

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14663

研究課題名（和文）狭間条件を好む難培養微生物を網羅的に分離する3D勾配培養法の開発

研究課題名（英文）Development of 3D-gradient cultivation method for as-yet-uncultivated microorganisms growing in a narrow range of environmental conditions

研究代表者

加藤 真悟（KATO, Shingo）

国立研究開発法人海洋研究開発機構・次世代海洋資源調査技術研究開発プロジェクトチーム・特任研究員

研究者番号：40554548

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）：新奇の微生物を単一種として分離して、室内で培養できるようにすることは、まだ見ぬ新・高機能をもつ微生物の発見と保全に直結し、有用な微生物資源を次世代社会に残すための重要課題である。しかしながら、人類がこれまで分離してきた微生物は、地球上に存在する全微生物種の1%にも満たない。本研究では、未培養性微生物を効率的に分離培養するための新たな方法確立した。同方法を用いて天然試料から微生物の分離培養を行った結果、いくつかの新奇微生物を分離培養もしくは集積培養することに成功した。本研究で確立した培養法は、今後の生物資源保全学および微生物学の発展に大いに貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Isolation and cultivation of as-yet-uncultivated microorganisms are essential for basic and applied studies of microorganisms. However, most of microbial species is still as-yet-uncultivated. In the present study, I developed new cultivation methods to efficiently isolate not-yet-cultivated microorganisms. Using the methods, some novel species of iron oxidizers and ammonia oxidizers were successfully isolated or enriched in culture from natural environments. The new cultivation methods will contribute to discover and exploit novel useful microorganisms.

研究分野：微生物学

キーワード：分離培養 難培養微生物

1. 研究開始当初の背景

自然界から単一種の微生物を「分離」して、実験室内で「培養」する手法は、微生物学の最も基本であり、対象とする微生物の生理や生態を知る上で最も効果的である。その一方で、自然界には多種多様な微生物が未だ分離培養されることなく残されている。

ある種の微生物は、非常に狭い物理化学条件幅でしか生育できないことが知られている。例えば、微好気性の鉄酸化細菌は、数 μM から数十 μM の間の酸素濃度条件下でしか生育できない。この鉄酸化細菌は、酸素濃度という一つの成分について形成された勾配のなかで、極めて狭い範囲の条件下で生きている「好狭間微生物」(図1)である。

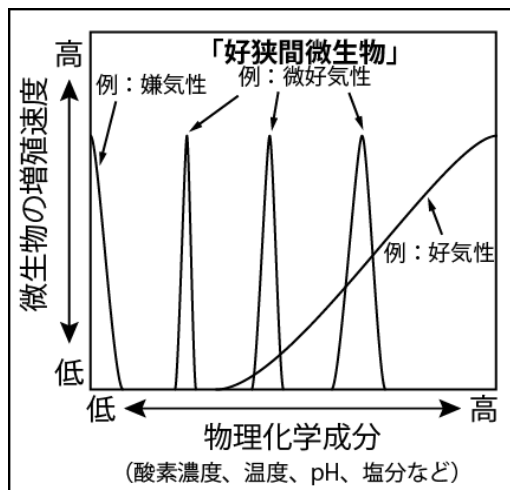


図1 「好狭間微生物」の狭い生育条件幅

陸上温泉や海底熱水噴出孔などの湧水域では、還元的な地下/海底の水が酸化的な地表・海底の水と継続的に交じり合っており、酸素濃度だけでなく、温度や pH 等様々な物理化学成分が1つの空間内で同時に勾配を形成しており、そこには未培養性の「好狭間微生物」が多数生息している可能性が極めて高い。さらに、1種類の微生物が2つ以上の成分について「狭間」の条件を好んでも不思議ではない。湧泉域から新奇の「好狭間微生物」を分離培養できれば、どのような環境条件下において、どの微生物がどの元素循環に関わっているのか、ということがわかり、湧泉域の微生物生態系の成り立ちの理解につながる。そのため、新奇の「好狭間微生物」を効率良く分離培養する手法を確立する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、複数の物理化学成分についての勾配を1つの空間内に同時に形成させる「1D、2D、3D勾配培養法」(図2)を開発し、同方法を用いて自然環境中から新奇の「好狭間微生物」を分離培養することを目的とした。

立方体の軟寒天培地の3面(A, B, C)から、3つのパラメーターについて、拡散によって供給することで、同時に勾配を形成させる。

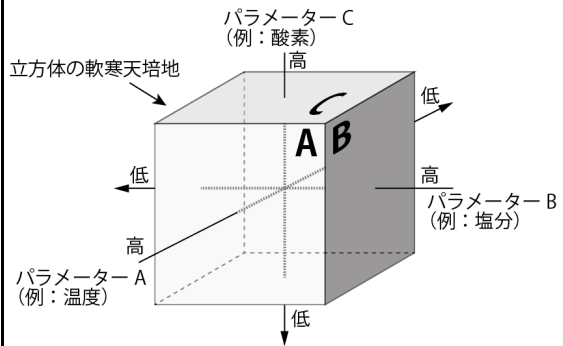


図2 3D勾配培養法のコンセプト

3. 研究の方法

培養容器の一端にヒーターを、もう一端にチラーを密着させて、それぞれの設定温度の中間値の温度にセットしたインキュベーターにいれることで、温度勾配を形成させた。二価鉄は、培養容器の一端に、1%アガロースで固化した FeS もしくは FeCO_3 を添加して、濃度勾配を形成させた。酸素は、培養容器の一端に空気(21% O_2) もしくは 1% O_2 を含む混合ガスを満たすことで、濃度勾配を形成させた。それぞれの成分が勾配を形成しているかどうかについては、微小電極や比色分析等を用いて測定した。それぞれの成分を培養容器内で直交するような軸(1軸、2軸、3軸)に沿って形成させることで、1D、2D、3D勾配培養とした。

連続勾配培養法の確立：拡散による濃度勾配形成では、微生物の消費速度によっては、増殖に必要な期間中に十分に勾配を維持できない可能性があった。そこで、培養容器に培地を連続的に添加し、その中で培養を行うことで、そこに生育する微生物の代謝活動によって酸素濃度やアンモニア濃度勾配を形成させた。インキュベーター温度は65と70に固定した。

4. 研究成果

3D勾配培養法の基礎となる1D勾配培養法においては、二価鉄と酸素の濃度勾配を、ひとつの培養容器内につくることに成功した。同培養法を用いて、汽水域の環境試料から、難培養性微生物の代表格として有名な微好気性鉄酸化バクテリア2株の分離培養に成功した(図3)。16S rRNA 遺伝子解析の結果、これらの株は *Mariprofundus* 属に属する新種のバクテリアであることが示唆された。詳細な生理性状分析の結果、それぞれが新種であることが示され、*M. aestuarium* と *M. ferrinatatus* と暫定的に命名した。

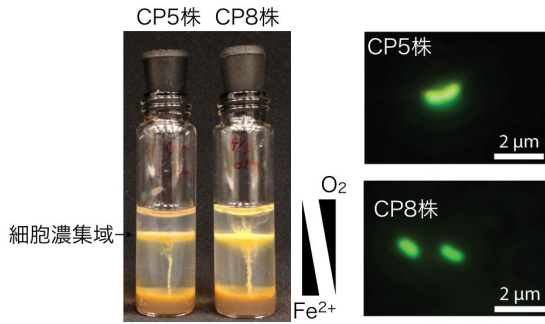


図3 新奇鉄酸化細菌2株の1D勾配培養

本分離株は両方とも、数百 nM の酸素濃度でも生育できる超好気性であることがわかり、本研究における1D勾配培養法の有用性が確かめられた。これらの株は、淡水（塩分0%）でも海水（3.5%）でも生育できず、その間の塩分でしか生育できない絶対汽水性であることがわかった。まさに「好狭間微生物」である。さらには、細胞外に酸化鉄でできた構造体を産出することも明らかにした。その構造体は、これまで分離培養されている好気性鉄酸化菌がつくる細胞外構造体とも形態的に異なっていた。それぞれの分離株の全ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析により細胞外構造体の産出に関わる遺伝子を推定した。それらの成果をまとめた論文を、*Geobiology* 誌および *Frontiers in Microbiology* 誌上にて発表した。

次のステップとして、2D勾配培養法の確立を試みたところ、ひとつの培養容器内に、温度と酸素の2D勾配が作れることを確認した。そこで、鉄を多く含む陸上湧水域から新たに試料を採取し、それを植菌元として培養を行った結果、難培養性の鉄酸化細菌の集積培養に成功した。現在、限界希釈による分離培養を試みているが、まだ分離には至っていない。

陸上温泉の試料を植菌元として、アンモニアを含む培地を連続的に培養容器に添加して、微生物の代謝によって様々な代謝物質の勾配をつくる連続培養法を試みたところ、難培養性好熱菌の集積培養に成功した。メタゲノム解析によって、それら好熱菌のほぼ完全ゲノムの再構築に成功した。得られたゲノムの系統解析の結果（図4）、まだ分離種が報告されていない門レベルのクラスターに属するゲノム配列も得られたことから、極めて新奇性の高い微生物が集積培養できていることが確認できた。培養条件を踏まえると、検出された微生物は間違いなくすべて好熱菌である。得られたゲノムからは、アンモニア酸化酵素をコードする *amo* 遺伝子や *m*、硝酸還元酵素の *nar* 遺伝子、一酸化窒素還元酵素の *nos* 遺伝子、炭酸固定酵素のルビスコ遺伝子、さらには鉄酸化に関わる *cyc2* 遺伝子も検出された。この結果から、この培養物にはアンモニア酸化菌や硝酸還元菌、脱窒菌、

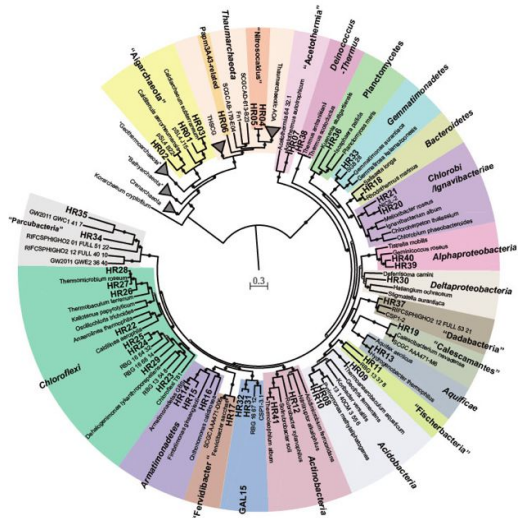


図4 連続勾配培養法で集積培養された微生物の系統樹

鉄酸化菌、独立栄養菌が含まれることが推定された。化学分析の結果、実際にアンモニアが消費され、硝酸が生成していることが確認された。培養容器内部に、酸素、アンモニア、硝酸の濃度勾配ができていいる可能性が高い。以上の結果から、これまでその生態学的-生物地球化学的な役割がまったくわかっていなかった未培養性の微生物が、元の温泉環境で、窒素や炭素、鉄のサイクルに関わっていることが示唆された（図5）。

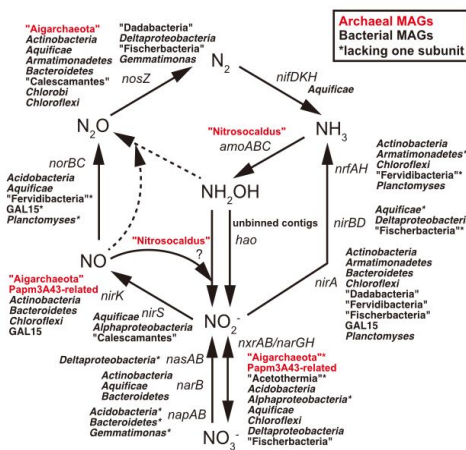


図5 集積培養された微生物の窒素サイクルにおける役割

この成果は論文にまとめ、*Microbes and Environments* 誌上で発表した。

以上のように、本研究期間内には当初の目的であった3D勾配培養法の確立までには至っていないが、これまでに得られた知見を元にして、近いうちに3D勾配培養法の確立を目指す。少なくとも、本研究で確立した1D、2D勾配培養法および連続勾配培養法は、新奇の「好狭間微生物」の分離培養に有効であることが示された。これらの培養法は、今後の湧泉域の微生物生態系の成り立ちの理解に止まらず、これからの生物資源保全学および微生物学の発展に大いに貢献することが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kato S, Sakai S, Hirai M, Tasumi E, Nishizawa M, Suzuki K, Takai K.

Long-term cultivation and metagenomics reveal ecophysiology of previously uncultivated thermophiles involved in biogeochemical nitrogen cycle.

Microbes Environ. 33:107-110 (2018)、
査読有

Chiu BK, Kato S, McAllister SM, Field EK, Chan CS. Novel pelagic iron-oxidizing Zetaproteobacteria from the Chesapeake Bay oxic-anoxic transition zone. *Front. Microbiol.* 8:1280. (2017) 、査読有

Field EK, Kato S, Findlay AJ, MacDonald DJ, Chiu BK, Luther III GW, Chan CS. Planktonic marine iron oxidizers drive iron mineralization under low-oxygen conditions. *Geobiology* 14: 499-508. (2016) 、査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Chiu BK, Field EK, Kato S, McAllister S, Luthier GW, Chan CS, Novel Fe-oxidizing Zetaproteobacteria floating in the Chesapeake: kinetics and genomic insights into microbial Fe cycling in a stratified marine water column, *AGU Fall Meeting 2016*.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jcm.riken.jp/JCM/staff/skato/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 真悟 (KATO, Shingo)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・次世代海洋資源調査技術研究開発プロジェクトチーム成因研究ユニット・特任研究員

研究者番号：4 0 5 5 4 5 4 8