

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660173

研究課題名(和文) 膜損傷が無く酵素活性を有する生きたシロウリガイ共生菌の電気回収

研究課題名(英文) Electrical retrieval of intact and active symbiotic bacteria from deep-sea bivalves
Calymene okutanii

研究代表者

小山 純弘 (KOYAMA, Sumihiro)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・技術副主幹

研究者番号：50344297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膜損傷が無く、さらにデヒドロゲナーゼ活性を有する生きた状態の共生微生物を単離回収する技術として、シロウリガイ類の体内に共生する化学合成細菌を、透明なITO電極基板上へ電氣的に誘引附着させる技術。そして電極基板上に附着した化学合成細菌を剥離回収する技術。上記2つの技術を開発した。さらに、沿岸で容易に捕獲できるカイメンを用い、カイメン共生菌の電気回収を試みた。電気化学的に附着回収された共生菌は、バクテリア31門、アーキア3門におよぶ事を明らかとした。電気化学的に附着回収された微生物の99%以上が生きた状態であることを膜損傷の有無および細胞内デヒドロゲナーゼ活性から確認した。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel electrical retrieval method for intact and active symbiotic bacteria from gill tissues of deep-sea bivalves *Calymene okutanii* and sponge-associated microorganisms from marine sponges. An indium tin oxide (ITO) optically transparent working electrode was placed on a chamber device with a counter- (Pt) and a reference (Ag/AgCl) electrode. We obtained 31 and 3 phyla of bacteria and archaea from *C. okutanii* and marine sponges *S. insignis* and *Callispongia confederata*. The electrically attached microorganisms had intact cell membranes and showed intracellular dehydrogenase activity. Dead microorganisms were not attracted to the electrode when the homogenized tissues were autoclaved before use.

研究分野：電極基板を利用した生きた微生物の電気回収

キーワード：共生微生物 電気回収 シロウリガイ オオパンカイメン ザラカイメン バクテリア アーキア

1. 研究開始当初の背景

化学合成生物群集は、1977年、米国の有人潜水調査艇「アルピン号」によって、東太平洋ガラパゴス諸島付近の深海底熱水噴出域で発見され、現在では、干潟、藻場、冷湧水噴出域の幅広い環境中において存在が確認されている【1, 2】。この化学合成生物群集の最大の特徴は、一次生産エネルギーにある。陸上や浅い海の世界では、太陽の光に依存する光合成生態系が主流であり、一次生産エネルギー源として光エネルギーを活用している。一方、これに対して、化学合成生物群集では、硫化水素やメタンといった還元的な化学物質の酸化エネルギーを化学合成細菌が利用することで、一次生産エネルギーを獲得している。化学合成生物群集を構成する生物のうち、シロウリガイ類、シンカイヒバリガイ類、ハオリムシ類といった体内に化学合成細菌を共生させる動物群は、栄養の大部分あるいはすべてを化学合成細菌に依存しており、自ら餌をほとんど摂ることが無い【2】。このような化学合成生物群集における、宿主-共生微生物間の相互作用や共生微生物の代謝に関する研究は、宿主細胞と共生微生物をそれぞれ単離培養する事が極めて困難な点から、これまでほとんど進められていなかった。

引用文献

【1】Cavanaugh CM et al. (2006): Marine chemosynthetic symbioses. In: The Prokaryotes, 3rd edn. A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied microbiology. Springer, New York.

【2】Fisher CR (1990): Chemoautotrophic and Methanotrophic Symbioses in Marine Invertebrates, Rev. Aquat. Sci., 2, 399-436

2. 研究の目的

深海性化学合成生物であるシロウリガイ類の化学合成細菌は、多くがエラ組織に共生しており、卵を経由して子孫に化学合成細菌

を伝搬させていると考えられている【3】。

本研究では、シロウリガイ類の体内に共生する化学合成細菌を透明なITO電極基板上へ電氣的に誘引付着し、化学合成細菌を膜損傷が無く、かつ、デヒドロゲナーゼ活性を有する生きた状態のまま、高純度で大量に剥離回収する手法を確立する。

引用文献

【3】Stewart FJ et al. (2008): Lateral symbiont acquisition in a maternally transmitted chemosynthetic clam endosymbiosis, Mol. Biol. Evol., 25, 673-687

3. 研究の方法

各種微生物が中性pHのバッファ中において、マイナスのゼータポテンシャルを有することから、培養された微生物を電氣的に分離する方法として、キャピラリー電気泳動を利用する手法がこれまでに報告されている【4】。しかし、微生物を電気泳動分離するためには120V/cm以上の電場を加える必要がある【4】。そのため、微生物を電気泳動分離するための印加電圧が、水の電気分解反応を引き起こし、微生物は電極表面上に付着できずに死んでしまう。

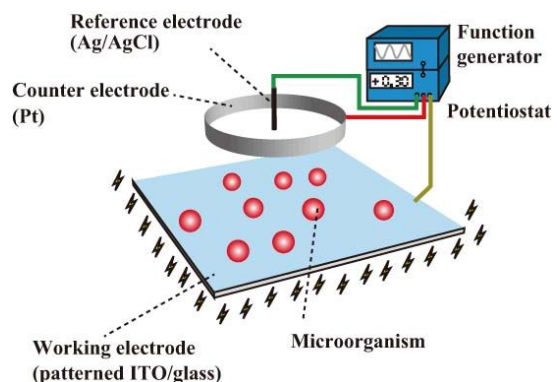


図1 3電極チェンバー模式図

そこで図1のような3電極培養系を構築し、水の電気分解反応が生じない微弱電位条件において、共生微生物の好む電位を印加することにより、シロウリガイ類のエラ組織中における、共生微生物を光学的に透明なITO電

極基板上へ誘引付着させる。さらに電極上に吸着した共生微生物の嫌う電位を印加することで、共生微生物を電極基板上から剥離、回収する。

実験方法について簡単に説明する。シマイシロウリガイは、大気圧、4 海水条件下で約 3 日間生存させる事ができる。この生存期間内にエラ組織を切り出し、粘液をペーパータオルで拭き取った後、70%エタノールで 10 から 30 秒間殺菌する。エタノール殺菌後、3 種抗生物質含有人工海水中で 1mm³ 以下になるまで、エラ組織片を切り刻む。エラ組織断片を石英乳鉢に移し、5 分間すりつぶした後、3 電極チャンバーに移し、-0.3V vs. Ag/AgCl の定電位を 2 時間 4 にて印加する。定電位印加 2 時間後、電極表面を 4 人工海水で洗い流し、±10mV vs. Ag/AgCl、9MHz の三角波電位を 20 分間印加することで、電極基板上に付着した微生物を剥離回収する。この電気的な微生物の吸着剥離プロセスを再度繰り返した後、得られた微生物の系統解析および FISH 解析を試みた。三浦半島沿岸で採取された各種カイメンサンプルの共生菌についても同様に検討した。

引用文献

【4】 Ebersole, R.C. and McCormick, R.M.: Separation and isolation of viable bacteria by capillary zone electrophoresis. *Biotechnology*, 11, 1278-1282 (1993)

4 . 研究成果

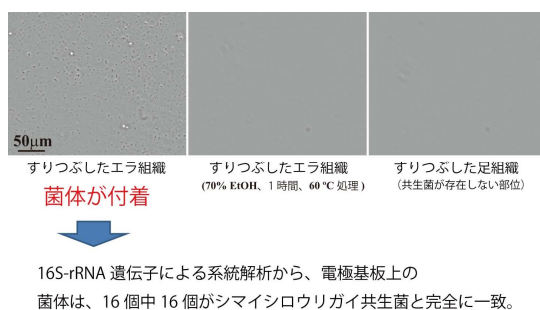


図 2 -0.3V vs Ag/AgCl 印加した ITO 電極で二回付着させたシマイシロウリガイ共生菌

図 2 は、すりつぶしたシマイシロウリガイエラ組織中の共生菌を、-0.3V 定電位を印加した ITO 電極上に 2 回付着させた後、位相差顕微鏡で観察した結果を示したものである。シマイシロウリガイのエラ組織中に存在する共生菌が、ITO 電極上に付着することを、16S-rRNA 遺伝子による系統解析の結果から、確認した。一方、70%EtOH 60 で 1h 固定処理したエラのサンプル、および共生菌が存在しないシマイシロウリガイの足組織をすりつぶしたサンプルからは、菌体そのものがマイナス電位を印加した電極基板上に付着しないことも確認した。次に、電極基板上に付着した微生物のうち、共生菌がどれくらいの割合で存在するのか、FISH 解析により確認した (図 3)。

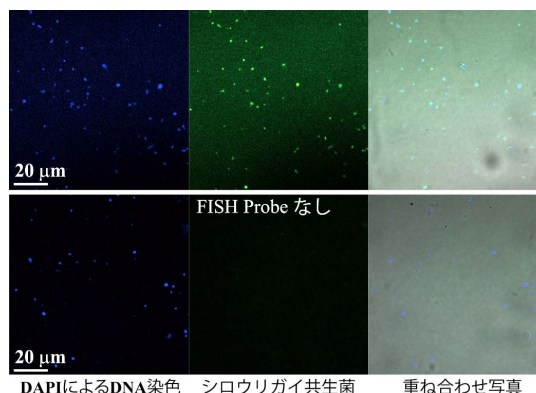


図 3 シロウリガイ共生菌の FISH 染色

FISH 解析の結果から、DAPI で染色された電極基板上の微生物のうち 98.6%、207 個中 204 個がシマイシロウリガイの共生菌であることを確認した。以上の結果から、シマイシロウリガイのエラ組織中に存在する共生菌が、-0.3V の定電位を印加した ITO 電極上に付着することを明らかとした。

次に、-0.3V vs. Ag/AgCl の定電位を印加した電極基板上には、どのような種類の微生物が付着できるのかを、16S-rRNA 遺伝子を指標とした次世代シーケンスで調査した。底面積が 58.5 c m² の 2 枚の 3 電極チャンバーを

用い、三浦半島沿岸で採取された各種カイメンサンプル由来の共生微生物について、付着と剥離のプロセスを 2 回繰り返した後、16S-rRNA 遺伝子を指標とした菌叢解析を試みた。この結果、バクテリア 31 門 (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *BD1-5*, *Candidate division ODI*, *OP3*, *OP11*, *SR1*, *TM7*, and *WS3*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *SM2F11*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *TM6*, and *Verrucomicrobia*)、そして、アーキア 3 門 (*Crenarchaeota*, *Marine Group I*, and *Thaumarchaeota*) を本手法で付着回収することに成功した。また、電気化学的に付着回収された微生物の 99%以上が生きた状態であることを膜損傷の有無および細胞内デヒドロゲナーゼ活性、そして各種培養実験から確認した。

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)

Tsubouchi, T., Koyama, S., Mori, K., Shimane, Y., Usui, K., Tokuda, M., Tame, A., Uematsu, K., Maruyama, T., Hatada, Y., *Brevundimonas denifitricans* sp. nov., a novel denitrification capability bacterium isolated from deep seafloor sediment, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3709-3716 (2014) 査読あり
DOI 10.1099/ijs.0.067199-0

小山純弘, 物理刺激による動物細胞機能の工学的な制御, *JAAC* ニュースレター, 24,

3-18 (2014) 査読なし

Koyama, S., Konishi, M., Ohta, Y., Miwa, M., Hatada, Y., Toyofuku, T., Maruyama, T., Nogi, Y., Kato, C., Tsubouchi, T., Attachment and Detachment of Living Microorganisms Using a Potential-Controlled Electrode, *Marine Biotechnology*, 15, 461-475 (2013)

査読あり

DOI 10.1007/s10126-013-9495-2

小山純弘, 電極基板を用いた効率的な環境微生物回収法, *バイオサイエンスとインダストリー*, 71, 533-535 (2013) 査読なし

[学会発表](計 5 件)

小山純弘, 西 真郎, 徳田真紀, 上村萌佳, 石川陽一, 瀬谷 敬, 張 成年, 伊勢優史, 秦田勇二, 藤原義弘, 坪内泰志 (2015 年 3 月 19 日) 凍結保存したカイメンからの共生微生物の電気回収, *ブルーアース 2015*, 東京海洋大学 (東京都港区)

小山純弘, 西 真郎, 徳田真紀, 上村萌佳, 石川陽一, 瀬谷 敬, 張 成年, 伊勢優史, 秦田勇二, 藤原義弘, 坪内泰志 (2014 年 11 月 22 日) 透明電極基板を用いた凍結保存したカイメンからの共生微生物の回収法, 第 55 回高圧討論会, 徳島大学 (徳島県徳島市)

小山純弘, 小西正朗, 大田ゆかり, 三輪哲也, 秦田勇二, 豊福高志, 丸山 正, 能木裕一, 加藤千明, 坪内泰志 (2014 年 6 月 1 日) 透明電極による生きた微生物の付着および剥離の電気制御, 第 16 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 三重大学 (三重県津市)

小山純弘, 小西正朗, 大田ゆかり, 三輪哲也, 秦田勇二, 豊福高志, 丸山 正, 能木裕一, 加藤千明, 坪内泰志 (2014 年 3 月 27 日) ITO 電極を用いた環境微生物の電気回収法, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

小山純弘, 小西正朗, 大田ゆかり, 三輪哲也, 秦田勇二, 豊福高志, 丸山 正, 能木裕一, 加藤千明, 坪内泰志 (2014 年 2 月 19 - 20 日) ITO 電極基板を用いた効率的な環境微生物の回収法, ブルーアースシンポジウム 2014, 東京海洋大学 (東京都港区)

〔図書〕(計 1 件)

小山純弘 他 146 名, 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, 技術情報協会 (2014), 584(281-287)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小山 純弘 (KOYAMA, Sumihiro)

独立行政法人海洋研究開発機構・

海洋生物多様性研究分野・技術副主幹

研究者番号 : 5 0 3 4 4 2 9 7