泥内に比較的高頻度で検出される Candidate division TM7, Candidate division SR1, Candidate division BD1-5, Candidate division OD1 を対象細菌群とし、分離培養ストラテジーに基づき 3 年間で純粋培養系の獲得を目指す。具体的な内容は以下に示す通りである。

研究項目① (対象微生物群の系統解析と可視化) : 16S rRNA 遺伝子に基づいた対象細菌門の系統樹を構築する。その後、蛍光 in situ hybridization (FISH) プロローブを設計・適用することで、複合微生物系のままに対象細菌群の大きさ、形状を把握する。

研究項目② (対象微生物群の増殖可能な有機物の特定) : 放射性同位元素をトレーサーとした microautoradiography (MAR) と FISH を組み合わせた MAR-FISH 法により、複合微生物系の中で目的とする微生物の利用可能な有機物をシングルセルレベルで特定する。

研究項目③ (対象微生物群の高濃度集積培養) : これまでに実績のあるスポンジまたは不織布を担体としたカラムリアクターまたはメンブレンバイオリアクターを用いて対象細菌群の集積培養を行う。

研究項目④ (新しいコンセプトに基づく分離培養手法の適用) : 対象微生物を選択的かつ物理的に分離する手法、原位置 (in situ) での培養手法、実環境中に仕掛けるだけで純粋菌株を捕獲・培養する全く新しい分離培養デバイスなど申請者らが開発した新規手法を適用する。

3. 研究の方法

研究項目① (対象微生物群の系統解析と可視化) に関しては、対象微生物群の存在が確認されている広島大学近辺の下水処理場の活性汚泥から DNA を抽出し、各門レベルに特異的なプライマーセットを設計し、16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーから各門の詳細な系統樹を作成した。次世代シーケンサーによる網羅的解析を用いなかった理由は次の FISH 法で必要となるプロローブの設計には 16S rRNA 遺伝子の全長を決定した方が望ましいからである。得られた塩基配列に基づき、蛍光プロローブの設計を行い、特異的検出ができるようにホルムアミド濃度などの条件を最適化した。プライマーおよびプロローブの設計には ARB ソフトウェア (Ludwig *et al.* Nucl. Acids Res. 2004) を用いた。Candidate division TM7 の系統樹作成および特異的なプロローブは既往の研究で達成済みであるので、本研究では Candidate division SR1 および Candidate division BD1-5, Candidate division OD1 を対象に行った。

研究項目② (対象微生物群の増殖可能な有機物の特定) に関しては、複合微生物系において対象細菌群の特異的検出が可能になったあと、MAR-FISH 法により増殖が可能な有機炭素源を特定し、最適培養条件を決定した。本研究では下水中に含まれていると考えられる有機物のうち、入手可能なモノマー化された単糖類、低分子有機酸、アミノ酸、アルコール、脂肪酸等の 10

種類の放射性トレーサーを用い、好気・嫌気条件下で MAR-FISH 法を行った。対象微生物群の利用可能有機物が決定した後、下水処理場の水質データ（温度、pH、活性汚泥濃度、溶存酸素濃度）から最適集積培養条件を決めるための回分試験を行った。この時、一定期間培養後、①で設計したプライマーセットを用いた定量 PCR 法を用いて、対象細菌群が実際に培養前後で増えたかどうか、全細菌に対する対象細菌群の割合は増加したかどうかを評価した。

研究項目③（対象微生物群の高濃度集積培養）に関しては、最適培養条件に基づいて、連続式バイオリアクターにより、対象微生物群が生物膜やグラニュールを形成しやすい場合は、微生物の高濃度保持が可能な不織布を担体としたカラムリアクター、もしくは、スポンジを担体とした散水ろ床型のリアクターを用いることとした。一方、対象細菌群が活性汚泥のような浮遊増殖型を好むのであれば、膜により菌体と培地を完全分離可能なメンブレンバイオリアクターを用いる。FISH 法により対象微生物群の優占度を適宜観察し、最終的な優占度は 80%以上を目標とした。

研究項目④（新しいコンセプトに基づく分離培養手法の適用）に関しては、セルソーターを用いた分離を試みた。対象微生物群が特徴のある形態（糸状またはマイクロコロニー）で存在している場合、セルソーターを用いた分離により複合微生物系から生きたまま分離できる可能性が高い。例えば、糸状性細菌の場合、大きく複雑な形状を示す分画を採取し、マイクロコロニーの場合には大きいシンプルな形状を示す分画を採取することで分離が可能である。また、対象微生物群が他の細菌と比べて特に小さい場合、または特定の基質に走化性を持つ場合などは微生物を捕らえる罌を用いて分離・培養を同時に行った。

4. 研究成果

研究項目①（対象微生物群の系統解析と可視化）に関しては、Candidate division SR1、Candidate division BD1-5 および Candidate division OD1 を対象に系統解析と FISH プローブの作製、プローブを用いた可視化を行った。SR1 と BD1-5 についてはそれぞれに特異性を有するプライマーセットを使用することで系統樹を作成することができた。その後、作成した系統樹を用いて4つの FISH プローブ（SR1 に対して2つ、BD1-5 に対して2つ）を設計することができた。さらに、活性汚泥に存在する SR1 と BD1-5 由来の 16S rRNA 遺伝子を組み込んだ大腸菌を使用した Clone-FISH 法を用いることで、それぞれのプローブの最適ホルミアミド濃度を決定することができた（図1左）。OD1 については特異性を有するプライマーセットの選定が難しく、系統樹は構築できたが、特異的プローブの設計は困難であった。最後に設計・最適化したプローブを用いて活性汚泥を対象に FISH 法を行った結果、BD1-5 に属するグループのみから良好な FISH シグナルが得られた（図1右）。

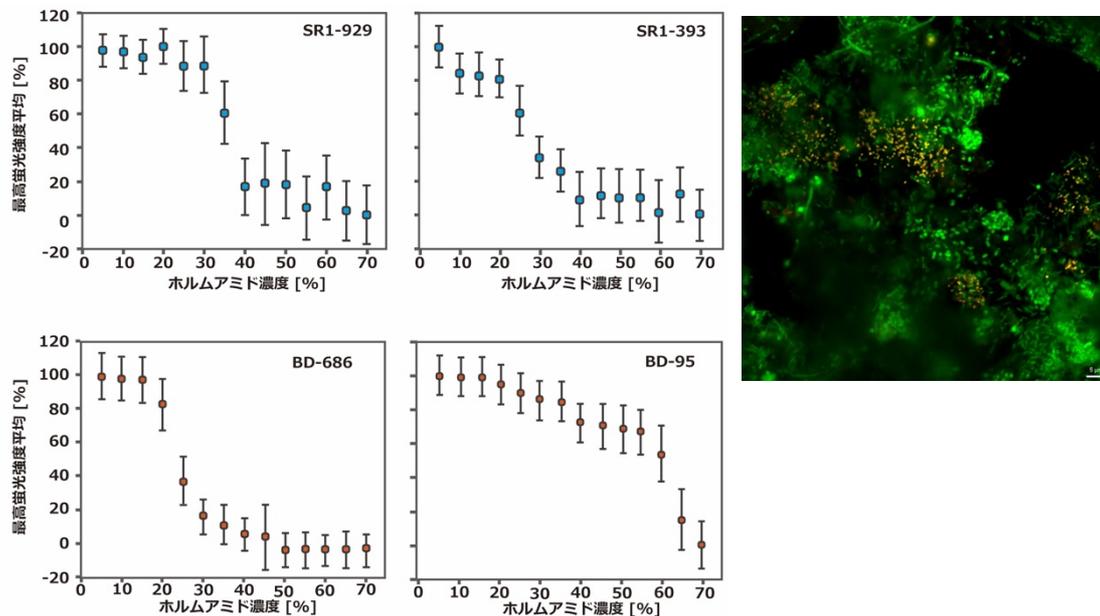


図1 Clone-FISH によるホルミアミド濃度の蛍光プロファイル（上：SR1、下：BD1-5）と活性汚泥の FISH 画像（右）。緑は全細菌、赤は BD-686 プローブで黄色の細菌が BD1-5。

研究項目②（対象微生物群の増殖可能有機物の特定）に関しては、Candidate division 細菌群の代謝機能についてメタゲノム解析を中心とした既報から推察した。活性汚泥を対象にメタゲノム解析を行い、BD1-5 門のドラフトゲノムを構築できた。ゲノムから推察される代謝機能として、解糖系の酵素の一部が欠けていることが示唆された。最適化された BD1-5 を標的とする FISH プローブとメタゲノム解析から推察される代謝のうち入手可能な放射性同位元素で標識された有機物を選定し、MAR-FISH 法を行った。その結果、セリンとアミノ酸混合物の取り込みが確認されたが（図2）、グリシン、グリセロール、グルコース 6 リン酸、有機酸の取り込みは確認されなかった。

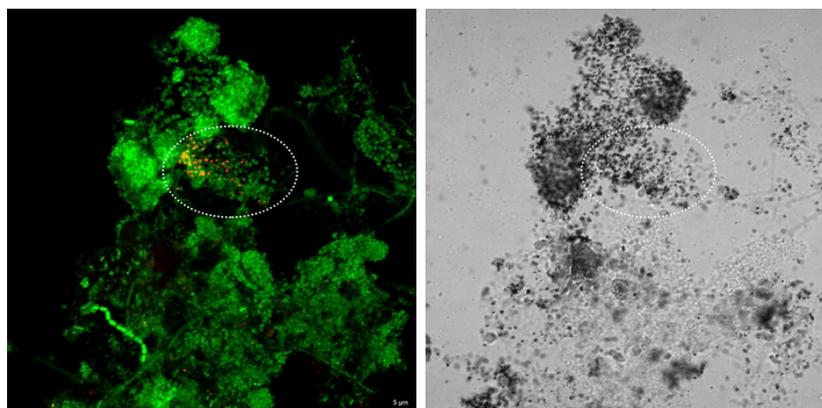


図2 セリンを用いた MAR-FISH 法の結果 (左 F : ISH 画像、右 : MAR 画像)

研究項目③ (対象微生物群の高濃度集積培養) に関しては、既に MAR-FISH 法により基質利用特性が明らかとなっている TM7 に対して集積培養を試みた。集積培養の評価には定量 PCR 法によるコピー数の増加を指標とするが、既報のプライマーセットの特異性を疑問視する論文が発表されたため、プライマーセットの特異性の評価を行った。その結果、以前より用いていたプライマーセットは TM7 以外の細菌も増幅し、定量値として過大評価することかがわかった。そこで、数種類ある既報の TM7 を標的とするプライマーセットの候補を 4 つ選定し、活性汚泥内の TM7 の定量に適しているプライマーセットを選定することができた。このプライマーセットを用いて集積培養を行った結果、糖および N アセチルグルコサミンを有機基質として増殖可能であることが明らかとなった。また、基質を加えていない系においてもコピー数の増加が見られたことから、他細菌の死骸も基質として増殖可能であることが示された。

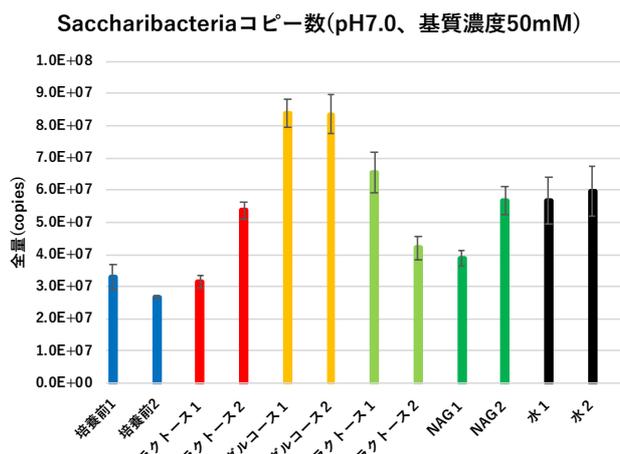


図3 各種培養条件における TM7 のコピー数の変化 (各系列 n=3)

研究項目④ (新しいコンセプトに基づく分離培養手法の適用) に関しては、セルソーターを用いた新規分離培養手法には関してはモデル難培養性細菌であるアナモックス細菌の分離を試みた。アナモックス細菌はシングルセルで存在するよりもマイクロコロニーを形成しやすいため、分離の条件として細胞として大きく、構造が単純 (球に近い) な条件を選定し、分離に成功した (図4)。また「微生物を捕らえる罠」については、モデル微生物を用いてコンセプトを実証できた。また、環境サンプルである土壌および活性汚泥に対して本手法を適用した結果、従来の寒天培地による分離培養と比較して、全く異なるグループの微生物を獲得することができた。

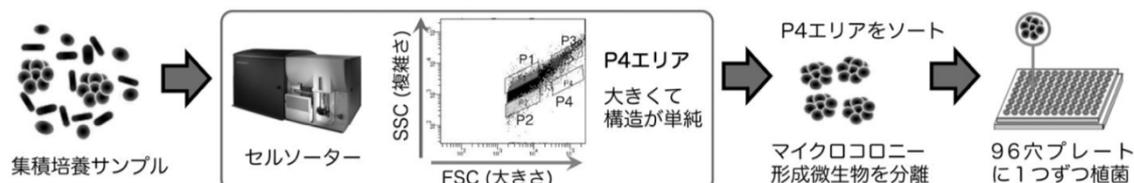


図4 セルソーターによる分離培養の概要

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Ryota Takenaka, Yoshiteru Aoi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi, Tomonori Kindaichi.
Specificities and efficiencies of primers targeting candidatus phylum *Saccharibacteria* in activated sludge.
Materials, 査読あり, Vol.11, pp. 1129, 2018.

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 赤木 秀至, 青井 議輝, 大橋 晶良, 金田一 智規.
活性汚泥内に存在する *Gracilibacteria* (BD1-5) 門の機能解析.
第 53 回日本水環境学会年会, 2018.
- ② 竹中 亮太, 青井 議輝, 大橋 晶良, 金田一 智規.
活性汚泥内 *Saccharibacteria* の集積培養条件の検討.
第 53 回日本水環境学会年会, 2018.
- ③ Ryota Takenaka, Yoshiteru Aoi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi, Tomonori Kindaichi.
Investigation of growth conditions of Candidatus *Saccharibacteria* in activated sludge.
日本微生物生態学会第 32 回大会, 2018.
- ④ 植田 雄人, 金田一 智規, 大橋 晶良, 青井 議輝.
環境中の微生物を自動的に“捕え”て“分離”する革新的分離培養手法の開発.
第 52 回日本水環境学会年会, 2018.
- ⑤ 竹中 亮太, 尾崎 則篤, 大橋 晶良, 金田一 智規.
活性汚泥内の Candidatus *Saccharibacteria* の集積培養の試み.
第 52 回日本水環境学会年会, 2018.
- ⑥ Ryota Takenaka, Tomonori Kindaichi, Yoshiteru Aoi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi.
Validation of the specificity of primers targeting Candidatus *Saccharibacteria* (TM7) in activated sludge.
International Conference on Civil and Environmental Engineering ICCEE 2017.
- ⑦ 竹中 亮太, 金田一 智規, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 青井 議輝.
活性汚泥内に存在する Candidatus *Saccharibacteria*(TM7)に対するプライマーの特異性の検証.
第 69 回土木学会中国支部研究発表会.
- ⑧ 竹中 亮太, 金田一 智規, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 青井 議輝.
活性汚泥内の Candidatus *Saccharibacteria* (TM7)に対するプライマーの特異性の検証.
環境微生物系学会合同大会 2017.
- ⑨ 竹中亮太, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良.
活性汚泥内の Candidatus *Saccharibacteria*(TM7)を標的とするプライマーの特異性の検証.
第 51 回日本水環境学会年会, 2017.3.15~17.
- ⑩ 植田 雄人, Dawoon Jung, Nil Tandogan, Edger D. Goluch, 金田一 智規, 大橋 晶良, 青井 議輝.
微生物を自動的に“捕え”て“分離”する革新的分離培養手法.
第 31 回日本微生物生態学会大会, 2016.10.22~25.
- ⑪ 西村 恭平, 金田一 智規, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 青井 議輝.
活性汚泥内に存在する Candidate division 細菌群の FISH 法を用いた可視化.
第 31 回日本微生物生態学会大会, 2016.10.22~25.
- ⑫ Yuto Ueda, Nil Tandogan, Edger D. Goluch, Tomonori Kindaichi, Akiyoshi Ohashi, Yoshiteru Aoi.
An innovative cultivation method that enable isolating pure culture automatically.
16th International Symposium on Microbial Ecology(isme16) 2016.8.21~26.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：青井 議輝

ローマ字氏名：Yoshiteru Aoi

所属研究機関名：広島大学

部局名：先端物質科学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：40386636