

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02291

研究課題名(和文) 活性汚泥の固体物性が微生物種間相互作用に与える影響の解明とその人為的な改質の試み

研究課題名(英文) Effects of properties of activated sludge on microbial interspecific interactions and attempts to artificially modify them.

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、活性汚泥の物性が系内の微生物種間相互作用(特に捕食-被食)に与える影響の解明を目指した。そのために必要な遺伝子発現解析データの処理技術開発にも取り組み、KEGGデータベースの代謝マップを基に、複合微生物系に適した可視化プログラムを作成した。さらに、代謝経路中で連続して遺伝子発現する経路長を評価することで、環境特異的に発現する遺伝子の抽出に成功した。活性汚泥の物性については、様々な有機・無機化合物の添加の影響を評価した。複数の無機化合物は活性汚泥の凝集性や微生物濃度に影響した。さらに、活性汚泥内の捕食性細菌の存在量が顕著に変化しており、捕食-被食関係が影響を受けたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水処理微生物集団である活性汚泥は、100年以上世界中で水処理に利用されてきた重要なバイオテクノロジーである。しかしその複雑さゆえ、水処理メカニズムは未解明の部分が多く残り、今なお予期せぬトラブルが尽きない。活性汚泥の水処理性能は、構成する微生物の組成に相関するといわれているが、活性汚泥自体の物性が、系内の微生物組成や微生物同士の相互作用にどう影響するかを調べた例は少なく、本研究で得られた知見は学術的・社会的に重要である。また、本研究で開発した遺伝子発現データの可視化方法や評価方法は、他の多くの研究に応用可能であり重要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at clarifying the effects of activated sludge physical properties on microbial interspecific interactions (especially predator-prey interaction) in the ecosystem. For this purpose, we also worked on the development of bioinformatics tools for visualizing the gene expression data and the novel methods for evaluation of metatranscriptomics data, succeeding in extracting environment-specifically expressed genes by evaluating pathway lengths of gene expression continuously in the metabolic pathways. Regarding the physical properties of activated sludge, we evaluated the effects of adding various organic and inorganic compounds. The addition of several inorganic compounds affected the flocculation properties of activated sludge and the concentration of microorganisms. Further, the abundance of one predatory bacterium indigenous to the activated sludge was substantially affected, suggesting that the predator-prey interactions were altered in the ecosystem.

研究分野：微生物生態学

キーワード：種間相互作用 活性汚泥 捕食性細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥とは、数千種以上で構成される水処理微生物生態系で、100年以上世界中で水処理に利用されてきた。そのため、最も身近で重要なバイオテクノロジーであり、現代社会を支える不可欠なインフラストラクチャーといえる。しかし活性汚泥は多様な微生物で構成されており、それら微生物群が水処理反応を担うため、そのメカニズムは未解明の部分が多く残り、今なお予期せぬトラブルが尽きない。

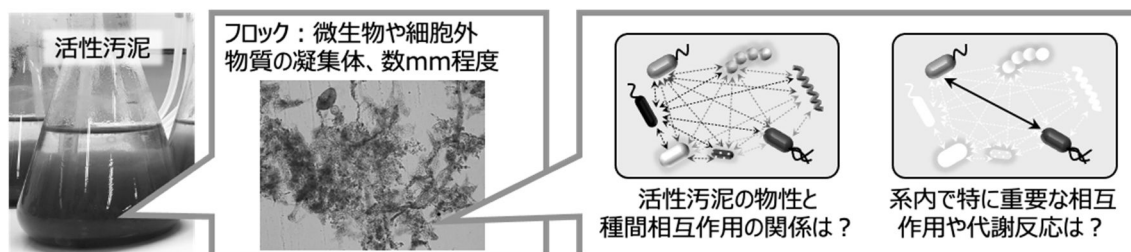
これまでの研究により、活性汚泥を構成する微生物の組成(どのような微生物がどれくらいいるかという構成比)が水処理性能と密接に関係することがわかってきた。一方、微生物組成は周囲の環境変化に応じて柔軟に変化する。そのため、各種環境変化に応じて活性汚泥内の微生物組成がどのように変化するかを知ることは重要である。

近年の研究では、周囲の環境変化だけでなく、微生物同士の関係性(相互作用)も微生物組成に大きく影響することがわかってきた。また我々はこれまでに、活性汚泥内には他の微生物を食べる捕食性細菌が一定量存在し、それらの働きが活性汚泥の微生物組成へも影響することを見出してきた。そして、特に捕食-被食という微生物間相互作用に着目すると、微生物同士の距離や接触が相互作用の頻度や強度に関係すると考えられるため、活性汚泥自体の物理的な性質(凝集体[フロック]の大きさや密度など)は重要なファクターである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、活性汚泥微生物生態系の物理的な性質が微生物種間の相互作用(特に捕食-被食関係に注目)に与える影響、ならびに、その相互作用が生態系にフィードバックされた結果、生態系全体の機能にどのような影響を与えるかを解明することである。さらには、活性汚泥の物性や、系内の微生物組成を人為的に変化させることで、微生物間相互作用や活性汚泥の機能を改変することにも挑戦したい。

また、これらの目的のためには、活性汚泥という複雑な微生物コミュニティにおいて、実際に機能している代謝ならびに種間相互作用を、分子生物学およびバイオインフォマティクスの解析技術を駆使して詳細に評価する必要がある。そのため、メタゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析技術それら自体に加えて、得られたデータの高度な処理技術の開発が必要になる。本研究では特に、複雑な微生物生態系における遺伝子発現データの可視化方法や新しい評価方法の確立も並行して進める。



3. 研究の方法

< 遺伝子発現データ処理技術の高度化 >

活性汚泥を飢餓条件で培養した際のメタトランスクリプトーム解析データを取得し、その可視化技術ならびに、重要遺伝子の評価方法の確立を目指した。具体的には、遺伝子発現データを、KEGG データベースを参照して可能な限りアノテーションし、KEGG pathway の情報も利用しながら、遺伝子発現データを代謝経路と紐づけて可視化するプログラムの開発を進めた。しかしながら、数千種が混在する微生物生態系が研究対象のため、遺伝子発現データの可視化に成功しても、その中でどの遺伝子が生態系で重要な役割を担っているかを明らかにすることは難しい。そのため、遺伝子発現データを元に、膨大な遺伝子データの中から重要遺伝子を見出す新しい評価方法の確立にも取り組んだ。確立した手法の確度については、別途取得したメタボローム解析結果などと比較することで評価した。なお、このテーマに取り組むためには高度な情報解析(インフォマティクス)技術とそれらに関連する深い知識が必要であったため、新たに情報解析を専門とする研究者に研究分担者として参画して頂いた。

< 活性汚泥の物性と種間相互作用 >

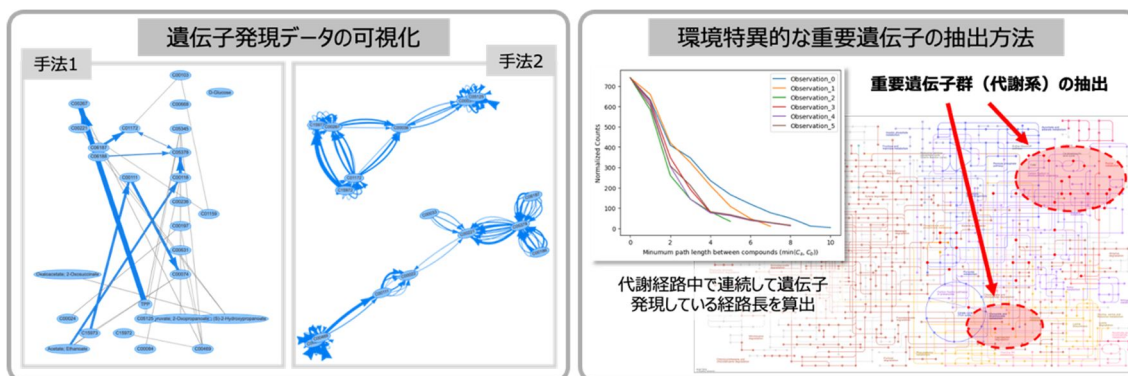
様々な条件の活性汚泥について化学分析および顕微鏡観察を行い、活性汚泥に含まれる成分と活性汚泥の物理的な性質の関係性を調べる。また、その際に、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析も実施し、微生物の組成と活性汚泥の物理的な性質の関係性を調べる。

次に、人為的に活性汚泥の物性等を変化させるために、活性汚泥に様々な有機化合物および無機化合物を加えて培養実験を行う。物性については、活性汚泥の性状解析でよく用いられる凝集性（沈降性、SV₃₀）や微生物濃度（OD₆₀₀）などを指標に評価する。また、その際に、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析も実施し、系内の微生物組成がどのように影響を受けるかを、特に捕食性細菌に着目して調べる。

4. 研究成果

< 遺伝子発現データ処理技術の高度化 >

まず、微生物コミュニティを対象とした遺伝子発現データの可視化方法の確立に注力した。遺伝子発現データに基づき代謝経路を可視化するプログラムは複数公開されているが、それらは基本的に単一の生物・微生物の解析に特化しており、複数の微生物から構成されるコミュニティでの遺伝子発現情報には対応していない。そのため我々は、同一の遺伝子が複数の微生物によって発現された場合にもそれが示されるように、代謝経路を複数線で描画するなどの工夫を行い、可視化プログラムの開発に取り組んだ。結果として、KEGG データベースの代謝マップをベースに、微生物コミュニティにおける複雑な遺伝子発現プロファイルを可視化することに成功した。



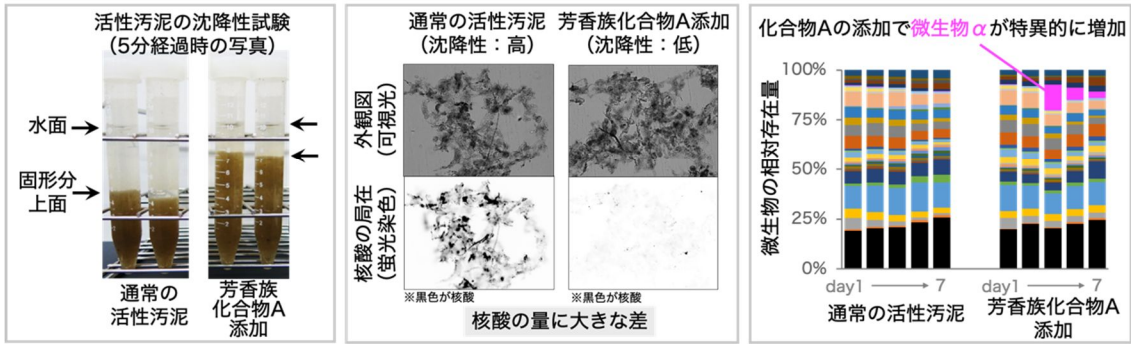
次に、それら発現遺伝子の中から、系内で実際に重要な働きをする遺伝子を抽出する、新しい評価方法の確立に取り組んだ。単純に「遺伝子発現量が高い = 重要遺伝子」と捉えてしまうと、細胞の維持や増殖に必要な、ごくありふれた重要遺伝子が多く検出されてしまう。しかし微生物は、各自が置かれた環境に応じて、その条件だからこそ必要な遺伝子を（細胞増殖関連遺伝子よりは低発現だが）特異的に発現していると考えられる。そのような、環境特異的な発現遺伝子の新しい評価方法の確立に取り組んだ。

まず、非負値行列因子分解(Non-negative Matrix Factorization)を応用し、全遺伝子データのクラスタリングを行い、類似した発現量と反応経路のパターンを持つ遺伝子群を抽出する手法を用いた。結果として、代謝的に重要な遺伝子群を抽出することができたが、さらなる改良が必要であった。そこで次に、代謝経路中で連続して遺伝子発現している経路長を抽出するプログラムを作成し、重要遺伝子群を抽出する試みを行った。結果として、単に遺伝子発現量が高いという遺伝子ではなく、各試験条件で特徴的な重要遺伝子群を抽出することに成功し、それらの結果はメタボーム解析等とも整合していた。このように、微生物生態系における複雑な遺伝子発現データから、重要遺伝子を特定する新しい評価方法を確立するという難しい課題に取り組み、有用な成果を得ることができた。

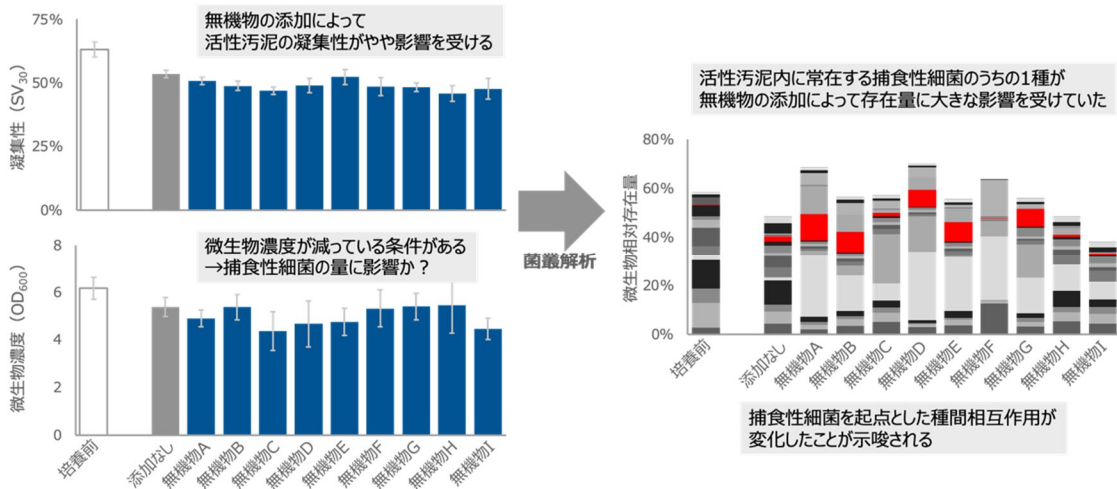
< 活性汚泥の物性と種間相互作用 >

活性汚泥に様々な有機物化合物を添加し、活性汚泥の物性変化を観察したところ、有機化合物の種類によって効果が大きく異なることがわかった。中でも、ある種の芳香族化合物（芳香族化合物 A）を加えると、活性汚泥の凝集性が大きく低下することがわかった。また、その際の活性汚泥内の構成成分について顕微鏡解析したところ、芳香族化合物 A を加えた系では、微生物凝集体のフロック内に含まれる核酸の量が低下していることがわかった。さらに、この活性汚泥について菌叢解析を行ったところ、芳香族化合物 A を加えた系でのみ微生物が特異的に増殖していることがわかった。この微生物が凝集性の変化と関係していることが考えられる。

芳香族化合物A添加有・無で活性汚泥を培養した際の物性、構成成分、微生物組成の違い



活性汚泥に様々な無機化合物を添加し、活性汚泥の物性変化を観察したところ、無機化合物の種類によって効果は様々であったが、活性汚泥の凝集性や微生物濃度に影響があることがわかった。また、微生物濃度が変化していることから、活性汚泥内の捕食-被食関係が変化した可能性があると考え、菌叢解析をおこなった。その結果、活性汚泥内に常在する複数の捕食性細菌のうち、1種の存在量が特に大きな影響を受けていたことがわかった。捕食性細菌以外の微生物についても存在量が変化しているものが複数みられ、無機化合物の添加によって捕食-被食関係に影響を与えることができたと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	深山 寛 (FUKAYAMA Satoru) (90712191)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員 (82626)	
研究分担者	稲葉 知大 (INABA Tomohiro) (90760439)	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 (82626)	

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