

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24686060

研究課題名(和文) ストレスマネジメントによる微生物全細胞統制技術の開発

研究課題名(英文) Stress management as the concept to control total bacterial cells in an environment

研究代表者

伊藤 司 (Ito, Tsukasa)

群馬大学・理工学府・准教授

研究者番号：80431708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトは生物であり、バクテリアもまた生物である。ストレスを感じ応答している。しかし、バクテリアがどのようなストレスをどの程度感じているのか、それがバクテリアの生存にどの程度重要なのか把握する方法はない。また、ストレスが小さい状態と比べて調べる必要があるが、その状態を作り出す方法がない。本研究で開発した超小型のマイクロバブル発生装置はバクテリアのストレスを極小にでき、本装置を用い、遺伝子の発現解析を合わせて行うことで、バクテリアの生存に影響の大きい主要なストレスを明らかにすることができた。そのストレスの与え方を操作すること(ストレスマネジメント)は、将来エコロジカルなバクテリア制御方法になる。

研究成果の概要(英文)：Humans are living creatures. Bacteria are also living things that feel stress and respond against it. However, there is no way to understand the stresses felt by living and growing bacteria (what stress they feel, how large it is, how important it is). It is necessary to compare standard stress levels to a low-stress state, but there was previously no method of creating a low-stress condition. This study developed a novel incubation device that produces very fine microbubbles and eliminates stress caused by bubble flow. Major stresses influential to bacterial growth and survival were revealed by using this device and gene expression analysis. Controlling the level of stress (stress management) on bacteria will be an invaluable ecological tool in the future; potential applications include better disinfectants and water purification.

研究分野：環境微生物学

キーワード：微細気泡 菌 MiBos マイクロバブル ストレスマネジメント ストレス エアレーション バクテリア 大腸

1. 研究開始当初の背景

たとえばコンクリートは強度以上の外的ストレスにより破壊される。破壊に至らない程度のストレスなら繰り返されることでひび割れが生じる。この場合ストレスはコンクリートの寿命を縮める方向にのみ働く。しかし生物の場合は違う。たとえば細菌は抗生物質等の薬剤にさらされると薬剤濃度が充分なら死に至るが、致死的でない濃度に繰り返しさらされると耐性を獲得し、生存できるようになる。薬剤ストレスが細菌の種の寿命を延ばしたことになる。耐性を獲得するとそれまでの致死濃度はもはや致死ではなくなくなっている。ストレスは生物の生き残る力を高める(高めてしまう)重要なファクターといえる。

細菌は地球にも人間にも普遍的存在である。細菌のストレスを考慮して対策することにより、細菌が関与する様々な問題を解決できる可能性がある。細菌のストレスを考慮した制御の考え方を申請者はストレスマネジメントとよび、基本概念の確立を目指している。

細菌の環境工学分野における重要性は多岐にわたる: 飲料水等の病原菌制御、冷却塔の管内の微生物膜形成による熱交換効率低下の原因、下水や産業排水や埋立地浸出水の生物学的処理、膜の目詰りの直接/間接要因(膜分離活性汚泥法 MBR、海水淡水化 RO)、土壤汚染対策等。他分野では医薬品製造、食品、物質生産への利用、人の細菌感染も関係する。これらの中で細菌が受けるストレスの種類には、貧栄養ストレス、低酸素ストレス、水や空気泡の流れによるせん断ストレス、塩濃度による浸透圧ストレス、熱ストレス、薬剤ストレス、菌体密度ストレス、酸化ストレス等がある。

2. 研究の目的

従来の、阻害剤や異なる条件下での活性評価の実験(Ito et al, 2002. AEM 68:356-64.)では細胞が対処しているストレスの種類や大きさが見えない。1種類のストレス応答にも多くの遺伝子が関与するため特定遺伝子の欠損株を用いた実験でもそれを見ることは困難である。遺伝子欠損株の実験は人間という解剖実験に類似し、人体を構成する各器官の働きがわかる(欠損株では個々の遺伝子の機能推定ができる)。しかし、人間が環境ストレスにさらされてどのような行動をとるかは、欠損のないそのままの人間を行動科学的に観察しなければならない。環境ストレスに反応して細菌細胞が最終的にどのような判断を下すのか? 細胞が細胞として「細胞内の様々な機能」を「ストレス応答」との天秤にかけて、どのような機能を切り捨て、どのような機能を優先するのか? それを知るためにはノーマルな細菌細胞を用い、「ストレスがない状態での行動」を基準として調査する必要がある。そして、

基準となる「ストレスがない状態(環境)」を作り出す必要がある。では、どのようにしてその状態(環境)を作り出すのか? このストレスがない状態を作り出すことが本研究課題の第一の目的である。そして、このストレスがない状態で細菌を培養し、従来の培養状態と比較することで、培養時の主要なストレスを明らかにすることが第二の目的である。

3. 研究の方法

3.1 ストレスがない(極めて少ない)状態を作り出す培養装置(MiBos バイリアクター)

これまでのマイクロバブル発生方法とは全く異なる原理による超小型の微細気泡発生装置を開発した。これは従来液体の噴霧に利用されている振動多孔板を用いて、振動板に接着された圧電素子に超音波で印加することにより振動板を振動させ、同時に振動板の微細孔に空気などのガスを通すことにより微細気泡を発生させる振動多孔板を用いた微細気泡発生装置(Microbubble Generator with an Oscillating Mesh (MiBos (マイボス) とよぶ)である。ストレスがない(極めて少ない)状態を作り出す MiBos バイリアクターは、振動多孔板を用いた微細気泡発生装置(MiBos)と反応槽(容量 0.5L)、コンプレッサー、発振機から構成される(図1)。

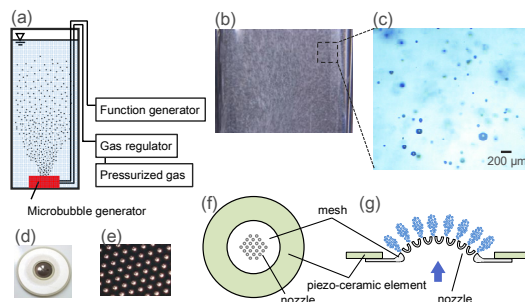


図1. 微細気泡発生装置(MiBos)を用いた低ストレス培養装置 MiBos バイリアクター. (a)培養装置の全体構成. (b)微細気泡画像. (c)10~100 μmの微細気泡の顕微鏡カメラ画像. (d)振動板. (e)振動板の孔の顕微鏡画像. (f) & (g)微細気泡発生イメージ

3.2 MiBos バイリアクターを用いた大腸菌培養による細胞外多糖類の評価

MiBos バイリアクターを用いて大腸菌 K12 株の回分培養を行った。培養中の濁度、DO と DOC を測定した。培地は M9 液体培地を用いた。対照系として通常の粗大な気泡による培養、振とう培養を行った。培養温度は 30°C で行った。培養液を採取し、顕微鏡により細胞の状態(フロックの存在や細胞形態など)を観察し、一方で蛍光レクチンにより細胞外多糖類を染色し、蛍光顕微鏡観察およびイメージングフローサイトメトリによる定量的解析を行った。

3.3 塩素抵抗性試験

大腸菌の培養は、MiBos 培養と振とう培養のそれぞれで行った。増殖期の培養液を採取し、リン酸緩衝液で洗浄後、消毒剤として

次亜塩素酸ナトリウムに接触させた。塩素濃度は 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 ppm の各濃度で行い、0, 1, 10, 30 分でサンプル液を採取し、リン酸緩衝液で希釈調整した後、LB 寒天培地に塗布して 37°C で培養した。24 時間培養後に発生したコロニー形成数をカウントし生菌数を測定した。塩素濃度 C と 99% 不活化までの接触時間 T の関係 (CT 値) より塩素抵抗性を評価した。

3. 4 網羅的遺伝子発現解析

3 つのバブリング条件 (純酸素微細, エアー粗大, エアー微細) を対象として対数増殖期の培養液から全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。異なる培養条件で遺伝子発現量を比較したとき、発現量が 2 倍以上または半減以下の遺伝子を解析対象とした。

4. 研究成果

本研究課題「ストレスマネジメントによる全細胞統制技術の開発」で、好気性微生物の培養で液中への酸素供給のために普通に行われているエアレーションや振とう培養による「せん断力」に着目してきた。せん断力はバクテリアの付着力を高めてバイオフィーム形成を促進するストレス因子である (Thomas et al, 2002, Cell 109:913-23) が、振とう培養等で常にこのストレスを与える実験が世紀を超えて行われてきたのは、せん断ストレスを与えずに酸素を効率的に供給する技術がなかったからである。しかし、空気を微細気泡化して供給できればせん断ストレスを無くすことが可能である。但し、従来の微細気泡発生装置は気体を液体と超高速混合するため、微細化時に培養液に多大なストレスを与えてしまう。そこで申請者は液体を巻き込まずに気体を微細化でき、かつ様々な気体を微細化できる特徴を有する超小型の微細気泡発生装置を開発し (特願 2015-96234, 特願 2013-025720)、この装置でせん断ストレスのない好気培養を初めて実現した。

微生物は基質の消費とともに細胞外へ多糖類を生成する。細胞表面の細胞外多糖類を蛍光 WGA レクチンで染色して約 2 万~4 万細胞をイメージングフローサイトメトリーで解析した結果、MiBos を用いた微細気泡バブリング培養の細胞外多糖類生成量は粗大気泡バブリング培養の約 3 分の 1 であった (図 2)。MiBos 培養では細胞表面の細胞外多糖類の生成量が少ないという結果が得られた。

塩素抵抗性を塩素濃度 C と接触時間 T の積の CT 値として表した。MiBos 培養の大腸菌は振とう培養の 6 分の 1 の CT 値であり、6 倍塩素抵抗性が低いという結果が示された。MiBos 培養の *S. saprophyticus* は振とう培養の 16 分の 1 の CT 値であり、16 倍塩素抵抗性が低い結果であった。このように MiBos 培養で塩素抵抗性が低く殺菌されやすい細胞であったのは、MiBos 培養では大腸菌や *S.*

saprophyticus が生成する細胞外多糖類が少なかったためではないかと考えられた。

粗大バブリング培養と微細バブリング培養とで大腸菌の遺伝子発現をマイクロアレイにより比較した。その結果、粗大バブリング培養では微細バブリングよりも繊毛 (Fimbrium) と鞭毛 (Flagellum) に関する遺伝子発現量が多かった (図 3)。よって、粗大気泡のバブリングは繊毛と鞭毛の運動を活発にしたと考えられた。イメージングフローサイトメトリーにより細胞のアスペクト比を解析したところ、粗大バブリングで培養された細胞には連結した長い細胞が多いことが分かった。これは活発な繊毛・鞭毛運動により細胞同士が結合されたためであると考えられた。逆に、微細バブリングでは分裂活性が高かったといえる。

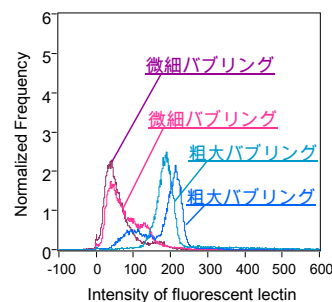


図 2. エアー微細バブリング培養の大腸菌とエアーク粗大バブリング培養の大腸菌の細胞外多糖類を蛍光レクチン染色し、イメージングフローサイトメトリーにより約 4 万細胞の蛍光強度を定量した結果

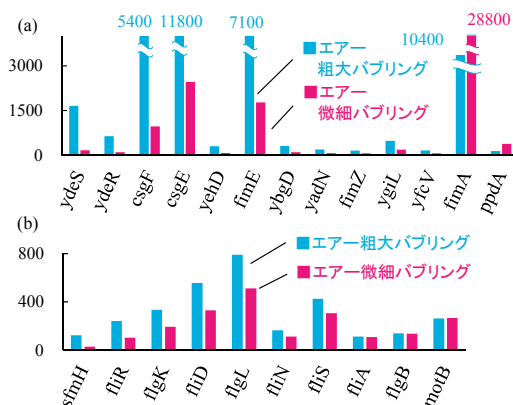


図 3. 大腸菌のエアーク微細バブリング培養およびエアーク粗大バブリング培養の網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ) の遺伝子発現シグナル値を比較した結果. (a) 鞭毛に関連する遺伝子と (b) 繊毛に関連する遺伝子

開発した MiBos バイオリアクターによりせん断ストレスの極めて小さい好気培養を実現できた。せん断ストレスが小さいため、大腸菌は繊毛・鞭毛運動や多糖類生成を行うよりも分裂増殖を活発にした。運動や多糖類生成は細胞にとってエネルギー消費が大きいと考えられる。バクテリアの制御 (活性化や抑制) にはエネルギー消費が大きい行動に繋がるストレスを考慮することが重要である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Ito T, Adachi Y, Yamanashi Y, Shimada Y, Long-term natural remediation process in textile dye-polluted river sediment driven by bacterial community changes, *Water Research*, 100: 458-465. (2016) (査読有) doi:10.1016/j.watres.2016.05.050
2. Mori M, Kotaki K, Gunji F, Kubo N, Kobayashi S, Ito T, Itabashi H. Suppression of cadmium uptake in rice using fermented bark as a soil amendment. *Chemosphere*, 148: 487-494. (2016) (査読有) doi:10.1016/j.chemosphere.2016.01.012
3. Ito, Tsukasa. Color removal by microorganisms isolated from human hands. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 14: 244-227. (2013) (査読有) doi:10.1128/jmbe.v14i2.545.
4. Song Y, Ishii S, Rathnayake L, Ito T, Satoh H, Okabe S. Development and characterization of the partial nitrification aerobic granules in a sequencing batch airlift reactor. *Bioresource Technology*, 139: 285-291. (2013) (査読有) doi:10.1016/j.biortech.2013.04.018
5. Mori M, Sugita T, Mase A, Funatogawa T, Kikuchi M, Aizawa K, Kato S, Saito Y, Ito T, Itabashi H. Photodecomposition of humic acid and natural organic matter in swamp water using a TiO₂-coated ceramic foam filter: Potential for the formation of disinfection byproducts. *Chemosphere*, 90(4): 1359-1365. (2013) (査読有) doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.07.056.
6. Ito T, Yoshiguchi K, Ariesyady HD, and Okabe S. Identification and quantification of key microbial trophic groups of methanogenic glucose degradation in an anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology*, 123: 599-607. (2012) (査読有) doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.108.
7. 伊藤 司. 穏やかに培養して高活性化させる微細気泡発生装置MiBosバイオリアクターの開発. 日本微生物生態学会誌

27(2):72-74. (2012) (査読無)
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009495492>

8. Satoh H, Tsushima I, Miura Y, Ito T, and Okabe S. Characterization of microbial community structures and their activities in single anaerobic granules by beta imaging, microsensors and fluorescence in situ hybridization. *Water Science & Technology*, 65(12): 2125-2131. (2012) (査読有) doi:10.2166/wst.2012.117.

[学会発表] (計16件)
(国際会議)

1. Ito T, Kondo H, Yamanashi Y, Takahashi K, Alias NB, Kuroo K, Kubota T. Reduction of Bacterial Extracellular Polymeric Substances Using a Novel Low-Stress Incubation Device. ASM2015. 373, May 30-June 2, New Orleans, Louisiana, USA (2015)
2. Ito T, Kondo H, Alias NB, Kuroo K, Kubota T. Development of a low-stress incubation device for reducing bacterial extracellular polymeric substances. ISME-15. 264A, August 24-29, Seoul, South-Korea (2014)
3. Ito T, Kubota T, Kinuta S, Amagai K. Managing microbial life by a novel bioreactor equipped with a microbubble generator by an oscillating porous board. ISME-14. 417B, August 19-24, Copenhagen, Denmark (2012)
4. Ito T, Okabe K, Itabashi H, and Mori M. Effect of a clay-originated ceramics carrier on the replacement of the dominant population of phototrophic microorganisms. Water and Environment Technology Conference 2012, 29-1A-10, June 29-30, Tokyo, Japan (2012)

(国内学会)

5. 山梨由布、伊藤司. 純酸素バブリングによる高酸素環境が大腸菌に及ぼす静菌作用の解明. 第50回日本水環境学会年会 2016年3月16~18日 アスティとくしま (徳島県徳島市)
6. 伊藤司、山梨由布. 高酸素がバクテリアに与える影響—マイクロバブル培養から見える静菌メカニズム—. 日本マイクロ・ナノバブル学会 2015年度第4回学術総会 2014年12月13日 明治大学駿

河台キャンパス（東京都千代田区）

7. 山梨由布、伊藤司. 微細気泡による大腸菌と発光細菌に対する活性化と制御に関する研究. 日本微生物生態学会第 30 回大会 2015年10月17~20日 土浦亀城プラザ（茨城県土浦市）
8. 山梨由布、近藤宏樹、伊藤司. 様々な微生物に対する微細気泡培養効果. 第 49 回日本水環境学会年会 2014年3月16~18日 金沢大学（石川県金沢市）
9. 高橋健、伊藤司. 微細気泡発生装置 MiBos を用いた生物学的排水処理性能. 第 49 回日本水環境学会年会 2014年3月16~18日 金沢大学（石川県金沢市）
10. 近藤宏樹、伊藤司. 微細気泡が微生物細胞に及ぼす影響. 第 49 回日本水環境学会年会 2014年3月16~18日 金沢大学（石川県金沢市）
11. 伊藤司、山梨由布、高橋健、近藤宏樹. 低ストレスで穏やかに微生物を培養する超小型微細気泡発生装置—液体を取り込まずに様々な気体を微細化できる—. 日本マイクロ・ナノバブル学会 2014 年度第 3 回学術総会 2014年12月7日 明治大学駿河台キャンパス（東京都千代田区）
12. Alias NB、近藤宏樹、伊藤司. 微細気泡発生装置 MiBos を用いた EPS の抑制による消毒効果の検証. 第 48 回日本水環境学会年会 2014年3月17~19日 東北大学（宮城県仙台市）
13. 近藤宏樹、Alias NB、伊藤司. 微細気泡発生装置 MiBos による大腸菌細胞外多糖類の抑制に関する塩素消毒効果の検証. 第 48 回日本水環境学会年会 2014年3月17~19日 東北大学（宮城県仙台市）
14. 黒尾健太、久保田智、伊藤司. 細胞外多糖類の生成を抑制する超小型微細気泡発生装置 MiBos の開発. 第 47 回日本水環境学会年会 2013年3月12日 大阪産業大学（大阪府東大阪市）
15. 伊藤司、久保田智、黒尾健太、山崎隆行. 細胞外多糖類の生成を抑制する超小型微細気泡発生装置の開発. 第 49 回環境工学研究フォーラム 2012年11月28日 京都大学（京都府京都市）
16. Tsukasa Ito. Managing microbial life by a novel bioreactor equipped with a fine bubble generator by an oscillating mesh. JSME2012, 2012年9

月 20 日、豊橋技術科学大学（愛知県豊橋市）

〔図書〕（計 1 件）

伊藤 司. 細胞外多糖類の生成を抑制する超小型微細気泡発生装置. 書籍「微細気泡の最新技術 Vol.2 ~進展するマイクロ・ナノバブルの基礎研究と広がる産業利用~」内 第 5 章第 1 節 p 223-230, エヌ・ティー・エス出版 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

名称： スライム抑制方法
発明者： 田中愛里、飯泉太郎、伊藤司
権利者： 群馬大学、栗田工業
種類： 特許
番号： 2016-66480
出願年月日： 2016年3月29日
国内外の別： 国内

名称： 気体の微細化装置
発明者： 伊藤 司、絹田精鎮、斎田克明
権利者： 群馬大学、オプトニクス精密
種類： 特許
番号： 2015-96234
出願年月日： 2015年5月11日
国内外の別： 国内

名称： 微生物培養装置ならびにそれを利用した微生物分散培養方法および細胞外多糖類抑制方法
発明者： 伊藤 司
権利者： 群馬大学
種類： 特許
番号： 2013-025720
出願年月日： 2013年2月13日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ
群馬大学大学院理工学府 水環境微生物研究室（伊藤司研究室）
<http://www.ce.gunma-u.ac.jp/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 司 (IT0, Tsukasa)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号： 80431708