

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 2日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760404

研究課題名（和文） 遺伝子配列特異的微生物回収技術の開発とそれを用いた廃水処理微生物群集の機能解明

研究課題名（英文） Development of functional gene-based cell enrichment method for understating microbial community in wastewater treatment systems

研究代表者

久保田 健吾（KUBOTA KENGO）

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80455807

研究成果の概要（和文）：サンプルをフィルトレーションし、CARD-FISH 法を適用した後、フィルターを溶解し、配列特異的に微生物を回収する技術の開発を行った。フィルターを溶解する溶媒やその量、微生物群集構造への影響を評価した。また廃水処理プロセスとしてフェノール処理バイオリアクターの微生物群集構造を解析した。主要3グループについて FISH プロブを設計し、それを用いてグラニュール内の空間分布を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed a method to enrich microbial cells after CARD-FISH. Effects of solvents to microbial community were also investigated. Microbial community of a phenol-degrading anaerobic reactor was analyzed. Specific FISH probes were designed and applied to decipher spatial distribution of major microorganisms involved in phenol degradation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：環境保全

1. 研究開始当初の背景

生物学的廃水処理技術では排水中の有機物や窒素分、有害物質を複合微生物群集を用いて分解・除去している。しかしながらその微生物群集の機能については未だ殆ど分かっていない。次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析などはアメリカを筆頭に世界中で行われているが、膨大な量の遺伝子配列情報を扱うバイオインフォマティクスは未だ開発途上であり、それをどう扱い、またそ

こから有用な知見が引き出せるかは、サンプルに未だ依存していると言っても過言ではない。その点、廃水処理複合微生物群集は、物質分解メカニズム解明において非常に優れたサンプルであると言ってもよい。例えばある特定の有害物質を含む廃水を連続的に処理している汚泥は、いわばその物質を分解可能な微生物コミュニティを集積していると言えるからである。つまり廃水処理複合微生物群集（= 未知なサンプル）は今日のバイオ

インフォマティクスを用いた微生物の機能解明には極めて有用なのである。

2. 研究の目的

本研究は、この廃水処理複合微生物群集から特定機能遺伝子配列情報に基づいて微生物を染色し、それらを抗原抗体反応を用いてマグネットビーズにより回収後、DNA抽出・核酸増幅を経てこれら細胞の分子系統および機能を解明するための技術を開発しようとするものである。またフェノール処理バイオリアクターの微生物群集構造を明らかにし、そこから開発技術を用いて、廃水処理微生物群集の機能解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

配列特異的微生物回収技術の開発のサンプルには、*Escherichia coli*, *Methanococcus maripaludis* あるいは河川水を固定したものをを用いた。サンプルは、フィルターにろ過した後、アガロース包埋した。Magneto-FISH法に用いる HRP 標識プローブの浸透性向上のために、リゾチームを用いて細胞壁処理を行った。プローブ (EUB338) を標的 rRNA に交雑させたのち、TSA (tyramide signal amplification) 反応により、FITC 標識チラミドを沈着させた。その後、有機溶媒を用いてフィルターを溶解させ、抗 FITC 抗体結合マイクロビーズを用い標的微生物を回収した。

フェノール処理バイオリアクターの微生物群集構造解析には、フェノール濃度が 1,500 ~ 3,000 mgCOD/L となるように調整されたフェノール単一人工廃水の連続処理実験を行っている UASB (11L) リアクターを用いた。HRT は 9.2 時間、水温は 35°C 付近に調整した。連続処理実験の結果、本 UASB リアクターでは約 83% の COD 除去率が得られ、良好な処理を行っていた。UASB からのサンプリングはサンプリングポート (Port1) から行った。このサンプルに対して、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析を行った (プライマーセット: EUB8f or ARC109f / UNIV1500r)。解読して得られた塩基配列 (約 600 塩基) のデータを用いて Operational Taxonomic Unit (OTU) に分類し、ARB プログラムおよび NCBI の BLAST 相同性検索ツールを用いて系統解析を行った。各 OTU の代表クローンについては 16S rRNA 遺伝子の全長の配列を決定した。

FISH 法による微生物叢の解析には、UASB リアクターより採取したグラニュール汚泥を 4%パラホルムアルデヒドで固定処理した

ものを用いた。解析に用いたプローブのデザインには、ARB の Probe Design を利用した。FISH 法のコントロールには当該配列を持つ菌株が必要となるが、分離菌株の入手および培養には時間がかかる。そのため、デザインしたプローブの評価を迅速に行うために Clone-FISH 法を用いてプローブの特異性を検証し、交雑条件の検討を行った。

4. 研究成果

フィルターを溶解させるため、2種類の有機溶媒を用いて検討を行い、フィルターの溶解が容易だった方を用いた。次に、河川サンプルを用いて有機溶媒による微生物への影響を調べたところ、有機溶媒により約 13% 微生物の損失が確認された。これより、河川中には有機溶媒による影響を受ける微生物が存在することがわかった。また、フィルターを包埋する際のアガロース濃度の検討を行った。0.2, 0.5, 1.0, 2.0% のアガロースを用いた場合の河川サンプル中の微生物の回収率を観察したところ、濃度が上がるに連れて回収率が低下する事に加え、フロックの形成も見られた。よってアガロース濃度は 0.2% とした。

上述の様に有機溶媒による処理で損失する微生物種が存在する可能性が示唆されたことから、フィルターを溶解する際の有機溶媒の濃度を下げることで、損失を抑えることができないか検討するために、0.2% のアガロースで包埋したフィルターを完全に溶解可能な有機溶媒の濃度および量について検討を行った。100, 75, 50% の有機溶媒を各々チューブへ入れ、フィルターの溶解を観察したところ、100% では溶解が確認できたが、75, 50% は溶解が確認できなかった。そのため、希釈した有機溶媒を用いて細胞への影響を低減する方法は難しいと考えられる。次に、アガロース包埋済のフィルターを溶解可能な有機溶媒の体積を検討したところ、フィルター 1 枚につき有機溶媒を 1700 μ l 添加することで、目視する限りで完全に溶解させることができた。

しかしながら溶解した溶液を顕微鏡で観察したところ、フロックが見られた。このフロックに標的微生物と非標的微生物が混在した場合、標的微生物を回収する際に非特異的に非特異微生物が回収されてしまうため、分散処理を施す必要がある。これらはアガロースに由来するフロックであると考え、溶液を 95°C に加熱することでフロックの溶解を試みたが、加熱処理を施すと逆にフロックが増加したため、加熱処理は行わないこととした。次に、超音波処理によるフロック

の物理的分散を行ったところ、適度に分散したため、超音波処理を行うこととした。

フェノール処理バイオリアクターの微生物群集構造では、16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析の結果、フェノール分解に貢献する *S. aromaticivorans* (28/117 クローン) および *C. phenolicus* (10/117 クローン)、*Syntrophus buswellii* (20/117 クローン) の3種類や *Desulfovibrio* 属 (13/117 クローン)、メタン生成古細菌 (37/38 クローン) などの微生物に近縁なクローンの存在が確認された。これにより、本 UASB リアクターにおけるフェノールの分解は、*Syntrophorhabdus* 属によって酢酸にまで直接分解されるもの (経路 1) と、*Cryptanaerobacter* 属によって安息香酸に変換され、それを *Syntrophus* 属などが酢酸にまで分解するもの (経路 2) の 2 パターンが想定された。

クローン解析結果からだけでは2つの分解パターンのフェノール分解への貢献度は推測できないので、FISH 法による *Syntrophorhabdus* 属と *Cryptanaerobacter* 属、*Syntrophus* 属の各々特異的な検出を行うことでフェノール分解能を有する微生物の存在量や位置情報を明確なものにすることが必要であると考えた。しかしこれらのグループに特異的なプローブは報告されていない。そのため各々のグループ内における 16S rRNA の共通配列部分を探索し、各グループを各々カバーするプローブを設計した。しかしながら、*Syntrophorhabdus* 属に特異的なプローブの設計は困難であったため、*Syntrophorhabdaceae* 科に特異的なものを設計した。また、標的にによって設計したプローブと 1 塩基ミスマッチを有するクローンがクローン解析より得られたため、それらに対してはコンペティタープローブを用いることで対応した。このように設計したプローブが標的に交雑するための自由エネルギー変化量 ($\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$) を検討した結果、値の低いものに関しては数塩基を LNA (Locked nucleic acid) で置換することで問題を解消した。そしてより強い蛍光を得るために、蛍光物質を二重修飾したプローブ (DOPE) を用いることで蛍光強度の増加を試みた。

次に、設計したプローブを用いて当該 RNA を発現させた菌株と当該 RNA と逆配列を持つ RNA を発現させた菌株の識別を試みた。この結果より最適ホルムアミド濃度を決定した。

固定したグラニュール汚泥に超音波分散を施したのに対して、DAPI と FISH 法による二重染色を行った。FISH 法に用いたプロー

ブは、設計した上記 3 プローブの他、*Bacteria* を標的とした EUB338 プローブと *Archaea* を標的とした ARC915 プローブである。DAPI 染色細胞に対する存在率は、*Bacteria*: 36.8±1.7%、*Archaea*: 34.7±2.2%、*Syntrophorhabdaceae* 科: 22.2±0.6%、*Cryptanaerobacter* 属: 3.5±1.5%、*Syntrophus* 属: 14.4±0.6%であった。この結果は、クローン解析結果と同様にフェノールの分解において *Syntrophorhabdus* 属による経路 1 と *Cryptanaerobacter* 属と *Syntrophus* 属による経路 2 が共存している事を示唆している。

さらに検証するため、グラニュール汚泥の切片 FISH 法を行い、この微生物群集の空間分布の把握を試みた。まず EUB338 プローブと ARC915 プローブを用いて二重染色を行った結果、グラニュール表層部には *Bacteria* が、中心部には *Archaea* が存在している事が確認され、その 2 種類が混在している部分も確認できた。さらに *Syntrophorhabdaceae* 科に特異的なプローブと *Cryptanaerobacter* 属に特異的なプローブ、*Syntrophus* 属に特異的なプローブを用いて多重染色を行った。その結果、グラニュール汚泥の内側に *Syntrophorhabdaceae* 科が、外側には *Cryptanaerobacter* 属と *Syntrophus* 属が存在していることが確認でき、*Cryptanaerobacter* 属と *Syntrophus* 属は非常に親密な関係をとっていることが明らかとなった。このことから、フェノール分解に直接寄与する *Syntrophorhabdaceae* 科と *Cryptanaerobacter* 属の 2 つのグループがグラニュール内部で住み分けをしていることが明らかとなり、その原因として基質親和性等の違いによる影響の可能性が示唆された。またグラニュール中心部においてもフェノールの分解が進行している事が明らかとなった。今後は開発した技術をこの廃水処理プロセス微生物群に適用し、更なる微生物群集の機能解明を行っていく。

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 4 件)

1. Kawakami, S., T. Hasegawa, H. Imachi, T. Yamaguchi, H. Harada, A. Ohashi, and K. Kubota. 2012. Detection of single-copy functional genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes. *Journal of Microbiological Methods*. 88(2): 218-223. 査読有.
2. 山田真義, 久保田健吾, 高橋優信, 田中

- 秀治, 山口隆司, 長野晃弘, 原田秀樹, 山内正仁. 2011. UASB-DHS システムによる高濃度フェノール廃水の連続処理特性と UASB 内微生物叢解析. *土木学会論文集 G (環境)*. 67(7): III_75-III_84. 査読有.
3. 山口剛士, 川上周司, 幡本将史, 高橋優信, 久保田健吾, 井町寛之, 荒木信夫, 山口隆司. 2011. Hybridization Chain Reaction (HCR) 法を用いた新規高感度 FISH 法の開発. *土木学会論文集 G (環境)*. 67(7): III_93-III_98. 査読有.
 4. 長谷川拓也, 川上周司, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹, 久保田健吾. 2010. Two-pass TSA-FISH 法を用いた微生物機能遺伝子の視覚的検出技術. *環境バイオテクノロジー学会誌*. 10: 97-103. 査読有.

[学会発表] (計 11 件)

1. 久保田健吾, 諸野祐樹, 原田秀樹, 稲垣史生. nanoSIMS を用いた微生物機能解明のための GISH 法の開発. 第 46 回日本水環境学会年会, pp. 474. 東洋大学, 2012.3.16.
2. 白取早恵, 久保田健吾, 原田秀樹. 未培養微生物群の新規 rm オペロン解析法の開発. 第 46 回日本水環境学会年会, pp. 402. 東洋大学, 2012.3.16.
3. 五十嵐慧, 久保田健吾, 山田真義, 長野晃弘, 原田秀樹. フェノール廃水処理 UASB グラニュール汚泥の微生物群集構造解析. 第 46 回日本水環境学会年会, pp. 376. 東洋大学, 2012.3.16.
4. 塚越大祐, 久保田健吾, 原田秀樹. LNA 置換プローブを用いた FISH 法における交雑時間の短縮. 平成 23 年度土木学会東北支部技術研究発表会. VII-17. 秋田大学. 2012.3.3.
5. 山田真義, 久保田健吾, 高橋優信, 田中秀治, 山口隆司, 長野晃弘, 原田秀樹, 山内正仁. 2011. UASB-DHS システムによる高濃度フェノール廃水の連続処理特性と UASB 内微生物叢解析. 第 48 回 環境工学研究フォーラム. III_75-III_84. 大同大学. 2011.11.25.
6. 山口剛士, 川上周司, 幡本将史, 高橋優信, 久保田健吾, 井町寛之, 荒木信夫, 山口隆司. 2011. Hybridization Chain Reaction (HCR) 法を用いた新規高感度 FISH 法の開発. 第 48 回 環境工学研究フォーラム. III_93-III_98. 大同大学. 2011.11.25.
7. 五十嵐慧, 久保田健吾, 原田秀樹. CARD-FISH 法を利用した未培養微生物の特異的回収技術の開発. 第 45 回日本水環境学会年会, pp. 155. 北海道大学, 2011.3.18.
8. 長谷川拓也, 久保田健吾, 原田秀樹. 低分子触媒物質を用いた高感度 FISH 法の開発. 第 45 回日本水環境学会年会, pp. 172. 北海道大学, 2011.3.18.
9. Hasegawa, T., S. Kawakami, K. Kubota, H. Imachi, A. Ohashi, and H. Harada. Deciphering microbial functions in granular sludge by two-pass TSA-FISH targeting functional genes. *The 12th World Congress on Anaerobic Digestion (AD-12), Guadalajara, Mexico*. IWA-5200. 2010.11.4.
10. Kawakami, S., K. Kubota, T. Hasegawa, H. Imachi, T. Yamaguchi, H. Harada, and A. Ohashi. Development of gene FISH with tyramide signal amplification and its application to environmental samples. *13th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-13)*, Seattle, WA, USA. 2008.8.21.
11. 長谷川拓也, 久保田健吾, 川上周司, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹. 機能遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法による環境微生物の特異的検出. 環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会, pp. 62 (P-45). 東北大学, 2010.6.21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 健吾 (KUBOTA KENGO)
 東北大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：80455807