

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20060

研究課題名（和文）環境中における大腸菌の増殖基質を探る

研究課題名（英文）Discovering growth substrate of E. coli in the environment

研究代表者

栗栖 太（Kurisu, Futoshi）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：30312979

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：環境中において増殖が問題となる微生物が、実際に環境中で用いている有機物を調べるための技術開発を目的とした。本研究では、環境中における大腸菌の増殖を例として行った。環境中で大腸菌が増殖する際に利用する基質を、精密質量分析計を用いた低分子有機物の網羅的分析手法を用いて抽出し、分子式推定を行い、構造推定を試みた。その結果、河川水中の有機物を利用して増殖すること、利用される有機物候補の分子式を示すことができた。環境中の他細菌と有機物の競合が起きている可能性があることも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中には、多種多様な物質が存在しており、極めて複雑な微生物生態系を作り上げている。環境中において増殖が問題となる微生物が、実際に環境中でどのような有機物を用いて増殖しているのかを調べるための技術を、環境中における大腸菌の増殖を例にとって開発した。精密質量分析計を用いて抽出することで、利用される有機物候補の分子式推定を行うことができた。環境中における大腸菌の増殖因子となる物質を特定することで、水質分析によって大腸菌の増殖を推定する道を拓くことができた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a technique for investigating the organic substances actually used in the environment by microorganisms whose growth could be a problem in the environment. In this study, the growth of Escherichia coli in the environment was taken as an example. We extracted substrates used for the growth of E. coli in the environment by a comprehensive analysis for low molecular weight organic substances using a high resolution accurate mass spectrometer. We estimated molecular formulas by precise mass and structure by fragmentation of the ions. As a result, we were able to show the growth of E.coli by organic matter in river water and the molecular formula of organic matter used in the river water. We could also demonstrate the possible competition for organic substances between other bacteria and E. coli in the environment.

研究分野：水環境工学

キーワード：大腸菌 未知スクリーニング分析 高分解能質量分析計 精密質量分析 ノンターゲット分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物学的廃水処理プロセスや、微生物を用いた土壌地下水汚染浄化(バイオレメディエーション)など、微生物を利用した浄化プロセスは、複合微生物系における除去対象物質の分解により成り立っている。プロセスを理解するには、「処理対象となる物質の分解にどのような微生物が関与しているか？」を明らかにしていく必要がある。そのためには、たとえば、安定同位体標識した対象物質を微生物群集に加えた後に、標識された DNA を解析することで解析が可能である。このほか、放射性同位体標識した物質を、蛍光 DNA プローブ法による特定微生物の検出と併せて行うこともできる。こうした研究における問いは、「問題となる物質を利用しているのはどの微生物か？」である。

他方、環境分野においては、たとえば塩素消毒を行った水道水における微生物の再増殖現象など、増殖が問題となる微生物もある。こうした微生物の制御には、「問題となる微生物が利用しているのはどの物質か？」の問いに答えるための手法が必要である。しかしながら、この問いに答えるための研究手法はこれまでにまったくとられてきていない。

近年、高質量精度・高分解能質量分析計である Orbitrap 質量分析計を用いることで、環境試料に溶存する有機物の未知スクリーニング分析を行うことができるようになった。研究代表者らは、この未知スクリーニング技術を確立させ(Urai et al., 2014)、下水再生水処理における処理工程ごとの有機物変化などを明らかにしている(Phungsai et al., 2016)。処理工程前後の変化と同様に、対象微生物増殖前後の試料を本分析技術により分析すれば、増殖により減少した(=利用された)有機物を検出できると考えた。

大腸菌は糞便汚染の指標微生物として世界中で用いられており、国内においても環境省は環境基準を大腸菌群から大腸菌へ変更することを検討している。大腸菌は環境中では増殖しないことを前提に、環境中での死滅因子について多くの研究がなされてきており、死滅因子を考慮することで糞便汚染の程度を推定することが行われてきた。ところが、大腸菌が環境中でも増殖しうることが近年報告されはじめている。大腸菌の環境中での増殖基質を明らかにすることは、大腸菌の指標微生物としての指標性について判断できる材料を提供することができる。

### 2. 研究の目的

環境中において増殖が問題となる微生物が、実際に環境中でどのような有機物を用いて増殖しているのか。この問いに答える技術を開発することが、本研究の大目的である。このような手法を、環境中における大腸菌の増殖を例にとって開発する。本研究では、環境中で大腸菌が増殖する際に利用する基質を、精密質量分析計を用いた低分子有機物の網羅的分析手法を用いて抽出し、分子式同定を行い、構造推定を試みる。環境中における大腸菌の増殖因子となる物質を特定することで、水質分析によって大腸菌の増殖を推定することを目指す。

### 3. 研究の方法

河川水のろ過滅菌には、孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ および $0.1\ \mu\text{m}$ のアノポアメンブレンフィルター(Anopore, Whatman, UK)を用いた。アノポアメンブレンフィルターは、ろ過孔の孔径が均一になっておりろ過性能がよく、またろ紙からの有機物の溶出も少ないとされる。ろ過された試料に対してさらに、 $75\ ^\circ\text{C}$ で1時間湯浴させることにより低温加熱処理を施した。

大腸菌株 *E. coli* K-12(NBRC 3361)株を用いた。大腸菌の培養実験を行う約1週間前に大腸菌を解凍し、LB培地で培養して、1~2日おきに数回継代した。継代を行っておよそ1日経過した大腸菌を遠心分離により培地を洗浄し、PBSに懸濁してさらに1日放置した。これにより、大腸菌を飢餓状態とし、大腸菌が体内に蓄積されている有機物を用いて増殖を行うことを防いだ。飢餓状態に放置された大腸菌を、滅菌された試料へ初期濃度が $10^3$  CFU/mL程度となるように植種した。大腸菌を植種した試料は、 $25\ ^\circ\text{C}$ で暗所にて培養した。培養実験中は溶存酸素が枯渇しないように、1日に1~2回攪拌を行った。培養実験中、滅菌ピペット等を用いて試料を採取し、大腸菌数や全菌数等を測定した。

大腸菌増殖前後の試料中の溶存有機物分析用の試料として、試料500 mLを有効孔径 $0.3\ \mu\text{m}$ のガラスファイバメンブレンフィルター(GF/75, Whatman, UK)でろ過したのち、Bond Elute PPL(容量6 mL, 充填材量500 mg, Agilent Technologies, USA)を用いて固相抽出を行った。有機物の溶出には10 mLのメタノールを用いた。

有機物の質量分析には四重極-Orbitrap 質量分析計(Q-Orbitrap MS) Q Exactive Focus(ThermoFisher Scientific, USA)を用いた。HPLCにはUltiMate3000シリーズ(ThermoFisher Scientific)を用いた。移動相にはメタノール(LC/MS grade, Wako, Japan)と超純水(Wako, Japan)を用い、0.1%のギ酸(試薬特級, Wako, Japan)を添加した逆相グラジエント分析を行った。LCカラムには、Hypersil Gold C18(粒子径 $5\ \mu\text{m}$ , 内径2.1 mm, 長さ150 mm, ThermoFisher Scientific, USA)を用いた。

Q-Orbitrap MSによる測定結果は、マススペクトル解析ソフトウェア Compound Discoverer 2.1(ThermoFisher Scientific, USA)を用い、アダクトイオンや同位体イオンなど、同一物質

に由来するピークをまとめるとともに、同位体イオンピークのパターンも利用し、分子式の推定を行った。物質推定においては、MS/MS データベース mzCloud 上のデータとの一致度や、フラグメントパターンを MetFrag を用いて推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験方法の検討

大腸菌の環境水中溶存有機物による増殖試験を行うに当たり、環境水を滅菌する方法を検討した。まず、滅菌操作における有機物変化を最小限にとどめるため、ろ過滅菌のみによる滅菌を検討した。0.2 $\mu$ m、0.1 $\mu$ m フィルタのろ過いずれにおいても、ろ過直後の全菌数は定量下限以下になっていたものの、1日後には 10<sup>4</sup> cells/ml まで増殖してしまうことがわかった。そこで、75 $^{\circ}$ C で1時間低温殺菌処理を追加したところ、1日後も定量下限以下を保っていた。滅菌処理前後での有機物変化を、Orbitrap 質量分析計で分析したところ、わずかながら変化もみられた。このことから、今後大腸菌の増殖基質を探索する際には、増殖前後の有機物を比較するとともに、増殖前後で減少した有機物が、滅菌処理により生成された人工産物でないかどうかの確認も必要であることがわかった。

##### (2) 河川水における大腸菌の増殖と増殖基質候補の探索

3箇所から採取した河川水を用いて、1日間無機塩緩衝液に入れて飢餓状態としておいた *E. coli* K12 株を接種し、培養実験を行った。また、対照試験として、大腸菌の最少培地から唯一の炭素源であるグルコースをのぞいた M9-Glu 培地に接種したのものも作成した。その結果、河川水中に接種したものは、無機塩培地に接種したものに比べて菌数が有意に増加しており、大腸菌が河川水中の有機物を利用して増殖可能であることが明らかとなった。

大腸菌を接種し増殖した試料、および大腸菌を接種せず同一期間培養した試料、それぞれ3連に対して固相抽出し、HPLC-四重極 Orbitrap ハイブリッド質量分析計で分析した。大腸菌の接種の有無それぞれの実験系におけるピーク強度の比を横軸にとり、3連の実験系において、大腸菌の接種の有無それぞれの中でのピーク強度の平均値に対して、有意差があるかどうかの検定を行い、p 値を縦軸にとった(図1)。この図において、有意水準、および比ピーク強度それぞれにおいてある閾値を設定して、増殖前後で有意差があるコンポーネントを抽出することができた。

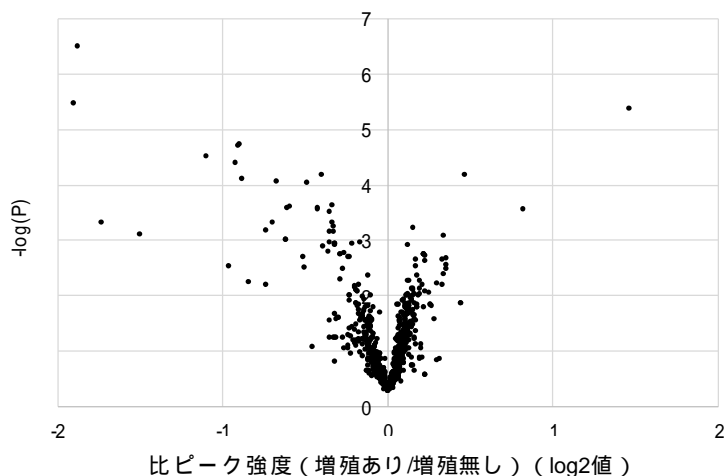


図1 検出された分子のボルケーノプロット

抽出されたコンポーネントについて、精密質量から分子式推定を行った。分子式組成から、Kendrick Mass Defect (KMD) を計算したところ、同一の KMD を持つものが存在したことから、共通した骨格を持つ化合物群があることが推定された(図2)。さらに、MS/MS 分析を行ったところ、11個に対して MS/MS データを取得でき、うち3個については MS/MS フラグメントパターンと既存のデータベースとの比較により、物質の候補を挙げることができ、1つはチロシンメチルエステルであった。標準物質を入手し比較したところ、一致するフラグメントも見られたものの、分析結果に違いがみられたことから、チロシンメチルエステルではなく、異性体である可能性が示唆された。

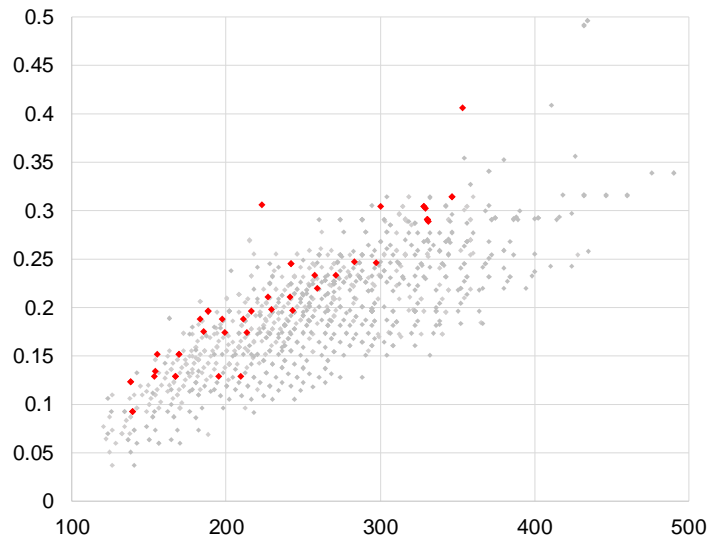


図2 検出された全分子と大腸菌増殖基質の Kendrick mass plot

### (3) 大腸菌と他細菌との競合

次に、河川水を0.2 $\mu\text{m}$ でろ過し細菌を除去したものと、0.8 $\mu\text{m}$ でろ過して河川水中の細菌類は残したものとで、大腸菌の増殖試験を行った。0.8 $\mu\text{m}$ でろ過した試水中では、0.2 $\mu\text{m}$ でろ過したものに比べ、大腸菌の増殖は有意に小さかった(図3)。Orbitrap質量分析計で分析したところ、0.2 $\mu\text{m}$ 試料で大腸菌が利用したと思われる物質は、0.8 $\mu\text{m}$ ろ過試料でも減少していたことから、大腸菌と河川水中の細菌で基質の競合が起こっており、その結果として大腸菌の増殖が抑制されていたと考えられた。

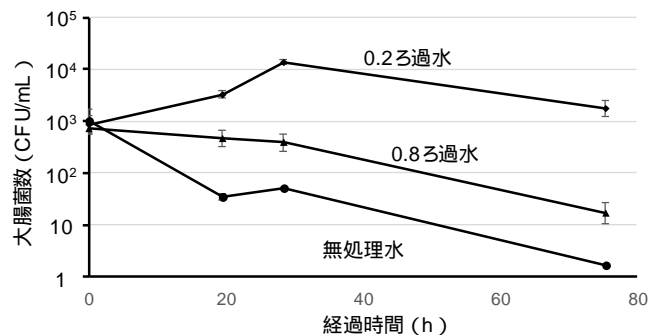


図3 多摩川上流地点の試料を用いた微生物の大腸菌増殖への影響評価実験の結果

### (4) 大腸菌野生株による環境水中での増殖

環境水中からの大腸菌の分離も試みた。河川水中からクロモカルト培地を用いて大腸菌を選択培養し、純化を行った。得られた菌株のうち2菌株に対して、バイオログを用いて基質利用性を評価した。その結果、K-12株と共通した基質は80%前後であり、環境水中の菌株は基質利用性が多少異なることが示された。

また、実験室分離株のほかに、京都大学より分譲いただいた琵琶湖からの分離株も使い、琵琶湖湖水での増殖試験を実施した。その結果、対照試験よりも有意に増殖する大腸菌株もあった。自然界においても大腸菌が環境水中の溶存有機物を利用して増殖していることが確かめられた。

環境中における大腸菌の増殖自体は既報が多くみられるが、その増殖に用いられている基質の推定は知る限りにおいては報告例は全くない。本研究成果は極めて新規性の高いものであるということが出来る。今後、増殖基質の確実な同定を行うと共に、環境水中における増殖への寄与を明らかにし、増殖への寄与の高い物質を明らかにしていく必要がある。これらの将来の研究に直結する研究成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihiro ISHII, Futoshi KURISU, Ikuro KASUGA and Hiroaki FURUMAI
2. 発表標題 Screening Growth Substrates of E.coli by Monitoring Changes in Dissolved Organic Matter Composition in Sterilized River Water
3. 学会等名 Water and Environmental Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石井淑大 栗栖太 春日郁朗 古米弘明
2. 発表標題 大腸菌が利用可能な河川水中溶存有機物の四重極-Orbitrap質量分析計による構造推定
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会講演集
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鎌田 素之  (Kamata Motoyuki)  (10386873)	関東学院大学・理工学部・准教授    (32704)	