

広島大学大学院工学研究科 学生会員 ○平山翔太郎

広島大学大学院工学研究科 正会員 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良

早稲田大学大学院先進理工学研究科 牛木章友, 常田 聡

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 村上 千穂, 青井 議輝

1. はじめに

アナモックスは嫌気条件下においてアンモニアを亜硝酸で酸化して窒素に変える微生物反応である。この反応およびそれを担っている微生物（アナモックス細菌）を廃水処理プロセスに応用することで、従来の硝化・脱窒法に比べ、低コスト・省エネルギー型の窒素除去プロセスを構築することが可能となる。アナモックス細菌はこのように環境工学的にその利用の拡大が期待されていると同時に、地球レベルでの窒素循環にも大きく関わっていることが判明しつつあるなど非常に重要な微生物である。しかしアナモックス細菌が発見されたのは、わずか13年前であり¹⁾、その生理・生態学的性質は未だ未解明な点が多い。

一方で、アナモックス細菌による廃水処理や窒素循環に関わるエコシステムの一端は、抽出した遺伝子情報をベースにして解析する分子生物学的手法の積極的な適用によって解明されつつあるが、詳細な生理学的性質や未知機能の解明など工学的応用につながる本質的な理解のためには、純菌株の獲得が必須であり、アナモックス細菌の分離培養を行う必要がある。

しかし、発見以来今日まで多くの研究者が挑戦してきたにも関わらず、アナモックス細菌の分離培養に成功したという報告は一例もない。そこで本研究では、従来まで行われてきた一般的な分離培養法とは一線を画した、まったく新しいコンセプトに基づいた新規手法を確立し、世界初のアナモックス細菌の分離培養を試みる。本研究では、既往の研究により明らかとなっている、アナモックス細菌が活性を持つためにはある一定以上の菌体密度が必要であること¹⁾²⁾、また増殖速度が極めて遅いこと³⁾⁻⁶⁾が、いままでアナモックス細菌の分離培養に成功しなかった主たる理由であると考え、これらの原因を解決するために、アナモックス細菌が数10 - 数100細胞から成る球状の凝集体“マイクロコロニー”を形成するという特異性に着目した新規手法を確立・検討した。1細胞ではなく数10 - 数100細胞から成るマイクロコロニーに着目する事で、局部的に高い菌体密度を満たすと同時に、アナモックス細菌のみを選択的に分離することが可能となる。さらに初期菌体量が従来法に比べ大幅に増えるために、培養期間の短縮を行う事ができる。

そこで本研究では1細胞ではなくマイクロコロニーを一つの増殖の基本単位（Growth unit）とする新しいコンセプトに基づいた新規手法、具体的にはセルソーターを用いてアナモックス細菌が形成するマイクロコロニーを選択的に分離し、その後二次培養を行う新規分離培養手法を適用し、その有効性を検討する。

2. 実験方法

2.1 集積培養

アナモックス細菌の菌体量の増加および他の微生物に対する割合を7割以上に保つことを目的として、アンモニアと亜硝酸を主体とした基質を連続的に供給し、アナモックス細菌が優占化するように集積培養リアクターの運転を行った。また、全菌染色やFluorescence *in situ* hybridization（以下FISH）を組み合わせ、アナモックス細菌の形成しているマイクロコロニーの特異性について検討を行った。

2.2 セルソーターを用いた細胞分取

上記集積培養系よりサンプリングしたアナモックス細菌を含む微生物サンプルに超音波処理を施し、さらにメッシュフィルターにより濾過を行い、セルソーター (FACS Aria II, BD) に供試するための前調整を行った。セルソーターを用いて、前調整したサンプルから目的のマイクロコロニーを選択的に分取し、96 穴マイクロプレートの各wellに対して1個ずつマイクロコロニーを植菌した。本実験ではセルソーターのパラメータとして、前方散乱光 (FSC) と側方散乱光 (SSC) を用いた。基本的にFSCは粒子の大きさを、SSCは粒子の複雑さを反映するため、集積サンプルでは、1) 密に詰まったマイクロコロニーは高いFSCと球状であるために低いSSCを示し、2) 不均一な形状をした凝集体は、高いFSCとSSCを示し、3) 単一の浮遊細胞は低いFSCとSSCを示すと予想できるため、アナモックス細菌だけで形成されるマイクロコロニーは、1) のグループに存在すると考えた。(図1)

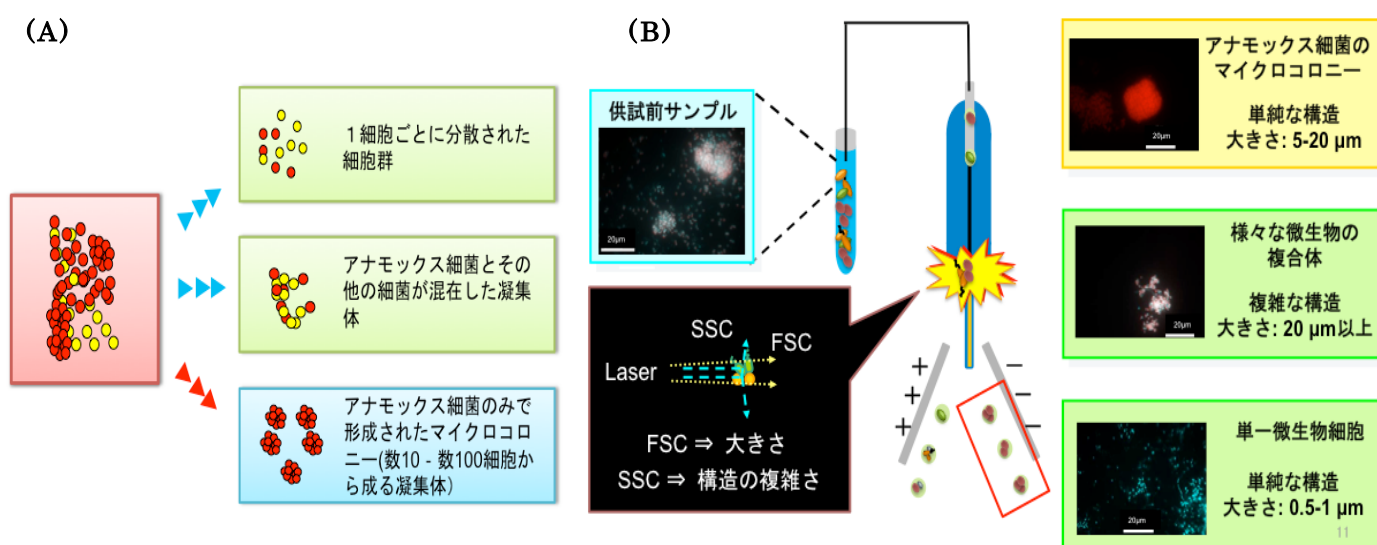


図1 マイクロコロニーを標的にしてアナモックス細菌を分離するコンセプト: サンプルを分散した際に生じる細胞およびその凝集体の種類 (A), セルソーターを用いてアナモックスを分離・分取する原理 (B)

2.3 アナモックス細菌の培養

96穴マイクロプレートに植菌後、アンモニアと亜硝酸を含んだ液体培地を用いて嫌気環境下 (グローブボックス内) で静置培養した。

3. 実験結果

3.1 集積培養

実験期間中、集積培養リアクター内においてアナモックス細菌のバイオマスを増加させ、高い割合で保持することに成功した。DAPI染色とFISH法を用いてマイクロコロニーを分析したところ、図2に示すように、直径約30 μm のものがアナモックス細菌以外のものが混在している割合が高い一方で、直径約10 - 20 μm のものがコロニー中に従属栄養細菌が入らずに、アナモックス細菌のみで形成されている割合が高いことが確認されたため、上記サイズをセルソーター分取におけるターゲットとすることに決定した。

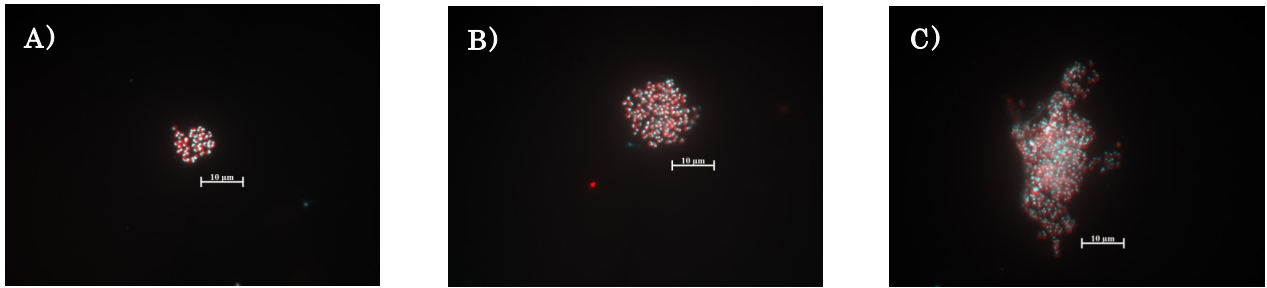


図2 マイクロコロニーの様子（直径：10 μ m 以下 (A)，20 μ m 以下 (B)，30 μ m 以上 (C))
DAPI および FISH 画像 (DAPI/Amx368)

3. 2 セルソーターを用いたマイクロコロニーの分取

サンプルをセルソーターに供試して得られたグラフを図3Aのように複数のエリアに分画して解析したところ、図中P1エリアに分画される粒子群が目的とするマイクロコロニーに相当すると判明したため、このエリアからマイクロコロニーを分取・植菌した（図3A）。

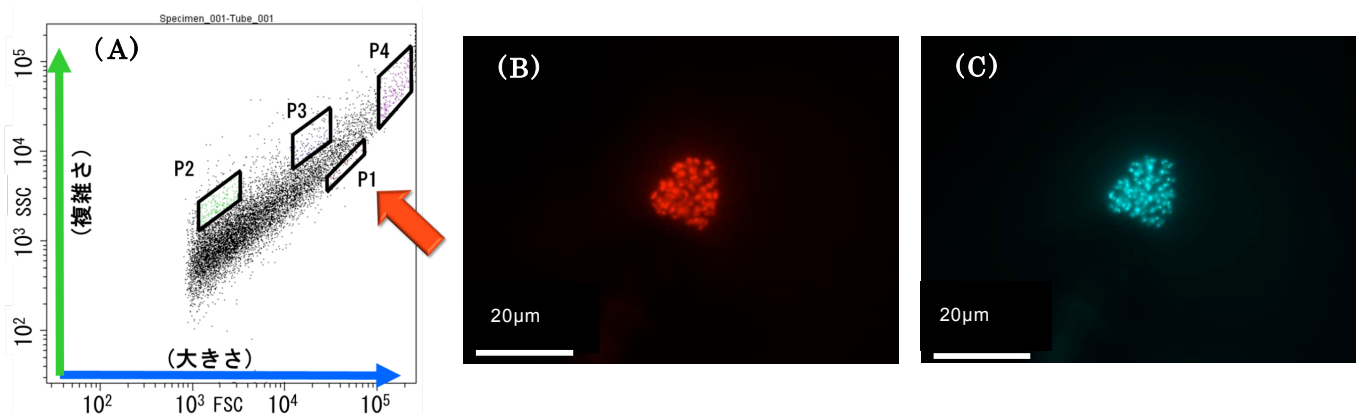


図3 セルソーターによる分取結果：ソーティングの際に得られたサンプルのドットプロット (A)，P1 エリアより分取したマイクロコロニー、DAPI 染色 (B)，FISH 画像 (Amx368) (C)

その際、同じエリアの粒子群をスライドガラスにSortingし、DAPI染色とFISH法を用いた分析を行ったところ、目的のアナモックス細菌を選択的に分取できていることが確認された（図3B, C）。分取したマイクロコロニーを定量したところ、5割以上の確率で96穴マイクロプレートの各wellあたりマイクロコロニー1個が植菌されていることが示された。また、本手法を適用することで全菌数に対するアナモックス細菌の割合は67.3 $\pm$ 18%（本手法適用前）から99.2 $\pm$ 1%（適用後）と、極めて高い値が得られた（図4）。

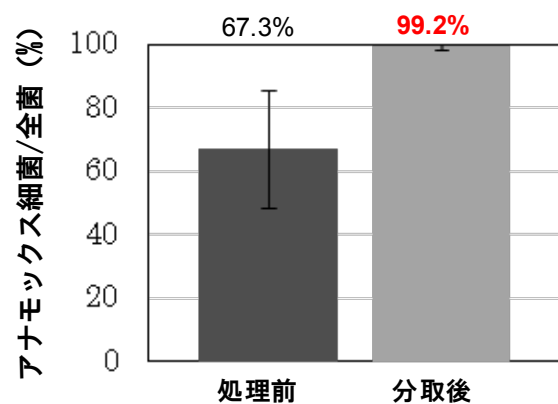


図4 セルソーター供試前後のアナモックス細菌の割合 (Amx368/DAPI)

4. まとめ

アナモックス細菌の集積培養リアクター内において、ある一定のサイズのマイクロコロニーはアナモックス細菌のみで形成されていることを確認した。大きさ及び構造の複雑さを指標としてセルソーターを用いることで、アナモックス細菌のみで形成されたマイクロコロニーを選択的に分取することに成功し、アナモックス細菌のみを選択的に分離することを可能とした。上記マイクロコロニーを複数分取する事により、アナモックス細菌を全菌数あたり99.2±1%にまで濃縮することに成功した。

本手法におけるSorting効率が50%以上であったことから、従来の分離培養法である限界希釈液体培養法などと比較して、本研究で確立した新規分離培養手法を用いることで、アナモックス細菌の分離培養の可能性が拡大したことが示された。

5. 参考文献

- 1) Strous *et al.* (1999) *Nature*, 400, pp. 446–449
- 2) Haydée De Clippeleir *et al.* (2011) *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, pp. 1511-1519
- 3) Isaka *et al.* (2006) *Appl Microbiol Biotechnol*, 70, pp. 47-52
- 4) Tsushima *et al.* (2007) *Water Research*, 41, pp. 785-794
- 5) Oshiki *et al.* (2011) *Microbiology*, 157, pp. 1706-1713
- 6) van der Star *et al.* (2008) *Biotechnol Bioeng.*, 101, pp. 286-294