

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450093

研究課題名(和文) 難培養性微生物の増殖活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the growth stimulating mechanism of previously uncultured microorganisms

研究代表者

村上 千穂 (MURAKAMI, CHIHO)

広島大学・工学研究科・日本学術振興会特別研究員 (RPD)

研究者番号：50649077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：難培養性微生物である亜硝酸酸化細菌Nitrospiraは、固形寒天培地上ではコロニーを形成できない。また、集積培養中ではNitrospiraの代謝産物を栄養源とする従属栄養細菌と共存している。これまで、Nitrospiraと従属栄養細菌との相互作用が片利共生なのか双利共生なのかは不明であった。そこで、Nitrospiraの純菌株と従属栄養細菌16株を共培養したところ、9株が増殖促進することがわかった。このことから、相互作用は双利共生であると考えられる。また、増殖活性化のメカニズムは、阻害因子の除去と増殖促進因子の供給が考えられるが、4株の従属栄養細菌が増殖促進因子を出していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously uncultured microorganisms Nitrospira which are also nitrite oxidizing microorganisms resist the cultivation of agar plates. Nitrospira are co-existing with heterotrophs in the enrichment culture. Growth of those heterotrophs are completely dependent on the organic compounds excreted from autotrophs as metabolic by-products. However, it is unclear whether the symbiotic relationships are commensal or mutualistic. Then we screened 16 isolates of heterotrophs, co-cultured with and tested growth promoting activity on Nitrospira. The growth of Nitrospira was clearly stimulated by co-cultivation with 4 isolates, suggesting to have a benefit to be co-existing with each other. We next tested those isolates to identify whether the growth promoting on Nitrospira are derived from, 1) removal of inhibiting factor for Nitrospira or, 2) supply of growth promoting factor. The result suggested that heterotrophs provide unknown growth promoting factor to Nitrospira.

研究分野：環境微生物学

キーワード：難培養性微生物 亜硝酸酸化細菌 増殖促進因子

1. 研究開始当初の背景

環境中の微生物の 99%は培養できない。この理由は、明らかになっていないが、環境中における微生物の実態解明や資源としての利用は、学術的・産業的にも重要である。

そこで、難培養性微生物の純菌株をモデルとして用いて、その増殖特性を解析すれば、他の環境微生物と共通する増殖を制御している因子の解明につながり、より多くの微生物資源を得ることができると考えた。

2. 研究の目的

「環境中に存在する微生物をなぜ培養できないのか」その原因を微生物間相互作用に着目して、解明することを目的とする。

3. 研究の方法

亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira* の純菌株を難培養性微生物のモデルとして使う。*Nitrospira* は、亜硝酸を硝酸に酸化する独立栄養細菌であり、寒天平板培地上でコロニーを形成できない。このことが原因で長らく分離培養が困難な重要株 (*Candidatus*) とされてきた。しかし、共存する従属栄養細菌とならコロニーを形成するとの報告がある。

そこで、*Nitrospira* の増殖は共存微生物との相互作用によって制御されている可能性が考えられた。

本研究では、新規な分離培養手法を用いて分離した *Nitrospira* の純菌株を用いて、その増殖活性化に寄与する共存微生物を探索して単離し、再度、共培養させることで、その相互作用のメカニズムの解明を目指した。

① 共存する従属栄養細菌の単離

Nitrospira を分取した集積培養や活性汚泥中などから *Nitrospira* 純菌株の培養上清が含また固形培地上でコロニーを形成したのを単離した。

② 従属栄養細菌の同定

得られた従属栄養細菌の 16S リボソーム RNA の配列を PCR して、シーケンスを解析することにより同定を行った。

③ 一次スクリーニング

同定した従属栄養細菌と *Nitrospira* を小スケールで共培養して、*Nitrospira* の増殖(亜硝酸酸化)を促進するものを探索した (Table1)。

④ 二次スクリーニング

増殖促進する可能性のある株に関して、スケールアップした状態で共培養の活性試験を行ってところ、ともに増殖する様子が観察された (写真 1)。さらに、*Nitrospira* の増殖曲線から比活性や増殖パラメータの解析を行い、共培養と単独培養の場合との比較を行った。

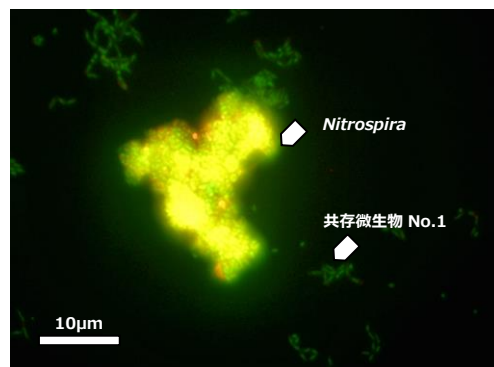


写真 1: 共培養の様子
共存微生物 No. 1 (緑) *Nitrospira* (黄)

⑤ 培養上清の影響の検討

従属栄養細菌の培養上清が *Nitrospira* の増殖に与える影響を調べた。

Table 1 Coexistence effect to the activity of *Nitrospira* in screening assay

strain No.	related species	Origine	identity	nitrite oxidation	strain No.	related species	Origine	identity	nitrite oxidation
No.0	<i>Pseudomonas putida</i>	CC	100	n.d.	No.33	<i>Microbacterium lacticum</i>	AS	99	-
No.1	<i>Sphingopyxis taejoniensis</i>	EC	98	+	No.35	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	AS	99	-
No.3	<i>Rudaea cellulolytica</i>	EC	98	-	No.36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EC	99	-
No.4	<i>Mycobacterium jacuzzii</i>	EC	98	+	No.37	<i>Gordonia cholesterolivorans</i>	EC	100	+
No.5	<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	EC	98	-	No.38	<i>Gordonia cholesterolivorans</i>	EC	100	+
No.9	<i>Rudaea cellulolytica</i>	EC	98	-	No.39	<i>Shinella fusca</i>	EC	99	-
No.11	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	EC	100	-	No.40	<i>Gordonia cholesterolivorans</i>	EC	99	+
No.14	<i>Mycobacterium brisbanense</i>	AS	99	+	No.47	<i>Gemmobacter lanyuensis</i>	EC	99	-
No.17	<i>Xanthobacteraceae bacterium</i>	AS	99	-	No.49	<i>Pseudomonas putida</i>	EC	99	+
No.20	<i>Gordonia australis</i>	AS	100	+	No.55	<i>Ensifer adhaerens</i>	EC	100	+
No.22	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	AS	98	-	No.61	<i>Alicyclophilius denitrificans</i>	EC	99	-
No.23	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	AS	98	-	No.63	<i>Sphingobacterium mizutaii</i>	EC	99	+
No.25	<i>Mycobacterium brisbanense</i>	AS	99	-	No.64	<i>Paludibaculum fermentans</i>	EC	94	+
No.26	<i>Zoogloea caeni</i>	AS	96	-	No.65	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	EC	99	-
No.29	<i>Sphingomonas asaccharolytica</i>	AS	99	-	No.70	<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i>	EC	99	-
No.30	<i>Mucilaginibacter ximonensis</i>	AS	99	-	No.71	<i>Shinella fusca</i>	EC	99	+
No.31	<i>Nakamurella multipartita</i>	AS	98	-	No.74	<i>Reyranelia massiliensis</i>	EC	99	+

⑥ 菌体の定量

共培養中の *Nitrospira* の菌体の定量方法として、ダイレクトカウントは共存微生物のために困難である。そこで、新たに SYBR-Green を用いたリアルタイム PCR による定量方法を確立した。

⑦ 培養上清成分の質量分析

さらに、従属栄養細菌の培養上清を ODS カラムで分離して質量分析を行った。増殖前後のヒートマップによる分析から *Nitrospira* と従属栄養細菌間で低分子有機物の授受が行われていることを確認した。

4. 研究成果

亜硝酸酸化細菌を含む硝化細菌は、その代謝産物を介して、共存する微生物である従属栄養細菌の増殖を助けていることが、集積培養などの複合微生物系において示唆されてきた(片利共生)。

また、硝化細菌の一種であるアンモニア酸化細菌と共存微生物間では、アンモニア酸化細菌の増殖促進に共存微生物の酸化ストレス除去が関与している可能性が示唆されていた(相利共生)。

しかし、門レベルで難培養である亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* に関しては、その共生関係は不明なままであった。そこで、本研究では、その共生関係を明らかにし、その相互作用メカニズムの解明を行った。

まず、*Nitrospira* の純菌株の培養上清を用いた、従属栄養細菌の分離においては、79 株の採取を行った。これは、これらの従属栄養細菌が、*Nitrospira* の出す代謝産物を栄養源にして増殖することを示している。

これらの株のうち、同定できた 33 株とコントロール株 (No. 0) を含む 34 株と小スケールのスクリーニングの結果を Table1 に示した。これにより、*Nitrospira* の増殖が 13 株の従属栄養細菌によって促進される可能性があることが分かった。

さらに、コントロール株を含む 16 株を 20ml スケールの共培養増殖試験に供した。16 株中、比活性により *Nitrospira* の増殖を促進している株を 3 株得ることができた。共培養中において、増殖促進を示す株は単独培養と比較して、3 株のうち 2 株は *Nitrospira* の菌体収量が高くなることが分かった。

また、*Nitrospira* の増殖に対する従属栄養細菌の培養上清の影響を調べたところ、比活性が上昇することが分かった。これには、前記の 3 株を含む 9 株が得られた。また、従属栄養細菌の培養上清は、*Nitrospira* の菌体収量の増加には影響を与えないことが分かった。

これらの結果から *Nitrospira* が共存微生物によって増殖促進されるには、次の二つの

方法が考えられる。

- 1) *Nitrospira* の出す増殖阻害因子を共存微生物が除去する
- 2) 共存微生物が増殖促進因子を *Nitrospira* に供給している

これらのうち、どちらかの方法、または両方により *Nitrospira* の増殖は促進されるはずである。

さらに、増殖阻害因子の影響を排除した条件で増殖試験を行った。その結果から、得られた株のうち、4 株に関しては、ふたつの促進方法のうち 2) の増殖促進因子を共存微生物が *Nitrospira* に供給している可能性が高いことが分かった。

また、培養上清の質量分析をすることで、従属栄養細菌は、*Nitrospira* の培養上清中の低分子有機物を消費していることがわかった。さらに、増殖促進する共存微生物に関しては低分子有機物を培地中に放出していることが明らかとなった。

以上のことから、*Nitrospira* と共存する従属栄養細菌との間には、有機物を介した双利共生の関係が成り立っていると考えられる。さらに、個々の共存微生物によって相互作用する低分子有機物は異なっている。このように、微生物間の複雑な相互作用が自然環境中では起きていると考えられる。

このような必須の栄養源や特異的なペアに由来しない緩やかな双利共生関係は、分離培養することによって失われるため、難培養性の一因になっている可能性がある。

本研究の結果は、難培養性微生物であるため、純菌株としての解析がこれまでほとんど不可能であった *Nitrospira* を用いた、微生物間相互作用の初めての知見である。

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 6 件) すべて査読あり

- (1) Nurmiyanto A, Kodera H, Kindaichi T, Ozaki N, Aoi Y, Ohashi A. 「Dominant Candidatus Accumulibacter phosphatis Enriched in Response to Phosphate Concentrations in EBPR Process」 Microbes Environ. 2017, 27;32(3):260-267.
- (2) Aoi Y, Kaneko Y, Tsuneda S. 「pH-gradient ion-exchange microbial cell chromatography as a simple method for microbial separation.」 J Biosci Bioeng. 2017, 123(4):431-436.

- (3) Jung D, Aoi Y, Epstein SS.
「In Situ Cultivation Allows for Recovery of Bacterial Types Competitive in Their Natural Environment.」
Microbes Environ.,
2016, 23:31(4):456-459.
- (4) Cao LT, Kodera H, Abe K, Imachi H, Aoi Y, Kindaichi T, Ozaki T, Ohashi A.
「Biological oxidation of Mn(II) coupled with nitrification for removal and recovery of minor metals by downflow hanging sponge reactor.」
Water Res., 2015, 1:68:545-553
- (5) Fujitani H, Ushiki N, Tsuneda S, Aoi Y.
「Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy.」
Environ Microbiol., 2014,
16(10):3030-3040.
- (6) Tandogan N, Abadian PN, Epstein S, Aoi Y, Goluch ED.
「Isolation of microorganisms using sub-micrometer constrictions.」
PLoS One., 2014, 30: 9(6)

[学会発表] (計 13 件)

- (1) 寺地裕康 村上千穂 金田一智規
大橋晶良 青井義輝
「亜硝酸酸化細菌の休眠と覚醒
—未知増殖制御メカニズムの解明—」
第 52 回日本水環境学会年会
2018 年 3 月 15-17 日 北海道
- (2) 村上千穂 町田光史 金田一智規
大橋晶良 中尾洋一 青井義輝
「難培養性微生物 *Nitrospira* の増殖促進・覚醒に関する因子の解明」
特殊環境微生物セミナー
2017 年 10 月 6 日 広島
- (3) 青井義輝 招待講演
「培養手法の革新：難培養性微生物の正体と資源としての可能性」
第 69 回日本生物工学会大会
2017 年 9 月 13 日 東京
- (4) 村上千穂 町田光史 金田一智規
大橋晶良 中尾洋一 青井義輝
「難培養性微生物 *Nitrospira* の増殖促進・覚醒に関する因子の解明」
第 31 回環境微生物系学会合同大会 2017
2017 年 8 月 29-31 日 仙台
- (5) 青井義輝 招待講演
「難培養性微生物とは何か？ どうしたら

培養できるのか？」
日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会
2017 年 8 月 26 日 岐阜

- (7) 寺地裕康 村上千穂 金田一智規
大橋晶良 青井義輝
「難培養性微生物 *Nitrospira* の休眠現象」
第 31 回環境微生物系学会合同大会 2017
2017 年 8 月 29-31 日 仙台
- (8) 青井義輝 招待講演
「培養できない微生物の正体と培養手法の革新」
環境バイオテクノロジー学会
2016 年度大会/年会シンポジウム
2016 年 6 月 13-14 日 広島
- (9) 青井義輝 招待講演
「分離培養手法の革新-難培養性微生物の正体と可能性-」
第 28 回微生物シンポジウム
2016 年 9 月 2-3 日 名古屋
- (10) 村上千穂 金田一智規 大橋晶良
青井義輝
「難培養性微生物 *Nitrospira* の増殖促進、休眠と覚醒現象の解明」
第 31 回日本微生物生態学会
2016 年 10 月 22-25 日 横須賀
- (11) 村上千穂 金田一智規 大橋晶良
青井義輝
「Growth-promoting, dormancy and awakening of previously uncultured microorganisms *Nitrospira*」
「難培養性微生物 *Nitrospira* の増殖促進、休眠・覚醒現象の解明」
第 30 回日本微生物生態学会
(7th JKT symposium)
2015 年 10 月 22-25 日 土浦
- (12) C. Murakami T. Kindaichi A. Ohashi
Y. Aoi
「How do microorganisms sleep and wake up?」
2nd Hiroshima International Symposium on Sustainability Sciences
2014 年 11 月 6 日 広島
- (13) 村上千穂 金田一智規 大橋晶良
青井義輝
「難培養性微生物の増殖活性化に寄与する異種間相互作用」
第 1 回環境微生物系学会合同大会 2014
2014 年 10 月 21-24 日 浜松
- [その他]
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sust6aoi/ja/styled-4/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 千穂 (MURAKAMI, Chiho)
広島大学・大学院工学研究科・
日本学術振興会特別研究員 (RPD)
研究者番号：50649077

(2) 研究分担者

青井 議輝 (AOI, Yoshiteru)
広島大学・大学院先端科学研究科・准教授
研究者番号：40386636