

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01564

研究課題名(和文)メタゲノム解析と微生物活性可視化技術を用いた下水処理微生物機能の全容解明

研究課題名(英文)Elucidating microbial functions involved in sewage treatment

研究代表者

久保田 健吾 (Kubota, Kengo)

東北大学・環境科学研究科・准教授

研究者番号：80455807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタゲノム解析により下水処理微生物の遺伝子情報に基づく代謝機能を解明するとともに、微生物活性可視化技術によって処理に貢献している微生物を検出することで、下水処理に關与する微生物群を解明することを目的とした。日本の下水処理活性汚泥の微生物群集構造およびコア微生物群を明らかにした。またPatescibacteriaなどの未培養微生物群のメタゲノム解析を行い、その機能推定を行った。PMAを用いた細胞生死判断基準法により生きている微生物群の解析を行った。またヘミンを用いた微生物検出技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性汚泥法はその誕生から100年を迎え、先進国における下水処理の標準技術になっているが、処理プロセスにおける微生物反応は未だブラックボックスとして扱われる場合が多い。その理由の1つとして、微生物の99%以上がその機能について分かっていないことが挙げられる。本研究では遺伝子情報を用いて廃水処理に關与する微生物群の解明を試みた。また遺伝子情報だけでなく細胞レベルで代謝活性や微生物生死を判断する技術の開発にも取り組んだ。これらの研究成果は廃水処理プロセスを理解し、廃水処理プロセスの適切なデザインに寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate microorganisms involved in sewage treatment by amplicon and metagenome analyses and single cell detection techniques. The microbial community structure and core microorganisms of activated sludge in Japanese sewage treatment plants were uncovered. Metagenomic analysis of uncultured microorganisms Patescibacteria revealed their functions. PMA-PCR allowed the analysis of microbial community based on cell viability. We also developed a hemin-based microbial detection technique.

研究分野：環境工学

キーワード：廃水処理微生物 メタゲノム解析 微生物検出技術

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法はその誕生から 100 年を迎え、先進国における下水処理の標準技術になっている。IWA から Activated sludge models が発表されるなど様々な条件が想定される下水処理施設の設計に対応できるような環境が整いつつある。一方で、その予測の精度は取り入れるパラメータによって変動するが、特に微生物反応については十分な理解が進んでいないのが現状である。また実際の運転管理においても微生物指標には水処理に間接的に関わるとされる原生動物が用いられるなど、処理プロセスにおける微生物反応は未だブラックボックスとして扱われる場合が多い。1990 年代における分子生物学的手法の導入、2000 年代後半における次世代シーケンサー (NGS) の導入により、微生物について少しずつその解明が進んでいる。NGS を用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析などは、安価に多くのサンプルの解析を可能にし、その反応場にどのような微生物がいるのかに加えて、環境変動に伴ったポピュレーションダイナミクスをも明らかにしてきた。デンマークのオルボーグ大学の研究グループなどは、デンマークの様々な処理施設の活性汚泥や嫌気性消化汚泥の微生物群集構造解析を行い、処理微生物の rRNA 遺伝子データベースを構築している。また様々な廃水・廃棄物処理プロセスの微生物群集構造解析において、処理水質に大きな変化が見られなくても群集構造はドラスティックに変化していること、処理水質変化の予兆と見られる微生物群集構造の変化を捉えるなどのデータが報告されている。しかし rRNA 遺伝子情報に基づいた微生物情報だけでは、微生物が何をしているかが分からない(99%以上の微生物についてその機能は不明と言われている)。一方で、NGS とバイオインフォマティクスの発展により、メタゲノム解析を行うことでゲノムを再構築することが可能になってきた。

一方、メタゲノム解析によりゲノムが再構築され、その機能を推定できるようになったとしても、下水処理汚泥中でそれらの微生物群が働いているかは分からない。例えば、細胞膜の透過性の異なる核酸染色剤を使って生菌と死菌を判断すると、存在する微生物の内 1-3 割の微生物が細胞膜に損傷を受けており死菌として判別される。また、細胞膜非透過性の光架橋型核酸染色剤を用いた生菌細胞由来の DNA に基づく群集構造解析を行うと、高頻度に検出されていた微生物群がほとんど検出されなくなるという結果も得られている (例えば、嫌気性消化のコアグループとして報告されていた Betaproteobacteria などは、ほとんど検出されなくなる)。このことは単に群集構造を調べ、その遺伝子情報に基づいた機能推定を行うだけでなく、実際にどのような微生物が活性を有して処理に貢献しているかを知る必要があることを示している。そこで微生物代謝を可視化する技術のを取り入れた解析を行う必要がある。

2. 研究の目的

メタゲノム解析により下水処理微生物の遺伝子情報に基づく代謝機能を解明するとともに、微生物活性可視化技術によって処理に貢献している微生物を検出することで、下水処理に關与する微生物群を解明する。

3. 研究の方法

汚泥のサンプリングは日本各地の下水処理場から行った。対象処理プロセスは標準活性汚泥法その他、嫌気-無酸素-好気法、硝化脱窒法、オキシデーションディッチ法など日本各地で採用されている主要な方法とした。採取した汚泥は rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコン解析により微生物群集構造を明らかにした。

メタゲノム解析は、ショットガンシーケンスデータを用いて行った。クオリティチェック後に作成したコンティグを用いてピンングを行った。クオリティ閾値 (完全性 50%以上、汚染率 10%以下) を満足したピンについて、系統分類とアノテーションを行った。

下水処理に普遍的に存在する Patescibacteria の解析を効率的に行うために、活性汚泥を遠心した上澄み液を、孔径 0.45 μm 、0.22 μm 、0.1 μm のフィルターを用いてサイズ分画した。

重水を用いた微生物活性可視化は、汚泥を重水を含む液体中で短時間培養したのち、細胞を固定し、ラマン顕微鏡により観察した。

細胞損傷状態により微生物の生死を判断し、生菌に基づいた解析方法の開発では、汚泥を PMA で処理するものとし、死菌については、rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコン解析により微生物群集構造を比較することで行った。

ヘミンを用いた微生物全菌検出法の開発は、ヘミンがアルブミン等のタンパク質に吸着されやすい性質を利用し、ヘミンを菌体組織に多量に沈着させた後、TSA 反応により tyramide 化合物を沈着させて行った。なお、金元素を用いる場合は、抗原抗体反応により金を結合させたのちに金増感反応を行い、SEM で観察した。

ヘミンを用いた微生物の特異的検出法の開発は、まず銅フリークリックケミストリーにより、オリゴヌクレオチドとヘミンを結合させた。オリゴヌクレオチドは、プローブ配列と guanine quadruplex 形成配列を含むもので末端に銅フリークリックケミストリーの反応基である DBCO を付加した。また hemin には azide を化学修飾した。両者を反応させ、ヘミン標識プローブを合成した。それを TSA-FISH 法と同様のプロトコルによって rRNA に交雑させたのち、guanine

quadruplex-hemin を形成させた。最後に TSA 反応により可視化した。

4. 研究成果

日本の下水処理活性汚泥の微生物群集構造およびコア微生物群を明らかにするために、原核生物の 16S rRNA 遺伝子を標的として、27 の処理場、6 の処理プロセスから夏季に採取した 33 サンプルを解析した。その結果、下水処理活性汚泥には 400-1,100 の属、600-1,500 の種が存在していると推察された。門レベルの微生物群集構造では Proteobacteria (Alphaproteobacteria、Gammaproteobacteria、Deltaproteobacteria が主) と Bacteroidetes が優占していた。この他に、Acidobacteria、Actinobacteria、Chloroflexi、Firmicutes、Nitrospirae、Patescibacteria が平均して 1%以上存在していた。オキシレーションディッチ法において微生物種が類似する傾向が見られたが、全体としては処理プロセスより下水性状の方が微生物群集構造に与える影響が大きいと考えられた。コア微生物群として全サンプルに共通して見られる属レベルの OTU は 32 あり、平均相対存在率の約 25%を占めた。コア微生物群を世界各地の活性汚泥と比較したところ、共通性が一部見られるものの、多くは日本の下水処理活性汚泥に独自なものであった。

その中で一大未培養系統群として知られる Patescibacteria に着目した。Patescibacteria は活性汚泥中に数パーセントしか存在していないため、より効率的な解析を行うために Patescibacteria の細胞サイズに着目した分画を前処理に取り入れて、Patescibacteria を効率的に回収する方法を開発した。その結果、Patescibacteria の集積に成功した。Patescibacteria がサンプル内で占めている割合は、活性汚泥では 5.8%であったのに対して、0.45-0.22 μ m 画分では 73.5%、0.22-0.1 μ m 画分では 52.5%であった。分画サンプルより、Saccharimonadia、Gracilibacteria、Paceibacteria、Microgenomatia、ABY1 が相対存在率で 1%以上検出された。この他に、Berkelbacteria、WS6 (Dojkabacteria)、WWE3 も数は少ないが検出された。Saccharimonadia は、分画の有無や分画サイズに関わらず、下水処理活性汚泥において最も優占している Patescibacteria であった。Gracilibacteria は 0.45-0.22 μ m 画分の方が 0.22-0.1 μ m 画分よりも割合が高く、Paceibacteria、Microgenomatia、ABY1 は 0.22-0.1 μ m 画分の方が 0.45-0.22 μ m 画分よりも割合が高くなっていった。このことは、フィルターの孔径サイズを変更することで、異なる Patescibacteria を集積することができることを示している。Patescibacteria の OTU 数は分画サンプルで大きく増加しており、より多くの種を捉えることができた。Saccharimonadia、Gracilibacteria、Paceibacteria、Microgenomatia、ABY1 の活性汚泥における主要な Patescibacteria の OTU 数は、未分画活性汚泥では 46 であったが、0.45-0.22 μ m 画分からは 279、0.22-0.1 μ m 画分からは 242 が得られた。活性汚泥をサイズ分画することで、これまでに考えられていたよりも多種多様な Patescibacteria が存在していることが示された。

メタゲノム解析ではサイズ分画を行った活性汚泥より、選定基準を満たす Patescibacteria (Paceibacteri、Saccharimonadia、ABY1、Gracilibacteria、Microgenomatia) のビンが 24 個得られた (完全性 69.8%以上、汚染率 6.98%以下)。また得られた Patescibacteria の予測平均ゲノムサイズは 0.8 Mbp であった。ゲノム情報を取得することができた Patescibacteria は、共通して解糖系 (Embden-Meyerhof 経路: EM 経路)、ペントースリン酸経路、カルビン回路に関する遺伝子の一部を持っていた。また複数のビンから糖質分解関連などの酵素も検出されたが、Patescibacteria が生体物質の生合成に関わる遺伝子を欠いているという報告と一致する結果も得られた。Patescibacteria はこのような特性から、既報と同様に代謝資源を他の微生物に依存している可能性が示唆された。また、Saccharimonadia のビンから T4SS に関連する遺伝子配列が見つかった。ビンのゲノムサイズが 1 Mbp 以上である Saccharimonadia からは Sec Secreted Array と考えられる分泌タンパク質の配列も確認された。さらに、下水処理活性汚泥からゲノムが構築された *Candidatus Saccharimonas aalborgensis* についても解析したところ、T4SS や Sec Secreted Array の存在が確認された。下水処理活性汚泥中に存在する Saccharimonadia の一部は、T4SS の分泌システムを介して他の微生物と相互作用している可能性がある。その他の Patescibacteria についても、一部ではあるが Sec Secreted Array が存在している可能性がある。今後は下水活性汚泥中に存在している Patescibacteria の寄生や共生に関わる他の鍵遺伝子についても解析を行い、他の微生物との相互作用についてより詳細な解析を行う必要がある。

重水を用いた微生物代謝検出法の開発において、様々な方法について検討を行ったが、ラマン顕微によるシグナルを捉えることができなかった。表面増強ラマンなど高感度化を試みたが、うまく行かなかった。そこで細胞壁の損傷程度を微生物の生死判断とする解析について検討を行った。下水汚泥を処理する嫌気性消化汚泥の微生物群集構造解析において、初沈汚泥や余剰汚泥由来の残存死細胞の DNA が問題となっているため、それを対象とした。細胞膜の損傷を生死の判断基準とする propidium monoazide (PMA)-PCR 法を用いて残存死細胞由来の DNA を除去し、高温嫌気性消化槽において生きている微生物の群集構造解析を行った。その結果、従来の抽出 DNA を用いる解析では、微生物の種数や多様性を過大評価していると考えられた。死細胞として残存している微生物は主として Alphaproteobacteria、Gammaproteobacteria (主として Betaproteobacteriales)、Actinobacteria であった。PMA-PCR 法によって明らかにされた高温消化汚泥の微生物群集構造では、相対存在率上位 15 OTU が全体の 8 割以上を占め、中温消化汚泥に比べて特定の系統群の働きが重要である事が確認された。

Patescibacteria などの超微小な微生物細胞を電子顕微鏡や細胞壁処理を行わない方法によ

って検出するための方法について検討を行った。ヘミンを用いた全菌染色手法については、まず *Escherichia coli* に対して適用したところ、全ての菌体から明確な強い蛍光シグナルが得られた。蛍光シグナルは菌体全体から均一に発せられており、ハ口状のようなムラのある蛍光シグナルは認められなかった。次に、グラニューク汚泥に対して適用したところ、*E. coli* と同様に明確で強く、かつ菌体全体より均一に発せられるシグナルが得られた。これらより、開発した本全菌染色手法は、実環境サンプルに対して十分に適用できることが示された。次に、本手法を金元素の標識に最適化し、金属組織学的な増感反応を組み合わせたプロトコルを適用し、SEM で観察した。まず、サンプル表面を反射電子像にて観察した結果、菌体よりも輝度が高く、金粒子であると推定される塊を菌体表面に多数確認した。次に、SEM-EDX により元素組成を分析した結果、顕著な金元素のシグナルが得られた。これらより、菌体に対する金元素の標識が成功したことが示された。本手法の長所は、同様のプロトコルによって任意の元素を菌体に標識可能である点にある。本手法により、SEM-EDX など、元素測定を含む検出器を用いた測定時に微生物細胞を識別することが可能となる。

細胞壁処理が不要な高感度 FISH 法の開発においては、まず guanine quadruplex 形成部分とプローブ部分より成る核酸配列とヘミンを化学結合させた。反応物を HPLC により精製した産物を高感度 FISH 法に供した。次に、ヘミンの菌体組織への沈着に伴う非特異的蛍光の発生を防ぐための処理手法を確立した。その後、高感度 FISH 法を行ったところ、標的微生物の rRNA に特異的にプローブが交雑したことが示されたが、TSA 反応で沈着した蛍光物質由来のシグナルは確認できなかった。これは、guanine quadruplex-hemin complex が形成されなかったことによって、本来持つ酵素触媒作用が発揮されなかった結果であると考えられる。本研究で標的としたリボソームは、タンパク質や RNA から成る高度に複雑な高次構造を有している。このリボソームの構造によって、guanine quadruplex-hemin complex 形成が阻害された可能性があり、今後は細胞内で立体構造を形成させるための空間をどのように確保するのが課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kubota Kengo, Igarashi Kei, Yamada Masayoshi, Takemura Yasuyuki, Li Yu-You, Harada Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Niche Differentiation of Phenol-Degrading Microorganisms in UASB Granular Sludge as Revealed by Fluorescence in situ Hybridization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Engineering	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eng.2021.05.012	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 Ni Jialing, Ji Jiayuan, Li Yu-You, Kubota Kengo	4. 巻 111
2. 論文標題 Microbial characteristics in anaerobic membrane bioreactor treating domestic sewage: Effects of HRT and process performance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Sciences	6. 最初と最後の頁 392-399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jes.2021.04.022	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 -

1. 著者名 Takemura Yasuyuki, Sekiguchi Yuji, Syutsubo Kazuaki, Harada Hideki, Omura Tatsuo, Li Yu-You, Kubota Kengo	4. 巻 87
2. 論文標題 Sequence-Specific Capture of Oligonucleotide Probes (SCOPE): a Simple and Rapid Microbial rRNA Quantification Method Using a Molecular Weight Cutoff Membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01167-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01167-21	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 -

1. 著者名 阿部天磨、佐藤幹子、矢口淳一、李玉友、久保田健吾	4. 巻 77
2. 論文標題 PMA-PCR法を用いた高温嫌気性消化汚泥の微生物群集構造の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 土木学会論文集G(環境)	6. 最初と最後の頁 111_103-111_109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2208/jscej.77.7_111_103	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 -

1. 著者名 Jialing Ni, Shingo Hatori, Yin Wang, Yu-You Li, Kengo Kubota	4. 巻 79
2. 論文標題 Uncovering viable microbiome in anaerobic sludge digesters by propidium monoazide (PMA)-PCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Ecology	6. 最初と最後の頁 925-932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00248-019-01449-w	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 該当する

1. 著者名 Hiroschi Iwano, Syo Hatohara, Tadashi Tagawa, Hideyuki Tamaki, Yu-You Li, Kengo Kubota	4. 巻 82
2. 論文標題 Effect of treated sewage characteristics on duckweed biomass production and microbial communities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water Science and Technology	6. 最初と最後の頁 292-302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2166/wst.2020.168	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 景政柊蘭、久保田健吾、李玉友、黒田恭平、中井亮佑
2. 発表標題 サイズ分画した活性汚泥の微生物学的特性把握
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦崎幹八郎、李玉友、久保田健吾
2. 発表標題 Hemin を用いた微生物の新規視覚的検出法の開発
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部天磨、李玉友、久保田健吾
2. 発表標題 PMA-PCR 法を用いた高温嫌気性消化汚泥の微生物群集構造解析
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部天磨、矢口淳一、李玉友、久保田健吾
2. 発表標題 PMA-PCR法を用いた嫌気性消化汚泥の微生物叢解析：中温と高温の比較
3. 学会等名 令和2年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 景政柊蘭，久保田健吾，李玉友
2. 発表標題 活性汚泥中の溶存態DNA解析による微生物群集の動態解明
3. 学会等名 第53回日本水環境学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋真，久保田健吾，佐藤幹子，李玉友，石井淑大，栗栖太
2. 発表標題 下水処理における微生物群集構造と溶存有機物組成の関係性の解明
3. 学会等名 第53回日本水環境学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤莉奈, 大久保努, 上村繁樹, 久保田健吾, 小野寺崇, 竹村泰幸
2. 発表標題 DHS担体付着汚泥の微生物群集構造の遷移
3. 学会等名 第53回日本水環境学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋真, 久保田健吾, 佐藤幹子, 李玉友, 石井淑大, 栗栖太
2. 発表標題 下水処理プロセスにおける微生物群集構造と溶存有機物組成の関係性の解明
3. 学会等名 平成30年度 土木学会東北支部 技術研究発表会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	黒田 恭平 (Kuroda Kyohei) (50783213)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	
研究 分担者	帆秋 利洋 (Hoaki Toshihiro) (60393708)	大分工業高等専門学校・都市・環境工学科・教授 (57501)	

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
---------	---------