

Title	アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性
Author(s)	見坂, 武彦
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169334
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

甲 7406

アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性

見 坂 武 彦

アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性

見 坂 武 彦

目次

緒論	1
本論	
第一章 HNPP-FISH 法を用いた細菌群集構造解析法の最適化	3
第二章 アジア都市河川環境の微生物学的評価	14
総括	28
結論	31
謝辞	32
引用文献	33

Abbreviations

A.T.	ambient temperature
CFU	colony forming units
Cy3-FISH	fluorescent in situ hybridization with mono-Cy3 labelled oligonucleotide probe
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DVC	direct viable counting
DVC-FISH	combination of fluorescent in situ hybridization with direct viable count approach
EC	electric conductivity
FISH	fluorescent in situ hybridization
FITC	fluorescein isothiocyanate
FITC-FISH	fluorescent in situ hybridization with mono-FITC labelled oligonucleotide probe
HNPP	2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate
HNPP-FISH	HNPP and Fast Red TR in situ hybridization
SYBR-II	SYBR green II
TDC	total direct count
TOC	total organic carbon
W.T.	water temperature

緒論

微生物は生物圏に広く生息し、多種多様な物質の分解、循環を通して、生態系を支えている。例えば動植物に由来する有機物を無機化し、栄養塩の再利用を促進している。また農薬や合成洗剤など環境中に放出された様々な化学物質を分解し、環境浄化に大きく貢献している。つまり微生物のこれらの働きがなければ、物質は循環せず、生態系の恒常性は維持できないといえる。このため微生物による化学物質の分解性を予測することは、環境負荷の軽減に重要な意味を持ち、日本をはじめ多くの先進国では、化学物質の製造にあたり生分解試験が課せられている¹⁻³⁾。また微生物は分解者として環境中で機能している一方、上位の生物に栄養源として利用され、生産者としての役割も担っている。この概念は *microbial loop* として 1980 年代から認識されるようになり⁴⁾、生物圏における炭素の流れを説明する上で必須のものとなっている。

このように環境中の微生物はその存在の重要性が認識されているにもかかわらず、群集の基本的情報、すなわち群集構造やそれを構成する個体の生理活性に関する情報ですら、いまだ十分には理解されていない。この大きな理由として、現在一般的に用いられている培養法では、環境中のごく一部の細菌しか検出できないことが挙げられる。つまり培養法により得られる細菌数は、直接計数法による値に比べ通常 10 倍から 1000 倍低く⁵⁻¹¹⁾、培養を基本とする手法のみでは、環境中の微生物群集に関する情報が制限される。このように培養の難しい細菌であっても、その多くは生理活性を有していることが明らかとなっている¹²⁻¹⁴⁾。またこれらの細菌の一部は感染能力や毒素産生能力を持つことが報告されており^{15,16)}、培養困難な細菌の重要性が認識されてきている。したがって環境中に生息する細菌の群集構造を解析しその生理活性を評価するためには、培養操作に依存しない検出法が必要となる。

環境中に生息する細菌を培養することなく属種レベルで明らかにする方法として、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法が 1990 年以降環境微生物学に応用されつつある¹⁷⁻¹⁹⁾。FISH 法は蛍光プローブを用いて菌体内の rRNA に対してハイブリダイゼーションを行い、特定の細胞を検出する方法である。rRNA は、界 (kingdom)、科 (family)、属 (genus)、種 (species) 等のレベルで共通な塩基配列をその中に含んでいる¹⁹⁾。したがって目的に応じた配列をプローブとして利用することによって、属や種に関する遺伝情報をもとにした特定細菌の検出が可能となる。しかしながら、FISH 法の検出感度は菌体内の

rRNA 含量に依存することから^{17,19)}, 貧栄養な環境に生息する rRNA 含量が低い細菌に対しては, その応用が制限される場合が多い. そこで本研究では検出感度の向上を目的として, 蛍光色素 HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2' phenylanilide phosphate) および Fast Red TR を用いた FISH 法 (HNPP-FISH 法) に着目した²⁰⁾. 本法はプローブに標識した酵素の反応により, 蛍光強度を増幅させる手法である. 本研究では, まず標準株を用いて HNPP-FISH 法の検出条件の最適化を試み, 本法を河川水中の細菌群集構造解析に応用しその有効性について検討した. 河川は湖沼, 地下水などと同様, 淡水資源として人間の生活に不可欠なものであり, 同時に親水空間として我々の生活に深く関わっている.

FISH 法の検出感度は細菌の rRNA 含量に依存することから, 細菌の生理活性を知る指標の一つとなる^{17,19)}. 一方, 飢餓状態に入った細菌では rRNA の半減期は数日であることが報告されており²¹⁾, FISH 法は厳密には細菌の生死を評価できる手法ではない. 環境中では生きている細菌, 高い生理活性を持つ細菌は物質循環における寄与が大きいと推察される. そこで DVC (direct viable counting) 法を行った試料に対して FISH を行い (DVC-FISH 法)^{9,22)}, 生きている細菌を対象とした群集構造解析を試みた. DVC 法は試料に培地成分と DNA gyrase を阻害する抗菌剤を加えて一定時間インキュベートする手法であり, 増殖能を有する細菌は抗菌剤により細胞分裂が阻害されるため伸長・肥大する⁶⁾. この時タンパク合成が行われ, 細胞内の rRNA 含量が増加する. このような試料に対し FISH を行うことにより, 細菌の属種とタンパク合成能を同時に検出することが可能となる.

本研究では, DVC-FISH 法を東南アジアの河川に生息する細菌の群集構造解析とその生理活性評価に応用した. 東南アジア諸国では, 急速に都市化, 工業化が進み, 生活排水, 工業廃水, さらに多量の農薬の使用による水質汚濁が深刻化している²³⁻²⁶⁾. 環境中に放出された汚染物質は微生物による分解を受けるため, 生態系に対する汚染物質の影響を評価するにあたっては, 微生物学的な検討が求められている. しかしながら環境微生物学は主に冷温帯に位置する欧米諸国を中心に発展してきたため, 東南アジアなどの熱帯に生息する細菌に関する知見は, 未だ限られている. そこで本研究ではマレーシアの首都クアラルンプールを流れる Kelang 川, タイの首都バンコクを流れる Chao Phraya 川, さらに大阪市周辺の河川を対象として都市河川に生息する細菌の現存量, 生理活性, 群集構造を調査し, 河川環境の微生物学的評価を試みた.

本論

第一章 HNPP-FISH 法を用いた細菌群集構造解析法の最適化

特定の種、属などの細菌を特異的にシングルセルレベルで検出する方法として、FISH 法が 1990 年以降環境微生物学に応用されつつある¹⁷⁻¹⁹⁾。FISH 法は細菌の rRNA の塩基配列をターゲットとしたプローブを作成し、その末端を fluorescein isothiocyanate (FITC) などの蛍光色素でモノラベルして検出を行うという方法が一般的である。このようなシングルセルレベルでの検出法では、同時に細菌の生理活性の情報を得ることが可能であり、将来的には多重染色法を用いて細菌の持つ複数の遺伝子情報、例えば属種と機能等を同時に知ることができる。

FISH 法はその有用性が認識されているものの、検出感度は菌体内の rRNA 含量に依存することから^{17,19)}、貧栄養な環境に生息する rRNA 含量が低い細菌に対しては、その応用が制限される場合が多い。そこで本研究では、蛍光基質として HNPP および Fast Red TR を用いた HNPP-FISH 法を用い²⁰⁾、蛍光シグナルの増強を試みた。HNPP-FISH 法ではまずジゴキシゲニンで 5'-末端を標識したプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行う (Fig. 1)。次にアルカリフォスファターゼを結合させた抗ジゴキシゲニン抗体を加えてプローブと結合させる。ここに蛍光基質である HNPP を添加すると HNPP が HNP に脱リン酸化され、さらに Fast Red TR を添加することによって蛍光物質 HNP/TR が生成される。この反応ではアルカリフォスファターゼに活性がある限り HNP/TR が細胞内に沈着する。したがってこのような酵素反応を利用した系を用いることにより、

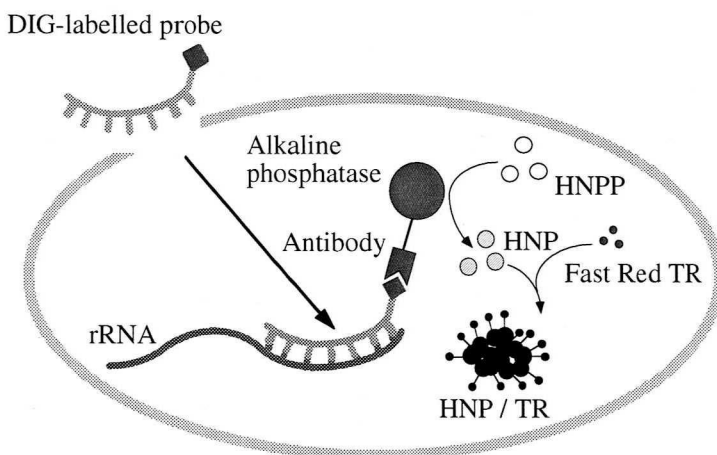


Fig. 1. Principle of HNPP-FISH.

増強することができる。HNPP-FISH 法では、FITC でモノラベルしたプローブを用いた FITC-FISH 法に比べ約 8 倍強い蛍光が得られることが示されている²⁰⁾。

本章ではまず水環境に多く生息すると報告されている細菌群を標的としたプローブを用いて HNPP-FISH 法の最適化を行った。そして本法を河

川水中の細菌群集構造解析に応用し、その有効性を検討した。

材料および方法

細菌株と培養

Escherichia coli は LB 培地 (1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) を用いて 37°C で振盪培養した。他の菌株は LB 培地 (ただし, *Flavobacterium* 属は 0% NaCl, *Vibrio* 属は 3% NaCl, 他の菌株は 0.5% NaCl) を用いて 30°C で振盪培養した。

採水地点

1996 年, 箕面川上流の高山, 大阪市内を流れる寝屋川の北橋にて表層水を採取した (Fig. 2)。高山は箕面治水ダムの上流に位置し, 山林地帯にある。川幅は狭く, 両岸は草や木が生い茂っている。寝屋川の北橋は大阪ビジネスパーク内に位置する。上流には小規模な工場が多く集まった地域があり, 住宅密集地域の一部では家庭排水が流れ込んでいる。

細菌数ならびに全有機炭素値の測定

コロニー形成数 (CFU) の測定にあたっては, R2A 培地²⁷⁾ に試料水を塗布し, 25°C で 1 週間培養した後, 培地表面に生じたコロニー数を計測した。

全菌数 (TDC) の測定には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を用いた。試料水に DAPI を終濃度 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ となるように添加し, 5 分間染色した後, 濾過によって試料中の細菌を Nuclepore black filter (Costar Scientific; 孔径 $0.20 \mu\text{m}$) 上に捕集した。フィルターをスライドガラス上に乗せ, エマルジョンオイルで封入し, 蛍光顕微鏡 (Olympus BH2) で観察・計数した。なお DAPI 由来の蛍光の観察には励起フィルター UG1, ダイクロイックミラー DM400, 吸収フィルター L420 を用いた。

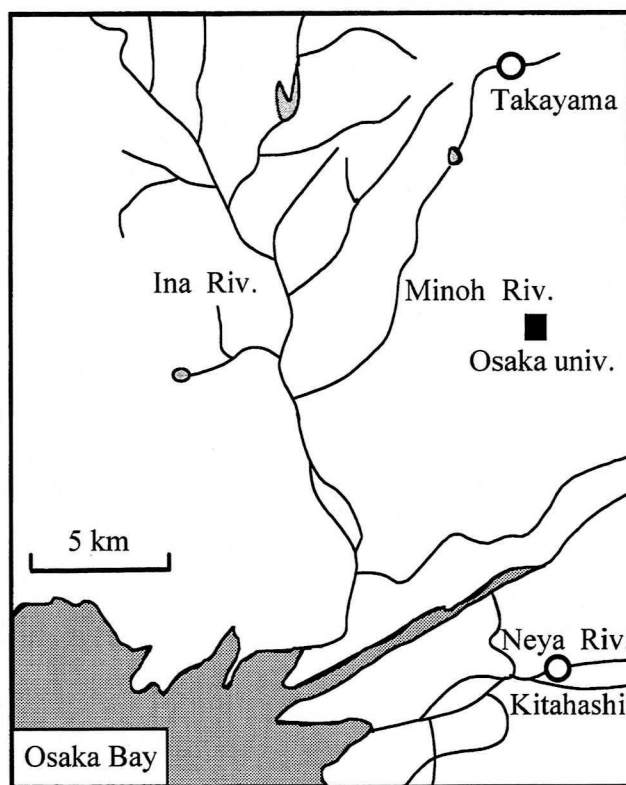


Fig. 2. Sampling stations in northern Osaka.

全有機炭素値は、TOC-500 (島津) により測定した。

オリゴヌクレオチドプローブ

本研究で用いたプローブの配列を Table 1 に示した。これらは水環境に多く生息すると報告されている細菌群を標的として作成したものであり、それぞれ FC : *Flavobacterium-Cytophaga* のクラスター, BCA : *Burkholderia-Comamonas-authentic Alcaligenes* グループ, VA : *Vibrio-Aeromonas* グループ, Ac : *Acinetobacter* 属, P(I) : *Pseudomonas* (rRNA group I) が検出対象である^{28,29)}。また真正細菌を標的としたプローブ EUB338¹⁸⁾ およびネガティブコントロールとなるプローブ NON³⁰⁾ を用いた。各プローブの 5'-末端はジゴキシゲニンで標識した。16S rRNA の塩基配列に基づく系統樹を Fig. 3 に示した。プローブ BCA のグループは *Proteobacteria* の beta グループ, プローブ Ac, VA, P(I) のグループは *Proteobacteria* の gamma グループに属する。各プローブの特異性およびハイブリダイゼーションの条件は、30 種の標準株を用い、HNPP-FISH 法により検討した。

Table 1. Oligonucleotide probes.

Probe	Specificity	Sequence (5'-3')	Target position ^a	Reference
FC	<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	AGGTACCCCCAGCTTCCATGGCT	16S, 1408-1430	28,29
BCA	<i>Burkholderia-Comamonas Authentic Alcaligenes</i>	GTGTGCCGGTTCTCTTTCGAGCAC	16S, 1022-1044	28,29
Ac	<i>Acinetobacter</i>	GCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCC	16S, 836-858	28,29
VA	<i>Vibrio-Aeromonas</i>	ACGACGCACTTTTTGGGATTCGCT CACTATCGCAAG	16S, 1265-1297	28,29
P(I)	<i>Pseudomonas</i> (rRNA I)	ATTTTCAGCCTACCACCTTAA	23S, 1467-1486	28,29
EUB338	domain <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	18
NON	Negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	16S, 338-355	30

^a *E. coli* rRNA numbering.

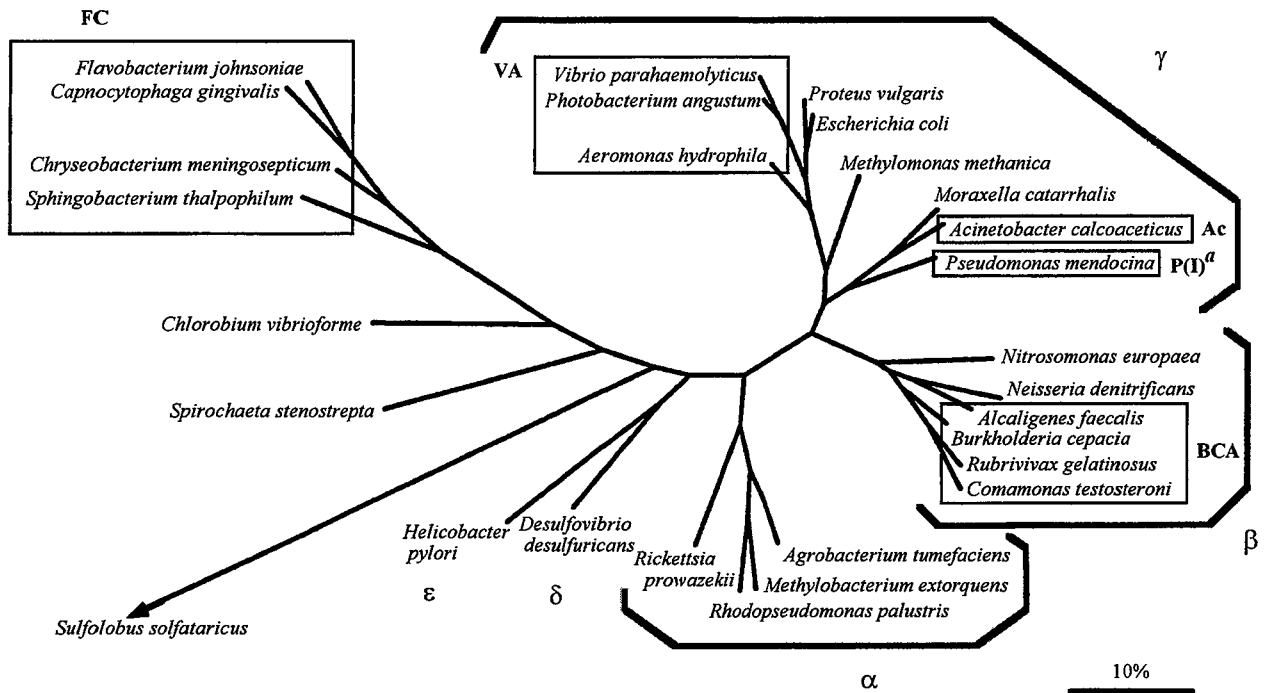


Fig. 3. Evolutionary distance tree based on 16S rRNA sequences. The bar corresponds to 10% estimated sequence divergence. ^a 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe.

HNPP-FISH

各試料に冷 paraformaldehyde 溶液 (12% in PBS [pH7.5]) を加え (終濃度 3%), 4°C で 8-16 時間固定した。次に, ガラスファンネルにフィルターをセットした濾過装置に試料水を入れ, 細菌をフィルター上にトラップした。濾過滅菌水で洗浄した後, このフィルターを容量 50 ml の Centrifuge tube (Corning) に入れ, 濾過滅菌水を加えてピペッティングにより細菌を再懸濁した。

ゼラチンコーティング (0.1% gelatin, 0.01% KCr(SO₄)₂) したスライドガラス上に再懸濁した試料を 20 μl 滴下し, 乾燥させた後, 50%, 80%, 100% エタノールにそれぞれ 3 分間浸すことにより脱水を行った。次に lysozyme 溶液 (0.5 mg ml⁻¹ in 100 mM Tris-HCl [pH8.2], 50 mM EDTA) を 30 μl 滴下し 4°C で 15 分間処理した後, 濾過滅菌水で軽く洗浄し, 再び 50%, 80%, 100% エタノールで脱水を行った。proteinase K 溶液 (0.1 μg ml⁻¹ in 10 mM Tris-HCl [pH8.2], 1 mM EDTA) を 30 μl 滴下し室温で 3 分間処理した後, 濾過滅菌水で軽く洗浄し, 再び 50%, 80%, 100% エタノールで脱水を行った。

次に digoxigenin で標識したオリゴヌクレオチドプローブ 200 ng を含むハイブリダイゼーションバッファー (0.9 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 20 mM Tris HCl [pH7.5], 30-45% formamide) を 20 μl 滴下し, 37°C で 1 時間インキュベートした。反応後, 37°C,

室温、4℃ の濾過滅菌水で軽く洗浄し、ブロッキング液 (30 mg ml⁻¹ BSA in PBS) を 30 μl 滴下し、室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。次にブロッキング液を 15 μl 除いた後、アルカリフォスファターゼ結合 Anti digoxigenin Fab fragments (Boehringer) をブロッキング液で 60 倍希釈し Tween 20 を 1% となるように加えた液を 15 μl 滴下して混合し、室温で 45 分間反応させた。反応後バッファー 1 (100 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), バッファー 2 (100 mM Tris-HCl [pH8.0], 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) でそれぞれ室温で 10 分間、2 回洗浄後、HNPP/Fast Red TR (Aisin Cosmos) 反応液 (100 μg ml⁻¹ HNPP, 250 μg ml⁻¹ Fast Red TR in バッファー 2) を 30 μl 滴下し、室温で 30 分間反応させた。この HNPP/Fast Red TR 反応を 2 回繰り返した後、濾過滅菌水で 5 分間洗浄した。DAPI によるカウンター染色 (終濃度 2 μg ml⁻¹) を行い、MacIlvaine バッファー (53.2 mM citric acid, 93.6 mM Na₂HPO₄ [pH4.5]) 10 μl で封入し、蛍光顕微鏡 (Olympus BH2) で観察・計数した。HNP/TR 由来の蛍光の観察には励起フィルター BP490+EY455, ダイクロイックミラー DM500, 吸収フィルター O515 を用いた。DAPI 由来の蛍光の観察には励起フィルター UG1, ダイクロイックミラー DM400, 吸収フィルター L420 を用いた。

結果および考察

検出条件の最適化

FISH 法により特異的な検出を行うには、ハイブリダイゼーション温度、塩濃度、formamide 濃度の最適化が必要となる。本研究では塩濃度を 0.9 M, ハイブリダイゼーション温度を 37℃ に固定し、ホルムアミド濃度を変化させた。

Flavobacterium breve (*Empedobacter brevis*) と *Aeromonas hydrophila* を試料として、プローブ FC を用いた HNPP-FISH を行い、DAPI で染色後、蛍光顕微鏡像を比較した (Fig. 4). Fig. 4a, b の写真は同一視野を撮影したものであり、UV 励起光下では DAPI により核酸染色された全ての細菌が蛍光を発した。一方、同一視野を青色励起光下で観察した場合プローブが標的とする細菌、すなわち プローブ FC とハイブリダイズし HNP/TR 由来の赤色蛍光を発する *Empedobacter brevis* のみを検出することができた。なお赤色蛍光が強い場合には UV 励起光下でも青色と赤色の混在したシグナルとして観察することができた。このように HNPP-FISH 法を用いることにより特定細菌のみを高感度に検出することが可能となる。ホルムアミド濃度を 0% から 55% まで 5% ごとに濃度を変化させ、蛍光顕微鏡

像を見ながら標的とする *Flavobacterium breve* のみを検出するハイブリダイゼーションの条件を検討したところ、至適条件はホルムアミド濃度 30%、ハイブリダイゼーション温度 37℃、ハイブリダイゼーション時間 1 時間となった。

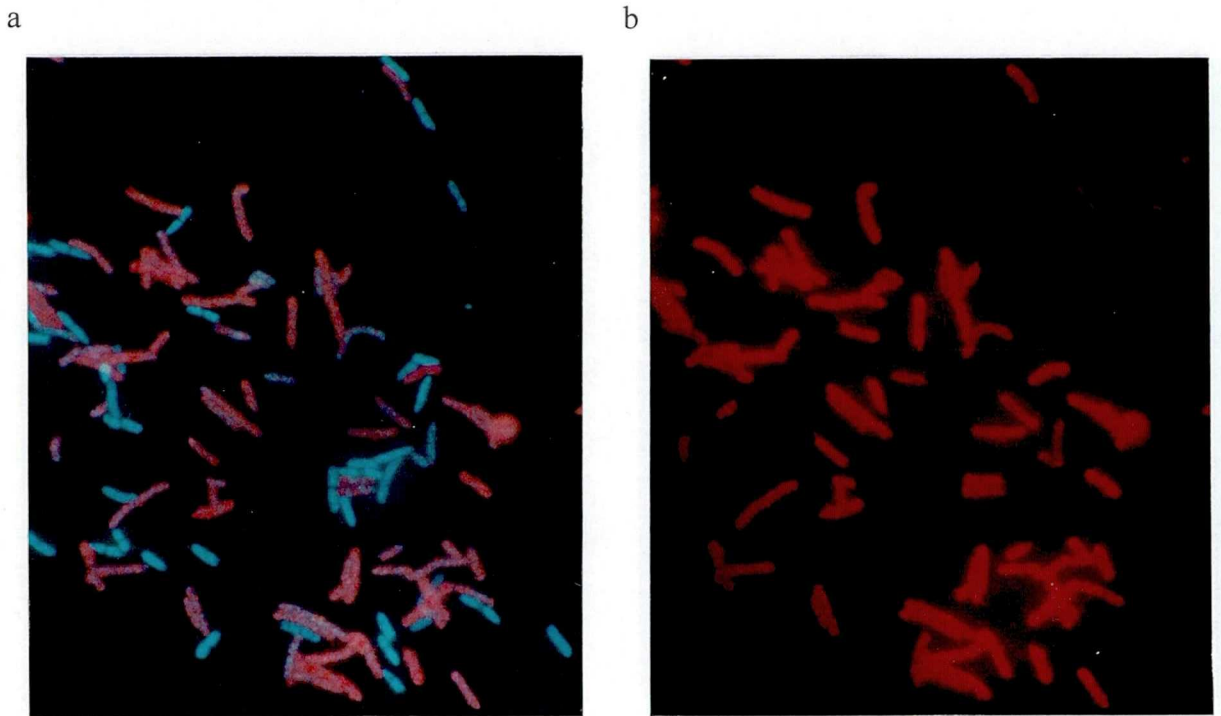


Fig. 4. Specific identification of target bacterial cells with HNPP/Fast Red TR whole-cell hybridization. *F. breve* (*E. brevis*) and *A. hydrophila* were hybridized with *Flavobacterium-Cytophaga* specific probe. The same microscopic fields are shown with UV excitation (a) and Blue excitation (b).

5 種のプローブ (FC, BCA, Ac, VA, P(I)) におけるハイブリダイゼーションの至適条件を、30 種の標準株を用いて検討した (Table 2). HNPP-FISH を行ったのち蛍光が見られたものは+、見られなかったものは-で表した。それぞれ標的とする細菌にのみ蛍光が見られるように検出条件を最適化することができたことから、HNPP-FISH 法を用いることにより、多種多様な細菌が混在する試料から特定の細菌のみを高感度に検出可能であると考えられた。

河川に生息する細菌に対する有効性

河川水試料を用いて本法の有効性を検討するに先立ち、採水地点の河川水の特徴を比較した。両地点の気温、水温、pH、EC、TOC 値および細菌数を Table 3 に示した。これらの結果より、高山に比べ北橋は有機物による汚染が進んでいることを確認した。

Table 2. Specificity of the designed oligonucleotide probes determined by in situ hybridization.

Strain	Presence of signal (no. of mismatches) for probe ^a :				
	FC [23]	BPA [24]	Ac [23]	VA [36]	P(I) [20]
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> ATCC 13253	+ (1)	— (12)	— (10)	— (19)	— (ND)
<i>Empedobacter brevis</i> GIFU3159	+ (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> ATCC 17061	+ (2)	— (7)	— (12)	— (12)	— (ND)
<i>Sphingobacterium thalophilum</i> ATCC 43320	+ (2)	— (13)	— (11)	— (15)	— (ND)
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 19018	— (ND)	+ (ND)	— (ND)	— (ND)	— (9)
<i>Alcaligenes xylooxidans</i> ATCC 27061	— (ND)	+ (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	— (9)	+ (1)	— (8)	— (13)	— (10)
<i>Comamonas acidovorans</i> IAM 12409	— (ND)	+ (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Comamonas testosteroni</i> IAM 12419	— (ND)	+ (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	— (9)	— (10)	+ (0)	— (14)	— (ND)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 23055	— (9)	— (10)	+ (0)	— (10)	— (9)
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> ATCC 17906	— (9)	— (10)	+ (0)	— (10)	— (ND)
<i>Acinetobacter johnsonii</i> ATCC 17909	— (9)	— (10)	+ (0)	— (10)	— (ND)
<i>Acinetobacter junii</i> ATCC 17908	— (9)	— (10)	+ (0)	— (14)	— (ND)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309	— (9)	— (10)	+ (0)	— (11)	— (ND)
<i>Aeromonas caviae</i> JCM 1060	— (10)	— (11)	— (12)	+ (2)	— (ND)
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	— (9)	— (13)	— (11)	+ (2)	— (10)
<i>Vibrio campbellii</i> ATCC 25920	— (10)	— (9)	— (10)	+ (1)	— (ND)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	— (10)	— (8)	— (9)	+ (3)	— (ND)
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562	— (10)	— (8)	— (10)	+ (3)	— (ND)
<i>Pseudomonas mendocina</i> ATCC 25411	— (9)	— (13)	— (7)	— (14)	+ (ND)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RIMD 1615005	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	+ (ND)
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	— (9)	— (10)	— (6)	— (15)	+ (ND)
<i>Ralstonia eutrophus</i> IAM12305	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110	— (12)	— (11)	— (11)	— (8)	— (6)
<i>Moraxella bovis</i> IAM12313	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Moraxella lacunata</i> IAM12150	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> IAM 12314	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Brevundimonas diminuta</i> GIFU657	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KM1168	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)	— (ND)
formamide concentration	30%	40%	40%	45%	45%

^a Probe lengths are shown in square brackets. ND, no data : sequence data are not available in GenBank.

Table 3. Physico-chemical characteristics of river water samples.

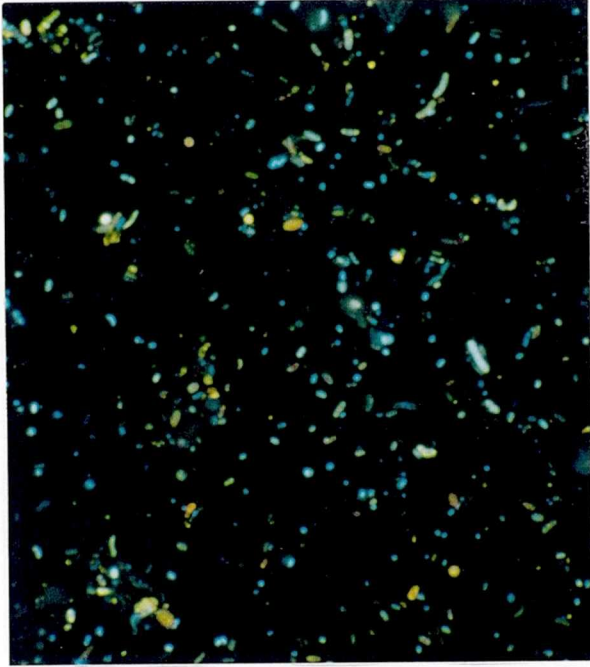
Property	Means ± SD for all 1995-96 measurements	
	Takayama	Kitahashi
Ambient temperature (°C)	8.3±7.9	14±9.9
Water temperature (°C)	8.0±5.6	16±7.8
pH	7.9±0.4	7.2±0.4
Electrical conductivity (μS cm ⁻¹)	120±40	470±250
Total organic carbon (mg liter ⁻¹)	2.0±1.3	10±7.9
TDC (cells ml ⁻¹) ^a	3.0±1.7x10 ⁵	9.9±7.7x10 ⁶
CFU (cells ml ⁻¹) ^b	1.3±0.8x10 ⁴	2.5±2.6x10 ⁶

^a TDC, total direct counts determined by DAPI staining.

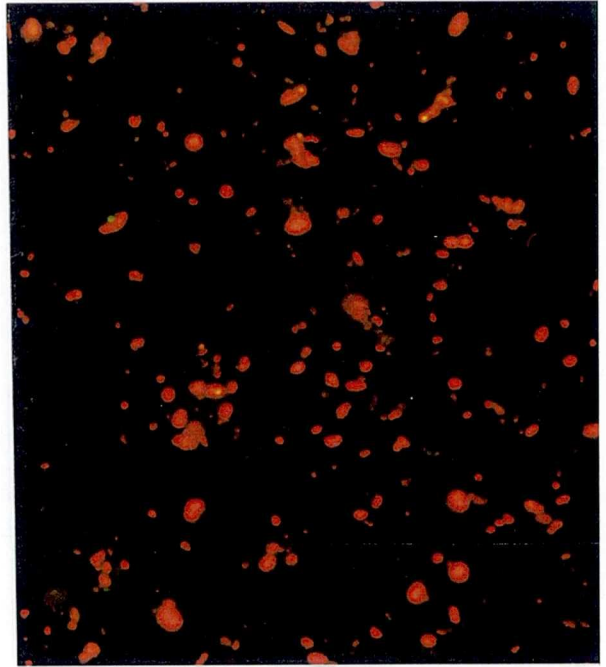
^b CFU, colony forming units on R2A medium.

次に真正細菌に共通なプローブ EUB338 を用いて FISH 法の検出効率を検討した。Fig. 5 は HNPP-FISH 法で検出した河川水中の細菌の蛍光顕微鏡写真である。左右の写真は同一

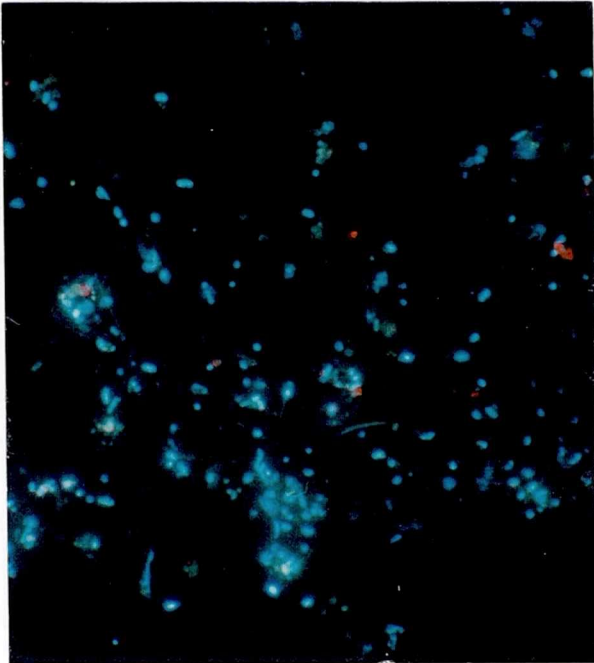
a



b



c



d

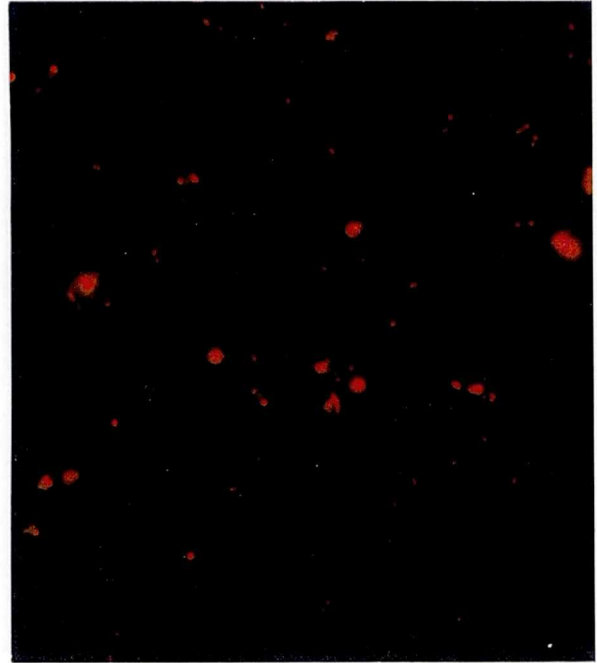


Fig. 5. Typical micrographs of bacterial cells detected by HNPP-FISH: cells hybridized with EUB338 in river water sample collected at Kitahashi (a, b) and Takayama (c, d). The same microscopic fields are shown with UV excitation (a, c) and Blue excitation (b, d).

視野を撮影したものである。a, b は北橋の試料, c, d は高山の試料である。UV 励起光下 (a, c) では全ての細菌が DAPI 由来の青色の蛍光を発しているのに対し、青色励起下

(b, d) では HNPP-FISH 法により検出した細菌のみが赤色の蛍光を発している。本研究では各励起光下で細菌を計数し、プローブとハイブリダイズした細菌の全細菌に対する割合を求めた。

Fig. 6 は寒天平板培養法, FITC-FISH 法, HNPP-FISH 法により検出可能な細菌の全細菌に対する割合を比較した結果である。試料として汚染の進んだ地点である北橋の河川水を用い, FITC-FISH 法, HNPP-FISH 法では真正細菌に共通なプローブ EUB338 を用いた。寒天平板培養法により検出できた細菌は全細菌の約 5%, 従来法である FITC-FISH 法により検出できた細菌は約 15% であった。これに対し HNPP-FISH 法では約 70% の細菌を検出することができ, HNPP-FISH 法は従来法に比べはるかに有効な手法であることがわかった。

また季節変化 (1月, 4月, 10月) について検討を行ったところ, プローブ EUB338 により検出できた細菌の割合は, 汚染の進んだ地点である北橋では 55–70%, 汚染の進んでいない地点である高山では 40–45% となり地点による差が見られた (Fig. 7)。これは貧栄養な地点ほど生息する細菌の rRNA 含量が低いことに起因すると考えられた。例えば, Kirchman らは放射性同位元素で標識した栄養基質を用いて, 汚染物質の量が多い地点ほど細菌による基質の取り込み量が多いこと, つまりタンパク合成が活発であることを報告している³¹⁾。また Yamaguchi らは汚染の進んだ地点では生理活性を持つ細菌の全細菌に対する割合が高いことを報告している¹⁴⁾。本研究の結果から有機物汚染が進んだ地点では, タンパク合成を行う細菌が多く, rRNA 含量が高いことが推察された。

グループ特異的な 5 種のプローブを用いて細菌群集構造を解析した結果では (Fig. 7), 北橋では約 50%, 高山では 25–40% の細菌がいずれかのプローブとハイブリダイズし, プローブ EUB338 で検出できる細菌の大部分を同定することができた。また両地点ともにプローブ FC, BCA とハイブリダイズする細菌が多く検出され, 季節による細菌群集構造の大きな変化は見られなかった。培養法を用いた細菌群集構造の調査では, 多くの河川や湖沼において *Flavobacterium* 属の細菌が優占種として存在していることが報告されている³²⁻³⁶⁾。本研究においても *Flavobacterium-Cytophaga* クラスターの細菌が多く検出され, これらの細菌群が淡水環境に広く分布していることが推察された。今後優占種の遺伝学的・生理学的性質を検討することにより, 環境中における役割や生態学的意義を理解できるものと期待される。

なお, いずれの試料においても HNPP-FISH 法では検出できない細菌が存在した。この

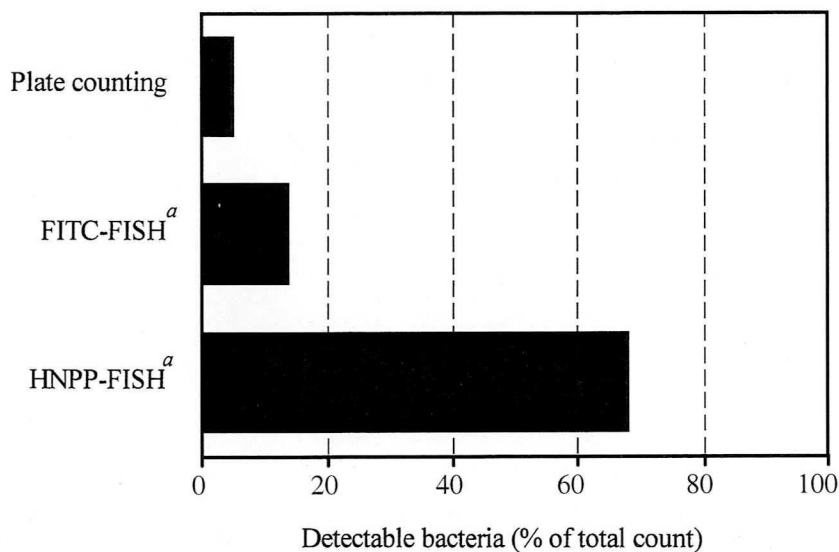


Fig. 6. Bacterial fraction detectable by three methods in river water sample collected at Kitahashi.
^a Cells hybridized with EUB338 probe.

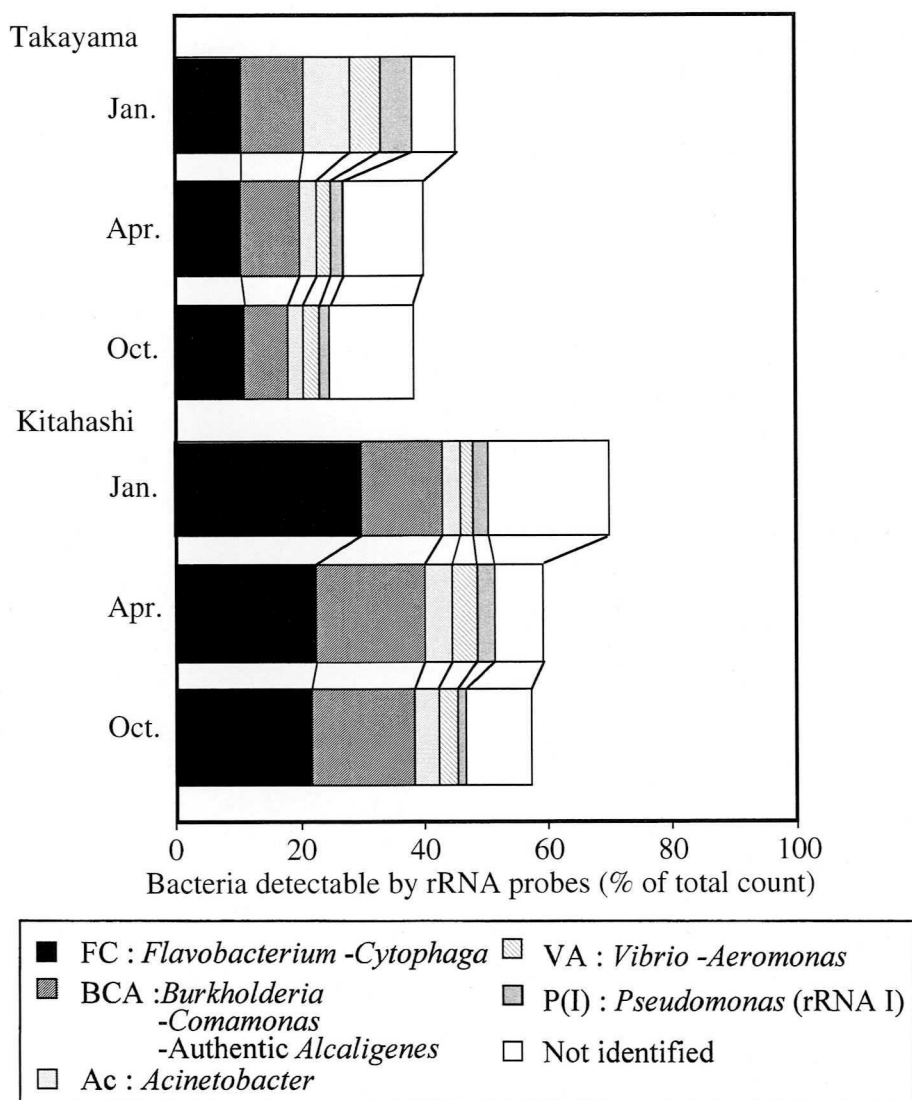


Fig. 7. Comparison of bacterial community structure in river water samples collected at Takayama and Kitahashi.

主な理由として、(I) 細胞壁の透過性が低いために HNPP-FISH 法の際にプローブや抗体が菌体内に入らなかったこと、(II) 菌体内の rRNA 含量が HNPP-FISH 法の検出限界以下であったことが挙げられる。(I) に関しては透過性処理に用いた lysozyme や proteinase K に対する感受性の低いことが考えられ、今後菌体の処理方法を改良することにより高い割合で河川水中の細菌群集構造を解析できるものと考えられる。(II) に関してはプローブの標的となる塩基配列の増幅が必要となる。その手段として細胞内で PCR 反応を行う in situ PCR 法^{37,38)} や、培地成分と抗菌剤を加えたインキュベーションにより細胞内の rRNA 含量を増加させる DVC-FISH 法^{9,22)} などが挙げられ、今後の発展が期待される。

小括

本研究では、河川水中の生理活性の低い細菌の群集構造を解析することを目的として、より高感度な検出が可能な HNPP-FISH 法に着目し、その最適化を試みた。水環境に多く生息すると報告されている細菌を標的とした 5 種の rRNA プローブを用い、そのハイブリダイゼーションの条件を 30 種の標準株を用いて決定した。

次に本法を河川水中の細菌群集構造解析に応用し、従来法との比較を行った。HNPP-FISH 法では全細菌の約 70% の細菌を検出することができたのに対し、培養法では約 5%、従来法である FITC-FISH 法では約 15% であった。このことから本法は従来法に比べはるかに有効な手法であることがわかった。

また 5 種のプローブを用いて群集構造解析を行った結果、有機物汚染の進んだ地点では約 50%、汚染の進んでいない地点では 25-40% の細菌がいずれかのプローブとハイブリダイズし、プローブ EUB338 で検出できる細菌の大部分を同定することができた。またいずれの地点でも *Flavobacterium-Cytophaga* クラスターの細菌が多く検出され、これらの細菌群が淡水環境に広く分布していることが推察された。

第二章 アジア都市河川環境の微生物学的評価

FISH 法は属種レベルでの群集構造解析に有効な手法であり、またその検出感度は細菌の rRNA 含量に依存することから、細菌の生理活性を知る指標の一つとなる^{17,19)}。しかしながら、飢餓状態に入った細菌では rRNA の半減期は数日であることが報告されており²¹⁾、FISH 法は厳密には細菌の生死を評価できる手法ではない。環境中では生きている細菌、高い生理活性を持つ細菌は物質循環における寄与が大きいと推察される。そこで本章では DVC 法を行った試料に対して FISH を行い (DVC-FISH 法)^{9,22)}、生きている細菌を対象とした群集構造解析を試みた。DVC 法は試料に培地成分と DNA gyrase を阻害する抗菌剤を加えて一定時間インキュベートする手法であり、増殖能を有する細菌は抗菌剤により細胞分裂が阻害されるため伸長・肥大する⁶⁾。この時タンパク合成が行われ、細胞内の rRNA 含量が増加する。このような試料に対し FISH を行うことにより、細菌の属種とタンパク合成能を同時に知ることができる。

本章では、DVC-FISH 法を東南アジアの河川に生息する細菌の群集構造解析とその生理活性評価に応用した。東南アジア諸国では、急速に都市化、工業化が進み、生活排水、工業廃水、さらには多量の農薬の使用による水質汚濁が深刻化している²³⁻²⁶⁾。環境汚染に対する的確な対策を講じるためには、まず河川環境の現状を明らかにすることが重要であり、特に生態系に対する汚染物質の影響を評価することが必須となる。細菌は多様な機能と豊富な現存量をもとに生態系の根幹部を支えているため、汚染物質の生態系影響評価にあたっては微生物学的な検討が必要である。また河川の持つ自浄作用において、細菌は極めて重要な役割を果たしていることから、今後社会の発展を維持しながらも、淡水資源を安全かつ効率的に利用していくためには、自浄作用における細菌の能力を評価し、河川に生息する細菌を深く理解することが必要である。しかしながら環境微生物学は主に冷温帯に位置する欧米諸国を中心に発展してきたため、東南アジアなどの熱帯に生息する細菌に関する知見は、未だ限られている。そこで本章ではマレーシアの首都クアラルンプールを流れる Kelang 川、タイの首都バンコクを流れる Chao Phraya 川、さらに大阪市周辺の河川を対象として、都市河川に生息する細菌の現存量、生理活性、群集構造を調査し、河川環境の微生物学的評価を試みた。

材料および方法

採水地点

1998年から1999年にかけて Kelang 川流域の 5 地点 (Fig. 8), Chao Phraya 川の 3 地点 (Fig. 9), 大阪近郊河川の 4 地点 (Fig. 10) にて表層水を採取した. クアラルンプール市内の採水地点である KL1, KL3, KL4 では, 川幅は約 10 m, 水深は 1-2 m であり, 周囲は市街地である (Fig. 11a, b, c). 約 10 km 下流のシャーラム市に位置する SA6 では, 川幅は約 50 m であり, 周囲は工場地帯である (Fig. 11d). さらに 5 km 下流のケラン市に位置する K7 では, 川幅は約 100 m であり, 周囲は市街地である (Fig. 11e). マレーシアでは未処理の下水が河川に流入するケースが多く, また下水処理場では塩素消毒が行われずに処理水が河川に放流される. Kelang 川では, 河川の水量が少ないにもかかわらず, 十分に処理されていない多量の下水が河川に流入するため, 水質汚濁が著しく進んでいる. バンコク市内の採水地点である CP1, CP2, CP3 の地点ではいずれも川幅は 100 m 以上, 水深は 10 m 以上あり, 周囲は市街地である (Fig. 11f, g, h). バンコク市内では下水処理場が存在するもののその数は少なく, また下水管の不備が多いため, 未処理の下水が Chao Phraya 川に流入するケースが多い. Chao Phraya 川は, Kelang 川に比べると水量がはるかに

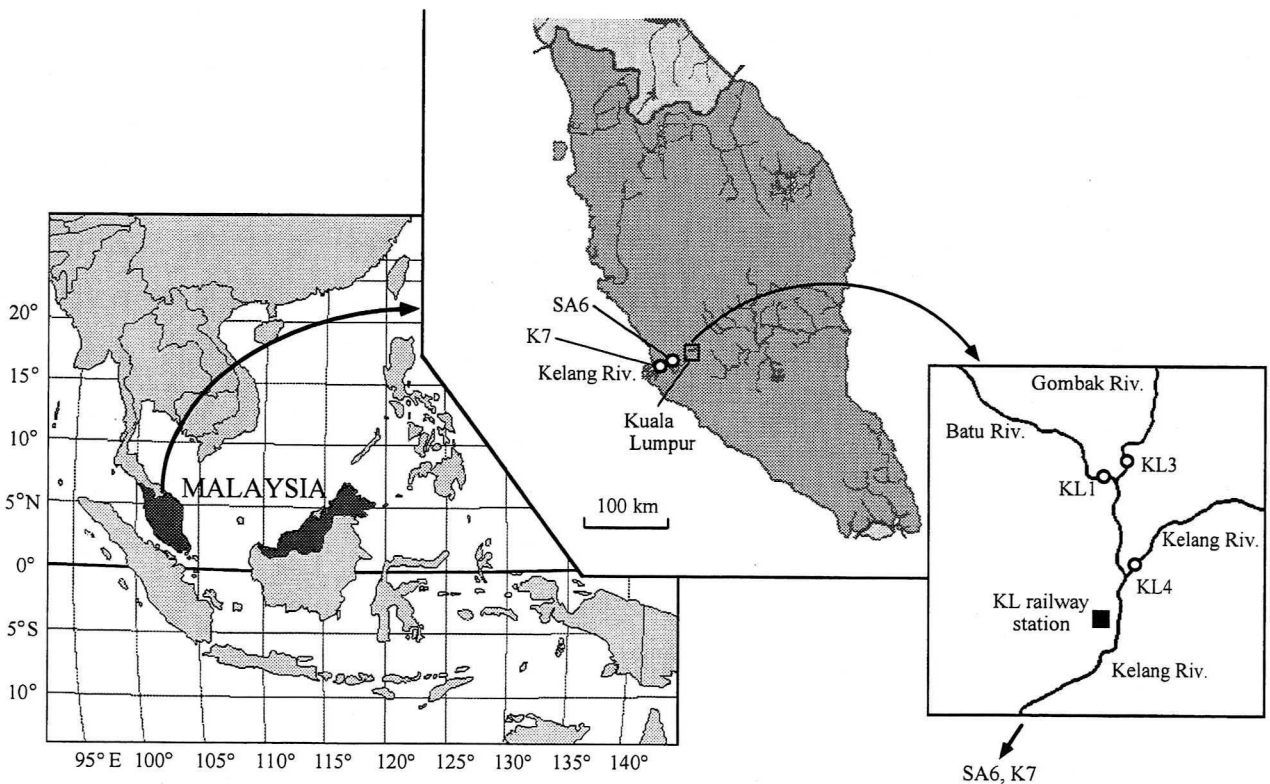


Fig. 8. Sampling stations in Kelang River basin.

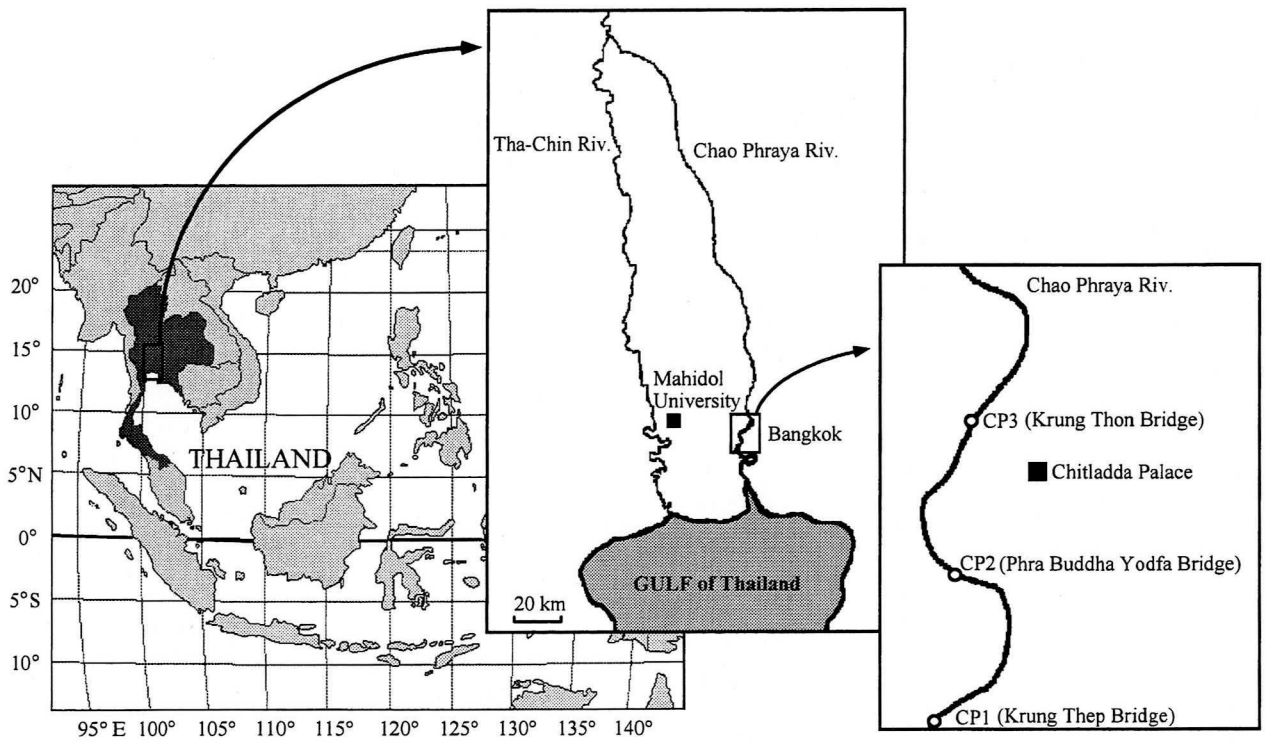


Fig. 9. Sampling stations in Chao Phraya River.

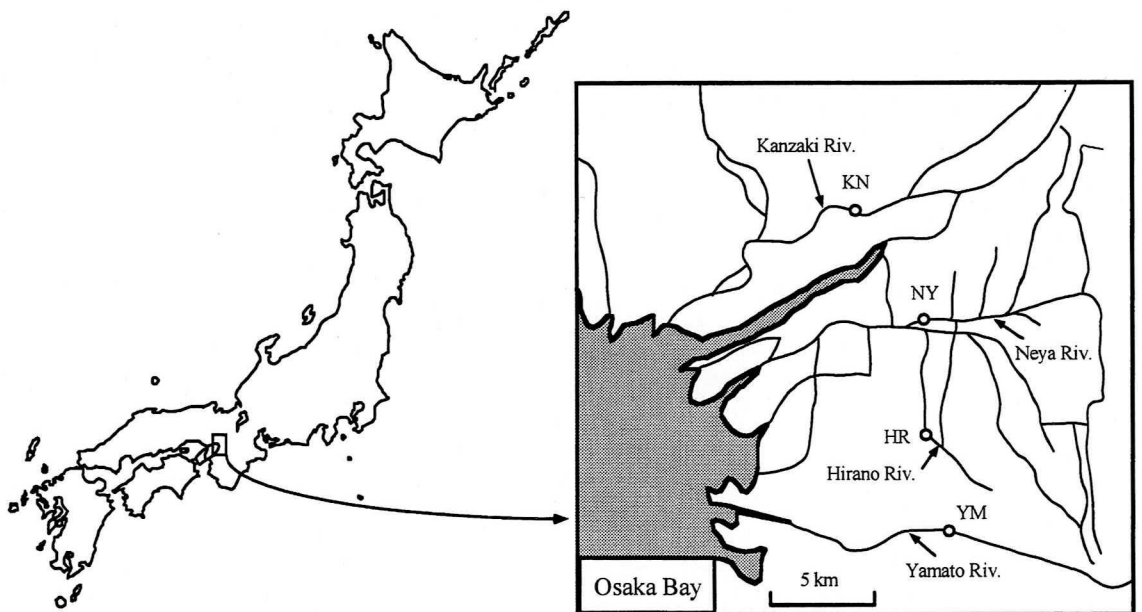


Fig. 10. Sampling stations in Osaka.

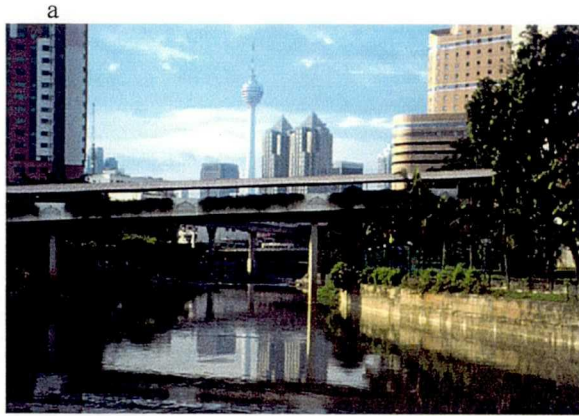


Fig. 11. Photographs of sampling stations.
a, KL1; b, KL3; c, KL4; d, SA6; e, K7; f, CP1; g, CP2; h, CP3.

多いことから、Kelang 川の方が流入する下水の影響をより強く受ける。大阪市内の採水地点である KN, NY, HR, YM はそれぞれ神崎川、寝屋川、平野川、大和川下流に位置し、都市近郊の汚染の進んだ地点である。

細菌数ならびに全有機炭素値の測定

コロニー形成数の測定にあたっては、R2A 培地に試料水を塗布し、30℃ で 1 週間培養した後、培地表面に生じたコロニー数を計測した。

全菌数の測定にあたっては、大阪の河川水試料に対しては DAPI を、他の試料に対しては SYBR-II (SYBR green II) を用いた。試料水に冷 paraformaldehyde 溶液 (12% in PBS [pH7.5]) を加え (終濃度 3%), 4℃ で 18 時間以上固定した。次に DAPI (終濃度 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) または SYBR-II (終濃度 stock solution の 1 万倍希釈) を添加して 5 分間染色し、濾過によって試料中の細菌をポリカーボネートフィルター (東洋濾紙; 孔径 0.20 μm) 上に捕集した。フィルターをスライドガラス上に乗せ、エマルジョンオイルで封入し、蛍光顕微鏡 (Olympus AX70) で観察・計数した。なお DAPI 由来の蛍光の観察には U-MWU キューブ、SYBR-II 由来の蛍光の観察には U-MNIBA キューブを用いた。

全有機炭素値は、TOC-5000 (島津) により測定した。

大腸菌群試験

大腸菌群数は、乳糖ブイヨン培地を用いた MPN 法により求めた³⁹⁾。

オリゴヌクレオチドプローブ

使用したプローブを Table 4 に示した。すなわち、*Proteobacteria* の alpha, beta, gamma サブクラスをそれぞれ標的としたプローブ ALF1b, BET42a, GAM42a⁴⁰⁾、*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 門の *Cytophaga-Flavobacterium* クラスタを標的としたプローブ CF319⁴¹⁾、偏性嫌気性グラム陰性細菌 *Bacteroides* グループを標的としたプローブ BAC303⁴¹⁾、通性嫌気性グラム陰性腸内細菌科 *Escherichia-Shigella* のグループを標的としたプローブ ES445 を用いた。プローブ ES445 は本研究でデザインした。また真正細菌を標的としたプローブ EUB338 およびネガティブコントロールとなるプローブ NON を用いた。各プローブの 5'-末端は蛍光色素 Cy3^{42,43)} で標識した。16S rRNA の塩基配列に基づく系統樹を Fig. 12 に示した。プローブ ALF1b, BET42a, GAM42a, CF319 の標的とす

る細菌は交差反応しない. プローブ BAC303 とハイブリダイズする細菌の一部はプローブ CF319 と, プローブ ES445 とハイブリダイズする細菌は, プローブ GAM42a と交差反応する.

Table 4. Oligonucleotide probes.

Probe	Specificity	Sequence (5'-3')	Target position ^a	Reference
ALF1b	Alpha subclass of <i>Proteobacteria</i>	CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG	16S, 19-35	40
BET42a	Beta subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACCTTCGTTT	23S, 1027-1043	40
GAM42a	Gamma subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	40
CF319	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i> cluster of CFB-phylum	TGGTCCGT(G/A)TCTCAGTAC	16s, 319-336	41
BAC303	<i>Bacteroides</i> cluster of CFB-phylum	CCAATGTGGGGGACCTT	16s, 303-319	41
ES445	<i>Escherichia-Shigella</i> and relatives	CTTTACTCCCTTCCTCCC	16s, 445-462	This study
EUB338	domain <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	16
NON	Negative control	ACTCCTACGGGAGGCAGC	16S, 338-355	28

^a *E. coli* rRNA numbering.

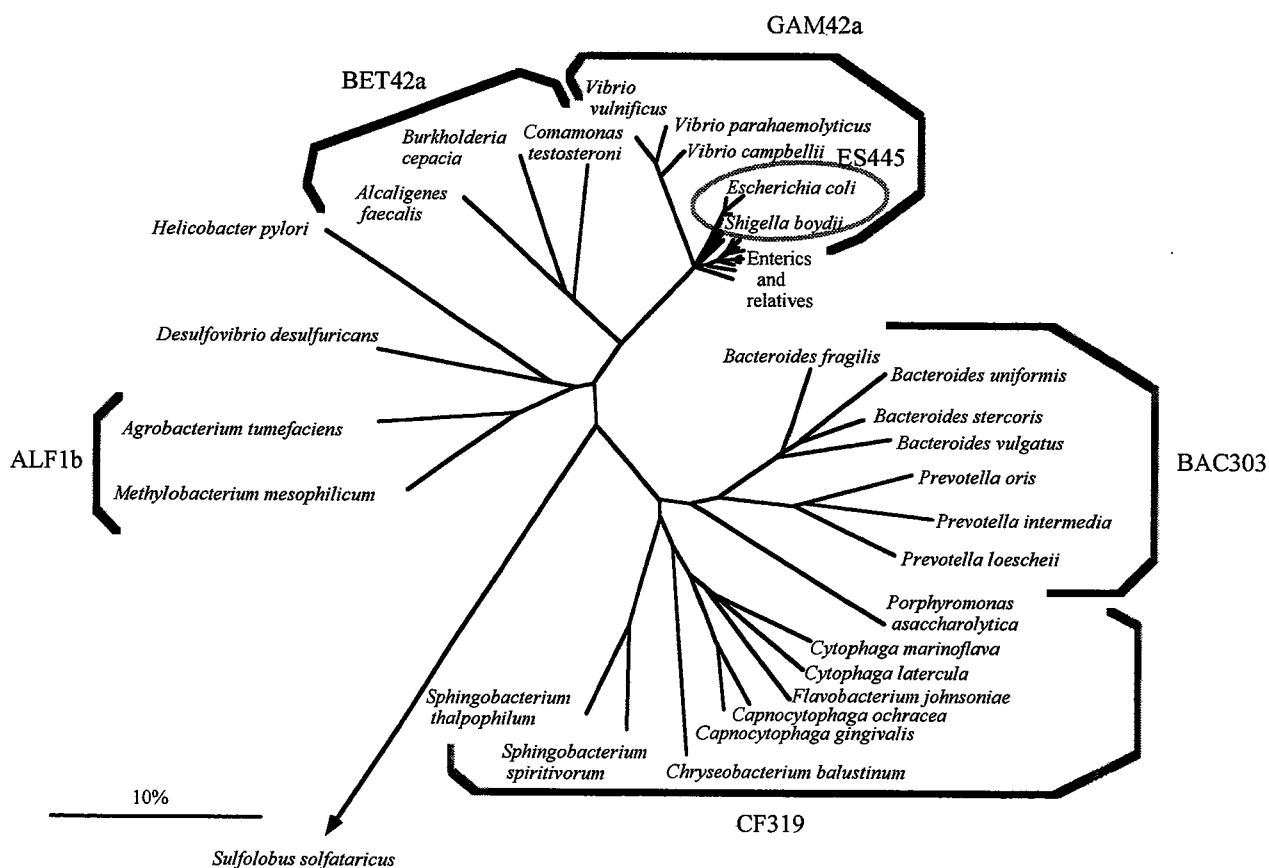


Fig. 12. Evolutionary distance tree based on 16S rRNA sequences. The bar corresponds to 10% estimated sequence divergence.

Cy3-FISH

各試料に冷 paraformaldehyde 溶液 (12% in PBS [pH7.5]) を加え (終濃度 3%), 4°C で 18 時間固定した. 次にポリカーボネート製フィルター上に細菌を捕集し, 濾過滅菌水で洗浄した. 続いて細菌を捕集したポリカーボネート製フィルターを 6 分の 1 に切断した. スライドガラス上に置いた濾紙に 40 μ l のハイブリダイゼーションバッファー (0.9 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 20 mM Tris-HCl [pH7.5], 各濃度の formamide [ALF1b, 20%; BET42a, 35%; GAM42a, 35%; CF319, 15%; BAC303, 0%; ES445, 45%; EUB, 0%; NON, 0%]) を吸収させ, その上に細菌を捕集したポリカーボネート製フィルターを置き, 51°C で 15 分間インキュベートした. 次に Cy3 で標識したオリゴヌクレオチドプローブ 2 ng μ l⁻¹ を含むハイブリダイゼーションバッファーを 40 μ l 滴下し, 46°C で 3 時間インキュベートした. ハイブリダイゼーション後, フィルターを 300 μ l の洗浄バッファー (各濃度の NaCl [ALF1b, 0.225 M; BET42a, 80 mM; GAM42a, 80 mM; CF319, 80 mM; BAC303, 0.9 M; ES445, 80 mM; EUB, 0.9 M; NON, 0.9 M], 5 mM EDTA, 0.01% SDS, 20 mM Tris-HCl [pH7.5]) に浸し, 48°C で 30 分間インキュベートした. 洗浄後, フィルターを 300 μ l の核酸染色溶液 (DAPI の終濃度は 1 μ g ml⁻¹, SYBR-II の終濃度は stock solution の 1 万倍希釈) に浸し, 室温で 5 分間インキュベートした. フィルターを濾過滅菌水で洗浄し, 風乾させた後, エマルジョンオイルで封入して蛍光顕微鏡 (Olympus AX70) で観察・計数した. なお DAPI 由来の蛍光の観察には U-MWU キューブ, SYBR-II 由来の蛍光の観察には U-MNIBA キューブ, Cy3 由来の蛍光の観察には U-MWIG キューブを用いた.

DVC

FISH 法の検出感度の向上と個々の細菌の生理活性を評価するため, DVC 法を併用した^{6,44)}. すなわち試料を容量 15 ml の Centrifuge tube (Corning) に入れ, yeast extract (50 μ g ml⁻¹), nalidixic acid (20 μ g ml⁻¹), pipemidic acid (10 μ g ml⁻¹), piromidic acid (10 μ g ml⁻¹), cephalexin (10 μ g ml⁻¹), ciprofloxacin (0.5 μ g ml⁻¹) を加え, 30°C で 18 時間静置した後, Cy3-FISH を行った.

結果および考察

Kelang 川, Chao Phraya 川, 大阪の河川の採水地点における気温, 水温, pH, EC, TOC 値および全菌数を Table 5 に示した. 有機炭素値はいずれも高い値を示し, 有機物汚染が

進んでいることを確認した。

Table 5. Physico-chemical characteristics of river water samples.

Sampling stations	Date	A.T. ^a (°C)	W.T. ^b (°C)	pH	EC ^c ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	TOC ^d (mg liter^{-1})	TDC ^e (10^6 ml^{-1})
KL1	22 Jul. 1999	25.1	26.7	7.6	534	9.7	15
	14 Oct. 1999	25.0	27.1	7.5	200	5.4	3.0
KL3	22 Jul. 1999	25.8	25.6	7.4	352	7.4	11
	14 Oct. 1999	25.1	25.6	7.4	189	4.1	3.0
KL4	22 Jul. 1999	27.8	26.3	7.7	351	7.3	10
	14 Oct. 1999	24.6	25.7	7.6	195	4.2	3.8
SA6	22 Jul. 1999	31.3	28.9	7.5	369	8.3	6.2
	14 Oct. 1999	31.8	27.5	7.3	219	6.5	4.0
K7	22 Jul. 1999	29.3	29.5	7.4	369	8.2	6.0
	14 Oct. 1999	29.0	26.7	7.3	159	5.5	3.2
CP3	20 Jul. 1999	31.3	31.2	7.6	652	7.1	3.1
	12 Oct. 1999	30.1	30.8	7.8	220	4.6	3.4
CP2	20 Jul. 1999	31.4	30.8	7.6	287	6.2	2.4
	12 Oct. 1999	29.5	30.7	7.9	200	4.7	3.3
CP1	20 Jul. 1999	28.8	31.2	7.6	308	6.0	2.2
	12 Oct. 1999	29.4	30.6	7.7	230	5.5	3.8
HR	27 Sep. 1999	29.3	26.4	7.6	700	9.8	13
YM	27 Sep. 1999	27.1	27.4	7.8	420	5.6	12
KN	27 Sep. 1999	23.8	26.3	7.8	387	6.3	4.7
NY	27 Sep. 1999	27.4	27.5	7.6	394	5.1	4.0

^a A.T., ambient temperature.

^b W.T., water temperature.

^c EC, electrical conductivity.

^d TOC, total organic carbon.

^e TDC, total direct counts determined by DAPI or SYBR-II staining.

コロニー形成細菌の全細菌に対する割合を Fig. 13 に示した。汚染の進んだ大阪の河川水試料では 10–30%, Chao Phraya 川の試料では 5–10% であったのに対し, Kelang 川の試料では 20–60% であり, 極めて高い値を示した。従来より環境中の細菌は大部分が培養困難であることが報告されていることから^{6-8,14)}, Kelang 川の細菌の生理状態はこれらの細菌と大きく異なることが推察された。

FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率を表した結果を Fig. 14 に示した。これは真正細菌に共通なプローブ EUB338 とハイブリダイズした細菌の全細菌に対する割合として表した。FISH 法のみを行った場合, Kelang 川の試料では 55–80%, Chao Phraya 川の試料では 15–35%, 大阪の試料では 45–60% であった (Fig. 14a)。FISH 法の検出効率は菌

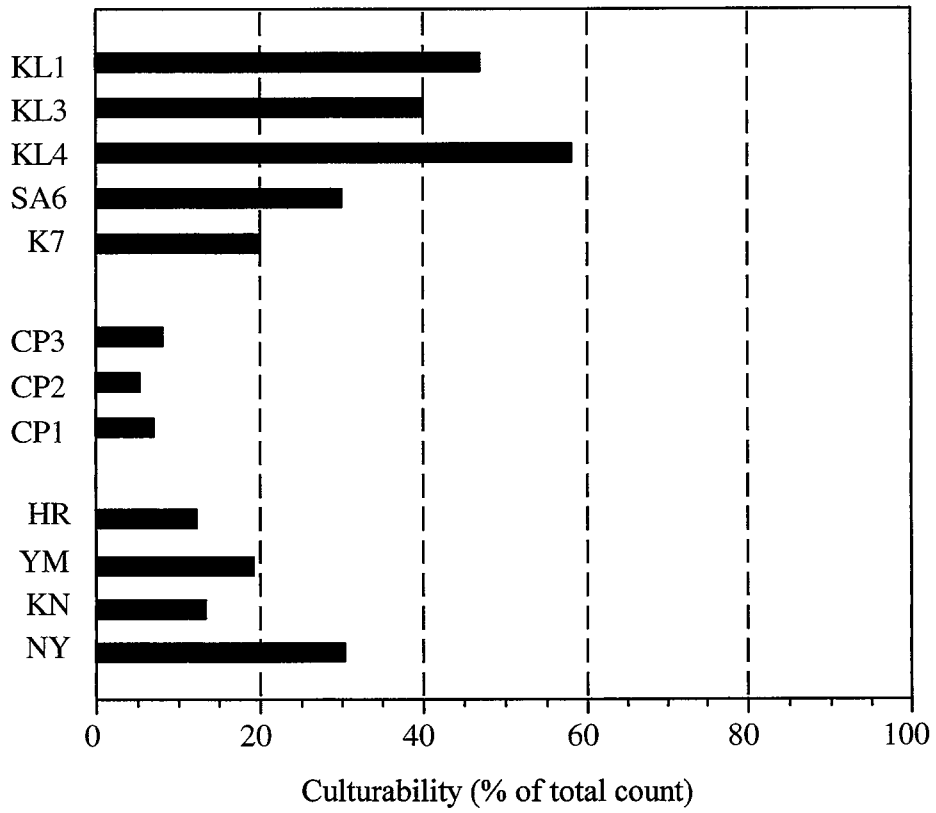
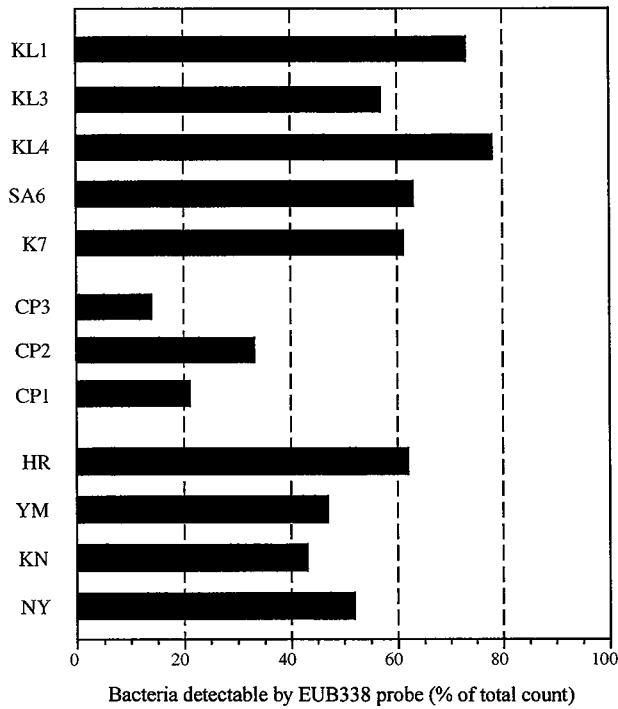


Fig. 13. Culturable bacteria in river water samples measured as CFU on R2A medium.

(a) FISH



(b) DVC-FISH

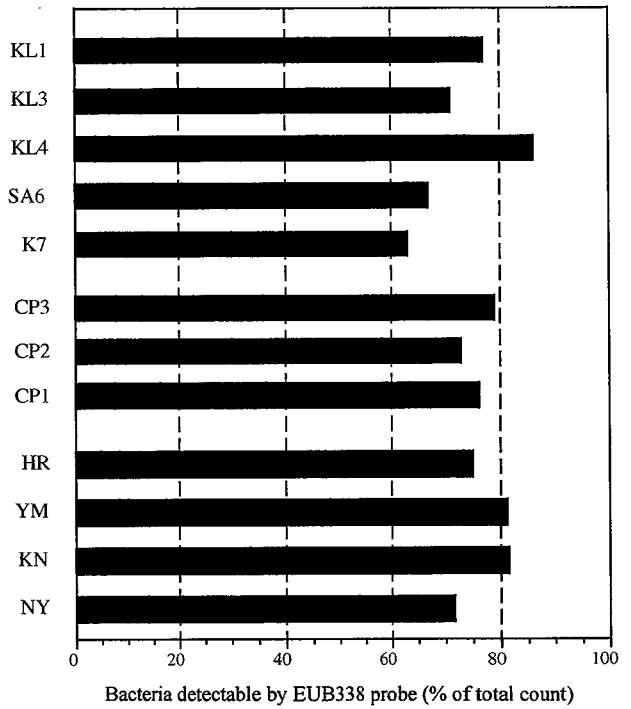


Fig. 14. Hybridization efficiency.

体内の rRNA 含量に依存することから^{17,19)}, Kelang 川の試料では rRNA 含量が高い, すなわち細菌の生理活性が高く, Chao Phraya 川の試料では生理活性が低いことが推察された. また DVC-FISH を行った場合, 検出効率は, Kelang 川の試料では大きく変化しなかったのに対し Chao Phraya 川の試料では 75–80%, 大阪の試料では 70–80% に向上した (Fig. 14b). 検出効率の増加は, DVC 法でのインキュベーションによりタンパク合成が行われ, rRNA 含量が増加した細菌が存在することを意味する. したがって FISH 法では検出されず, DVC-FISH 法でのみ検出可能となった細菌, すなわち Chao Phraya 川の試料では 40–60%, 大阪の試料では 10–40% を占める細菌は, 河川水中での生理活性が低いものの, タンパク合成能を保持していると考えられた. また Kelang 川の試料では, 河川水中での生理活性が高い細菌が多いため, 検出効率が大きく変化しなかったと考えられた.

このように Kelang 川, Chao Phraya 川, 大阪の河川水試料を比較したところ, EC, TOC 値, 全菌数では, これら 3 地域による違いは, 顕著に見られなかった. しかしながら, コロニー形成細菌の全細菌に対する割合, FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率をもとに細菌の生理活性を検討したところ, 3 地域による違いが見られ, Kelang 川では生理活性の高い細菌が多いことが明らかとなった. Kelang 川では水量が少ないにもかかわらず, 十分に処理されていない多量の下水が流入している. また処理された場合でも, 塩素消毒が行われずに河川に放流される. このような理由により河川水中に生理活性の高い細菌が多いと考えられた.

Fig. 15 はグループ特異的なプローブを用いて細菌群集構造を解析した結果である. 上のカラムが FISH 法を用いた結果 (Fig. 15a), 下のカラムが DVC-FISH 法を用いた結果 (Fig. 15b) である. FISH を行ったところ, 大阪の河川では beta サブクラスの細菌が優占するのに対し, Kelang 川, Chao Phraya 川では beta および gamma サブクラスの細菌が多く生息していることがわかった. 冷温帯の水環境では beta サブクラスの細菌が優占し, 次いで *Cytophaga-Flavobacterium* クラスターの細菌または alpha サブクラスの細菌が多く, gamma サブクラスの細菌の現存量は極めて少ないことが報告されている^{42,43,45-48)}. これに対し Kelang 川, Chao Phraya 川の試料では gamma サブクラスの細菌が優占種の一部であることが特徴として挙げられる. また大阪の試料では DVC-FISH を行うことにより, gamma サブクラスの細菌が多く検出されるようになった (Fig. 15b). FISH 法を用いた結果との比較から, 大阪の河川に生息する gamma サブクラスの細菌は河川水中での生理活性が低いものの, タンパク合成能を保持していることがわかった. このことは通常の FISH 法

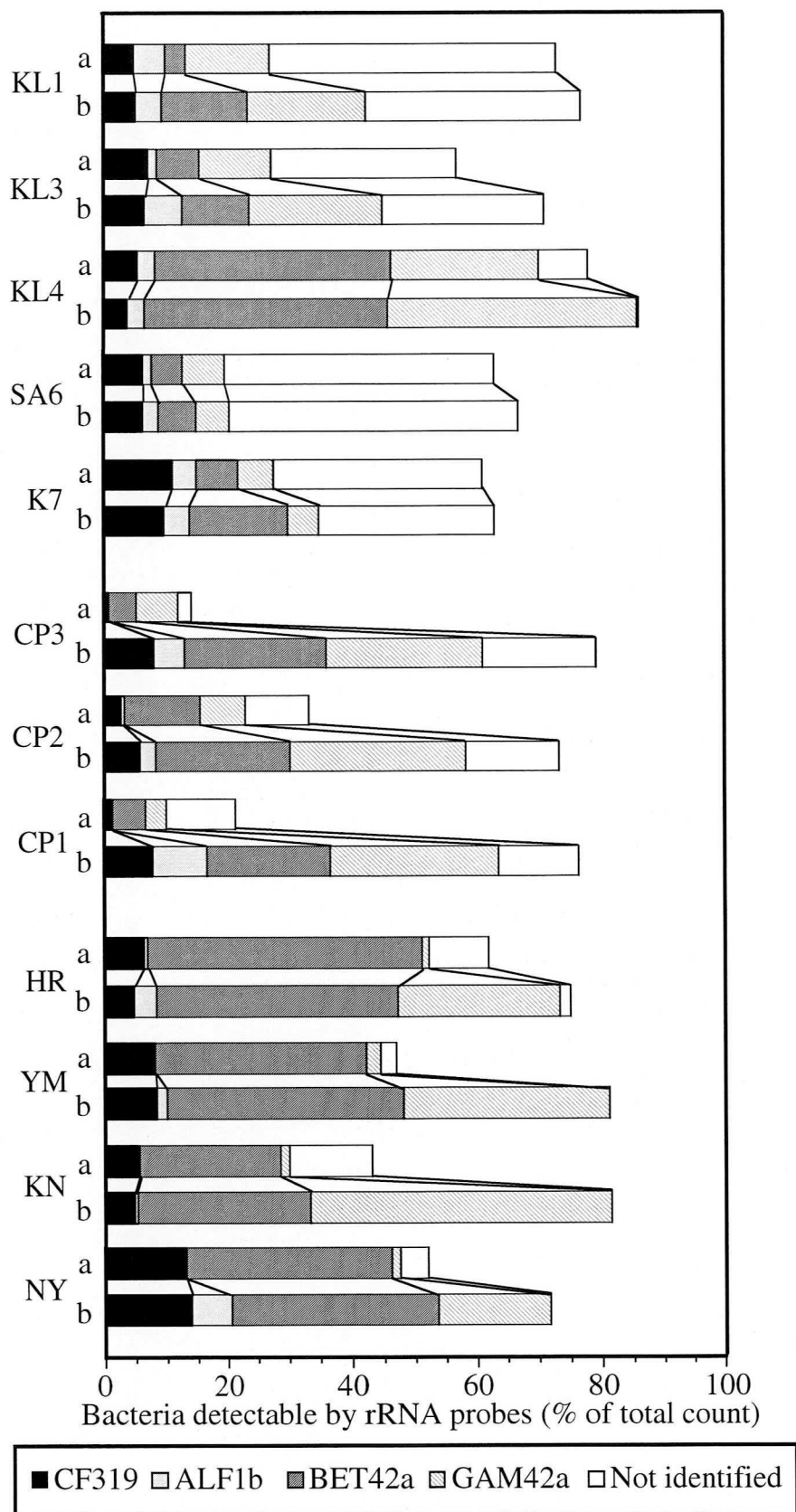


Fig. 15. Bacterial community structure in river water samples determined by FISH (a) and DVC-FISH (b).

では、生理活性の低い gamma サブクラスの細菌の現存量が過小評価されていたことを意味する。一般的に gamma サブクラスの細菌は自然環境中での現存量は少ないと報告され

ているものの^{42,43,45-48}、実際には冷温帯の水環境に生理活性が低い状態で生存していることが推察された。

東南アジアでは下水が十分処理されずに河川に流入するが多い。そこで動物消化管由来の細菌の現存量を検討するため、尿尿汚染の指標として一般的に用いられる大腸菌群試験を行った。しかしながらこの方法は、(I) 培養法であるため時間を要する、(II) 大腸菌の他、自然環境中に生息する *Erwinia carotovora* や *Citrobacter freundii* など尿尿とは無関係の細菌を検出してしまう³⁹⁾、という問題点がある。そこで本研究では、同時に FISH 法による検出を行い、結果を比較した。プローブとして *Escherichia-Shigella* グループを標的としたプローブ ES445、*Bacteroides* グループを標的としたプローブ BAC303 を用いた。大腸菌 (*Escherichia coli*) は尿尿汚染の指標として用いられる細菌である。大腸菌と *Shigella* 属の細菌の 16S rRNA の塩基配列は相同性が高く区別できないため、本研究では *Escherichia-Shigella* グループを標的としたプローブを作成した。また *Bacteroides* グループは動物消化管において最優勢を占める細菌群である⁴⁹⁻⁵²⁾。Table 6 はそれぞれ大腸菌群数、プローブ BAC303 または ES445 とハイブリダイズした細菌数を測定した結果である。またこれらの細菌の全細菌に対する割合を併記した。

大腸菌群数は、Chao Phraya 川、大阪の河川水試料では 10^3 MPN ml⁻¹ 未満であるのに対し、Kelang 川の試料では 10^3-10^4 オーダーという高い値を示した。また Kelang 川の試料では、プローブ BAC303 とハイブリダイズした細菌は、全細菌の 1-8% であった。

Bacteroides グループの細菌は、動物消化管内では *Escherichia-Shigella* グループに比べはるかに現存量が多く、また偏性嫌気性菌であるため、溶存酸素の存在する河川水中では生存できないという特徴を持つ^{49,50)}。Kelang 川の試料では、プローブ BAC303 とハイブリダイズする細菌がプローブ ES445 とハイブリダイズした細菌よりも多く、全細菌に占める割合が高い (1-8%) こと、大腸菌群数が非常に多いことから、Kelang 川は尿尿を含んだ下水による有機物負荷を強く受けていることが示された。

Chao Phraya 川の試料では、プローブ ES445 とハイブリダイズした細菌は、全細菌の 1-9% であった。下水処理場で塩素処理を受けた場合、*Escherichia-Shigella* グループの細菌は殺菌されるはずである。しかしながら河川水中でのその現存量はプローブ BAC303 とハイブリダイズした細菌よりも多く、全細菌に占める割合が高い (1-9%) ことから、尿尿を含んだ下水が Chao Phraya 川に流入し、その後 *Escherichia-Shigella* グループの細菌が河川水中で生存・増殖していると考えられた。またプローブ BAC303 とハイブリダイズした

細菌および大腸菌群の現存量は、Kelang 川の試料に比べ少なかったことから、Chao Phraya 川は尿尿を含んだ下水による有機物負荷を受けているものの、河川の水量が多いため Kelang 川ほどその影響は強くないと考えられた。

大阪の試料では、プローブ BAC303 または ES445 とハイブリダイズした細菌の全細菌に対する割合は、本実験の検出限界である 0.1% 未満であったことから、十分に下水処理が行われていると考えられた。

FISH 法、DVC-FISH 法を用いた結果から、Kelang 川、Chao Phraya 川では、動物消化管由来の細菌は培養法である大腸菌群試験により得られる値に比べはるかに高い割合で存在していることが明らかとなった。尿尿汚染の見られる環境では、消化器感染症の病原体の存在が危惧される。したがって Kelang 川、Chao Phraya 川では、培養操作に依存しない手法を用いて汚染指標細菌をモニタリングする必要があると考えられた。

Table 6. Abundance of fecal bacteria in river water samples.

Sampling stations	Coliform 10^3 MPN ml ⁻¹	BAC303 ^a 10^3 cells ml ⁻¹	ES445 ^b 10^3 cells ml ⁻¹
KL1	>24 (>0.5) ^c	69 ^d (1.4)	<4.9 ^d (<0.1)
KL3	5.4 (0.10)	140 ^d (3.9)	<3.7 ^d (<0.1)
KL4	>24 (>0.30)	550 ^d (7.7)	2.9 ^d (0.4)
SA6	2.4 (0.06)	140 ^d (3.7)	99 ^d (2.6)
K7	9.2 (0.30)	79 ^d (2.2)	29 ^d (0.8)
CP3	0.54 (0.017)	9.3 (0.3)	260 (8.5)
CP2	0.35 (0.015)	17 (0.7)	22 (0.9)
CP1	0.35 (0.016)	15 (0.7)	150 (6.6)
HR	0.35 (0.0027)	<13 (<0.1)	<13 (<0.1)
YM	0.92 (0.0080)	<12 (<0.1)	<12 (<0.1)
KN	0.35 (0.0075)	<4.7 (<0.1)	<4.7 (<0.1)
NY	0.35 (0.0088)	<4.0 (<0.1)	<4.0 (<0.1)

^a *Bacteroides* groups determined by DVC-FISH.

^b *Escherichia-Shigella* and relatives determined by DVC-FISH.

^c % of total count.

^d Determined by FISH.

小括

東南アジア諸国では、急速に都市化、工業化が進み、生活排水、工業廃水、さらには多量の農薬の使用による水質汚濁が深刻化している。環境汚染に対して的確な対策を講じる

ためには、まず河川環境の現状を明らかにすることが重要であり、生態系の根幹部を支えている細菌を深く理解することが必要である。そこでマレーシアの Kelang 川およびタイの Chao Phraya 川に生息する細菌の群集構造およびその生理活性をシングルセルで検討した。大阪の都市河川水との比較を行ったところ、Kelang 川に生息する細菌の 20-60% が培養可能であることが分かり、細菌の生理状態が全く異なることが推察された。

細菌の rRNA 含量を指標とした FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率の結果から、Kelang 川に生息する細菌は河川水中での生理活性が高いこと、Chao Phraya 川に生息する細菌は河川水中での生理活性が低いものの、その多くはタンパク合成能を有していることがわかった。Kelang 川では水量が少ないにもかかわらず、十分に処理されていない多量の下水が流入している。また処理された場合でも、塩素消毒が行われずに河川に放流されることから、Kelang 川に生息する細菌の多くは生理活性が高いものと考えられた。

細菌群集構造解析の結果から、両河川ともに *Proteobacteria* の beta, gamma サブクラスの細菌が優占し、beta サブクラスが優占する冷温帯の水環境との違いがみられた。また大阪の試料では DVC-FISH を行うことにより、gamma サブクラス of 細菌が多く検出されるようになったことから、これらの細菌は河川水中での生理活性が低いものの、タンパク合成能を保持していることが明らかとなった。一般的に gamma サブクラス of 細菌は自然環境中での現存量は少ないと報告されていることから、実際には冷温帯の水環境に生理活性が低い状態で生存していることが推察された。

FISH 法を用いて *Bacteroides* グループ、*Escherhichia-Shigella* グループの細菌の現存量を検討した結果、Kelang 川および Chao Phraya 川では、動物消化管由来の細菌が培養法により得られる値に比べはるかに高い割合で存在していることが明らかとなった。尿尿汚染の見られる環境では、消化器感染症の病原体の存在が危惧される。したがって Kelang 川、Chao Phraya 川では、培養操作に依存しない手法を用いて汚染指標細菌をモニタリングする必要があると考えられた。

DVC-FISH 法を用いることにより、通常の FISH 法では困難であったタンパク合成能を持つ細菌を対象とする群集構造解析が可能となり、水環境の微生物モニタリングに有効な手法であると考えられた。また本法は迅速かつ高感度にタンパク合成能を持つ特定細菌を検出可能であることから、医療や食品分野、住環境における微生物管理に応用できるものと期待される。

総括

微生物は生物圏に広く生息し、多種多様な物質の分解、循環を通して、生態系を支えている。例えば動植物に由来する有機物を無機化し、栄養塩の再利用を促進している。また農薬や合成洗剤など環境中に放出された様々な化学物質を分解し、環境浄化に大きく貢献している。つまり微生物のこれらの働きがなければ、物質は循環せず、生態系の恒常性は維持できないといえる。また微生物は分解者として環境中で機能している一方、上位の生物に栄養源として利用され、生産者としての役割も担っている。このように環境中の微生物はその存在の重要性が認識されているにもかかわらず、群集の基本的情報、すなわち群集構造やそれを構成する個体の生理活性に関する情報ですら、いまだ十分には理解されていない。この大きな理由として、現在一般的に用いられている培養法では、環境中のごく一部の細菌しか検出できないことが挙げられる。また培養の難しい細菌であっても、その多くは生理活性を有していることが明らかとなっており、環境中における重要性が認識されてきている。したがって環境中に生息する細菌の群集構造を解析しその生理活性を評価するためには、培養操作に依存しない検出法が必要となる。

環境中に生息する細菌を培養することなく属種レベルで明らかにする方法として、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH 法) が 1990 年以降環境微生物学に応用されつつある。しかしながら、FISH 法の検出感度は菌体内の rRNA 含量に依存することから、貧栄養な環境に生息する rRNA 含量が低い細菌に対しては、その応用が制限される場合が多い。そこで本研究では蛍光基質 HNPP および Fast Red TR を用いた高感度な FISH 法 (HNPP-FISH 法) に着目し、河川水中の生理活性の低い細菌の群集構造を解析することを目的として、その最適化を試みた。水環境に多く生息すると報告されている細菌を標的とした 5 種の rRNA プローブを用い、そのハイブリダイゼーションの条件を 30 種の標準株を用いて決定した。

次に本法を河川水中の細菌群集構造解析に応用し、従来法との比較を行った。HNPP-FISH 法では全細菌の約 70% の細菌を検出することができたのに対し、寒天平板培養法では約 5%、従来法である FITC-FISH 法では約 15% であった。このことから本法は従来法に比べはるかに有効な手法であることがわかった。また 5 種のプローブを用いて群集構造解析を行った結果、有機物汚染の進んだ地点では約 50%、汚染の進んでいない地点では 25-40% の細菌がいずれかのプローブとハイブリダイズし、プローブ EUB338 で検出できる

細菌の大部分を同定することができた。本法は淡水環境に生息する細菌の役割や生態学的意義を理解するための基礎となるものと考えられた。

FISH 法の検出感度は細菌の rRNA 含量に依存することから、細菌の生理活性を知る指標の一つとなる。しかしながら、飢餓状態に入った細菌では rRNA の半減期は数日であり、FISH 法は厳密には細菌の生死を評価できる手法ではない。環境中では生きている細菌、高い生理活性を持つ細菌は物質循環における寄与が大きいと推察される。そこで DVC 法を行った試料に対し FISH を行い (DVC-FISH 法)、東南アジアの河川に生息する細菌の群集構造解析とその生理活性評価に応用した。本研究では水質汚濁が深刻化しているマレーシアの Kelang 川およびタイの Chao Phraya 川、さらに大阪市周辺の都市河川を対象とした。

細菌の rRNA 含量を指標とした FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率の結果から、Kelang 川に生息する細菌は河川水中での生理活性が高いこと、Chao Phraya 川に生息する細菌は河川水中での生理活性が低いものの、その多くはタンパク合成能を有していることがわかった。Kelang 川では水量が少ないにもかかわらず、十分に処理されていない多量の下水が流入している。また処理された下水であっても、塩素消毒が行われずに河川に放流されることから、Kelang 川に生息する細菌は生理活性が高いものと考えられた。

細菌群集構造解析の結果から、両河川ともに *Proteobacteria* の beta, gamma サブクラスの細菌が優占し、beta サブクラスが優占する冷温帯の水環境との違いがみられた。また大阪の試料では DVC-FISH を行うことにより、gamma サブクラスの細菌が多く検出されるようになったことから、これらの細菌は河川水中での生理活性が低いものの、タンパク合成能を保持していることが明らかとなった。一般的に gamma サブクラスの細菌は自然環境中での現存量は少ないと報告されていることから、実際には冷温帯の水環境に生理活性が低い状態で生存していることが推察された。

FISH 法を用いて *Bacteroides* グループ、*Escherichia-Shigella* グループの細菌の現存量を検討した結果、Kelang 川および Chao Phraya 川では、動物消化管由来の細菌が培養法により得られる値に比べはるかに高い割合で存在していることが明らかとなった。屎尿污染の見られる環境では、消化器感染症の病原体の存在が危惧される。したがって Kelang 川、Chao Phraya 川では、培養操作に依存しない手法を用いて汚染指標細菌をモニタリングする必要があると考えられた。

DVC-FISH 法を用いることにより、通常の FISH 法では困難であったタンパク合成能を持つ細菌を対象とする群集構造解析が可能となり、本法は水環境の微生物モニタリングに

有効な手法であると考えられた。また DVC-FISH 法は迅速かつ高感度にタンパク合成能を持つ特定細菌を検出可能であることから、医療や食品分野、住環境における微生物管理に応用できるものと期待される。

結論

1. 河川水中の生理活性の低い細菌に対する群集構造解析を目的として HNPP-FISH 法を最適化した。
2. HNPP-FISH 法を用いることにより、河川水中の約 70% の細菌を対象とする群集構造解析が可能となった。従来法である寒天平板培養法では約 5%, FITC-FISH 法では約 15% であったことから、HNPP-FISH 法ははるかに有効な手法であることが示された。
3. DVC-FISH 法を用いることにより、通常の FISH 法では困難であったタンパク合成能を持つ細菌を対象とする群集構造解析が可能となった。
4. DVC-FISH 法は迅速かつ高感度にタンパク合成能を持つ特定細菌を検出可能であることから、水環境の微生物モニタリングのみならず、医療や食品分野、住環境における微生物管理に応用可能であると考えられた。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始暖かい御指導と御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授・恩師 那須正夫先生に篤く御礼申し上げます。

研究途上、数々の御助言をいただきました大阪大学大学院薬学研究科講師、谷佳津治先生、大阪大学大学院薬学研究科助手、山口進康先生に深謝いたします。

また、本研究に御協力をいただきました大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野の諸氏に御礼申し上げます。

マレーシア、タイでの調査・研究にあたり、数々の御助言、御協力を頂きました財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所、田所博先生、藤本一馬先生、SIRIM-JICA Project, 三上栄一先生、マヒドン大学環境資源学部講師、Benjaphorn Prapagdee先生に深謝いたします。また、実験室ならびに実験器具等を提供して頂いた SIRIM Berhad, マヒドン大学環境資源学部にご心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) OECD Environment Directorate. p301C. *In* OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
- 2) OECD Environment Directorate. p301E. *In* OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
- 3) OECD Environment Directorate. p302C. *In* OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
- 4) Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. and Thingstad, F. : *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, 257 (1983).
- 5) Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228 (1977).
- 6) Kogure, K., Shimidu, U. and Taga, N. : *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420 (1979).
- 7) Jones, J.G. : *Freshwater Biol.*, **7**, 67-91 (1977).
- 8) Torsvik, V., Goksyr, J. and Daae, F.L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 782-787 (1990).
- 9) Karlmbach, S., Manz, W. and Szewzyk, U. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4164-4170 (1997).
- 10) 谷佳津治, 山本かおり, 山口進康, 那須正夫 : *防菌防黴*, **26**, 415-421 (1998).
- 11) Kawai, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M. : *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 496-504 (1999).
- 12) Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgway, H.F. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1801-1808 (1992):
- 13) Porter, J., Diaper, J., Edwards, C. and Pickup, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2783-2786 (1995).
- 14) Yamaguchi, K. Kenzaka, T. and Nasu, M. : *Microb. Environ.*, **12**, 1-8 (1997).
- 15) Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M.A. and Colwell, R.R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 115-120 (1996).
- 16) Colwell, R.R. : *Science*, **274**, 2025-2031 (1996).
- 17) Delong, E.F., Wickham, G.S. and Pace, N.R. : *Science*, **243**, 1360-1363 (1989).

- 18) Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. : *J. Bacteriol.*, **172**, 762-770 (1990).
- 19) Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. : *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169 (1995).
- 20) Yamaguchi, N., Inaoka, S., Tani, K., Kenzaka, T. and Nasu, M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 275-278 (1996).
- 21) Flardh, K., Cohen, P.S. and Kjelleberg, S. : *J. Bacteriol.*, **174**, 6780-6788 (1992).
- 22) Nishimura, M., Kogure, K., Kita-Tshukamoto, K. and Ohwada, K. : *Bull. Jap. Soc. Micro. Ecol.*, **10**, 109-113 (1995).
- 23) Lee, Y.H. and Stuebing, R.B. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**, 272-279 (1990).
- 24) Kusamran, W.R., Wakabayashi, K., Oguri, A., Tepsuwan, A., Nagao, M. and Sugimura, T. : *Mutat. Res.*, **325**, 99-104 (1994).
- 25) Tan, G.H. : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 171-176 (1995).
- 26) Department of Environment, Ministry of Science, Technology and the Environment, Malaysia, Environmental Quality Report (1997).
- 27) Reasoner, D.J. and Gerldreich, E.E. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1-7 (1985).
- 28) Welikala, N., Yamaguchi, N., Kenzaka, T., Tani, K. and Nasu, M. : *Biocontrol Science*, **2**, 79-86 (1997).
- 29) Yamaguchi, N., Itoh, Y., Masuhara, M., Tani, K. and Nasu, M. : *Microb. Environ.*, **14**, 1-9 (1999).
- 30) Wallner, G., Amann, R.I. and Beisker, W. : *Cytometry*, **14**, 136-143 (1993).
- 31) Kirchman, D., K'nees, E. and Hodson, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 599-607 (1985).
- 32) Lighthart, B. : *Can. J. Microbiol.*, **21**, 392-394 (1975).
- 33) Konda, T. and Tezuka, Y. : *Jap. J. Ecol.*, **29**, 209-220 (1979).
- 34) Maeda, S. : *Jap. J. Limnol.*, **41**, 163-171 (1980).
- 35) Stopinski, M. : *Acta. Microbiol. Pol.*, **30**, 283-294 (1981).
- 36) Nuttall, D. : *J. Appl. Bacteriol.*, **53**, 49-59 (1982).

- 37) Hodson, R.E., Dustwan, W.A., Garg, R.P. and Moran, M.A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4074-4082 (1995).
- 38) Tani, K., Kurokawa, K. and Nasu, M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1536-1540 (1998).
- 39) 日本薬学会編 衛生試験法・注解, p.174-178 (1990).
- 40) Manz, W., Amann, R. Ludwig, M., Wagner, M. and Schleifer, K.-H. : *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**, 593-600 (1992).
- 41) Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanney, M. and Schleifer, K.-H. : *Microbiology*, **142**, 1097-1106 (1996).
- 42) Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F.O., Wille, A. and Psenner, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2138-2144 (1996).
- 43) Glockner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, L., Psenner, R., Trebesius, K. and Field, K.G. : *System. Appl. Microbiol.*, **19**, 403-406 (1996).
- 44) Joux, F. and Lebaron, P. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3643-3647 (1997).
- 45) Weiss, P., Schweitzer, B., Amann, R. and Simon, M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1998-2025 (1996).
- 46) Pernthaler, J., Alfreider, A., Posch, T., Andreatta, S. and Psenner, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4778-4783 (1997).
- 47) Pernthaler, J., Glockner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R. and Amann, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4299-4306 (1998).
- 48) Glockner, F.O., Fuchs, B.M. and Amann, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3721-3726 (1999).
- 49) Moore, W.E.C. and Holdeman, L.V. : *Appl. Microbiol.*, **27**, 961-979 (1974).
- 50) Holdeman, L.V., Good, I.J. and Moore, W.E.C. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 359-375 (1976).
- 51) Kreader, C.A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1171-1179 (1995).
- 52) Blaut, M. : German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke Annual Report 1996, 69-70 (1997).

