

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H01901

研究課題名(和文) 下水処理プロセスを担う原生動物の代謝基盤の解析と微生物間代謝ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analysis of basic metabolism of protozoa responsible for sewage treatment process and elucidation of microbial metabolism network

研究代表者

新里 尚也 (Shinzato, Naoya)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：00381252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、下水処理プロセスで水の浄化に主要な役割を果たす、トリミエマ原虫の共生バクテリアTC1の全ゲノム情報を解析し、TC1が宿主原虫よりアミノ酸を得て脂質の合成を活発に行っている可能性を示した。また、シクリディウム属に近縁な原生動物(シクリディウム原虫)にもメタン生成菌に加え、機能未知の共生バクテリアが存在することを明らかにし、これをヒドロゲノソモバクター・エンドシンビオティカスと命名した。組織化学的解析の結果、メタン生成菌とヒドロゲノソモバクターは共に、宿主の水素生成オルガネラである、ヒドロゲノソームに密着して存在していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下水処理プロセスで水の浄化に主要な役割を果たす原生動物は、メタン生成菌を始めとした原核微生物を細胞内に共生させていることが多い。メタン生成菌は、宿主原生動物の嫌気代謝の結果生じる水素をメタン化することで、宿主による不溶性有機物の代謝を活性化している。その一方で、それ以外の共生微生物については宿主への寄与が明らかとなっていなかった。本研究は、下水処理プロセスで働く原生動物の共生バクテリアが、脂質合成を行って宿主へ供給するとともに脂質顆粒の形成を促し、宿主の飢餓条件への適応度を高めている可能性を示した。本研究成果は、原生動物の代謝基盤の理解を深め、プロセスの安定化や高度化に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed in detail the whole genome information of the bacterial symbiont TC1 living in Trimyema ciliate, which plays a major role in a sewage treatment process. As the results, it was shown that TC1 may have obtained amino acids from host ciliate and actively synthesized lipids. In addition, it was revealed that another ciliate closely related to the genus Cyclidium also have symbiotic bacteria of unknown function in addition to methanogens, which was named Hydrogenosomobacter endosymbioticus. Histochemical analysis showed that both methanogens and Hydrogenosomobacter symbiont are in close contact with hydrogen-generating organelle, hydrogenosomes.

研究分野：微生物生態学

キーワード：嫌気環境 原生動物 細胞内共生 ゲノム解読 脂肪酸合成

1. 研究開始当初の背景

下水処理における有機物の分解や栄養塩類の除去による水の浄化やメタンガスの生成は、原生動物を始めとした微生物の働きに依存したプロセスであり、施設の構成や運用は、微生物活性を最大限利用できるように考慮されている。下水処理プロセスで優占化する微生物には大きく分けて、不溶性の有機物を摂食して分解する原生動物と、主に溶質の分解に関わるバクテリアやアーキア等の原核生物があり、運転条件によってはカビが増えることがある。

これらの中で原生動物は形態で分類することが可能であり、これまでも 200 種を超える種が記載され、下水処理プロセスの状態を反映する指標としてモニタリングの対象となっている (Madoni, 2011)。また、バクテリア等の原核生物叢は、近年、培養を介さない遺伝子解析により数千にもものぼる種が存在することが示されている (Zhang et al., 2012)。こうした微生物の間には、捕食や被食の関係以外にも、お互いの代謝産物に依存した食物網 (フード・ウェブ) や、細胞内外に他の生物を住ませる共生関係等の複雑な相互作用が存在する。

こうした複雑な下水処理プロセスの制御は、主には原生動物叢の変化や、生物量、滞留時間、容積負荷等のプロセス変数を総合的に判断することにより経験的に行われているが、それぞれの対応と結果を論理的に説明することはできていない。その一方で、下水処理プロセスにおいて、不溶性有機物の分解に大きな役割を果たしている原生動物は、人為的に培養することが困難であり、これまで安定的に維持されている株はほとんど知られていない。培養株を用いた研究が欠如しているために、原生動物の生態や代謝に関する基本的な知見が決定的に不足している。次の世代を見据えた下水処理プロセスのさらなる安定化、効率化、高度化を実現するためには、原生動物を始めとした、そこで機能する微生物叢の全容解明とそれらの代謝ネットワークの包括的な理解が不可欠であると思われる。

2. 研究の目的

上述の背景において、本研究室では国内 (茨城県) の下水処理施設より、トリミアマ属原虫の一種であるトリミアマ・コンプレッサム (以下、トリミアマ原虫) について乳酸菌を餌として安定に培養化することに成功した (Shinzato et al., 2007)。これまでの研究から、トリミアマ原虫は細胞内にメタンを生産するメタン生成菌と、機能的に未知のバクテリアを共生させていることが知られていたが、これまでの研究により、メタン生成菌は水素をメタンに変換するメタノプレバクター属のメタン生成菌であり、共生バクテリアは、ファーミキューテス門に属する新規なバクテリアであることを明らかにした。さらに平成 28 年度には、共生バクテリアの機能を明らかにすることを目的とした、全ゲノム情報の解読にも成功した (Shinzato et al., 2016)。この情報からは、本共生バクテリアが、トリミアマ原虫の細胞内で脂肪酸の合成に関わっている可能性が示唆されている。合成した脂肪酸が脂質顆粒等でトリミアマ原虫の細胞内で貯留されているとすると、原生動物が飢餓条件に晒された条件において、生存戦略上の大きなアドバンテージになると思われる。また、本共生体の基本的な代謝についても、アミノ酸を利用していることが示唆されているが、この点についても、通常は主要なエネルギー源である糖質に関して、宿主であるトリミアマと奪い合うことがないことから極めて合理的である。ここで推定された代謝経路は宿主である原生動物の遺伝子発現を詳細に調べることで明らかになると期待される。

上述のように、培養株を用いることで、原生動物の基本的な代謝に関する情報が得られるのみならず、バクテリア等の捕食速度や嗜好性、代謝産物組成、メタンの生成速度、有害物質への耐性等の評価が可能であり、下水処理プロセス内での原生動物の挙動の理解に役立つ多くの知見を提供できると考えられる。また、本研究室ではトリミアマ原虫に加え、沖縄県内の下水処理施設から新たにシクリディウム属に近縁な原虫株 (GW7) を培養することにも成功した。この原生動物についても、1990 年代にイギリスの研究者によって、一時的に研究が行われ、メタン生成菌とバクテリアを細胞内に共生させていることが報告されているが、それ以外には明らかにされていない (Esteban et al., 1993)。新たに異なる系統の原生動物株を得たことで、トリミアマ原虫との比較解析が可能となり、下水処理プロセスで機能する原生動物の特徴をより一般化できると期待される。

本研究では具体的に、培養化に成功した 2 種の原生動物株について、網羅的な遺伝子発現の解析と、細胞内に共生することが知られている機能未知のバクテリアならびに、メタン生成菌の全ゲノム情報の解読等を行って、原生動物が担う不溶性有機物の分解からメタン生成までの主要な代謝経路を明らかにすることにより、将来的な下水処理プロセスの高度化・高効率化に繋がる、生物学的、工学的知見の統合的な理解を進めたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) トリミアマ原虫内における共生バクテリアの機能推定

トリミアマ原虫の共生バクテリアは、そのゲノム情報から宿主の細胞内で脂肪酸の合成に関わっている可能性が示唆されている。合成された脂肪酸が脂質顆粒等の形でトリミアマ原虫の細胞内に貯留されているとすると、原生動物の生存戦略上大きなアドバンテージがあると思われる。本研究では、これらの点を明らかにすべく、共生バクテリアの脂肪酸合成に関わる遺伝子

群 (fab オペロン) の遺伝子発現がどのように行われているか、その上流にある制御領域を詳細に解析するとともに、実際の各遺伝子の発現状況を「定量 PCR 法」を用いて確認を行う。また、宿主であるトリミア原虫の網羅的な遺伝子発現を、次世代シーケンサーを活用した「RNA-Seq 解析」により評価し、共生バクテリアの推定される代謝経路との比較解析を行う事で、共生バクテリアの機能を明らかにする。

(2) トリミア原虫におけるメタン生成経路の推定

トリミア原虫は細胞内に共生バクテリアに加えて、共生メタン生成菌も生息させており、不溶性有機物の代謝により生じる水素を細胞内で直接メタン化している事が知られている。こうした原生動物とメタン生成菌の共生現象はこれまでも数多く報告されているが、これらのゲノム情報が解析された報告はなく、共生メタン生成菌がどのような代謝経路でメタンを生成しているのか、また、原生動物との間にどのような相互作用があるのかについては良くわかっていない。本研究では、トリミア原虫の共生メタン生成菌についても全ゲノム情報の解析を行う事で、実際に水素がメタン生成の基質となっているのか等について明らかにする。

(3) シクリディウム原虫共生体の系統学的な帰属の推定

シクリディウム原虫は、以前の研究から、トリミア原虫と同様にメタン生成菌とバクテリアを細胞内に共生させている事が報告されている。これはトリミア原虫の状況と同様であるが、共生メタン生成菌と共生バクテリアが、水素を生産する細胞内オルガネラである「ヒドロゲノソーム」と複合体を形成している事が示唆されており (Esteban et al., 1993)、トリミア原虫とは異なった代謝ネットワークが存在する可能性がある。そこで本研究では、第一に、16S リボソーム遺伝子の解析を行って、それぞれの共生体の系統学的な帰属を明らかにする。また、これらの配列情報から、「蛍光 DNA プローブ」を作成し、「in situ ハイブリダイゼーション法」により、シクリディウム原虫内でのそれぞれの共生体の分布についても可視化して確認を行う。

(4) シクリディウム原虫共生体の全ゲノム解読による機能推定

シクリディウム原虫の生物学的理解には、その内部に生息する共生体の役割を明らかにする事が不可欠である。細胞内に共生する微生物は、共生進化の過程において、共生に必要な遺伝子セット以外を段階的に失う事が多く、共生体の機能を推定するには、全ゲノム情報を解読するのが近道である。細胞内共生体のゲノム解読は、すでにトリミア原虫において技術的に確立している事から、基本的に同様な手法を用いて解析する予定である。共生体のゲノムに繰り返し配列等が多く、ショートリード・シーケンサーでは解析が困難な場合は、ロングリードが可能なパシフィック・バイオサイエンス社のシーケンサーの利用を予定している。

(5) シクリディウム原虫共生系の代謝ネットワークの解析

上述のゲノム解析から得られた情報より推定される共生体の機能については、宿主の遺伝子発現の情報と比較解析することにより、相補的な代謝経路が明らかになるとと思われる。そこで本研究では、宿主であるシクリディウム原虫についても、次世代シーケンサーを活用した「RNA-Seq 解析」を行って、網羅的な遺伝子発現の情報を得る。この解析には多くのデータ量を必要とすることから、出力に優れるイルミナ社のシーケンサー (HiSeq2000) を利用する。

(6) 原生動物株の長期保存技術の確立

本研究で培養化に成功した 2 つの原生動物株は、下水処理プロセスから得られた安定的に培養できる原虫株として世界的に見ても非常に貴重である。しかしながら、これまでに株として安定的に保存する手法の検討が行われてこなかったために、現在は月に一度、生細胞を細々と植え継いで維持している状況である。貴重な研究材料を失わないためにも、株の変質を防ぐ上でも凍結等により安定に保存する技術の確立が不可欠である。本項では、様々な保護剤や添加剤、プログラムフリーザーを用いた凍結方法の検討を行って、本共生系を長期的に安定保存する技術開発を行い、他の研究者らへも供給できる管理体制の確立を目指す。

(7) 自由生活性の原核生物叢のメタゲノム解析

下水処理プロセスにおいて溶質に含まれる有機物等の分解は、もっぱら自由生活性の従属栄養バクテリアが担っている。また、消化タンクにおけるメタン生成についても、自由生活性のメタン生成菌の働きが重要であると考えられることから、下水処理プロセスにおける原核生物叢の組成や、それぞれの微生物群の機能を把握することは重要である。本研究では、実際の下水処理施設における主要な処理槽 (沈殿池やエアレーションタンク、消化タンク等) より試料採取を行って、試料中の DNA を断片化して、それらの配列を網羅的に解析する「メタゲノム解析」を行って、それぞれの微生物のゲノム情報を再構築する。

(8) 下水処理プロセス内の微生物代謝ネットワークの構築

再構築したゲノム情報に含まれる 16S リボソーム RNA 遺伝子の情報から、下水処理プロセス中の主要微生物群を特定するとともに、コードされたタンパク質の情報から、プロセス中で機能している代謝経路と代謝産物ネットワークを in silico (コンピューター上) で再構築する事

で、下水処理プロセスの高度化、高効率化に必要な、生物学的、工学的知見の統合的な理解へ繋げる。

4. 研究成果

(1) トリミア原虫内における共生バクテリアの機能推定

本研究課題では、これまでに全ゲノム解読に成功しているトリミア原虫のバクテリア共生体 TC1 について、詳細なゲノム構造の解析を行う事でこの共生関係の代謝基盤の推定を行った。その結果、本共生体のゲノムは極めて縮退しているものの、アミノ酸化により得られた還元力を Rnf 複合体により膜ポテンシャルに変換し、膜 ATP 合成酵素によりエネルギーを獲得していることが示唆された。また、特筆すべき点として、TC1 共生体は脂肪酸合成酵素の遺伝子群 (fab オペロン) を保持している一方で、脂肪酸の分解遺伝子群をほぼ完全に欠いている事が明らかとなった。さらに、fab オペロンの構造を近縁の種と比較解析した結果、TC1 の fab オペロンには、通常存在する転写リプレッサーが存在しないことが示され、TC1 共生体が脂肪酸合成酵素群を恒常的に発現して、脂肪酸あるいはその派生物 (例えばリポ酸) を活発に合成している可能性があることが推察された。トリミア原虫は嫌気環境に適応しており、ミトコンドリアを持っておらず、代わりに起源を同じくするヒドロゲノソームを保持している。真核生物では脂肪酸の de novo 合成はミトコンドリアで行われており、ヒドロゲノソームでは行われていない。同じくミトコンドリアを欠いているジアルディア等の原虫は生育に脂肪酸を外部環境から取り込む必要がある事を考え合わせると、TC1 は宿主であるトリミア原虫が必要とする脂肪酸を体内で合成する役割を担っている可能性が伺われた。

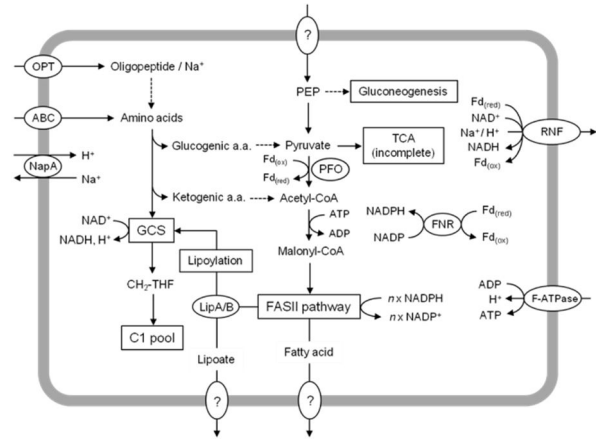


図1 TC1 共生体の推定代謝経路

(2) トリミア原虫におけるメタン生成経路の推定

トリミア原虫の共生体ゲノム解析では共生バクテリアの完全長ゲノムを解析する事はできなかったが、共生メタン生成菌のゲノム情報を得る事ができなかった。これは壊れやすい共生バクテリアのゲノムを調製するために、プロテアーゼのみの処理を行ったために、比較的強固な細胞壁を持つ共生メタン生成菌のゲノムが抽出できなかった事が推察された。その一方で、同じく共生メタン生成菌を保持するシクリディウム原虫では、培養細胞からゲノムを調製する手法を用いて共生バクテリアと、共生メタン生成菌と思われるメタノレギュラ属メタン生成菌のゲノムが完全長に近い状態で解析できた (後述)。詳細な解析は今後行う予定であるが、当該ゲノムからは、宿主原生動物が生じる水素をメタン生成の基質として利用している事を支持するデータが得られている。また、トリミア原虫の共生メタン生成菌も同様な手法を用いてゲノムの調製を進めたいと考えている。

(3) シクリディウム原虫共生体の系統学的な帰属の推定

本研究で新たに沖縄県内の下水処理施設より培養化に成功した嫌気性原生動物、GW7 株について、単細胞分離によるクローン化と 18SrRNA 遺伝子による分子分類を行った。その結果、GW7 株はシクリディウム・ポルカタム (*Cyclidium porcatum*) として報告された種に比較的近縁な新規原生動物である事が示された。しかしながら、シクリディウム・ポルカタムは、他のシクリディウム属原虫と系統的に大きく離れており、帰属を見直す必要があると考えられた (本研究では便宜上、シクリディウム原虫として記述する)。また、当該シクリディウム原虫の細胞内に生息する共生体の分子系統解析ならびに、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) を行った結果、メタノレギュラ属に比較的近縁なメタン生成菌と -プロテオバクテリアに属するバクテリアの 2 つの共生体を保持していることが明らかとなった。超薄切片の電子顕微鏡観察の結果、この 2 つの共生体は両者とも原生動物の水素生成オルガネラである、ヒドロゲノソームに密着して存在している事が明らかとなった。本研究で新たに見出した共生バクテリアは、ヒドロゲノソモバクター・エンドシンピオティカス (*Candidatus Hydrogenosomobacter endosymbioticus*) と命名して論文発表した (Takeshita, et al., 2019)。

(4) シクリディウム原虫共生体の全ゲノム解読による機能推定

シクリディウム原虫から調製した共生体画分よりゲノム DNA を抽出し、ショットガン・シーケンスと共生体ゲノムの再構築を試みた。その結果、共生が確認されていたメタン生成菌であるメタノレギュラならびに、共生バクテリアであるヒドロゲノソモバクターのゲノムをほぼ完全長で再構築することができた。中でもヒドロゲノソモバクターのゲノムは 827kb と非常に縮退しており、多くの代謝系の遺伝子を失っていた。この事は、ヒドロゲノソモバクターが長い期間にわたって、シクリディウム原虫と共生関係にあった事で、自由生活する上で必要な遺伝子を欠失

していった結果であると考えられた。その一方でヒドロゲノソモバクターには脂肪酸の合成経路の遺伝子群がよく保存されており、これらの点が原生動物内での共生体の機能を明らかにする上で大きなヒントになると考えられた。

(5) シクリディウム原虫共生系の代謝ネットワークの解析

シクリディウム原虫についてはさらに、共生体を抗生物質で処理した際の代謝産物の変化を有機酸分析により解析した。シクリディウム原虫に共生するメタン生成菌とヒドロゲノソモバクターはともに水素を生産するヒドロゲノソームに密着して存在していることから、両者が水素代謝に関与している可能性があると考え、抗生物質で共生体を処理した際に GW7 株の代謝産物が変化することが期待された。その結果、抗生物質によりバクテリア共生体を除去した際には、代謝産物としてプロピオン酸が生成され、メタン生成菌を除去した際には、さらに酢酸が生成される事が示された。これらの結果は、両者が水素代謝により宿主の余剰還元力処理に寄与している事と矛盾しないが、これらを検証するためにヒドロゲノソモバクターのゲノム情報と併せてさらに詳細な解析を進める予定である。

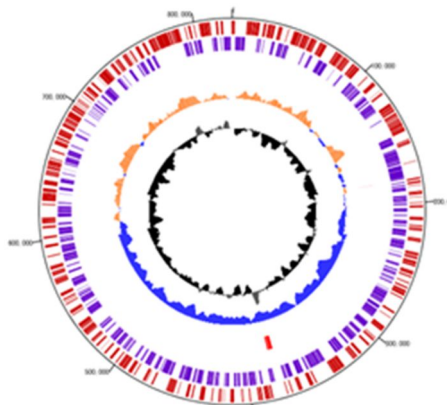


図2 ヒドロゲノソモバクターのゲノム

(6) 原生動物株の長期保存技術の確立

本研究では、嫌気性原生動物の長期保存技術の確立を目的に、グリセロールやエチレングリコール等を始めとした種々の凍結保護剤・添加剤ならびに、プログラムフリーザーを用いた多様な凍結プログラムの組み合わせを検討したが、いずれの条件からも凍結保存したトリミア原虫を復元する事はできなかった。嫌気性原生動物の中にはシスト形成して乾燥に耐えるものもあり、培養細胞の保存方法とは異なったアプローチが必要である可能性がある。

(7) 自由生活性の原核生物叢のメタゲノム解析

本研究では、下水サンプルの解析に先立ち、トリミア原虫株と共存する原核微生物叢の解析を 16S rRNA のアンプリコン解析により実施した。セルソーティングで分取したトリミア原虫約 100 細胞から DNA を抽出し、バクテリアならびにアーキアの 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR 増幅してイルミナ・MiSeq シーケンサーで解析した。その結果、1%以上の頻度で検出されたバクテリアは 34 種 (OTU) あり、この中には、細胞内共生が確認されている TC1 共生体も、全ての株に 0.8% から 4.6% の範囲で共生していることが確認された。メタノレギュラを共生させる株から検出されたバクテリアは、他のトリミア原虫株とは異なり、Rikenellaceae 科や Melioribacteraceae 科、Prolixibacteraceae 科に属する特定の系統が多く検出されたが、いずれも発酵代謝を行うバクテリアで、共生メタン生成菌とこれらのバクテリアとの関係性は現状では考察することはできなかった。

(8) 下水処理プロセス内の微生物代謝ネットワークの構築

本項目は上記、微生物叢解析手法を用いて、下水処理プロセス内の原生動物と原核微生物 (バクテリアとアーキア) の網羅的解析データを取得し、下水処理プロセス中の主要微生物群を特定するとともに、その代謝ネットワークを *in silico* で再構築することを目的としていたが、本実施期間では、微生物叢解析の予備検討までしか行えなかった。今後の研究でこれらの予備的知見を活かして研究を進展させ、下水処理プロセスの高度化、高効率化に必要な、生物学的、工学的知見の統合的な理解へ繋げていきたいと考えている。

< 引用文献 >

- Madoni, 2011, Ital J Zool 78:3-11
- Zhang et al., 2012, ISME J 6:1137-47
- Shinzato et al., 2007, Microb Ecol 54:627-36
- Shinzato et al., 2016, Genome Announc 22:e01032-16
- Esteban et al., 1993, Europ J Protistol 29:262-270
- Yoon et al., 2015, Curr Opin Microbiol 24:38-46
- Nobu et al., 2015, ISME J 9:1710-22
- Takehita et al., 2019, Appl Environ Microbiol 85:e00854-19

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshita, K., Yamada, T., Kawahara, Y., Narihiro, T., Ito, M., Kamagata, Y., Shinzato, N.	4. 巻 85
2. 論文標題 Tripartite symbiosis of an anaerobic scuticociliate with two hydrogenosome-associated endosymbionts, a Holospora-related alphaproteobacterium and a methanogenic archaeon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00854-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00854-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹下和貴, 山田尊貴, 川原邑斗, 成廣 隆, 伊藤通浩, 鎌形洋一, 山崎 玲, 新里 尚也
2. 発表標題 嫌気性繊毛虫GW7株におけるメタン生成アーキア、バクテリアとの共生関係
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazutaka Takeshita, Takanori Yamada, Yuto Kawahara, Takashi Narihiro, Yoichi Kamagata, Naoya Shinzato
2. 発表標題 Endosymbiotic interaction in anaerobic ciliates with methanogens and bacteria
3. 学会等名 32nd Annual Meeting of Japanese Society for Microbial Ecology & 10th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹下和貴、山田尊貴、成廣隆、鎌形洋一、新里尚也
2. 発表標題 培養に成功した嫌気性繊毛虫シクリディウム原虫における3者間共生
3. 学会等名 環境微生物系合同大会2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Naoya Shinzato, Kazutaka Takeshita, Yoichi Kamagata	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 261
3. 書名 (Endo)symbiotic Methanogenic Archaea (Microbiology Monographs Book 19) 2nd Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------