

(61) *Bacillus*属細菌を捕食する 河川中の原生動物の解析

須藤 真志¹・高野 智博²・中村 寛治^{1,2*}

¹東北学院大学大学院工学研究科 (〒985-8537 宮城県多賀城市中央一丁目13-1)

²東北学院大学工学部環境建設工学科 (同上)

* E-mail: knaka@jcc.tohoku-gakuin.ac.jp

グラム陽性細菌である*Bacillus*属細菌を利用して、広瀬川河川水中に生息する細菌捕食性原生動物の存在を調査した。広瀬川の上流から下流までの8ヶ所のサンプリングポイント(Sp)を設定し、河川水を採水、*Bacillus*属細菌を添加して、捕食実験を行った。その結果、すべてのSpにおいて捕食者は存在し、18S rRNA遺伝子の塩基配列の解析から、ほとんどのSpでStramenopilesのChrysophyceaeに属する鞭毛虫が本細菌を捕食したことが明らかとなった。これらの鞭毛虫の中には、過去にグラム陰性細菌である*Cupriavidus necator* KT1株を捕食した鞭毛虫と18S rRNA遺伝子の塩基配列が100%一致するものもあり、本系統の原生動物が、河川中で細菌の捕食者として一定の役割を果たしていることが示唆された。

Key Words : *Bacillus*, grazing, 18S rRNA, stramenopiles, river water, flagellate

1. はじめに

Bacillus 属細菌は自然界に広く分布しているグラム陽性細菌である。その中で、*Bacillus cereus* は食中毒を引き起こし、*Bacillus anthracis* は炭疽の原因菌であり非常に危険な細菌である。しかしながら、多くの *Bacillus* 属細菌は人に無害であり、納豆菌は食用となる。また、*Bacillus thuringiensis* は微生物農薬として利用され、*Bacillus subtilis* は臭気物質の分解を初めとし、環境浄化の分野で幅広く利用されている。

実際に商品化され、浄化に利用されている *Bacillus* 属細菌 (あるいは *Bacillus* 属細菌を主成分とする) は数多くあり、特に臭気物質分解への適用例は多い。これらの製品の中には、担体に固定化され、河川や湖沼の水質浄化に利用されているものもある。一方、河川中に生息する細菌群集の解析に関しては、数多くの研究例があり、16S rRNA 遺伝子の取得、解析も行われている¹⁾²⁾。しかしながら、*Bacillus* 属細菌は主要な構成細菌として検出されていない。*Bacillus* 属細菌の生息域は主として土壤中であり、河川中に定着することは稀であるのかも知れない。

Bacillus 属細菌のような分解能力に優れた細菌が、水質改善のために特定細菌として河川等の水環境に放出された場合、長く生存し、その分解能力が発揮されること

が望ましい。しかし、一方では、その様な外来細菌は速やかに数を減少させることが、微生物生態系保全の観点からは望ましい。何れにせよ、環境中での具体的な挙動を把握し、その理解に基づいて利用していくことが求められるが、関連する知見がほとんど存在しないのが現状である。

そこで、我々は *Bacillus* 属細菌が一般的な水環境である河川中に添加された場合の挙動を、実際の河川水を使用して調査した。河川水中には細菌捕食性の原生動物が存在しており、それらの原生動物による捕食を想定して実験を進めた。実験に利用する *Bacillus* 属細菌は、実際に商品化され、市場で流通している商品から分離した。また、河川中の原生動物を想定し、過去にグラム陰性細菌である *Cupriavidus necator* KT1 株を利用した捕食実験³⁾で、既に細菌捕食性原生動物の存在が確認されている広瀬川河川水を利用した。

2. 実験方法

2.1 本研究で使用した *Bacillus* 属細菌

本研究では、2種類の *Bacillus* 属細菌を使用した。1種類はA社から商品化されている、ブロック状の固定化

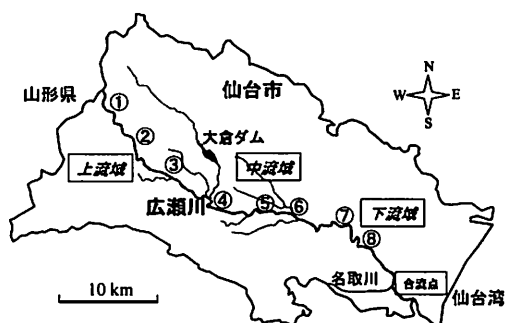


図-1 広瀬川サンプリングポイント

剤に埋め込まれている *Bacillus* 属細菌で、ブロックから少量の破片を取得し、それを LB 培地 (Difco 社製 Tryptone 10 g, Difco 社製 Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, 蒸留水 1 L 中, pH 7.0) 中に浸漬し、200 rpm, 30℃で一晩振とう培養を行った。その後、培養液を希釈した上で LB 寒天培地 (1L の LB 培地に 30 g のナカライテスク社製の精製寒天末を添加) に塗布し、コロニーを形成させた (30℃, 1 日)。生育したコロニーは LB 寒天培地上で 2 回画線培養を繰返し、純化を行った。もう 1 種類は B 社から商品化されているもので、排水中の油脂成分の低減、活性汚泥処理における発生汚泥量の低減に利用されている。高濃度の液体タイプの商品を購入し、本液を希釈して LB 寒天培地に塗布し、30℃で一晩培養し、コロニーを形成させた後、2 回画線培養を繰返し、純化を行った。この様に純化された *Bacillus* 属細菌はそれぞれ、A 社の製品由来の BX 細菌、B 社の製品由来の BY 細菌とした。

22 河川水の採水

Bacillus 属細菌の捕食実験を行うため、仙台市内を流れる広瀬川の河川水を利用した。上流域から下流域までなるべく等間隔になるように、合計 8ヶ所のサンプリングポイント (Sp) を設定した。図-1 に 8ヶ所の Sp (①～⑧) を示す。Sp の名称は、Sp1: 源流域, Sp2: 相生橋, Sp3: 作並川崎, Sp4: 苦地橋, Sp5: 開成橋, Sp6: 生瀬橋, Sp7: 大橋, Sp8: 宮沢橋である。採水は 2008 年 10 月 18 日に行い、採水後 8 時間以内に実験に使用した。採水時、降雨はなかった。また、採水日の過去 1 週間の作並観測所 (国土交通省雨量観測所、図-1 の上流域) における累計雨量は 0mm であった。

23 捕食実験

被食者の *Bacillus* 属細菌の培養には、LB 培地を利用し、200 rpm, 30℃で一晩振とう培養を行った。その後、ろ過滅菌 (MILLIPORE 社製、マイレックス、孔径 0.22 μ m) し

た河川水 (上記の図-1 の Sp1 より 2008 年 8 月 8 日に採水) で 2 回洗浄 (11,100×g 5 min, 4℃で集菌し、上澄みを捨て、河川水に懸濁) し、最終的に滅菌河川水に懸濁、一晚、200 rpm, 20℃で振とう培養した後、使用した。捕食実験では、用意した *Bacillus* 属細菌適量を滅菌試験管に入れ、河川水を添加して、吸光度計 (タイテック社製、Mini photo 518R) にて 600 nm での吸光度 (A_{600}) が約 0.2 (5×10^7 cells/mL) になるように調整し、180 rpm, 20℃で振とう培養を行った。これまでの研究から広瀬川河川中には $10^5 \sim 10^6$ cells/mL オーダーの細菌が生息していることが確認されており⁴⁾、添加濃度は河川中の細菌数より 1~2 オーダー高い値である。 A_{600} の値が初期値の 20%以下になった時点で、デジタルカメラ (ZEISS 社製 AxioCam MRC5, AxioVision Rel.4.6) を装着した蛍光顕微鏡 (ZEISS 社製 Axio Imager.A1) の位相差モードで観察、撮影した。その後、培養液から DNA を抽出した。河川水や捕食実験後の試料からの DNA 抽出は既報³⁾に示したとおりに行った。試料中の細菌、真核生物等をフィルターに捕捉し、SDS 処理、Bead Beater 処理を行った。抽出した DNA は 50 μ L の TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) に溶解した。また、本研究で解析対象とした真核生物は肉眼では確認できない微小真核生物であり、その他の大型真核生物は含まれない。

24 16S rRNA 遺伝子の取得および解析

2 種類の *Bacillus* 属細菌、BX 細菌、BY 細菌の 16S rRNA (Small Subunit rRNA) 遺伝子の塩基配列を決定するため、LB 培地で培養した細菌から、23 に示した方法に準じて DNA を抽出した。DNA をテンプレートに、細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。この際、プライマーペアは表-1 に示す Bact9f, Bact1492r⁹⁾を使用した。DNA ポリメラーゼは Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) を使用し、反応容量は 25 μ L とし、プライマーの濃度は 0.2 μ M (以下、全ての PCR 反応で本濃度) とし、他の成分の組成は全て添付マニュアルに従った。PCR 反応は、Pre-heating: 94℃, 2 分に続き、第 1 段階: 94℃, 20 秒, 第 2 段階: 55℃, 30 秒, 第 3 段階: 72℃, 90 秒を 30 サイクル繰返し、Post extension: 72℃, 7 分を行った。塩基配列の決定には、マイクロスピナラム S-300 HR (GE Healthcare 社製) でプライマーを除去した PCR 産物をそのまま使用し、プライマーウォーキング法で、DNA シーケンシング用試薬、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems 社製) により、添付マニュアルに従って反応、処理を行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) で両方向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

表-1 本研究で使したプライマー

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	長さ (bases)	18S rRNA遺伝子中の位置*	文献
(18S rRNA遺伝子増幅・解析用)				
Ek-SSU-83f	AAA CTG CGA ATG GCT CAT	18	83-100	本研究
Ek-SSU-558f	GCC GCG GTA ATT CCA GCT	18	558-575	本研究
Ek-SSU-1253f	TGG TGG TGC ATG GCC G	16	1253-1268	本研究
Ek-SSU-551r	ATT ACC GCG GCT GCT GGC	18	568-551	本研究
Ek-SSU-1254r	GAA CGG CCA TGC ACC ACC	18	1271-1254	本研究
Ek-SSU-1763r	ATC CTT CTG CAG GTT CAC CTA C	22	1784-1763	本研究
(18S rRNA遺伝子検出用)				
Ek-SSU-412f	GCA GCA GGC GCG YAA ATT (Y=C:T)	18	412-429	本研究
Ek-SSU-546r	GCG GCT GCT GGC ACC AG	17	562-546	本研究
(16S rRNA遺伝子増幅用)				
Bact 9f	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G (M=C:A)	19	—	4
Bact1492r	ACG GYT ACC TTG TTA GGA CTT	21	—	4
(インサートDNA増幅用)				
pKNA-fl	GTG AGC GAG GAA GCG GAA GA	20	—	本研究
pKNA-rl	AAG GGC GAC ACG GAA AT	17	—	本研究

*Type Strain - *Ochromonas danica* 18S rRNA gene (Accession No: M32704)での位置

付, 近縁種を決定した。

25 18S rRNA 遺伝子の取得および解析

抽出 DNA をテンプレートに, 表-1 の Ek-SSU-83f (Euk-82F⁹)の3'側に AT を付加) と Ek-SSU-1763r (Medlin B⁷)の5'側の2 base を削除) のプライマーペアを使って真核生物の 18S rRNA (Small Subunit rRNA) 遺伝子を PCR 増幅した。酵素は増幅時のエラーの少ない DNA ポリメラーゼ Prime STAR (タカラバイオ社製) を使用し, 反応容量は 25 μ L とした。PCR 反応は, Pre-heating: 94°C, 2 分につき, 第1段階; 94°C, 20 秒, 第2段階; 58°C, 15 秒, 第3 段階; 72°C, 100 秒を 30 サイクル繰り返し, Post extension; 72°C, 7 分を行い, マイクロスピンカラム S-300 HR でプライマーを除去した。本 PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行い, 塩基配列を決定できた場合は, その塩基配列を解析に使用した。複数の 18S rRNA 遺伝子が混在するため波形データが読めず, クローン取得が必要な場合は, 引き続き dA の付加反応を行った。反応は, 適量のサンプルを Ex Taq Hot Start Version で処理した。この時, 添付 Buffer の他は dNTP のみを添加し, 94°C, 2 分に引続き, 72°C, 10 分で反応を行った。引き続きマイクロスピンカラム S-300 HR で精製した後, TA クローニング用のプラスミドベクター-pKNA90XT により挿入し, 形質転換体を取得した。pKNA90XT は pKNA80⁹ (pTtr99A 由来) のマルチクローニングサイト内の *Eco*RI~*Hind*III までを切り出し, 2ヶ所の *X*cmI サイトを有する DNA 断片に置き換えたプラスミドベクターである。置換 DNA 断片は, AATT (*Eco*RI サイト用) リンカー

に CCATGATTATCGTGG CCACGATAATCATGG を繋ぎ, 反対鎖に TCGA (*Hind*III サイト用) リンカーを付けたものである (アンダーライン部分が *X*cmI サイト)。プラスミドは *X*cmI で切断後, 切断片を除去して使用した。

得られた形質転換体のコロニーは, 滅菌した爪楊枝で少量採取し, 10 μ L の TE が入った PCR チューブに懸濁させ, 95°C, 2 分で処理, プラスミドの熱抽出を行った。本抽出物をテンプレートに, プラスミドに 18S rRNA 遺伝子のクローンが挿入されていることを確認するため, pKNA90XT の挿入部の上・下流の塩基配列から, 表-1 の pKNA-fl, pKNA-rl をデザインし, プライマーペアとして使用した。PCR 反応には Ex Taq Hot Start Version を使用, Pre-heating: 94°C, 2 分につき, 第1段階; 98°C, 10 秒, 第2段階; 60°C, 30 秒, 第3段階; 72°C, 90 秒を 30 サイクル繰り返しした。1種類のサンプルについて8個の18S rRNA 遺伝子クローンを取得した。PCR 増幅産物は, マイクロスピンカラム S-300 HR で精製後, まず Ek-SSU-83f で約 750bases の塩基配列を決定し, グループ分けを行った。各グループについて, 1つの代表クローンを選出し, PCR 増幅に利用した Ek-SSU-1763r に加えて, これまでの 18S rRNA 遺伝子解析から独自にデザインした4種類のユニバーサルプライマー, Ek-SSU-558f, Ek-SSU-1253f, Ek-SSU-551r, Ek-SSU-1254r (表-1) を使って全塩基配列を両方向から決定した。決定し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による全 18S rRNA 遺伝子の定量

捕食実験による原生動物の増加を確認するため、サンプル中の全 18S rRNA 遺伝子を qPCR (quantitative real-time PCR) 法によって定量した。プライマーペアとして表-1 の Ek-SSU-412f と Ek-SSU-546r を利用した。本プライマーペアは後述する図-6 の 18S rRNA 遺伝子クローン全てを検出できるように設計した。測定には LightCycler 2.0 (Roche Diagnostic 社製) を使用し、増幅された DNA を SYBR Green で検出する方法を選択した。運転条件は製品のマニュアルに従い検討し、以下のように設定した。初期変性; 95°C, 1 分, 温度変化 20°C/秒 (これは設定温度への変化速度を表す) に続き, PCR 増幅は第 1 段階; 95°C, 10 秒, 温度変化 20°C/秒, 第 2 段階; 60°C, 5 秒, 温度変化 20°C/秒, 第 3 段階; 72°C, 6 秒, 温度変化 20°C/秒を 45 サイクル繰り返した。サンプル 2 μ L に対して 0.5 U の Ex Taq Hot Start Version を使用し, SYBR Green I ($\times 10,000$ concentrate in DMSO, Cambrex 社製) を蒸留水で 1/5,000 に希釈したものを 0.6 μ L 添加した。また, 終濃度で, プライマー 0.5 μ M, dNTP 0.2 mM, $MgCl_2$ 2 mM, BSA 250 mg/L になるように添加し, 蒸留水を加えて反応液の全容量を 20 μ L とした。計測は 3 回行い, 平均値, 標準偏差を算出した。検量線作成のため, *Spumella-like flagellate* JBC07 の 18S rRNA 遺伝子 (Accession Number: AY651097) と同じ塩基配列を有するクローンを pKNA90XT に挿入し, 表-1 の pKNA-fl, pKNA-r1 で PCR 増幅し, スタンダードとして使用した。

2.7 T-RFLP 解析

河川水および捕食実験試料からの抽出 DNA をテンプレートに, 18S rRNA 遺伝子群の解析を Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 解析により行った。18S rRNA 遺伝子群の PCR 増幅のプライマーペアは Ek-SSU-83f, Ek-SSU-1763r で, Ek-SSU-83f の 5'末端は 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) で標識し, Ek-SSU-1763r の 5'末端は 2,7,8-benzo-5-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein (NED) で標識したもの (Applied Biosystems 社製) を, 酵素は Ex Taq Hot Start Version を使用した。PCR 反応は, 25 に示したとおりであるが, 58°C でのアニーリング時間は 30 秒とした。PCR 産物はマイクロスピナラム S-300 HR で精製後, 適量を制限酵素 *Bst*UI (New England Biolabs 社製) で切断し, Sephadex G-50 (GE Healthcare 社製) を蒸留水で膨潤させたものでろ過し, 脱塩処理を行った。その後, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer により Gene Mapper (Applied Biosystems 社製, Ver 3.7) モードで運転, 解析を行い, Terminal Restriction Fragment (T-RF) のピークデータ (0~600 bases の範囲) を取得した。T-RF ピークデータは 18S rRNA 遺伝子の 5'末端および 3'末端に関

して得られたが, 本研究では 5'末端の 6-FAM による解析結果のみを利用した。また, 内部標準には GeneScan500 ROX (ROX: 6-carboxy-X-rodamine, Applied Biosystems 社製) を利用した。

3. 実験結果

3.1 *Bacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子解析

決定した BX 細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は *Firmicutes* 中の *Bacillales* と位置付けられている, *Bacillus subtilis* (Accession Number: EU257436) と配列は 100% 一致した。また BY 細菌は *Firmicutes* 中の *Bacillales* と位置付けられている, *Bacillus* sp. LD153 (Accession Number: AM913923) と配列は 100% 一致した。この様に, 2 種類の商品には *Bacillus* 属細菌が含まれていることが確認できた。BX 細菌は細胞表面が疎水性を示し, 培養時には細かな塊状となった。一方, BY 細菌は親水性であり, 容易に水に懸濁した。

3.2 捕食実験

捕食実験に使用した河川水の水温, pH, 電気伝導度を表-2 に示す。これら 8ヶ所で採水した河川水を使って行った捕食実験における, *Bacillus* 属細菌の吸光度 A_{600} の経時変化を図-2 (A: BX 細菌添加系, B: BY 細菌添加系) に示す。図中の Control は Sp1 の河川水を 0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌したものであり, 細菌の吸光度の自然減衰を表している。BX 細菌では Sp 間の吸光度低下にある程度の差が生じ, プロットにばらつきが見られた。Sp1 では 9 日目, それ以外の Sp では 6 日目に初期の A_{600} 値の 20% 以下となった。BY 細菌は 3 日目に全 Sp で A_{600} が初期値の 20% 以下となった。総じて, BY 細菌の吸光度低下の方が著しかった。また, Control は, 各 Sp で A_{600} が初期値の 20% 以下となった時点で初期値の 65~70% 程度となり, 各 Sp での低下は Control に対して有意であることが分かる。顕微鏡による観察では, ほとんどの Sp で *Bacillus* 属細菌を捕食したと思われる 5~10 μ m の大きさの鞭毛虫が確認された。例として図-3 に BY 細菌添加系で出現した原生動物の写真を示す。これらの鞭毛虫は河川水に生息していたものであるが, *Bacillus* 属細菌添加前の河川水ではその濃度は低く, 顕微鏡下で見つけることはできない。*Bacillus* 属細菌の捕食によってその数を増やし, 観察できたものと推測する。

表-2 捕食実験に使用した河川水

採水地点	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8
水温 (°C)	11.0	13.8	13.0	14.1	14.1	14.6	15.2	15.8
pH	6.82	7.05	7.15	7.31	7.34	7.58	7.75	7.81
電気伝導度 (mS/m)	8.62	16.9	12.1	10.3	12.0	14.2	14.7	15.0

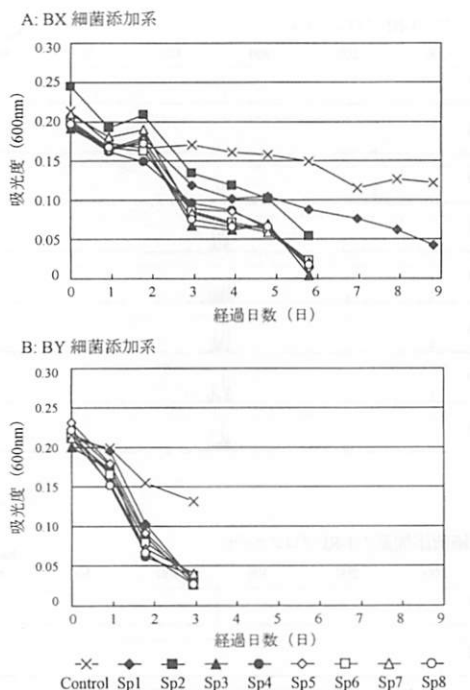


図-2 *Bacillus*属細菌添加系の吸光度経時変化
(A: BX細菌添加系, B: BY細菌添加系)

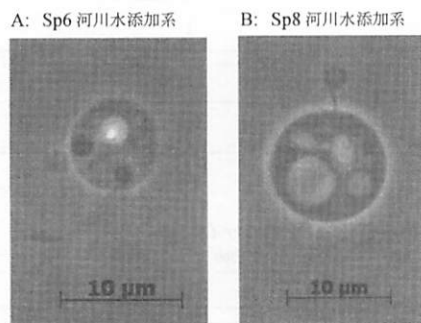


図-3 BY細菌添加系の出現原生動物
(A: Sp6河川水添加系, B: Sp8河川水添加系)

また、図-3の原生動物は後述する18S rRNA遺伝子クローン解析の結果（表-3）から、*Spumella*属に分類される原生動物に近縁と推測されるが、*Spumella*属は細菌捕食性で、図に示すような形態⁹⁾をしており矛盾はない。

3.3 qPCRによる全18S rRNA遺伝子の定量

前項の捕食実験において観察された原生動物の増殖を確認するために、捕食実験前後の全18S rRNA遺伝子を図-4に示すようにqPCRにより定量した。図-4Aに示した検量線より、 $10^1 \sim 10^7$ copies/tube までの幅広い範囲で良好

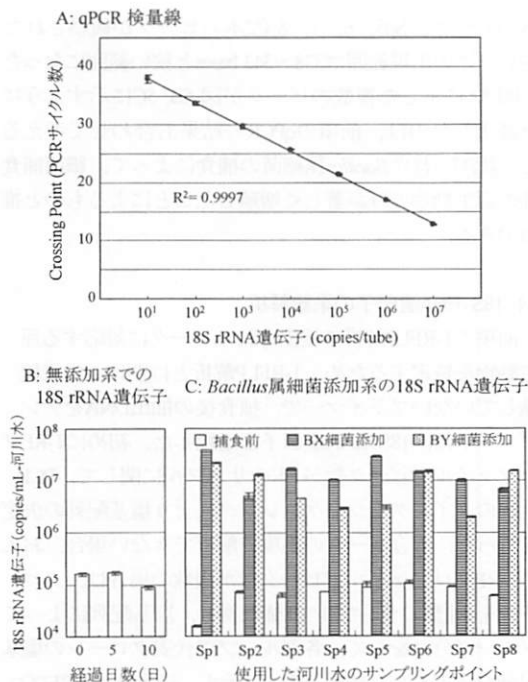


図-4 qPCRによる18S rRNA遺伝子の定量

(A: スタンダードによる検量線
B: 2008/6/18採水のSp5河川水無添加系の18S rRNA遺伝子
C: BX細菌, BY細菌添加系の捕食前後の18S rRNA遺伝子)

に定量できることが分かる。本手法により測定した捕食実験前後の18S rRNA遺伝子の濃度変化を図-4Cに示す。また、捕食実験に先立って、2008/6/18に採取したSp5の河川水を使用した、無添加系での18S rRNA遺伝子の濃度変化を図-4Bに示す。無添加系では18S rRNA遺伝子濃度は10日間ほぼ一定であった。一方、図-4Cに示すとおり、捕食前の河川水と比較して、捕食実験後では、平均して2オーダー程度18S rRNA遺伝子が増加し、捕食によって原生動物が増加した結果と推察された。

3.4 T-RFLP解析

捕食実験後サンプルからDNAを抽出し、これをテンプレートにT-RFLP解析を行った。また、実験に使用した捕食実験前の河川水のDNAも抽出し、同様にT-RFLP解析を行った。結果を図-5に示す。捕食前の河川水のT-RFプロファイルを図-5Aに示す。複数のピークが観察され、複数の真核生物が河川水中に存在したことが分かる。BX細菌添加系のT-RFプロファイルを図-5Bに示す。Sp1, 5, 6に関しては1本のピーク、Sp2, 7, 8に関しては2本のピーク、Sp3, 4では3本のピークが観察された。最も高い主ピークはSp3 (355.8 bases)を除いて340~345 basesの狭い範囲に集まった。次に、BY細菌添加系のT-RFプロファイルを図-5Cに示す。Sp1, 2, 3, 4と4サンプルで1

本のピーク, Sp5, 6, 7, 8で2本のピークが観察された。主ピークの出現範囲は338~343 basesと狭い範囲になった。

図-5Aに示した複数のピークが図-5B, 5Cに示すように単純化したのは, 前項のqPCRの結果も合わせて考えると, 添加された*Bacillus*属細菌の捕食によって, 細菌捕食性の原生動物のみが著しく増殖したことによるものと推察できる。

3.4 18S rRNA遺伝子の系統解析

前項のT-RFLP解析で検出されたピークに対応する原生動物を特定するため, T-RFLP解析とは別に, 蛍光標識していないプライマーで, 捕食後の抽出DNAをテンプレートに, 18S rRNA遺伝子を増幅した。初めにT-RFプロファイルでピーク数が1本のサンプルに関して, PCR産物のダイレクトシーケンシングにより塩基配列の決定を行った。混合ピークの出現で解析できない場合, およびT-RFプロファイルでピーク数が複数の場合は, クローンを1種類のサンプルで8個取得し, 塩基配列によってグループ分けをして, 各グループの代表クローンの塩基配列を決定した。結果を表3に示す。結果は, T-RFプロファイルでのピークに対応して整理した。6列目のピーク面積相対%は検出ピークが1本の場合は100となり, 複数の場合は, 最大ピークを100とし, 他はそれに対する割合を示している。観察されたT-RFピークの中で, 主ピークで無い6つのピークは対応するクローンが得られなかったが(表中グレーで表示), 残りの21のピークに関しては対応のクローンが得られた。最も多かったのは*Stramenopiles*に属するクローンで16, *Amoebozoa*に属するものが4, *Rizaria*に属するものが1となった。また, 16の主ピークに対応するクローンは15が*Stramenopiles*の*Chrysophyceae*に属し, 本分類の原生動物が両*Bacillus*属細菌の主たる捕食者であったことが分かる。

それぞれの被食者ごとに見てみると, BY細菌の捕食者は全て*Stramenopiles*の*Chrysophyceae*に属し, 系統的に極めて狭い範囲の原生動物に捕食されたことがわかる。これと比較し, BX細菌の捕食者は僅かに多様性を増し, 1例ではあるが, Sp3で*Rizaria*に属する原生動物が主となり, サブピークとしては4ヶ所のSpで*Amoebozoa*に属するものが検出された。2種類の*Bacillus*属細菌共にSp1~8までの間で検出された真核生物は系統的に似ており, 上流域と下流域では捕食者に大きな差は見られなかった。

取得クローンの解析結果を基に, ClustalWにより図-6に示す系統樹を作成した。河川中の微小真核生物中での系統学的な位置と範囲を把握するため, 2005年10月1日にSp5で採水された河川水から抽出されたDNAを基に得られた60個の18S rRNA遺伝子クローンの解析結果(片側のみの塩基配列決定でEk-SSU-83fとEk-SSU-1763で増幅さ

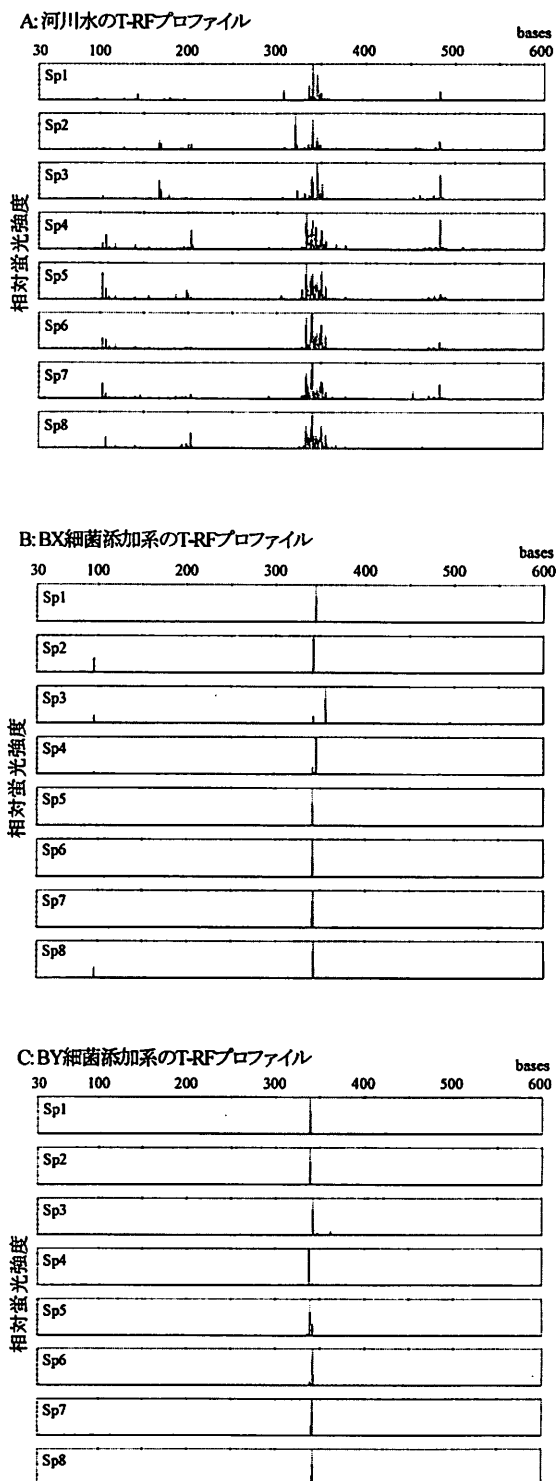


図-5 PCR増幅した18S rRNA遺伝子のT-RFプロファイル
(A: 河川水, B: BX細菌添加系, C: BY細菌添加系)

表-3 取得18S rRNA遺伝子クローンの解析結果

河川水 Sp名	被食者	T-RF ピーク 数	T-RF 理論値 (bases)	T-RF 計測値 (bases)	ピーク 相対%*	解析対象	決定 塩基配列 (bases)	NCBI最近縁 Accession No	大分類	最近縁種名	相同性 (%)	クローン 名**	Accession No
Sp1	BX細菌	1	345	344.9	100	PCR Product	1709	AY651097	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBM08	94	BX1	AB520716
Sp2	BX細菌	2	342	342.2	100	Sp2-Cln1	1662	AY651097	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC07	100	BX2-Cln1	AB520717
			99	95.4	38	Sp2-Cln2	1702	AF293895	Amoebozoa	Echinamoeba exundans	99	BX2-Cln2	AB520718
Sp3	BX細菌	3	356	355.8	100	Sp3-Cln6	1689	DQ243996	Rizaria	clone PCG5AU2004 18S rRNA	99	BX3-Cln6	AB520719
			99	95.5	22	Sp3-Cln2	1702	AY651098	Amoebozoa	Echinamoeba exundans	99	BX3-Cln2	AB520720
				342.0	21								
Sp4	BX細菌	3	345	345.1	100	Sp4-Cln3	1709	AY651095	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBM08	94	BX4-Cln3	AB520721
				341.3	19								
			99	95.6	8	Sp4-Cln1	1702	AF293895	Amoebozoa	Echinamoeba exundans	99	BX4-Cln1	AB520722
Sp5	BX細菌	1	341	340.8	100	Sp5-Cln7	1665	EF043285	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBM/S11	97	BX5-Cln7	AB520723
Sp6	BX細菌	1	341	341.3	100	Sp6-Cln1	1665	EF043285	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBM/S11	99	BX6-Cln1	AB520724
Sp7	BX細菌	2	342	341.8	100	Sp7-Cln2	1662	AY651097	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC07	100	BX7-Cln2	AB520725
				340.5	5								
Sp8	BX細菌	2	342	342.2	100	Sp8-Cln1	1662	AY651097	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC07	100	BX8-Cln1	AB520726
			99	95.5	29	Sp8-Cln4	1702	AF293895	Amoebozoa	Echinamoeba exundans	99	BX8-Cln4	AB520727
Sp1	BY細菌	1	338	338.1	100	PCR Product	1660	DQ388540	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC21	100	BY1	AB520728
Sp2	BY細菌	1	338	338.9	100	PCR Product	1660	DQ388540	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC21	100	BY2	AB520729
Sp3	BY細菌	1	342	342.2	100	Sp3-Cln3	1662	AY651097	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC07	100	BY3-Cln3	AB520730
Sp4	BY細菌	1	338	338.0	100	Sp4-Cln1	1660	AY651071	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBFA35	99	BY4-Cln1	AB520731
Sp5	BY細菌	2	338	338.9	100	Sp5-Cln1	1660	DQ388540	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC21	100	BY5-Cln1	AB520732
			341	341.9	35	Sp5-Cln3	1665	AY651079	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBAS36	99	BY5-Cln3	AB520733
Sp6	BY細菌	2	342	342.2	100	Sp6-Cln1	1662	AY651097	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC07	100	BY6-Cln1	AB520734
				338.7	9								
Sp7	BY細菌	2	341	341.9	100	Sp7-Cln1	1665	AY651079	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBAS36	99	BY7-Cln1	AB520735
				340.5	27								
Sp8	BY細菌	2	342	342.3	100	Sp8-Cln1	1662	AY651097	Stramenopiles	Spumella-like flagellate JBC07	100	BY8-Cln1	AB520736
				341.3	27								

*ピーク面積相対%: 最大ピークの面積を100とした場合の割合

**系統解析を行う場合の表記

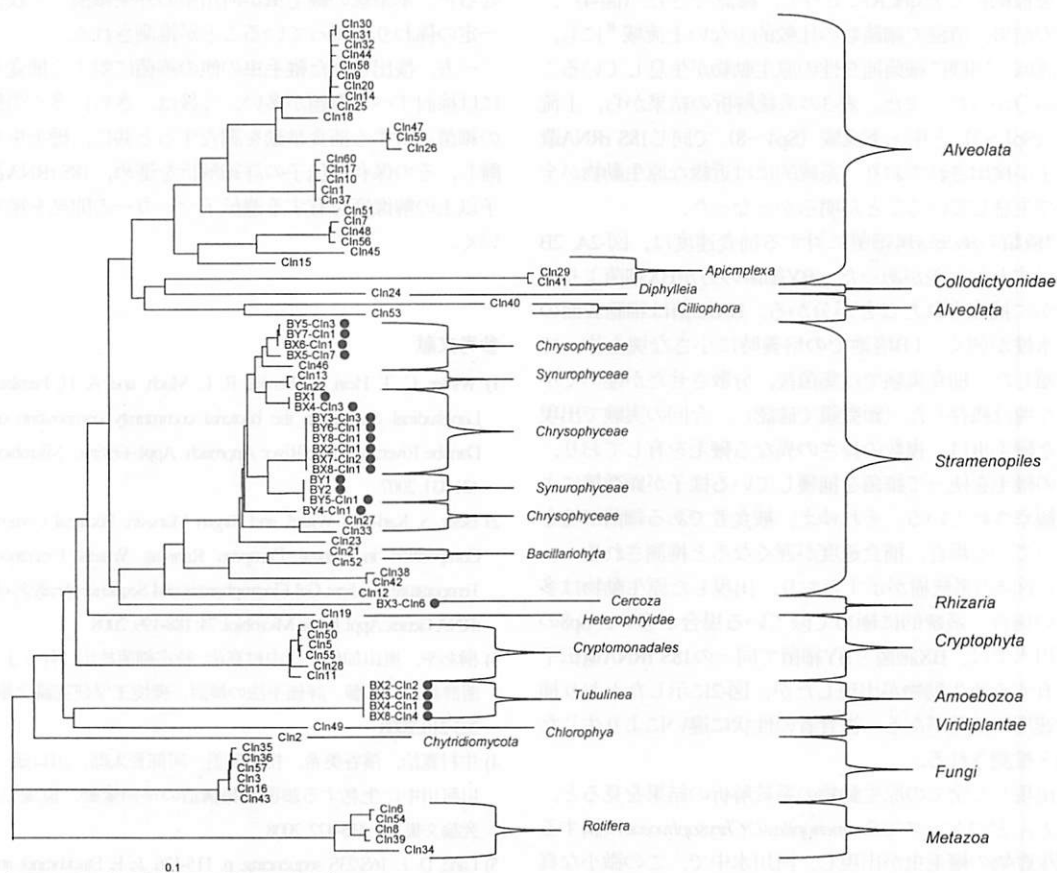


図-6 18S rRNA遺伝子クローンの系統学的位置
(系統樹は近隣接合法・Kimuraの方法により作成, ●は捕食実験からのクローン)

れた全域を決定)と共に、系統樹を作成した。河川中には、*Alveolata*, *Colodiciyonidae*, *Stramenopiles*, *Rhizaria*, *Cryptophyta*, *Amoebozoa*, *Viridiplantae*, *Fungi*, *Metazoa*と多様な微小真核生物が生息していることがわかる。その中で、本実験で主要な捕食性原生動物として検出されたものは系統的に非常に狭い範囲に分布している。また、2種類の*Bacillus*属細菌で主な捕食者として検出されているクローンの多くは*Stramenopiles*中で重なった位置にあり、系統学的に極めて似ている原生動物が両細菌を捕食したことがわかった。しかしながら、*Rhizaria*, *Amoebozoa*, はBX細菌の捕食実験のみでしか出現しておらず、両細菌で差も見られた。

4 考察

仙台市内を流れる広瀬川の上流から下流までの8ヶ所にSpを設けて河川水を採取、2種類の*Bacillus*属細菌を添加して、その挙動を調査した。

上流域から下流域の全てのSpの河川水で、添加した2種類の*Bacillus*属細菌の原生動物による捕食が起きた。また、捕食に伴う18S rRNA遺伝子の増加が、18S rRNA遺伝子を標的にしたqPCRによって、確認できた(図4)。その結果、清澄で細菌数の比較的小ない上流域⁹⁾にも、下流域と同様に細菌捕食性の原生動物が生息していることが分かった。また、表3の系統解析の結果から、上流域(Sp1~3)と中・下流域(Sp4~8)で同じ18S rRNA遺伝子が検出されており、系統的には近縁な原生動物が全域で生息していることが明らかとなった。

2種類の*Bacillus*属細菌に対する捕食速度は、図2A, 2Bに示すとおり差があった。BY細菌の方がBX細菌より速やかに捕食されたことが分かる。BX細菌は細胞表面の疎水性が強く、LB培地での培養時に小さな塊を作って増殖した。捕食実験では集菌後、分散させたが極めて小さな塊は残存した(顕微鏡で確認)。今回の実験で出現した鞭毛虫は、複数の長さの異なる鞭毛を有しており、この鞭毛を使って細菌を捕獲している様子が顕微鏡により観察されている。それゆえ、被食者である細菌が塊を作っている場合、捕食速度が遅くなると推測される。一方、図6の系統樹が示すとおり、出現した原生動物は多くの場合、系統的に極めて似ている場合が多い。Sp8の河川水では、BX細菌とBY細菌で同一の18S rRNA遺伝子を有する原生動物が出現したが、図2に示したとおり捕食速度には差がある。被食者の性状に違いにより生じた差と推測される。

出現した全ての原生動物の系統解析の結果を見ると、ほとんどのケースで*Stramenopiles*の*Chrysophyceae*に属する原生動物の鞭毛虫が出現し、河川水の中で、この微小な真核生物が*Bacillus*属細菌の捕食で重要な役割を果たしたと

推察できる。また、今回、複数回検出された*Spumella*-like flagellate JBC07と同じ18S rRNA遺伝子を有する原生動物は、過去、グラム陰性細菌である*Cupriavidus necator* KT1の捕食者としても検出されている⁹⁾。

これらの実験結果を、そのまま解釈すれば、*Spumella*-like flagellate JBC07と同じ18S rRNA遺伝子を有する鞭毛虫は多様な細菌を非常に速やかに捕食できる、という推測ができる。しかしながら、Boenigkらの研究では*Spumella*-like flagellate JBC07と、同一の18S rRNA遺伝子を有する3種類の鞭毛虫(他は*Spumella*-like flagellate JBNZ41, *Spumella*-like flagellate JBM10)を用い実験を進め、3種類の鞭毛虫では同一の被食者に対して捕食挙動が異なることを示している¹⁰⁾。つまり、18S rRNA遺伝子が同じであることは、必ずしも捕食挙動の一致にはつながらないことになる。それゆえ、18S rRNA遺伝子のレベルを越えた多様性があり、今後の検討課題である。

まとめると、今回の研究から、河川中に*Bacillus*属細菌が添加された場合、その捕食者として*Stramenopiles*の*Chrysophyceae*に属する鞭毛虫が出現し、*Bacillus*属細菌が捕食されることが明らかとなった。過去の事例⁹⁾もあわせると、本系統の鞭毛虫が河川中の外来細菌の生残性に一定の係わりを持っていることが推測される。

一方、検出された鞭毛虫の他の細菌に対する捕食挙動には検討すべき課題が多い。今後は、さらに多くの種類の細菌に対する捕食挙動を調査すると共に、鞭毛虫を単離し、その保有遺伝子の詳細解析を進め、18S rRNA遺伝子以上の解像度を有する遺伝子マーカーの開発を進めていく。

参考文献

- 1) Winter, C, T. Hein, G. Kavka, R. L. Mach, and A. H. Famleiner : Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a Whole-River Approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 421-431. 2007
- 2) Beier, S, Karl-Paul Witzel, and Jürgen Marxen: Bacterial Community Composition in Central European Running Waters Examined by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 188-199. 2008
- 3) 桒あや, 奥山加代子, 中村寛治: 特定細菌放出に伴う土着細菌群集への影響: 評価手法の検討, 環境工学研究論文集, 45: 203-210. 2008
- 4) 中村寛治, 濱谷美希, 相澤瑛美, 阿部晋太郎, 川口猛: 広瀬川河川中に生息する細菌群集構造の季節変動, 環境工学研究論文集, 45: 415-422. 2008
- 5) Lane, D. J.: 16S/23S sequencing, p. 115-176. In E. Stackbrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley &

Sons, New York, NY.1991

- 6) Skillman, L. C., A. F. Toovey, A. J. Williams, and A.-D. G. Wright: Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 200-206. 2006
- 7) Medlin, L., H. J. Elwood, S. Stickel, and M. L. Sogin: The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491-499. 1988
- 8) 中村寛治, 鈴木義彦, 石田浩昭: フェノールによるトリクロ
ロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の
解析, 環境工学研究論文集, 36: 1-10. 1999
- 9) Medea Lab Imaging System (http://www.medcalab.de/englisch/heterotrophic_nanoflagellate_Spumella.html)
- 10) Boenigk, J., P. Stadler, A. Wiedroither, and M. W. Hahn: Strainspecific differences in the grazing sensitivity of closely related ultramicrobacteria affiliated with the Polynucleobacter cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5787-5793. 2004

(2009. 5. 22 受付)

Analysis of Protozoa in a River, That Graze Bacteria belonging to Genus *Bacillus*

Masashi SUTO¹, Tomohiro TAKANO² and Kanji NAKAMURA^{1,2}

¹Graduate school of Engineering, Tohoku Gakuin University

²Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku Gakuin University

Protozoa, that grazed bacteria belonging to genus *Bacillus*, Gram-positive bacteria, obtained from the Hirose River were analyzed. Eight sampling points were set along the river, and river water samples were used for grazing experiments with two types of *Bacillus* bacteria. Protozoa were obtained from all samples. Most of protozoa which grazed the bacteria were small flagellates belonging to *Chrysophyceae* in *Stramenopiles*. A gene of 18S rRNA of a flagellate that grazed a Gram-negative bacterium, *Cupriavidus necator* KT1, was also observed in this experiment. This group of protozoa may play a certain role in the food chain in the river.