

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04716

研究課題名(和文) 活性汚泥というブラックボックスの解剖と再構築：遺伝子発現から群中の個の挙動を見る

研究課題名(英文) Deciphering metabolic behaviors of individual microbes in activated sludge by metatranscriptomics

研究代表者

佐藤 由也 (Sato, Yuya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：80711291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、数千種からなる複雑な微生物集団「活性汚泥」を対象に、系内で「誰が何をしているのか」を研究し、複数の鍵微生物を特定した。研究成果の一つは、系内にくわすかにしか存在しない硝化細菌が、他の微生物との相互作用を介して水処理装置全体の活性を左右することを見出したことである。系内の存在量とその微生物の重要性は必ずしも一致せず、それが活性汚泥における予期せぬ性能低下の一因になることを示した。もう一つの成果は、活性汚泥内で他の細菌を食べる、捕食性細菌の機能と重要性を明らかにしたことである。水処理装置で増えすぎた微生物は余剰汚泥として廃棄されるが、捕食性細菌の働きは余剰汚泥の減容に有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然環境では微生物は単独で存在することなく多種と共生しているが、そのような複雑な微生物コミュニティの中で「個々の微生物が何をしているのか」を明らかにすることは極めて難しい。本研究では、数千種からなる複雑な微生物コミュニティに遺伝子発現解析を適用し、個々の微生物の挙動を代謝レベルで解明することに成功しており、その技術的な進捗に大きな価値がある。また、研究対象に扱った活性汚泥は世界中で廃水処理に使われており、特定された重要微生物の情報や関連する知見は学術だけでなく産業的にも非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：Activated sludge, which is a complex microbial community composed of thousands kinds of microbes, has been used for wastewater treatment for over 100 years. Yet, because of its complexity, wastewater treatment mechanisms in activated sludge has remained unclear. This study aimed to decipher “who does what” in activated sludge. One of the findings of this study is that small minority nitrifiers can govern the overall performance of the activated sludge bioreactors, via interspecific interactions. Disagreement between population abundance and functional importance in the ecosystem was demonstrated; this uncertainty may contribute to the unpredictable deterioration of activated sludge bioreactors. Another finding is important role of predatory bacteria in controlling biomass of activated sludge. Predatory bacteria can contribute to reduce excessively grown microbes in activated sludge; resulting in reduction of microbial wastes.

研究分野：微生物生態学

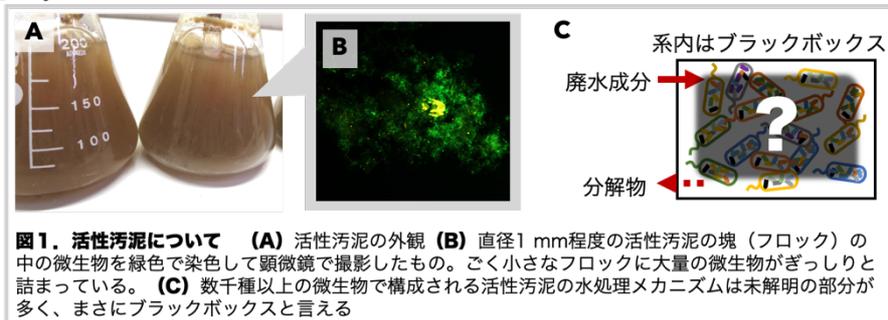
キーワード：活性汚泥 微生物環相互作用 微生物生態系 メタトランスクリプトーム 捕食性細菌 メタゲノム代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥は100年以上水処理に利用されてきた微生物集団である(図1A, B)。しかし、数千種で構成される複雑な微生物コミュニティによる水処理メカニズムは未解明の部分が多く、その複雑性は今なお予期せぬトラブルの原因になっている(図1C)。一方、近年の世界的な水不足を背景に、水処理プロセスや運転方法を根本的に見直す動きが出ている。例えば水処理にかかるエネルギーを徹底的に削減し、逆に可能な限りエネルギーを回収するなどの方法が提案されているが、その実現のために避けて通れないのが、活性汚泥微生物コミュニティの体系的な理解である。

活性汚泥は長年にわたり研究が続けられ、近年の次世代シーケンサー技術の台頭により「系内にはどのような微生物がいるか」という情報は、数千種レベルという高い解像度で解明が進んでいる。この、構成微生物の情報は非常に重要であり、これまでの研究からも微生物組成と水処理性能は密接にリンクすることが知られている。一方で、活性汚泥微生物は数千種以上と極めて多様であるため、同じ性質・機能を有する微生物も多く存在し、それらの系内での役割は重複している。この、機能的な冗長性こそが活性汚泥の体系的な理解を妨げている大きな要因であり、「そこに誰がいるかは分かっても、その中で実際に誰が機能しているかわからない」というのが現状といえる(図1C)。我々はこの問題に着目し、複雑な系内でも「誰が何をしているか」を代謝レベルで理解する必要があると考え、遺伝子発現解析を微生物コミュニティに適応する研究を進めてきた。

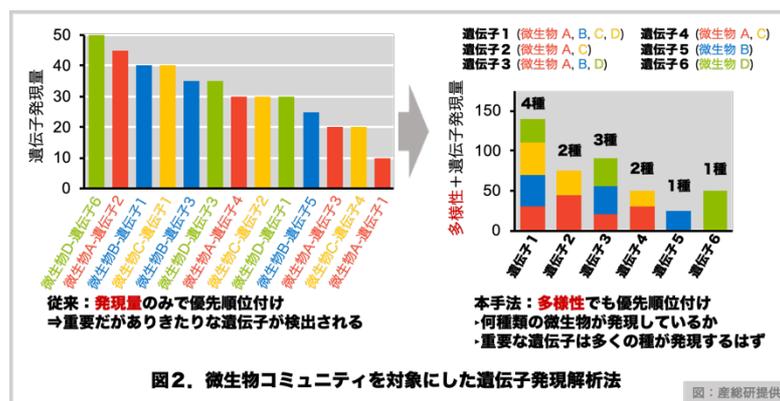


2. 研究の目的

本研究では前述の活性汚泥のブラックボックス解消を目的に掲げている。この目的のためには、複雑な活性汚泥微生物コミュニティの中で、「誰が何をしているか」という、個々の微生物の挙動について精緻に評価する必要がある。そしてそれらの情報を基に、どの微生物が活性汚泥の機能に重要かを評価し、系内で鍵となる微生物を特定する。さらに、それら鍵微生物情報を基に、活性汚泥の基本的な機能を実現するために必要な微生物を予測し、評価する。また、本研究では活性汚泥における微生物の評価法として遺伝子発現解析を用いるが、本手法を数千種からなる複雑な微生物コミュニティに適用した例はほとんどなく、解析・評価手法についても並行して確立を目指す。

3. 研究の方法

活性汚泥内の個々の微生物の挙動を解明する手法として遺伝子発現解析を用いた。従来の遺伝子発現解析では、「発現量の高い遺伝子ほど重要」という優先順位で遺伝子を評価してきた(図2左)。この方法は単一の微生物種を対象にした場合は有効であるが、活性汚泥のような複雑な微生物コミュニティへの適用は難しい。遺伝子発現量のみで評価すると、例えば微生物の増殖に関する遺伝子など、多くの微生物に共通するありきたりな遺伝子が検出されやすく、個々の微生物による環境応答や分解反応などの特異的な遺伝子が検出されることはまれである。そこで本研究では、遺伝子の発現量だけでなく「多様性(その遺伝子を発現する微生物種の数)」で評価する手法を考案した(図2右)。これにより、莫大な遺伝子データから「ある環境で特に重要な遺伝子」を抽出できる。本研究では、本手法を用いて活性汚泥リアクターの重油分解経路の解析を行った。2つのリアクターに同じ活性汚泥を加え、重油の濃度を段階的に上げながら添加したところ、同じ条件での運転にもかかわらず、リアクター処理能に大きな差が生じたため、その原因解明を目指した。



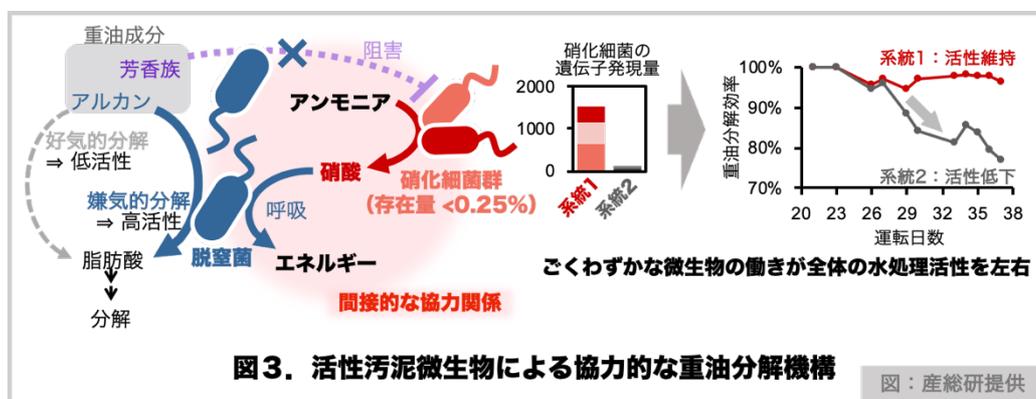
また、活性汚泥のバイオマス量の恒常性維持に寄与する微生物にも着目した。活性汚泥内で増えすぎた微生物は余剰汚泥と呼ばれ廃棄処分されるが、その排出量は国内産業廃棄物の実に20%にもものぼり大きな問題になっている。一方、我々はこれまでに他の微生物を捕食する「捕食性細菌」が活性汚泥内に一定量存在することを見出していたため、それらが活性汚泥の減容に寄与すると考え着目した。活性汚泥を栄養あり（富栄養条件）・なし（飢餓条件）の2つの条件で培養し、系内の微生物の存在量の変遷、遺伝子発現の変化、代謝産物量の推移を、メタゲノム解析、遺伝子発現解析、メタボローム解析を駆使して調べた。

4. 研究成果

第一の研究成果は、複雑な微生物コミュニティを対象とした遺伝子発現解析法の確立である。本研究の中で得られた遺伝子発現データについて、従来法通り「遺伝子発現量の高低」のみを評価基準とすると、やはり微生物の増殖や成長に関する遺伝子など、ありきたりな遺伝子が検出されてしまった（図2左）。一方、「遺伝子発現量」と「遺伝子の多様性」の両方を基準にデータを評価したところ、膨大な遺伝子データが大幅に集約され、注目する代謝反応（重油の分解反応など）に関与する遺伝子を網羅的に同定することができた（図2右）。

次に、確立した遺伝子発現解析手法を用いて、重油含有廃水を処理する活性汚泥の評価を行った。一般に重油は、酸素存下で微生物に分解されることが知られている。しかしながら、今回遺伝子発現解析を行った活性汚泥リアクター中では、酸素を供給しているにもかかわらず酸素を使わない嫌氣的な重油分解経路が主要であることが明らかになった。検出された重油分解菌の多くは、酸素ではなく硝酸を使った呼吸でもエネルギーを獲得する種であったが、硝酸は廃水に含まれていなかったためその由来に着目した。その結果、硝化細菌とよばれる微生物が廃水由来のアンモニアを原料に硝酸を生成していたことが明らかになった。重油分解菌はこの硝酸を使ってエネルギーを獲得し、重油の分解を行っていたと考えられる。硝化細菌の活性は高処理能力リアクターでのみ高く（図3右）、重油分解菌のエネルギー源である硝酸が十分に供給され、重油分解反応が促進されていたことが分かった。また、重油には微生物の活性を阻害する芳香族化合物も含まれるが、重油分解菌は芳香族化合物も分解するため、それによって硝化細菌は活性阻害を免れることができたと考えられる。このように、重油分解菌と硝化細菌の二者間には間接的な協力関係が存在し、その種間相互作用によって微生物コミュニティの機能が維持されていたのである。興味深いことに、硝化細菌の存在量は全体の0.25%に満たないわずかなものであったが、この希少種の働きが起点となり、活性汚泥微生物コミュニティ全体の活性が左右されることを見出した。

このように、好気および嫌気環境で有機物分解反応を担う脱窒菌と、その活性をサポートする硝化細菌群が鍵微生物として特定された。



捕食-被食関係は最も一般的な生物間相互作用であり、既往の多くの研究によって生態系の構造に大きく影響することが知られている。一方で、活性汚泥内に一定量存在する捕食性細菌が微生物生態系に与える影響や、彼ら捕食性細菌の微生物コミュニティ中での生存戦略—特に代謝戦略—については多くが未解明である。活性汚泥を富栄養条件で培養すると少数の従属栄養性細菌が顕著に優占化したが、栄養源を加えない飢餓条件におくと活性汚泥全体のバイオマス量が低下し（12日間で22%減少）、*Lysobacter* 属、*Myxococcales* 目、*Sphingobacteriales* 目の捕食性細菌および近縁種が優占化することがわかった。このことより、活性汚泥のバイオマス量の減容には捕食性細菌が大きく寄与していることが示唆された。次に、これら捕食性細菌群の代謝レベルでの挙動を明らかにすべく、遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析の結果、従来活性汚泥中の主要な捕食者と考えられていた原生動物・後生動物を含む真核生物よりも、捕食性細菌を含む原核生物の方が遺伝子発現量が大きく、それら細菌群が微生物捕食において重要な役割を担っていたことが考えられる。各種酵素遺伝子の発現量に着目すると、脂肪酸、タンパク質、核酸などの生体高分子の分解酵素や、その分解物を用いて TCA 回路等の中央代謝を駆動する代謝系が高活性化していることが示された。なお、この結果は並行して行ったメタボローム解析の結果とも一致している。餓条件では転写・翻訳・増殖等の活性を落とす一方、生体高分子を分解・資化する代謝系が高活性化しており、他菌体や細胞残渣等の限られた基質を有効利用するという、

捕食性細菌の巧みな代謝戦略が明らかになった。

このように、活性汚泥のバイオマス量の恒常性維持において捕食性細菌群が鍵微生物として特定された。また、捕食性細菌には、何をどのように食べるかという点で複数種類に分けることができるが、活性汚泥には多様な微生物が含まれるため、捕食性細菌は一種ではなく複数種存在することが重要であると考えられる。

なお本報告書には詳述しないが、この他にも実廃水処理施設の活性汚泥等についても、次世代シーケンサー解析を駆使して活性汚泥中の微生物の役割分担やそれぞれの重要性について深く調査し、重要な知見を得ることができた。さらに、それらの解析によって重要性が示唆された微生物数種を用い、シンプルな人工生態系（模擬活性汚泥）を作成し、その水処理性能等も評価した。

上記研究成果の一部は既に論文として発表を行っているが、今後もさらに継続して論文発表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhao Yan-Jie†、Sato Yuya†、Inaba Tomohiro、Aoyagi Tomo、Hori Tomoyuki、Habe Hiroshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Activated sludge microbial communities of a chemical plant wastewater treatment facility with high-strength bromide ions and aromatic substances	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.2323/jgam.2018.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 佐藤由也、稲葉知大、青柳智、堀知行、羽部浩	4. 巻 18
2. 論文標題 食べる：捕食の関係が作り出す水処理技術の新たな展開	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 佐藤由也、小池英明	4. 巻 96
2. 論文標題 メタトランスクリプトーム解析：RNA-seqで環境を診る	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 403-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Sato Yuya、Hori Tomoyuki、Koike Hideaki、Navarro Ronald R.、Ogata Atsushi、Habe Hiroshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Transcriptome analysis of activated sludge microbiomes reveals an unexpected role of minority nitrifiers in carbon metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s42003-019-0418-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yuya†, Zhao Yan-Jie†, Hori Tomoyuki, Aoyagi Tomo, Inaba Tomohiro, Aizawa Hidenobu, Ogata Atsushi, Habe Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Transition of microbial community structures after development of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1186/s13568-020-0959-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤由也、堀知行、小池英明、羽部浩	4. 巻 78
2. 論文標題 ごくわずかな硝化細菌が活性汚泥による重油分解の効率を左右する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 116-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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12件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤由也、堀知行、小池英明、Navaro Ronald R.、尾形敦、羽部浩
2. 発表標題 活性汚泥の網羅的遺伝子発現解析 (de novo RNA-seq) で見えた希少種の決定的な役割
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、羽部浩
2. 発表標題 微生物コミュニティにおける捕食性細菌の代謝戦略
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 佐藤由也、堀知行、小池英明、Navaro Ronald R.、尾形敦、羽部浩
2. 発表標題 De novo RNA-seq deciphers an unexpected metabolic link between C and N in a complex microbiome
3. 学会等名 ISME17 (17th International Symposium on Microbial Ecology) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、成廣隆、羽部浩
2. 発表標題 活性汚泥における微生物捕食メカニズム解析と汚泥減容化への応用
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、羽部浩
2. 発表標題 De novo メタトランスクリプトーム解析とメタボローム解析の併用による捕食性細菌群の代謝戦略の解明
3. 学会等名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、羽部浩
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 佐藤由也
2. 発表標題 De novo RNA-seq : 微生物群集の挙動から環境中の反応をあぶり出す
3. 学会等名 第77回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤由也、堀知行、稲葉知大、Navarro Ronald R.、尾形敦、羽部浩
2. 発表標題 メタトランスクリプトーム解析による活性汚泥中の微生物捕食の特徴づけ
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤由也、堀知行、小池英明、Navarro Ronald R.、尾形敦、羽部浩
2. 発表標題 De novo RNA-seq : 活性汚泥微生物群の網羅的遺伝子発現解析で見えた希少種の決定的な役割
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、羽部浩
2. 発表標題 RNA-seqによる活性汚泥中の微生物捕食の特徴付け
3. 学会等名 第20回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、羽部浩
2. 発表標題 活性汚泥における微生物捕食作用の促進要因
3. 学会等名 日本水環境学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、羽部浩
2. 発表標題 活性汚泥における微生物捕食作用の機構解明と捕食促進による汚泥減容効果
3. 学会等名 本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤由也、稲葉知大、堀知行、羽部浩
2. 発表標題 食べる：捕食の関係が作り出す水処理技術の新たな展開
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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