

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19360374

研究課題名（和文） 難培養共生微生物群追跡技術の確立とその産業利用

研究課題名（英文） Development of a tracking method for minor group in microbial community and its industrial application

研究代表者

塩谷 捨明（SHIOYA SUTEAKI）

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：50026259

研究成果の概要：

マイナーな微生物を追跡するための Population-Normalization by RNA Subtraction 法（PNS 法）を開発した。この方法では、試料から抽出した全 16S rRNA から逆転写 PCR によって得られる cDNA をリガンドとして固相に固定し、試料中のメジャーな 16S rRNA を除去する。メジャーな 16S rRNA ほどリガンド濃度が高く、除去率が高くなり、16S rRNA のポピュレーションは均一化され、Temperature Gradient Gel Electrophoresis により 16S rDNA を指標とした菌叢解析が可能となる。そこで、16S rRNA の可変領域のうち、最も短い V1 または V5 領域を増幅し、そのアンチセンス鎖を磁気ビーズに固定し、PCR に用いた共通配列部分を相補鎖でマスクすることによってアフィニティ担体を調製し、これを用いてメジャーな菌群の RNA を除去し、構成比の平滑化が出来た。応用例としてセルロース分解に焦点を当て、その共生微生物を単離し、またその役割を明らかにし、工業利用として発展させた。また、Annamox 菌による嫌気性脱窒反応の共生系の解析をした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス（5504）

キーワード：微生物、共生、サブトラクション、16SrRNA、TGGE、セルロース分解菌

1. 研究開始当初の背景

従来の応用微生物学では、優良な性質を有する単一微生物の育種とその能力の発揮に重きを置き、純粋培養を前提として研究を進めてきた。しかしながら、これまで単離された微生物の種類は、全微生物の 1%にも満たないとされており、残りの微生物の多くは、

別の微生物と共生関係にあるために従来法では単離・培養できないと考えられている。このような共生微生物群がある有用な機能を発現している場合、その鍵となる微生物が数的にメジャーであれば、従来既知の方法でその微生物の盛衰を追跡することができる。しかし、このような場合はむしろ希であり、

多くの場合は、鍵となる微生物は数的にマイナーなために既存の方法では検出が不可能であると考えられる。従って、共生微生物群の持つ有用な機能を産業的に利用しようとする場合には、その鍵となる数的にマイナーな微生物を単離・濃縮するか、もしくは、その微生物群中での盛衰を追跡することによって、その菌数を維持または増加させる操作条件を見つけなければならない。近年 バイオマスとして食糧と競合しないリグノセルロース物質が注目を浴びている。これら未利用バイオマスを効率的に利用するにも、分解活性の高い菌群や酵素群を選抜する必要があり、マイナーな菌群を濃縮・単離出来る技術が重要となっている。

2. 研究の目的

セルロース分解活性向上の鍵を握る「難培養性かつマイナーな微生物」(以下‘鍵微生物’と呼ぶ)の菌数を維持・増加させ、それにより、対象とする微生物集団のセルロース分解能を向上させることである。ここで、鍵微生物の菌数の制御するにあたっては、Population-Normalization by RNA Subtraction法(以下PNS法)によるマイナー微生物の追跡ならびに Couple-Enrichment by Affinity Selection法(以下CEAS法)による難培養性微生物の濃縮を利用する 方法を開発する。

また応用展開例の候補として Annamox 菌による嫌気性脱窒反応の共生系の解析を行い、反応効率化の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 方法論の開発

試料から抽出した全 16S rRNA から逆転写 PCR によって cDNA を得る。これをリガンドとして固相に固定し、試料中のメジャーな 16S rRNA を除去する。メジャーな 16S rRNA ほどリガンド濃度が高く、除去率が高くなり、16S rRNA のポピュレーションは均一化される。normalization を行った後、逆転写 PCR を行い、TGGE のバンドを解析し、菌群の追跡を行うことが出来る。リガンの調製は、V1 領域を含む 40 塩基の配列、及び、V5 領域を含む 61 塩基の配列を挟む 20~31 塩基のコンセンサス配列の 5'側に、40 塩基の GC 配列を付加したプライマーを合成し、マレイミド基を付加した磁気ビーズに固定して作成する。

一方、CEAS 法によりセルロース分解菌に付着・共生した鍵微生物を濃縮するには、すでに単離済みのセルロース分解菌をビオチン標識し、微生物集団の培養液に添加する。1~2 時間培養した後、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いてビオチン化したセルロース分解菌を培養液から回収することにより行う。この微生物群から、鍵微生物の単離を試みる。

(2) リグノセルロース高分解活性菌群の分離同定とその解析

具体的に水生植物オオカナダモのコンポスト中から上記の法論に従って、鍵微生物を単離、その有効性を確認する。また鍵微生物の有効利用を図る。

(3) Annamox 菌による嫌気性脱窒反応の共生系の解析

anammox リアクター中の汚泥の菌叢に関して、優占菌である anammox 細菌以外の菌種の存在比率など特徴について明らかにする。2 種の anammox リアクター(それぞれ K リアクター、L リアクター)中で馴養した汚泥を試料に用い、その菌叢の違いを検討する。K リアクターの菌叢は汚泥から DNA を抽出し、制限酵素で処理後、クローニング、塩基配列を決定するメタゲノム解析研究の過程で得られる 16S rRNA 遺伝子断片の塩基配列を求めることにより、および PCR-DGGE による方法により決定した。さらに、L リアクター汚泥の菌叢の解析には、一般的によく行われている菌叢解析法である PCR を用いる方法も用いた。細菌特異的プライマーであるオリゴヌクレオチドの 1492r と 6F を使い PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅し、クローニング後塩基配列を決定し、各塩基配列から菌種を決定した。

4. 研究成果

(1) 方法論の開発

3 種のモデル微生物に対し表 1 に示すようなプライマーを設計して、リガンド用ペプチド合成した。

表 1 PNS 法のプライマーの設計

Primer	Sequence (5' → 3') end
Th1 (37 bs)	SH-TTTTTTTTTTAAACCTAAAG GAGCAA GCTCCCTTCGGT
Th5 (37 bs)	SH-TTTTTTTTTTGACCAAACC AAGCAA GCTCCGTTTGGT
Th9 (37 bs)	SH-TTTTTTTTTTGGATCCTCATC CCGAA GGATGATTCTC
FAM1 (27 bs)	FAM- ACCGAAGGGAGCTTGCT CCTTTAGGTT
FAM5 (27 bs)	FAM- ACCAAACGGAGCTTGCT TGGTTTGGTC
FAM9 (27 bs)	FAM- GAGAATCATCCTTCGGG ATGAGGATCC

すなわち、モデル微生物の 16S rRNA の可変領域のうち、最も短い V1 または V5 領域を増幅し、そのアンチセンス鎖を磁気ビーズに固定し、PCR に用いた共通配列部分を相補鎖でマスクすることによって Normalization 用のアフィニティ担体を調製した。サンプルから抽出した RNA をこのアフィニティ担体と反応させることによって、表-2 に示すように、

メジャーな微生物の RNA をより多く除去することができ、ポピュレーションを平滑化出来ることがわかった。

表 2 サブトラクションによるポピュレーションの平滑化

Liganad	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M
Init. F-labeled target conc. (M)	1 × 10 ⁻⁸	1 × 10 ⁻⁹	1 × 10 ⁻¹⁰
Ratio	100	10	1
F (binding fraction)	0.96	0.91	0.63
F-labeled target conc. after subtraction (M)	4.0 × 10 ⁻¹⁰	8.8 × 10 ⁻¹¹	3.7 × 10 ⁻¹¹
Ratio	10.7	2.4	1

従ってこの技術と CEAS 法により、鍵微生物が単離出来ることが明らかとなった。

(2) リグノセルロース高分解活性菌群の分離同定とその解析

水生植物オオカナダモを原料とした高温コンポスト化では、セルロースが約 2 週間という短期間で分解されることを見出した。また、本コンポスト化では返送を繰り返しても、反応が安定的に進行した。この結果から、本コンポスト化過程には水生植物に土着の微生物で構成される、安定的なセルロース分解細菌集団が存在することが示唆された。

そこで、本研究成果に基づき TGGE による菌叢の解析を行い、コンポスト化、中後半から現れるバンドの中に高い紙分解能（培養上清 1 mL あたり約 0.1 FPU）を有する菌を見だし、その単離に成功した。本菌株の 16S rDNA の部分塩基配列を解読したところ、*Thermobifida fusca* の配列と相同性を示した。次に、水生植物を原料としたコンポスト化において、*T. fusca* がセルロース分解にどの程度寄与しているか調査したところ、コンポスト化のセルラーゼ比活性が急激に上昇する時間帯に *T. fusca* が優占した。また、本コンポスト化で働くセルラーゼのほとんどが、*T. fusca* 由来であり、*T. fusca* が本コンポスト化のセルロース分解で主役となる微生物であることが明らかとなった。*T. fusca* はセルロース分解菌として知られ、それが生産するセルラーゼやキシラナーゼは耐熱性や高い活性を有することから、広く研究されている。化学的処理をした植物体のセルロースに、*T. fusca* の酵素を作用させると、ある程度分解可能であることは明らかとなっている。

ところが、*T. fusca* を単独で滅菌した水生植物に播種し、コンポスト化を行ったところ、

炭素変換率が全く上昇せず、セルロースが分解されないことが明らかとなった。一方、滅菌していない水生植物に、*T. fusca* 単独で播種した場合、炭素変換率が 25% まで上昇した。これは、土着の微生物の中に、*T. fusca* によるセルロース分解を助ける微生物が存在することを示しており、このような微生物として、一種の CEAS 法と考えられる集積培養の際に、優占して天然培地に出現するセルロース非分解菌が候補として挙げられた。本菌株は、単離操作の際、*T. fusca* と重なった状態で多く出現し、このことから、両者の間には何らかの関係があるのではないかと推測された。本菌株の 16S rDNA の部分塩基配列を解読したところ、*Ureibacillus thermosphaericus* の配列と相同性を示した。*T. fusca* および *U. thermosphaericus* を単独で滅菌した水生植物に播種しコンポスト化を行ったところ、炭素変換率は土着の微生物で行ったコンポスト化と同様の 30% 近くまで上昇し、2 種の細菌のみによって、水生植物に土着のセルロース分解細菌集団の機能を再構成できた。

この水生植物（リグノセルロース）分解においては、*U. thermosphaericus* は鍵微生物であることが判明した。この微生物の役割を明らかにするため、走査型顕微鏡（SEM）を用いて水生植物を観察し、*U. thermosphaericus* による表面の変化を調べた。図 1 に作用 6 日目の写真を示す。

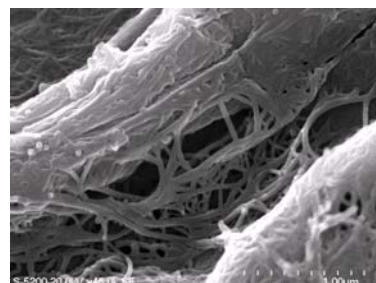


図 1 作用 6 日目

T. fusca のみを作用させた場合は、無処理と同じ平滑な表面であり、明らかに差が見て取れる。そして、直径数 10 nm のセルロースマイクロフィブリルがはっきりと確認される。SEM 観察およびセルラーゼによる糖収率の結果は、*U. thermosphaericus* がリグニンを分解し、水生植物のセルロースマイクロフィブリルを露出させ、Cel6A をはじめとするセルラーゼがセルロースに結合するのを助けることを示している。

この結果、鍵微生物の役割をもっと積極的に応用するため、廃建材からのエタノール発酵の前処理に使えないかの検討を行った。木質系バイオマスからのバイオエタノール生産に

において、酸や熱による加水分解液に含まれる発酵阻害物質の除去は重要な課題の一つである。ここでは従来の過剰石灰処理 (overliming) に代わる方法として、リグニン分解能が確認されている好熱性細菌 *Ureibacillus thermosphaericus* を用いた生物処理を試みた。

建設廃木材のヘミセルロースを希硫酸で加水分解して得られた糖液に対し、Tryptic Soy Broth 培地で増殖させた *U. thermosphaericus* を 2.4 g-dry cell/l を加え 50°C で 24 h 好氣的に処理した。処理後の加水分解液を用いると、*Saccharomyces cerevisiae* TJ1 の比増殖速度およびエタノール比生産速度は overliming と同等まで向上した。*U. thermosphaericus* は糖の資化性を持たないため、糖のロス は overliming より小さかった。フルフラールと HMF の試薬の *U. thermosphaericus* による変換物質を HPLC で調べたところ、いずれも主なピークとしてアルデヒド基がカルボキシル基に酸化されたカルボン酸が検出された。一方、加水分解液ではフラン類の減少が試薬の場合より小さく、また、主な有機酸もほとんど減少しなかったことから、*U. thermosphaericus* 処理によるエタノール生産の向上にはリグニン由来の未検出成分の減少も寄与していることが示唆された。

(3) Annamox 菌による嫌気性脱窒反応の共生系の解析

K リアクターの菌叢：

① DGGE による解析

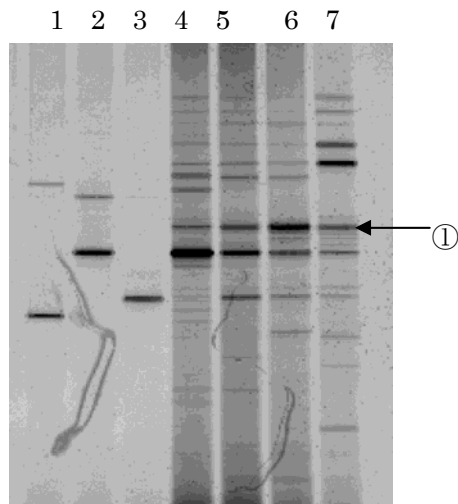


図2 DGGE による各種汚泥の菌叢
1: clone A マーカー、2: anammox 菌 KSU-1 株マーカー、3: anammox 菌 KU2 株マーカー
4: リアクター上部不織布付着汚泥
5: リアクター下部不織布付着汚泥
6: 外壁赤色汚泥、7: 外壁黄色汚泥

上記の DGGE の解析写真より、メジャーな細菌は anammox 菌 KSU-1 株であることが分かった。さらに、①のバンドを切り出し分析した結果 Chloroflexi に属する細菌のものであることが分かった。

②メタゲノム解析からの 16S rRNA 遺伝子に基づくリアクター上部の菌叢

表3 メタゲノム解析による菌叢

Phylum	Taxon	Number of clones
Planctomycete	anammox KSU-1	9
	uncultured bacterium	2
Chloroflexi	uncultured bacterium	8
alfa-Proteobacterium	uncultured bacterium	1
beta-Proteobacterium	uncultured bacterium	1
delta-Proteobacterium	uncultured bacterium	1

表3の結果は DGGE 解析の結果と良く対応し、anammox 菌 KSU-1 株が最も多く、次に Chloroflexi 門の細菌が多く見られた。

以上①と②の結果から K リアクターの菌叢はメジャーな anammox 菌 KSU-1 株とセカンドメジャーな細菌として Chloroflexi 門の細菌がいることが判明した。

L リアクターの菌叢：

L リアクターのメジャーな細菌は K リアクターとは異なり、anammox 菌 KU2 株であった。しかし、Chloroflexi に属する細菌が多く存在し、リアクター条件に関わり無く anammox に重要な役割があると思われた。

このような菌叢解明にも、本研究で展開している方法論が使えるか 更なる検討が必要である。

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)

- ① S. Qiao, Y. Kawakubo, Y. Cheng, T. Nishiyama, T. Fujii, K. Furukawa, Identification of bacteria coexisting with anammox bacteria in an upflow column type reactor, 20, 117-124, (2009), 査読有
- ② N. Okuda, M. Soneura, K. Ninomiya, Y. Katakura and S. Shioya: Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. J. of Biosci. and Bioeng., 106, 128-133. (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① Takao Fujii, Takashi Nishiyama, Kenji Furukawa, Members of anammox bacteria detected in two kinds of sludge acclimated, The 8th General Seminar of the Core University Program, 2008.11.27, Osaka
- ② Suteaki Shioya “ Potential of microbial ecosystem for industrial application. 13th International Biotechnology Symposium, 2008.10.15, Dalian, China
- ③ 奥田直之, 埴浦真由美, 仁宮一章, 片倉啓雄, 塩谷捨明 “*Ureibacillus thermosphaericus*を用いた木質系バイオマス分解酵素前処理プロセスの評価” 日本生物工学会平成 20 年度大会, 要旨集p61, 2008 年, 8/27-29, 東北学院大学
- ④ 辻林宏章, 森岡こころ, 福井純一, 仁宮一章, 片倉啓雄, 塩谷捨明 “蛍光標識 cellulose binding domainを用いたリグノセルロース系バイオマス前処理プロセスの評価” 化学工学会第 73 年会, 要旨集, Vol. 2008, p389, 2008 年, 3/17, 静岡大学
- ⑤ 森岡こころ, 辻林宏章, 福井純一, 仁宮一章, 片倉啓雄, 塩谷捨明 “2 種の菌によるコンポスト化反応再構築系の解析” 日本生物工学会平成 19 年度大会, 要旨集, p216, 2007 年, 9/25-29, 広島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩谷 捨明 (SHIOYA SUTEAKI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：50026259

(2) 研究分担者

片倉 啓雄 (KATAKURA YOSHIO)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50263207

仁宮 一章 (NINOMIYA KAZUAKI)

(2007 年度)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：10379125

研究者番号：10379125

山本 進二郎 (YAMAMOTO SHINJIRO)

(2008 年度)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：40262307

林 修平 (HAYASHI SHUHEI) (2008 年度)

崇城大学・生物生命学部・助教

研究者番号：30389522

藤井 隆夫 (FUJII TAKAO) (2008 年度)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：80165331

(3) 連携研究者

仁宮 一章 (NINOMIYA KAZUAKI)

(2008 年度)

金沢大学・環日本海域環境研究センター・助教

研究者番号：10379125

研究者番号：10379125