

広島大学大学院工学研究科	学生会員	○上原亮平
広島大学大学院工学研究院	正会員	金田一智規
広島大学大学院工学研究院	正会員	尾崎則篤
広島大学大学院工学研究院	正会員	大橋晶良

1. 研究背景・目的

Candidate division TM7 は土壌、淡水、海水、海の底泥、活性汚泥、人の口内など様々な地域、場所で検出されている。この TM7 の一部はゲノムが解読されているが、分離、培養の報告はない。糸状性と桿状、球状の形態をしていることが FISH 法により報告されている⁽¹⁾が、その生理学的特性には不明な部分が多い。

未分類細菌の基質取り込みを確認するには対象とする細菌の純粋分離・培養が必要となるが、MAR-FISH 法や ELF-FISH 法などの分子生物学的手法を用いることで、環境中の未分類細菌の基質利用特性を調査することができる。本研究では ELF-FISH 法を用いて微生物細胞表面の酵素活性の有無を調査した。ELF-FISH 法とは基質に蛍光物質を標識して対象の微生物と培養させることで、微生物の細胞表面にある酵素活性を可視化させ、顕微鏡より確認できる方法のことである。

本研究では東広島下水処理場内の未分類細菌の中から、汚泥バルキングの原因菌の可能性があると考えられている糸状性細菌 candidate division TM7 に着目し、分子生物学的手法を用いて基質利用特性を調査する。また、得られた基質利用特性を用いて TM7 の分離培養を試みる。

2. 実験方法

TM7 が存在すると考えられる活性汚泥は東広島の下水处理場から採取した。TM7 の細胞表面の酵素活性を見るために ELF-FISH 法⁽²⁾を行った。ELF-FISH 法で調査する酵素は既往の研究成果である MAR-FISH 法の結果から酵素活性を示す可能性の高いキチナーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リパーゼ、エステラーゼに決定した。以上の酵素に対応する基質に蛍光物質が標識されているものを活性汚泥に入れ 2 時間培養を行った。培養後、酵素反応の有無を顕微鏡により判断した。酵素反応がある場合、微生物は黄色い蛍光を示し、酵素反応がない場合、微生物は青い蛍光を示す。FISH 法を行い酵素反応が確認された細菌が TM7 かどうか判断した。FISH 法で使用するプローブは TM7 を対象とする TM7905、TM7305、TM7-933、TM7-720a、TM7-720b の 5 種類と全細菌を対象とする EUB338mix、合計 6 種類を用いた。TM7905 プローブは TM7 門の大部分を検出することができるプローブである⁽¹⁾。TM7-933 プローブは TM7905 プローブでは検出できない TM7 を検出することが可能なプローブである。TM7305 プローブと TM7-720b プローブは TM7905 プローブが検出できる範囲で糸状性細菌の TM7 を検出することができ、TM7-720a プローブは TM7905 プローブが検出できる範囲である特定の糸状、桿状、球状性細菌を検出することが可能なプローブのことである⁽³⁾。

既往の研究成果である MAR-FISH 法で得られた基質利用特性を用いて TM7 の分離培養を試みた。容量 60mL の培養ビンの中に活性汚泥を 50mL 入れ、あえてバルキング現象が起きるような条件で液体培養を行った。培地の pH は 4.0 に調整し、炭素源となる有機物は基質利用特性よりグルコースと N-アセチルグルコサミンを選択した。FISH 法で TM7 の量を確認しつつ数日間培養を行い、TM7 の集積が確認された段階で、培養していた液体培地を植種源とするプレート培養を行った。培地には寒天とگرانガムを選択した。培地を作成する際に炭素源が枯渇しないようグルコース又は N-アセチルグルコサミンを加えた。有機物濃度は 0.1, 1, 10[g/L]と 3 つの系に分けた。プレート表面にコロニーが形成されたら TM7905 プローブと EUB338mix プローブを使用した FISH 法と DAPI 染色法を用いて顕微鏡よりコロニーを形成する微生物が TM7 かどうか確認した。DAPI 染色により微生物の DNA を染色することで生物と非生物を見分けることができる。

3. 結果と考察

1) TM7 の基質利用特性の調査

細胞表面の酵素活性の有無を ELF-FISH 法より調査した結果、表 1 より、TM7905 プローブで検出される TM7 には β -ガラクトシダーゼ活性とリパーゼ活性が確認された。TM7305 プローブで検出される TM7 にもリパーゼの活性が確認された。その他に TM7-933、TM7-720a、TM7-720b プローブで検出される TM7 にも酵素活性の有無を確認したが、これらのプローブで検出される TM7 にはどの酵素の活性も見られなかった。

以上の結果より TM7 は乳酸を分解する β -ガラクトシダーゼ活性と脂質を分解するリパーゼ活性を有しているが、キチンを分解するキチナーゼやグルクロン酸を分解する β -グルクロニダーゼ、エステル結合を分解するエステラーゼは有していないことが判明した。既往の研究から得られた基質利用特性と照らし合わせると、TM7 はグルコースや N-アセチルグルコサミンなどの単糖の取り込みを行うことがわかっている。 β -ガラクトシダーゼは乳糖を分解する酵素で乳糖は分解されるとグルコースとガラクトースに分けられる。グルコースの取り込みは β -ガラクトシダーゼ活性を経由して行われているのかもしれない。しかし N-アセチルグルコサミンの生成に関わるキチナーゼ活性は確認することが出来なかった。以上のことから多糖や配糖類の分解能は一部有しているが、その他は共存する他の微生物に依存しているのではないかと考えられる。また、今回 TM7 がリパーゼ活性をもつことが判明した。リパーゼ活性は脂質のエステル結合を分解し、脂肪酸を生成する酵素である。基質取り込みが確認された脂肪酸であるオレイン酸はこのリパーゼ活性によって生成され取り込みが行われている可能性がある。

表 1 TM7 の酵素活性

	TM 7905	TM 7305	TM 7-933	TM 7-720a	TM 7-720b
キチナーゼ	-	-	-	ND	ND
β -グルクロニダーゼ	-	-	-	ND	ND
β -ガラクトシダーゼ	+	-	-	-	-
リパーゼ	+	+	-	-	-
エステラーゼ	-	-	-	ND	ND

+ positive

(+ 糸状性細菌, + 球状性菌, + 両方)

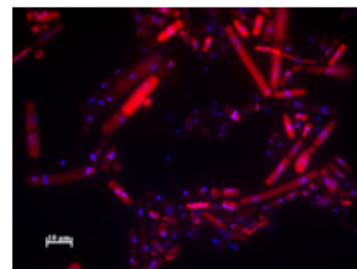
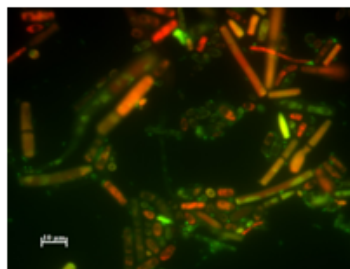
- negative

ND 未観察

2) TM7 の分離培養の試み

バルキング現象を利用して TM7 の集積を試みた結果、バルキング現象は再現できなかったが培養ビンの上澄み中に糸状性細菌の TM7 が検出された。上澄み中にはその他に真核生物や対象でない細菌が検出されたが、通常の活性汚泥内に存在する量と比較するとかなり少ない。今回の培養条件で液体培養を行うことで TM7 が増殖したかどうかはわからないが、TM7 を通常の活性汚泥内よりも遊離した状態で採取することはできた。

液体培養より採取することができた TM7 を寒天培地に撒いて培養を行ったところ、プレート表面に白いコロニーが形成された。このコロニーを FISH 法と DAPI を用いて観察したところ、図 1 より、コロニーを形成しているのは球形や桿状形の微生物だった。これらの微生物は全細菌を対象とする EUB338mix での蛍光が弱く、DAPI 染色により微生物細胞内の核が蛍光を示しているので、対象とする糸状性細菌 Candidate division TM7 ではなく真核生物ではないかと考えられる。細菌の場合 EUB338mix プローブで強い緑色の蛍光を示し、DAPI 染色により細胞全体が青い蛍光を示す。以上のことから寒天培地では TM7 の培養を行うことはできなかった。培養出来ない理由としていくつか挙げると、元々 TM7 はコロニーを形成する細菌ではないことや培養している間に真核生物が優占化してしまったこと、想定よりも TM7 の倍加時間が遅いためにプレート培養での培養期間が短すぎたことなどが考えられる。



緑+赤
緑 : EUB338mix 赤 : TM7905 青 : DAPI

図 1 コロニー中に確認された微生物

4.今後の課題

今回プレート培養法で TM7 の培養は行えなかった。改善点として培養時間を延ばすことや、植種源となる液体培地の上澄みから真核生物を取り除くことが考えられる。取り除く方法としては微生物の細胞の大きさの違いを利用して膜による真核生物の分離方法や抗生物質を用いて真核生物や TM7 以外の細菌を死滅させる方法などが考えられる⁽¹⁾。また、液体培養により TM7 を通常の活性汚泥中より純粋な状態で採取することは出来たが、TM7 が今回の培養条件で増殖しているのかわからなかった。TM7 を分離することができたとしても増殖する条件がわからなければ培養することはできない。TM7 がどのような環境で増殖するのか、倍加時間はどの程度かかるのか、分離培養を成功させるために調査していく必要がある。

5.参考文献

- (1) Hugenholtz et al. : AEM, 67, pp.411-419, (2001)
- (2) Nielsen et al. : Methods in Molecular Biology, pp. 120-126, (2010)
- (3) 山岡ら : 第 46 回日本水環境学会年会講演集, p.473, (2012)