

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650145

研究課題名(和文) 門レベルの系統群に分類される未培養環境微生物の分離培養ストラテジー

研究課題名(英文) Strategy for obtaining pure culture of candidate division microorganisms in the environments

研究代表者

金田一 智規 (Kindaichi, Tomonori)

広島大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10379901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は新規分離培養ストラテジーに基づいて、門レベルの分類系統群を構成する微生物群(Candidate division微生物群)を対象に分離培養を目的とするものである。活性汚泥を対象とした次世代シーケンス解析の結果、Candidate division TM7、OD1、SR1、BD1-5細菌群が比較的高頻度で検出されたため、対象細菌群とした。これらの細菌群の門レベルでの詳細な系統樹を作成でき、それに基づいて特異的なFISHプローブを設計することができた。TM7門に関してはMAR-FISH法によって増殖可能な有機物を特定することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, candidate phyla (TM7, OD1, SR1, and BD1-5), which were frequently detected using next generation sequencing for activated sludge samples. The phylogenetic tree at the phylum level could be constructed and FISH probes were newly designed and optimized. MAR-FISH analysis revealed the organic compound that TM7 bacteria can be utilized for their growth.

研究分野：土木環境システム

キーワード：群集・生態系多様性 微生物ダークマター

1. 研究開始当初の背景

環境中には分離培養され学名記載の報告はないが、16S rRNA 遺伝子に基づく系統分類では“門レベル”の分類系統群を構成する微生物群 (Candidate division 微生物群) が多く存在するといわれており、現在まで提案されている門のうち約半分は Candidate division 微生物群である。これらの細菌群は土壌、海洋、排水処理施設など様々な環境中から検出されているものの、分離培養の報告は数えるほどしかない。これは Candidate division 細菌群の最適培養条件(有機炭素源、温度、pH、好気/嫌気条件など)が不明なことが一因となっている。

申請者らの予備的調査の結果、Candidate division 微生物群のいくつかは下水処理場の活性汚泥内に高頻度で検出されることがわかっている。これらの微生物群は下水中の有機物を利用して増殖していると考えられるが、生理生態学的特性は不明である。一方で、海洋や土壌環境では温度、pH などが変動しやすいのに対し、下水処理場では流入・流出の総有機物濃度、水温、pH 等をモニタリングしており、有機物の種類および濃度以外の培養条件を設定しやすい。従って、対象微生物群が利用する有機物が分かれば、理想的な培養条件の構築が可能になる。

2. 研究の目的

活性汚泥内に高頻度で検出される Candidate division TM7, Candidate division OD1, Candidate division SR1 および Candidate division BD1-5 を対象細菌群とし、以下の分離培養戦略に基づき2年間で純粋培養系の獲得を目指す。

- (1) 対象細菌群の 16S rRNA 遺伝子配列からプローブを設計し、FISH 法により可視化する。
- (2) MAR-FISH 法により対象細菌群の有機物利用特性を把握し、最適培養条件を探索する。
- (3) スポンジ/不織布を担体としたバイオリアクターにより高濃度集積培養を行う。
- (4) 新規分離手法により対象微生物を選択的に分離し、純粋培養系を獲得する。

3. 研究の方法

(1) 対象細菌群の系統解析と FISH 法による可視化

複合微生物系の中から目的とする細菌群を観察する FISH 法に必要な蛍光プローブを設計するために、対象細菌群の系統樹を構築する。対象とする Candidate division 細菌群の塩基配列はデータベースに多数登録されているが、実際にどの種が活性汚泥内に存在しているか把握する必要がある。そこで予備的調査から対象細菌群の存在が確認されている広島大学近辺の下水処理場の活性汚泥から DNA を抽出し、各門レベルに特異的なプライマーセットを設計し、16S rRNA 遺伝子

配列に基づいた系統樹をクローニングにより作成する。ここで敢えて次世代シーケンサーによる網羅的解析を用いない理由は次の FISH 法で必要となるプローブの設計には 16S rRNA 遺伝子の全長を決定した方が望ましいからである。得られた塩基配列に基づき、蛍光プローブの設計を行い、特異的検出ができるようにホルムアミド濃度などの条件を最適化する。もし、通常の FISH 法で検出できない場合は、二重蛍光標識プローブなどのより高感度 FISH 法の適用を行う。

(2) MAR-FISH 法による対象細菌群の増殖可能有機炭素源の特定

次に複合微生物系において対象細菌の特異的検出が可能になったあと、放射性同位元素標識された有機物をトレーサーとした MAR-FISH 法により増殖が可能な有機炭素源を特定し、最適培養条件を決定する。放射性同位元素は高感度で測定できるために培養時間は2時間程度でよく、培養期間中で特定の微生物が優占化するというバイアスがなく、活性汚泥微生物の各構成比を維持したまま、目的とする微生物の有機物利用特性を把握することができる。放射性標識された有機物を菌体内に取り込んだ細胞の表面には銀粒子が形成され、明視野で容易に観察できることから、FISH 法の蛍光視野と組み合わせることで目的とするグループの特定と有機物利用特性が把握できる。

本研究では下水中に含まれていると考えられる有機物のうち、実際に販売されているモノマー化された単糖類、低分子有機酸、アミノ酸、アルコール、脂肪酸等の10種類の放射性トレーサーを用い、好気・嫌気条件下で MAR-FISH 法を行う予定である。得られた増殖可能な有機物の利用特性と下水処理場の水質データ(温度、pH、活性汚泥濃度、溶存酸素濃度)から回分培養試験を行う。ここでの培養パラメータとしては有機物の種類と濃度のみであり、他のパラメータは活性汚泥の環境と一致させる。一定期間培養後、①で設計したプライマーセットを用いた定量 PCR 法を用いて、(1)対象細菌群が実際に培養前後で増えたかどうか、(2)全細菌に対する対象細菌群の割合は増加したかどうかを評価項目として、最適培養条件の決定を行う。

(3) 対象細菌群のバイオリアクターによる高濃度集積培養

Candidate division 細菌群の培養が難しい理由として、基質親和性が高く、活性汚泥内ではごく微量の有機物を摂取して増殖していることが想像される。このため、最適培養条件に基づき、対象細菌群が他の細菌よりも優占化する条件でバイオリアクターを運転する。

本研究で用いるバイオリアクターは、微生物の高濃度保持が可能な不織布を担体としたカラムリアクター、もしくは、スポンジを担体とした散水床型のリアクターを用いる。他の微生物の混入(コンタミ)を防ぐ目

的と、できるだけ高流量で基質供給を可能にするために、バイオリアクター体積は 50 mL 程度の小規模なもので行う。この時、対象細菌群の優占度 80%以上を目標とする。これまでに低濃度基質を連続供給した不織布カラムリアクターで嫌気性アンモニア酸化細菌の高濃度集積培養、スポンジを担体とした散水床型リアクターで亜硝酸酸化細菌の集積培養、メタン酸化細菌の集積培養に成功しており、本研究の集積培養がうまく行かない場合は、これらの経験・運転ノウハウに基づき、運転方法の改良を行う。

(4) 対象細菌群の選択的分離と純粋培養

複数の種類の微生物が含まれるサンプルをセルソーターに供試し、2種類の散乱光の強度比(大きさの指標となる前方散乱光、および構造の複雑さの指標となる側方散乱光)に基づいて分画し、細胞の構造、大きさ、形状などの形態学的な特異性に基づいて目的の微生物を選択的に分離する。その際、FISH解析を分画したサンプルに対して行うことで、対象微生物群だけが含まれる分画(ソーティングエリア)を導き出す。

4. 研究成果

(1) 対象細菌群の系統解析と FISH 法による可視化

活性汚泥を対象とした次世代シーケンス解析の結果、Candidate division TM7、OD1、SR1、BD1-5 細菌群が比較的高頻度で検出された。これらの4門を対象に特異的プライマーセットを用いてクローニングを行い、詳細な系統樹を作成できた。各系統樹を用いて、門全体を対象としたプローブおよび高頻度で検出される優占的なクローンを対象とした FISH プローブを ARB ソフトを用いて設計した。プローブの評価は ARB ソフトを用いた特異性の検索、アクセス効率、mathFISH による熱力学的検討により行った。いくつかのプローブ候補を選定したのち、clone-FISH 法により最適ホルムアミド濃度を決定した。本研究により、Candidate division TM7、SR1、BD1-5 細菌群を対象とした FISH プローブを設計することができた。

(2) MAR-FISH 法による対象細菌群の増殖可能有機炭素源の特定

門全体を対象としたプローブおよび高頻度で検出される優占的なクローンを対象とした FISH プローブを設計・最適化できた TM7 門に対して MAR-FISH 法を適用した。好気条件、無酸素条件(脱窒条件)および嫌気条件のいずれの条件においても TM7 細菌群はグルコースおよび N アセチルグルコサミンを取り込むことが明らかとなった。これにより、有機物の中でも糖を主に利用する細菌群であると考えられる。

(3) 対象細菌群のバイオリアクターによる高濃度集積培養

活性汚泥中の TM7 細菌群の糖を用いた増殖を確認するために、まず回分試験をおこなった。増殖の確認は定量 PCR 法により確認した。温度・pH・糖濃度などを変化させて回分培養を行った結果、有機物はグルコース、有機物濃度は微生物濃度 10 mgSS/L に対して 0.2 mM、培養期間は 2 日、培養温度は 25 °C、pH は 6.0 の条件が最も増殖が確認された。また、活性汚泥内で他の微生物代謝産物を分解している報告もあるため、培地成分を下水処理水としては培養も行った結果、通常の合成培地よりも増殖が見られた。しかしながら、植継培養については現段階で TM7 細菌群の集積を行うことはできていないため、連続式リアクター培養を含めた新たな培養方法を検討していく必要がある。

(4) 対象細菌群の選択的分離と純粋培養

セルソーターを用いた複合微生物系からの目的細菌の分離は、100 μm 程度の微生物塊(マイクロコロニー)を形成する亜硝酸酸化細菌やアナモックス細菌の分離においては成功している。本研究で対象とする TM7 細菌群は糸状性を示し、SR1 細菌群や BD1-5 細菌群は微小な球状コロニーを示すことが FISH 法の観察により明らかとなっている。したがって、ある程度の集積培養が達成できれば、存在形態や大きさをパラメータとしてセルソーターによる分離ができると考えられるが、そこまで到達できなかった。

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1件)

1. Tomonori Kindaichi, Shiro Yamaoka, Ryohei Uehara, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi, Mads Albertsen, Per H. Nielsen, Jeppe L. Nielsen.
Phylogenetic diversity and ecophysiology of candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge.
FEMS Microbiology Ecology, Vol. 92, No. 6, pp. 1-11. (2016 Jun.)査読有り
DOI: 10.1093/femsec/fiw078

[学会発表](計3件)

1. 上原 亮平, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良.
活性汚泥中に存在する糸状性細菌 Candidatus Saccharibacteria の集積培養.
第 49 回日本水環境学会年会, 3-G-10-4. (2015.3.16-18) 金沢.
2. 上原 亮平, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良.
Candidatus Saccharibacteria の生理学的特性の解析と分離培養の試み.
環境微生物系学会合同大会 2014, P13-1. (2014.10.21-24) 浜松.

3. Simon McIlroy, Takanori Awata, Marta Nierychlo, Aaron Saunders, Mads Albertsen, Anna Szyszka, Piotr Starnawski, Tomonori Kindaichi, Jeppe Nielsen, Per Nielsen.
Ecophysiology of novel core phylotypes in activated sludge wastewater treatment plants with nutrient removal.
15th International Symposium on Microbial Ecology (isme15), PS08.279A.
(2014.8.24-29) ソウル(韓国)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田一 智規 (KINDAICHI TOMONORI)
広島大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：10379901

(2) 研究分担者

青井 議輝 (AOI YOSHITERU)
広島大学・サステナブル・ディベロップメント実践研究センター・特任講師
研究者番号：40386636