

広瀬川河川水からの *Bacillus* 属細菌捕食性原生動物の単離・解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○須藤真志
東北学院大学 工学部 正会員 中村寛治

1. 背景および目的

広瀬川河川中には、原生動物が生息しており、外来細菌を導入した場合、原生動物によって外来細菌が捕食されることが分かっている¹⁾。しかしながらこれらの原生動物は単離されていないため、捕食に関する正確なデータを得るには限界がある。そこで本研究では、広瀬川河川水中に生息する捕食性原生動物を単離し、その原生動物の解析を行った。

2. 実験材料および方法

2-1 添加細菌及び利用河川水

捕食実験に使用する特定細菌として、16S rRNA遺伝子の塩基配列が *Bacillus* sp. LD153 と 100% の相同性を示した *Bacillus* 属細菌 (以下、BY細菌) を選出した¹⁾。また、本細菌を添加するために利用した河川水は、図-1 に示す仙台市広瀬川のサンプリングポイント (Sp) 2 箇所所で採水した。(Sp1 作並川崎、Sp2 大橋)



図-1 広瀬川サンプリングポイント場所

2-2 捕食実験による原生動物の単離

捕食実験ではLB培地で調整したBY細菌 0.15mL を試験管に入れ、4.85 mL の河川水 (Sp1、Sp2) を添加し、180 rpm、20°C で振盪培養を行った¹⁾。600 nm での吸光度 (A_{600}) を測定し、値が初期値 (0.2 に設定) の 20% 以下になった時点で、サンプル中で優占化した捕食性原生動物を希釈法により単離した。サンプル原液から 10 倍段階希釈液 ($10^{-1} \sim 10^{-6}$) を作成した。BY細菌 0.15mL、Nutrient broth soyotone yeast extract inorganic basal medium²⁾ (以下、NSY-IB) 4.75mL を試験管に入れ、0.1mL の段階希釈液 ($10^{-1} \sim 10^{-6}$) を各段階ごと 3 本に添加し、180rpm、20°C で振盪培養を行った。濁度が低下した最大希釈域

の培養液を選出した。この操作を繰り返し、原生動物を単離した。本サンプルからのDNA抽出手順は既報の論文¹⁾に従った。

2-3 単離した原生動物による捕食実験

BY細菌をNSY-IBに懸濁し A_{600} を 0.2 に調整した 5mL の菌懸濁液を試験管に入れ、原生動物を単離したサンプル 0.01mL を加え、180 rpm、20°C で振盪培養を行い、捕食が起こるかを確認した。吸光度が初期値の 20% 以下になった時点でDNA抽出を行った。

2-4 T-RFLP 解析

抽出DNAを基にプライマーとして M-Euk82ff (5'-AAACTCGCGAATGGCTCAT-3', 5' 末端 6-FAM 標識)、M-MedlinBN (5'-ATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3', 5' 末端 NED 標識) を用いての 18S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。反応条件は前熱処理 (94°C, 1 分) の後、第 1 段階 (94°C, 20 秒)、第 2 段階 (58°C 30 秒)、第 3 段階 (72°C, 1 分 40 秒) を 30 サイクル繰り返し、後伸長反応 (72°C, 7 分) を行った。プライマー除去後、PCR 産物を制限酵素 (*Bst* U I) で切断し、脱塩処理を行った。その後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer により Gene Mapper モードで解析し、Terminal Restriction Fragment (T-RF) のピークデータを取得した。

2-5 18S rRNA 遺伝子の取得および解析

T-RFLP 解析の後、前項と同様のプライマー (蛍光標識はなし) および PCR 条件で 18S rRNA 遺伝子を増幅し、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列データはインターネット上で National Center for Biotechnology Information (NCBI) に送付、近縁種を決定し、加えて DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にて Clustal W による系統解析を行った。

2-6 qPCR による 18S rRNA 遺伝子の定量

単離した原生動物による細菌の捕食を確認するために、2-3 項で得たDNAを基にサンプル中の 18S rRNA 遺伝子を qPCR (quantitative real-time PCR) 法によって定量した。18S rRNA 遺伝子検出用プライマーペア¹⁾ を利用した。測定には LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic 社製) を使用し、運転条件は既報の論文¹⁾に従った。

キーワード 単離 18S rRNA 遺伝子 原生動物

連絡先 中村 寛治 (宮城県多賀城市中央 1-13-1) 022(368)7045

3. 実験結果および考察

3-1 T-RFLP 解析結果

単離した2種類の原生動物(以下、Sp1由来の原生動物をPtz1、Sp2由来の原生動物をPtz2とする)より抽出したDNAを基に、図-2のT-RFLP解析結果を得た。どちらの単離原生動物もピークが1本だけ出現したため、それぞれ1種類の原生動物が分離できたと推測される。また互いにピーク出現位置が1bases以内と極めて近く、捕食者は系統学的に近縁であることが予想された。

3-2 近縁種の決定および系統解析結果

NCBIによる解析結果から、Ptz1は*Spumella obliqua*、Ptz2は*Spumella sp.* Mbc_3Cに近縁な原生動物であることが明らかとなった。また以前、広瀬川河川水で得られた18S rRNA遺伝子のクローンと共に系統樹を作成したものを図-4に示す。解析結果より単離した原生動物は極めて近縁な関係にあることがわかり、過去*Bacillus*属細菌を添加した捕食実験で出現した原生動物¹⁾とも近縁な関係にあることがわかった。

3-3 qPCRによる18S rRNA遺伝子の定量

単離した原生動物をBY菌に添加し培養した所、濁度の減少が見られた。そのため単離した原生動物を使用した捕食実験において、原生動物の増殖を確認した。原生動物を単離したサンプル0.01mLをBY菌に添加した時点と、その後、BY菌が捕食され吸光度が初期値の20%以下になった時点での、サンプル中の18S rRNA遺伝子をqPCRによって定量し、比較した。測定した18S rRNA遺伝子の濃度変化を図-3に示す。図より、原生動物添加時と捕食後の18S rRNA遺伝子のコピー数に、2オーダー以上の差が確認された。つまり捕食によって原生動物の個体数が増加したと推察された。

今後は単離した原生動物を使用して原生動物1個体あたりの18S rRNA遺伝子コピー数、収率の算出、原生動物1種あたりの捕食の多様性などを検討していく。

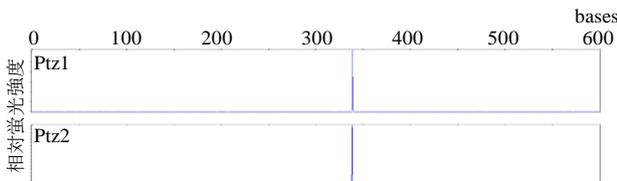


図-2 単離した捕食性原生動物のT-RFプロファイル

4. 結論

1. バチルス属細菌であるBY菌を捕食する原生動物2種類を広瀬川河川中から希釈法によって単離することができた。

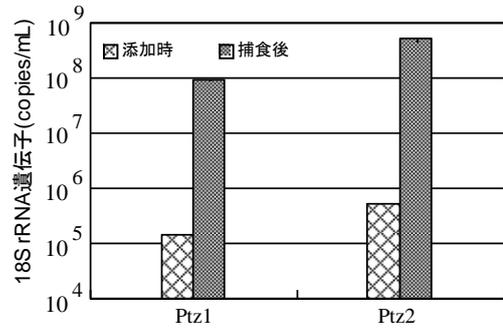


図-3 単離を行った原生動物の18S rRNA遺伝子のコピー数の変化

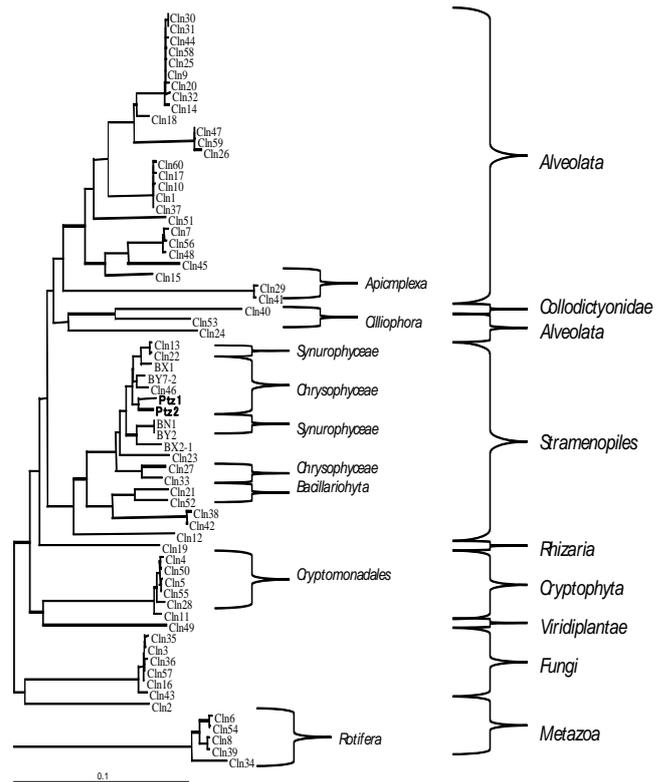


図-4 単離した原生動物の18S rRNA遺伝子の系統学的位置(Ptz:単離した原生動物 Cln:広瀬川河川で得られたクローン¹⁾ BX, BY:過去の捕食実験で出現した原生動物¹⁾)

2. 単離した原生動物をBY菌に加え培養した所、濁度の低下が見られ、それに伴ない18S rRNA遺伝子のコピー数が著しく増加した。
3. 単離した原生動物からDNAを抽出し、18S rRNA遺伝子を増幅させ、系統解析を行った結果、どちらのSpで単離した原生動物も互いに近縁で*Spumella*属の鞭毛虫であることが明らかとなった。

(参考文献)

- 1) 環境工学研究論文集 Vol. 46, 2009, P511
- 2) AEM Vol. 69, 2003, P1442