

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05331

研究課題名(和文) 多段シントロフィーによるアミノ酸・分枝鎖脂肪酸分解微生物群の動態解明

研究課題名(英文) Multistep syntrophy in the degradation of amino acids and branched-chain fatty acids in anaerobic ecosystem

研究代表者

成廣 隆 (Narihiro, Takashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20421844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：酸素が存在しない嫌気環境におけるアミノ酸の分解、特に分解の過程でイソ酪酸等の分枝鎖脂肪酸を生じる分枝鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)を分解する微生物の実体を解明するため、アミノ酸含有食品系廃水を浄化処理するリアクター内部の微生物群を対象とし、最先端のオミクス技術を駆使してそれらの代謝機能を解析した。その結果、リアクターの内部では多種多様な微生物が有する各種代謝機能が多段的に機能することで分枝鎖アミノ酸やタンパク質の分解を遂行していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Metagenomic analysis of a methanogenic microbial community in an anaerobic bioreactor treating amino acid-containing wastewater revealed synergistic metabolic network of syntrophic substrate-oxidizing bacteria, methanogens, and functionally unknown microorganisms. A laboratory-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor fed with wastewater discharged from soy sauce processing manufactory was operated at 20 °C. We successfully recovered metagenomic bins of dominant microbes in the reactor. Metabolic reconstruction suggested that dominant microorganisms perform fermentative and syntrophic degradation of amino acids and catabolic by-products facilitated by various energy conservation systems. Thus, diverse anaerobic organisms may unite to form a metabolic network to perform complete degradation of amino acids in the methanogenic microbiota.

研究分野：環境微生物学

キーワード：微生物ゲノム 廃水処理 メタゲノム アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

メタンガスは地球温暖化に關与する温室効果ガスとしてその排出の抑制が求められる一方、消化汚泥リアクター等の嫌気性废水处理プロセスや、油ガス田・メタンハイドレート等の地下環境からも回収が可能であり、将来的に有望なエネルギー資源として注目を集めている。生物由来メタンの発生源は、湿地や地下圏等の自然環境から、水田、ルーメン、废水处理プロセス等の人為的環境まで多岐に渡るが、これまでの微生物学的研究成果から、これらのどの環境においても、多種多様な嫌気性微生物群が「メタン生成共生系(シントロフィー)」を介してさまざまな有機物をメタンに分解していることが明らかとなっている。そのメタン生成共生系の中核を担うのが、炭水化物やタンパク質等の高分子有機化合物を加水分解してプロピオン酸や酪酸などの揮発性脂肪酸やアルコール類を生成する「発酵細菌」、生じた揮発性脂肪酸やアルコール類を水素と酢酸に分解する「共生細菌」、さらに水素や酢酸からメタンガスを生成する「メタン生成アーキア」の3種の微生物群である。しかし、メタン生成共生系を構成する中核微生物の多くが未だに分離培養されておらず、その生態学的機能の全貌は明らかにされていない。例えば、環境中に存在する様々な有機物のうち、タンパク質は発酵細菌によりアミノ酸に分解され、その大部分はさらなる発酵により水素や酢酸に分解されるが、分枝鎖アミノ酸(バリン、ロイシン、イソロイシン)は発酵による分解が熱力学的に困難であることが知られている。これらのアミノ酸は、ごく限られた種の嫌気性共生細菌とメタン生成アーキアのシントロフィーにより分解されることが知られているが、その代謝経路や実環境での機能発現に関する知見は極めて少ない。また、分枝鎖アミノ酸の分解産物として、イソ酪酸、イソ吉草酸、2-メチル酪酸などの分枝鎖脂肪酸が産生されるが、これらの化合物を分解可能な微生物はこれまでにわずか2種しか報告

が無く、イソ吉草酸に至ってはその分解の担い手が未だに発見されていない。

2. 研究の目的

上記1に記載した背景を受けて本提案課題では、各種アミノ酸が数種の嫌気性共生細菌とメタン生成アーキアの共生系によって分解するという「多段シントロフィー」によりメタンにまで完全分解されるという仮説を提唱し、申請者が有する高度な嫌気培養技術、および最先端のバイオフィーマティクス技術に裏打ちされたゲノム、メタゲノム等のオミクス技術を駆使することでその解明を試み、嫌気環境におけるアミノ酸起源のメタン生成プロセスの統合的理解を目指した(図1)。

3. 研究の方法

(1)微生物群集構造解析

代表的な嫌気環境である汚泥消化プロセスから微生物試料を採取し、汚泥を構成する微生物群の組成を、MiSeq シークエンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシークエンシングにより解明した。日本各地の都市下水処理施設から採取した嫌気消化タンクや、アミノ酸を高濃度に含む食品系工場廃水を処理する嫌気性リアクターから汚泥試料を採取し、市販の DNA 抽出キットを用いて全ゲノムを抽出し、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を標的として PCR による増幅を行った。得られた PCR 産物を精製し、イルミナ社 MiSeq シークエンサーを用いてシークエンシングを実施した。シークエンサーからの出力データは QIIME ソフトウェアにより処理し、嫌気汚泥試料に存在する微生物の存在量と系統学的所属を解析した。

(2)ゲノム解析

嫌気環境において多段シントロフィーを形成すると考えられる純粋分離菌の代謝機能を解析するために、酪酸等を分解することが知られている *Syntrophomonadaceae* 科の共生細菌である *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica*、および、*Methanomicrobiaceae* 科に属するメタン生成アーキアである *Methanoculleus horonobensis*、*Methanoculleus thermophilus*、*Methanofollis ethanolicus* のドラフトゲノム塩基配列を決定した。各菌株から抽出したゲノム DNA のショットガンシークエンシングはイルミナ社 MiSeq シークエンサーを用いて実施した。出力された遺伝子リードを SPAdes ソフトウェアによりアセンブルし、Prokka ソフトウェアや KEGG BlastKOALA (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>) 等を利用してアノテーションと代謝経路の推定を実施した。

(3)メタゲノム解析

アミノ酸を高濃度に含む食品系工場廃水

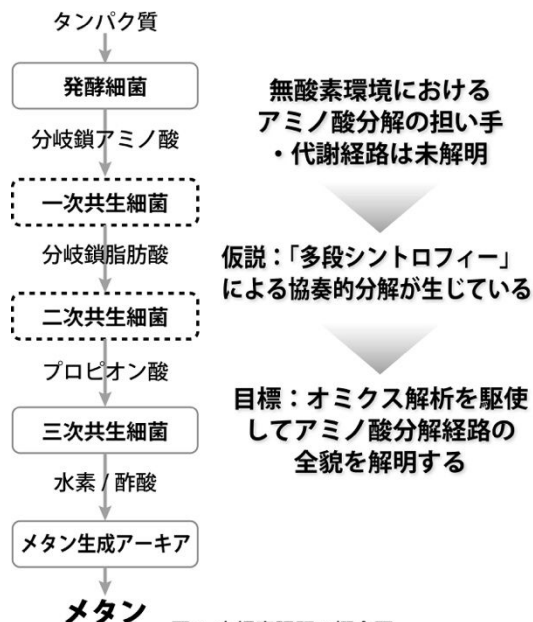


図 1. 本提案課題の概念図

を処理する嫌気性リアクターから採取した汚泥試料を対象とし、多段シントロフィーによるアミノ酸分解を担う嫌気性微生物群の代謝機能をメタゲノム解析により明らかにすることを試みた。市販の DNA 抽出キットを用いて抽出した全ゲノム DNA のショットガンシーケンシングを、イルミナ社 MiSeq シーケンサーを用いて実施した。前項のゲノム解析と同様にアセンブルやアノテーションを実施した。さらに、MaxBin ソフトウェアを用いて、単一の微生物から由来すると考えられるコンティグを抽出するピニングを実施してドラフトゲノムを再構築した。

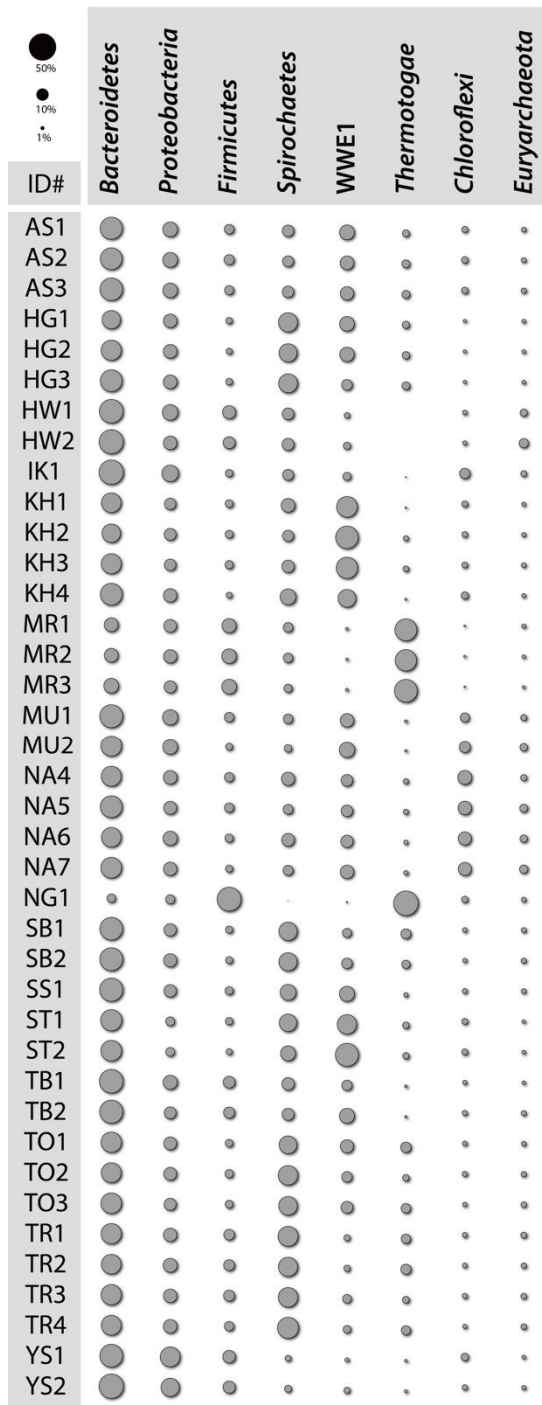


図 2. 嫌気消化汚泥の主要微生物群と分布

4. 研究成果

(1) 微生物群集構造解析

嫌気環境のモデルとして都市下水処理施設の消化タンクから採取した汚泥試料を対象とし、それらの微生物群の組成を MiSeq シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により調べた。微生物の高次系統群である門レベルで見たときの存在量を図 2 に示す。解析の結果、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Chloroflexi*、*Spirochaetes*、*Thermotogae*、*Euryarchaeota* 等の既知の門に属する微生物群に加え WWE1 グループとして知られる“*Ca. Cloacimonetes*”が高頻度で検出された。アミノ酸を高濃度を含む食品系工場廃水を処理する嫌気性リアクターから採取した汚泥においては、上記消化汚泥で見られた系統群に加え、アミノ酸分解菌が属する *Synergistetes* 門が検出された。さらに詳細に科・属レベルで見ると、*Firmicutes* 門では *Syntrophomonas* 属や *Pelotomaculum* 属、*Proteobacteria* 門では *Deltaproteobacteria* 綱の *Syntrophorhabdus* 属に近縁の嫌気共生細菌の一群、*Euryarchaeota* 門では *Methanobacterium* 属や *Methanospirillum* 属等の水素利用メタン生成アーキア、*Methanosaeta* 属や *Methanosarcina* 属の酢酸利用メタン生成アーキアが検出されていた。

(2) ゲノム解析

2-メチル酪酸を分解することが知られている嫌気性共生細菌である *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyrica* およびイソ酪酸を分解することが知られている *Syntrophothermus lipocalidus* の分枝鎖脂肪酸分解経路を特定するために、同じ *Syntrophomonadaceae* 科の酪酸分解菌である *Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei* との比較ゲノム解析を実施した。その結果、2-メチル酪酸およびイソ酪酸の分解に関連する代謝経路を遺伝子レベルで初めて特定することに成功した(図 3)。

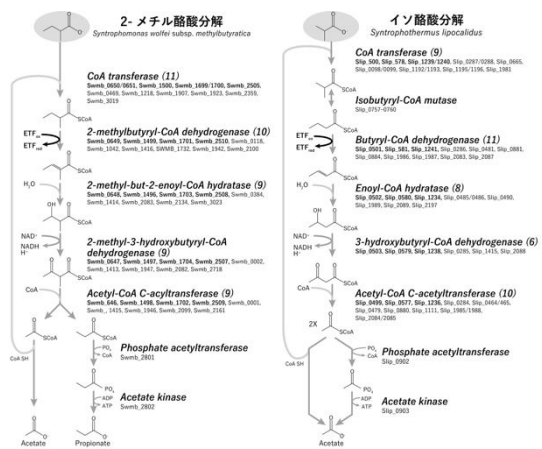


図 3. (左) 2-メチル酪酸および(右)イソ酪酸の分解経路 (Narihiro et al. 2016 Microbes Environ を改変)

表 1. アミノ酸含有廃水処理リアクター汚泥から再構築したドラフトゲノム

門	系統群	ゲノム完成度 (%)	コンタミ率 (%)	Size (Mbp)
Firmicutes	<i>Syntrophomonas</i>	87.93	6.76	3.4
	<i>Thermoanaerobacterales</i>	80.38	4.09	1.8
	<i>Pelotomaculum</i>	99.19	2.85	3.0
	<i>Ruminococcaceae</i>	96.98	2.35	2.2
	<i>Clostridiaceae</i>	88.47	5.04	2.8
Synergistetes	<i>Synergistaceae 1</i>	96.61	6.78	2.4
	<i>Synergistaceae 2</i>	81.43	4.39	2.4
	<i>Synergistaceae 3</i>	86.13	2.85	1.9
	<i>Synergistaceae 4</i>	100.0	3.7	2.1
Thermotogae	<i>Mesotoga</i>	98.28	1.72	2.3
Proteobacteria	<i>Syntrophorhabdaceae</i>	95.38	4.2	3.9
	<i>Desulfovibrio</i>	100.0	0.02	3.9
Bacteroidetes	<i>Bacteroidia 1</i>	99.45	5.81	3.4
	<i>Bacteroidia 2</i>	96.19	4.67	3.2
	<i>Bacteroidia 3</i>	91.31	6.33	4.1
	<i>Bacteroidia 4</i>	97.62	6.25	3.0
	<i>Bacteroidia 5</i>	96.77	1.81	4.4
Spirochaetes	<i>Spirochaetes</i>	98.85	1.99	2.8
Chloroflexi	<i>Chloroflexi</i>	82.73	6.22	2.0
Actinobacteria	<i>Actinobacteria</i>	98.45	4.7	3.5
Euryarchaeota	<i>Methanosaeta</i>	93.14	14.38	3.3
	<i>Methanosarcina</i>	99.18	6.48	4.5
	<i>Methanospirillum</i>	98.37	2.34	3.2
	<i>Methanobacterium</i>	95.51	3.42	2.3

さらに、*Syntrophomonadaceae* 科等の嫌気性脂肪酸分解菌と共生関係を形成するメタン生成アーキアのうち、嫌気性廃水処理プロセスで高頻度に検出されることが知られている *Methanoculleus* 属の比較ゲノム解析を実施するために、新たに *Methanoculleus horonobensis*, *Methanoculleus thermophilus*, *Methanofollis ethanolicus* の 3 株のドラフトゲノムシーケンスを決定した。これらの 3 株を含む 11 株の *Methanoculleus* 属ゲノムを対象に比較解析を実施した結果、*Methanoculleus* 属は、他のメタン生成アーキアでは見られないトレハロース合成経路やストレス応答システムを保有していることが明らかとなった。これらの機能遺伝子が、嫌気性共生細菌との相互作用において重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3)メタゲノム解析

アミノ酸含有食品系工場廃水処理リアクターから採取した汚泥を対象としてメタゲノム解析を実施したところ、上記 4(1)の実験項目で見出された優占微生物群のドラフトゲノムを再構築することに成功した(表 1)。これらのメタゲノムライブラリを対象として各種微生物の代謝機能を詳細に解析した。その結果、*Bacteroidetes* 門、*Spirochaetes* 門、*Thermotogae* 門に属する微生物が廃水中に含まれるタンパク質の分解によりアミノ酸を生じ、*Synergistetes* 門や *Syntrophorhabdaceae* 科に属する微生物が分枝鎖アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、バ

リン)を酪酸や分枝鎖脂肪酸(イソ酪酸、2メチル酪酸、イソ吉草酸)に分解し、さらに酪酸・分枝鎖脂肪酸は *Syntrophorhabdus* 属微生物によりプロピオン酸、酢酸、水素に分解される。分枝鎖アミノ酸以外のアミノ酸も *Synergistetes* 門、*Syntrophorhabdaceae* 科、*Ruminococcaceae* 科、*Clostridiaceae* 科等の嫌気性微生物によりプロピオン酸、酢酸、水素に分解される。一方、*Bacteroidetes* 門、*Spirochaetes* 門、*Thermotogae* 門、*Actinobacteria* 門、*Chloroflexi* 門は糖等の炭水化物を発酵的に分解し、プロピオン酸や酢酸を生じる。さらに、プロピオン酸は *Pelotomaculum* 属により酢酸、水素に分解され、最終的に *Euryarchaeota* 門に属する各種メタン生成アーキア (*Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanobacterium*) によりメタンと二酸化炭素に分解されることが示された(図 4)。これらの結果から、アミノ酸分解処理リアクター内部では、多種多様な微生物による多段的な分解反応が進んでいることが明らかとなった。

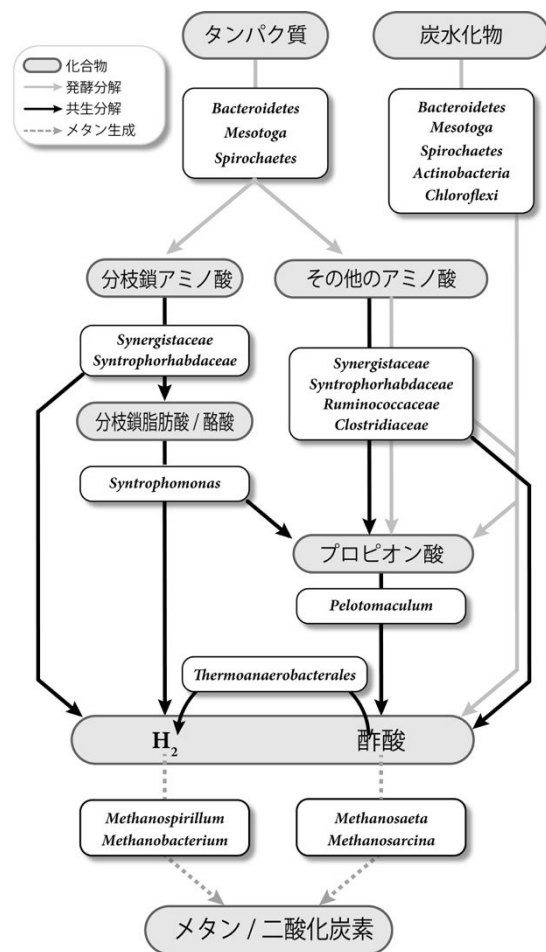


図 4. アミノ酸含有廃水処理リアクター内の有機物分解フロー

本研究で得られた成果から、嫌気環境における微生物のアミノ酸分解が、複数種の微生物による多段的な共生関係によって支えられていることが明らかとなった。今後、他の

嫌気環境においても同様の微生物生態システムが形成されているのかどうかを明らかにすることで、地球規模の物質循環の解明に向けた知見を得ることができると考えている。また、応用的な展開として、アミノ酸分解や脂肪酸分解等の微生物の代謝機能と相互作用に基づいたリアクターの最適化を目指すことも考えている。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

Okamoto T, Aino K, Narihiro T, Matsuyama H, Yumoto I. Analysis of microbiota involved in the aged natural fermentation of indigo, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:70, 査読有, 2017年

Narihiro T, Kamagata Y. Genomics and metagenomics in microbial ecology: recent advances and challenges. *Microbes and Environments*, 32(1):1-4., doi:10.1264/jsme2.ME3201rh, 査読無, 2017年

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Sekiguchi Y, Liu WT. Comparative genomics of syntrophic branched-chain fatty acid degrading bacteria. *Microbes and Environments*, 31(3):288-292., doi: 10.1264/jsme2.ME16057, 査読有, 2016年

Narihiro T, *Microbes in the Water Infrastructure: Underpinning Our Society*, *Microbes and Environments*, 32(2):89-92, doi: 10.1264/jsme2.ME3102rh, 査読無, 2016年

Narihiro T, Kusada H., Yoneda Y, Tamaki H. Draft genome sequences of *Methanoculleus horonobensis* strain JCM 15517, *Methanoculleus thermophilus* strain DSM 2373, and *Methanofollis ethanolicus* strain JCM 15103, hydrogenotrophic methanogens belonging to the family *Methanomicrobiaceae*. *Genome Announcements*, 4(2): e00199-16. doi: 10.1128/genomeA.00199-16. 査読有, 2016年

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Liu WT. Draft genome sequence of *Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica* strain 4J5^T (JCM 14075), a mesophilic butyrate- and 2-methylbutyrate-degrading syntroph. *Genome Announcements*, 4(2): e00047-16. doi: 10.1128/genomeA.00047-16. 査読有, 2016年

〔学会発表〕(計13件)

Narihiro T, Introducing "Database for Environmental Microbiology" 2017 Anaerobic Microbial Syntrophy Forum,

2017年

當房 陸, 山田真義, 山内正仁, 黒田恭平, 成廣 隆, 幡本将史, 山口隆司. 低温 UASB と常温 DHS を組み合わせたシステムによる実醤油製造廃水の連続処理実証実験, 水環境学会年会, 2017年

Nobu MK, 成廣 隆, 黒田恭平, Liu WT. 環境ゲノム解析による嫌気性廃水処理プロセス内未知微生物の実態解明, 日本水環境学会シンポジウム, 2017年

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Sekiguchi Y, Liu WT. Comparative genomics of branched-chain fatty acid degrading syntrophs reveals multiple genes involved in β -oxidation and energy conservation system. 16th International Symposium on Microbial Ecology, 2016年

Narihiro T, Nobu MK, Kuroda K, Tobo A, Liu WT, Yamada M, Metagenomics reveals metabolic capacity of methanogenic microbiota in a bioreactor treating soy sauce-processing wastewater, 日本微生物生態学会年会, 2016年

Narihiro T, Nobu MK, Kuroda K, Tobo A, Liu WT, Yamada M, Metagenomics of methanogenic microbiota in an anaerobic bioreactor treating amino acids-containing wastewater, The 9th Asia-Pacific Landfill Symposium in 2016 (APLAS2016), 2016年

Narihiro T, Metagenomics of methanogenic microbiota in an anaerobic bioreactor treating amino acids-containing wastewater, Workshop on environmental microbes in Sichuan University, 2016年

成廣 隆, 水資源循環の要としての廃水処理プロセスと微生物の生態, 東三河生態系ネットワークフォーラム 2016, 2016年

成廣 隆, 嫌気性廃水処理プロセスの汚泥を構成する未知微生物群の機能解明, 産技連 LS-BT 合同研究発表会, 2016年

成廣 隆, 嫌気性廃水処理プロセスの汚泥を構成する未知微生物群の機能解明, 微生物研究の新展開シンポジウム, 2016年

Narihiro T, Nobu MK, Tamaki H, Kamagata Y, Liu WT. Genome analysis of branched chain fatty acid degrading syntrophs: "*Syntrophomonas wolfei* subsp. *methylbutyratica*" strain JCM 14075^T and *Syntrophothermus lipocalidus* strain TGB-C1^T. 日本微生物生態学会年会, 2015年

成廣 隆, Nobu MK, 鎌形洋一, Liu WT. 嫌気性廃水処理プロセスの汚泥を構成する微生物群の機能解明, NGS 現場の会 第4回研究会, 2015年

Narihiro T, Nobu MK, Liu WT., Application of Microbial Ecology

Molecular Tools in Environmental Engineering and Science Studies -QIIME analysis-, Anaerobic Syntrophy: Microbial Ecology & Energetics, 2015年

[図書](計2件)

Narihiro T, Sekiguchi Y. Primers-functional genes and 16S rRNA genes for methanogens. *In* Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, pp. 79-139, 2015年

Narihiro T, Kamagata Y. Anaerobic cultivation. *In* Manual of Environmental Microbiology 4th Edition, 2.1.2-1 ~ 2.1.2.12, 2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成廣 隆 (NARIHIRO, Takashi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：20421844

(2) 研究協力者

山田 真義 (YAMADA, Masayoshi)
鹿児島工業高等専門学校
都市環境デザイン工学科・准教授・
研究者番号：80469593

黒田 恭平 (KURODA, Kyohei)
都城工業高等専門学校・
物質工学科・助教
研究者番号：50783213

延 優 (NOBU, Masaru)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
生物プロセス研究部門・研究員
研究者番号：40805644

LIU, Wen-Tso
イリノイ大学・土木環境工学系・教授

LEE, Po-Heng
香港理工大学・土木環境工学系・助教

TANG, Yueqin
四川大学・環境工学系・教授