

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14816

研究課題名（和文）安定同位体プローブ法と次世代シーケンスの融合で拓くレアバイオスフィアの生理生態

研究課題名（英文）Ecophysiology of rare biosphere revealed by a combination of stable isotope probing and high-throughput sequencing

研究代表者

堀 知行 (Hori, Tomoyuki)

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：20509533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自然環境において微生物群集の有する異なる代謝機能、すなわち難分解性有害化学物質「1,4-ジオキサン」の分解および微生物死細胞成分の分解（微生物食物連鎖）に焦点を当て、未培養微生物の高感度機能同定技術「高感度SIP」を適用することで、これらの代謝過程に関与する未知微生物、特にレアバイオスフィアを同定した。前者では、多様な分解菌が石油化学工業廃水中の1,4-ジオキサンの安定的な除去に協働的に関与していることが示された。後者では、堆肥中において微生物死細胞成分を効率的に分解・利用する様々な微生物が共存することで、病原菌の増殖が抑えられている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、高感度SIPが自然環境中に存在する未知のレアバイオスフィアの機能解明に極めて有効であることが明らかになった。高感度SIPは、今回対象とした研究対象のみならず、あらゆる自然環境試料に適用し得ると考えられる。よって本研究で得られた成果は、普遍的かつ強力な微生物生態系機能の評価・予測ツールを提供し、さらに生態系機能発現に関わる共通原理の理解に大きく貢献するものとして捉えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, high-sensitivity stable isotope probing was implemented to identify the hitherto unknown microorganisms, including rare biosphere, involved in the degradation of 1,4-dioxane (recalcitrant compound biodegradation) and the degradation of dead bacterial biomass (microbial food web) as the different metabolic functions of microbial communities in natural environments. The former research revealed that the co-existence and individually distinct dynamics of various 1,4-dioxane-degrading microorganisms played pivotal roles in the maintenance of the biological system removing the recalcitrant pollutant. The latter research demonstrated that a variety of bacteria were potentially competitive with pathogens due to their preferential assimilation of dead biomass in compost.

研究分野：微生物生態学

キーワード：遺伝子 生態学 微生物学 環境分析 環境技術

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの登場と技術進展は、自然環境試料から大規模な遺伝子情報を直接取得することを可能にした。中でも 16S rRNA 遺伝子の大規模塩基配列解読により、膨大なデータに裏付けられた詳細な微生物群集構造が明らかにされている。特筆すべきは、本技術の適用により見出された、極めて高い微生物多様性である。新たに発見された微生物の多くは、微生物群集全体の 0.1%にも満たない「レアバイオスフィア(稀少微生物)」として自然界に広く存在し、従来の微生物群集解析技術の感度では到底検出できないものであった。

レアバイオスフィアの発見はなぜ重要なのだろうか。それは、環境での微生物の「優占度」と「重要度」は必ずしも一致しないことに起因する。例えば、嫌気有機物分解の最終反応を担うメタン生成菌は、最終電子受容反応である CO<sub>2</sub>還元から僅かなエネルギーしか得ることができないため生育が遅く(同化代謝活性が低く)、自然環境中で優占化することはほとんど無い。しかし、エネルギー代謝の回転率を上げる(異化代謝活性を高くする)ことで、環境中の物質動態に大きな役割を担っている。このように、レアバイオスフィアは生態系機能発現には重要であるが、その生育の乏しさゆえに培養困難である場合が多い。よって、レアバイオスフィアの代謝機能を探る手立てはこれまでに存在しなかった。

未培養微生物の代謝機能を同定する手法として「安定同位体プローブ法(Stable Isotope Probing: SIP)」が広く用いられている。本手法は、ある環境試料に安定同位体で標識された化合物を加えて一定期間培養した後、そこから同位体化合物を取り込んで重くなった微生物核酸を超速心で分離して塩基配列を決定し、同位体を取り込んだ微生物種を同定するものである。従来法では、同位体で標識された核酸を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE)や末端標識制限酵素断片多型分析法(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: T-RFLP)などで検出していた。これらの 16S rRNA フィンガープリント法では、全体の 1%以上の主要な標識核酸しか検出することができず、レアバイオスフィア由来の僅かな標識核酸を検出するには感度が不十分であった。ごく最近、SIPに次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子の大規模塩基配列解読を融合させることで、従来法の約 500 倍の検出感度を有する「高感度 SIP」が開発され、レアバイオスフィアの代謝機能を解明に極めて有望と期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、自然環境において微生物群集の有する異なる代謝機能、すなわち(1)難分解性有害化学物質「1,4-ジオキサン」の分解および(2)微生物死細胞成分の分解(微生物食物連鎖)に焦点を当て、未培養微生物の高感度機能同定技術「高感度 SIP」を適用することで、これらの代謝過程に関与する微生物、特にレアバイオスフィアを同定することを目的とした。これらの微生物生態系機能の実態解明を通して、未知環境微生物が担う物質・エネルギー循環プロセスのより正確な評価と将来の制御技術創出に資する科学的知見を提供することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 難分解性化合物「1,4-ジオキサン」の分解

1,4-ジオキサンは、人への発がん性が疑われ、世界的な規制強化が進む人工の有害化学物質である。1,4-ジオキサンの処理方法として、低コスト・低環境負荷型の生物処理が大きな注目を集めているが、これまで 1,4-ジオキサン分解菌は主に分離培養法によって調べられており、限られた数種類の分解菌の情報しか得られていなかった。またモノオキシゲナーゼ遺伝子をバイオマーカーとして利用し 1,4-ジオキサン分解菌の分子生態が調べられているが、モノオキシゲナーゼに分解を依存しない分解菌も存在することから、実環境で実際に機能する分解菌を探し出すことは困難であった。ここでは、高感度 SIP を用いて、石油化学工業廃水の生物処理槽における 1,4-ジオキサン分解菌(レアバイオスフィア)を同定した。さらに、同定された分解菌の生物処理槽での年間動態を 16S rRNA 遺伝子に基づく次世代シーケンサー解析により明らかにし、その 1,4-ジオキサン除去との関連性を評価した。

#### (2) 微生物死細胞成分の分解(微生物食物連鎖)

堆肥化過程において、病原菌の大部分は有機物分解で発生する熱により死滅するが、残存する一部が堆肥中で再び増殖することが問題となっている。病原菌を堆肥化過程において完全に除去するためには、病原菌の利用する基質や生存をめぐる競合関係を明らかにする必要がある。堆肥化過程では、微生物群集が劇的に変遷し、微生物の死滅や増殖が頻発していることから、死滅した微生物の細胞成分が他の微生物の栄養分として利用されることが示唆されてきた。ここでは、<sup>13</sup>C 標識化合物で培養したモデル微生物の死細胞成分による高感度 SIP を適用することで、病原菌による微生物死細胞成分の利用有無(微生物食物連鎖)を検証し、さらに死細胞成分を分解する新規微生物(レアバイオスフィア)を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 難分解性化合物「1,4-ジオキサン」の分解

石油化学工業廃水を安定的に処理している生物処理槽から活性汚泥を取得し、バイアル瓶に

封入した後、 $^{13}\text{C}$  標識 1,4-ジオキサンを加えて好氣的に 8 時間振とうした。その結果、1,4-ジオキサンの減少に伴って  $^{13}\text{CO}_2$  が生成した。滅菌汚泥を用いた処理区では 1,4-ジオキサン濃度の顕著な減少は見られなかったため、1,4-ジオキサンが活性汚泥微生物により分解されたことが示された。次に、活性汚泥から抽出した RNA を超遠心に供し、 $^{13}\text{C}$  標識 1,4-ジオキサン由来の  $^{13}\text{C}$  を取り込んで重くなった RNA を分離・回収した。重い RNA 画分に含まれる 16S rRNA を RT-PCR により増幅し、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解読を行ったところ、 $^{13}\text{C}$  標識 1,4-ジオキサンを取り込んだ微生物 9 種を同定することに成功した。このうち、1 種は既知 1,4-ジオキサン分解菌 (*Pseudonocardia dioxanivorans*) と同種であったが、残りの 8 種はこれまでに 1,4-ジオキサン分解能が報告されていない新規分解菌であった。さらに、最も重い RNA 画分と 2 番目に重い RNA 画分でのみ検出された分解菌 4 種は、1,4-ジオキサン分解だけで得られる僅かなエネルギーで生存すること、3 番目に重い RNA 画分で検出された残りの分解菌 5 種は、1,4-ジオキサンだけではなく、生物処理槽に共存する他の化学物質 (モノエチレングリコールやアルカン類など) を共代謝的に利用して比較的高い存在量で生存することが強く示唆された。さらに、生物処理槽の 1,4-ジオキサン分解菌の動態を、約 1 年にわたり、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子解析により追跡した。同定された 1,4-ジオキサン分解菌は、いずれも年間平均の相対存在量 0.001 % ~ 1.523 % を示す微生物であり、その多くはレアバイオスフィア (稀少微生物) として定義された。驚くべきことに、これらは常に一定の割合で存在しているのではなく、年間を通してその割合を劇的に変化させていることが明らかになった。例えば、分解菌のうち存在量が大い 5 種の変遷に着目すると、7~8 月の除去率が急激に低下する時期には、5 種全ての 1,4-ジオキサン分解菌が減少したが、その後、ある 2 種の分解菌が増加に転じ、除去率の迅速な回復に貢献した。定期メンテナンスのためのシステム停止期間後の 10 月の除去率回復時期には、1 種の分解菌が一旦増加してから減少した後、それを補うように続けて、他の 3 種の分解菌が増加し、除去率の回復・安定化を支えた。以上から、これらの多様な分解菌 (レアバイオスフィア) が石油化学工業廃水中の 1,4-ジオキサンの安定的な除去に協働的に関与していることが示された。

## (2) 微生物死細胞成分の分解 (微生物食物連鎖)

$^{13}\text{C}$  標識グルコースで培養したモデル微生物を  $90^\circ\text{C}$ 、30 分の条件での不活性化することで、高感度 SIP の基質である微生物死細胞成分を用意した。この死細胞成分を堆肥に添加して 3 日間培養したところ、堆肥の  $^{13}\text{C}$  の存在比が 1.21% から 1.17% に低下した。よって、培養期間中に微生物死細胞成分の分解・無機化が起きていることが示された。病原菌モデルである大腸菌は純粋培養時には死細胞成分を利用して旺盛に増殖したが、死細胞成分を添加した堆肥中では大腸菌数の有意な上昇は観察されなかった。培養後の堆肥から RNA を抽出し、超遠心により分離・回収した重い RNA 画分を調べたところ、大腸菌による  $^{13}\text{C}$  の取り込みは検出されなかった。このことから、堆肥中において大腸菌などの病原菌は、死細胞成分を利用していないことが強く示唆された。さらに、堆肥中において死細胞成分を優先的に分解した微生物を同定するため、重い RNA 画分を次世代シーケンサーにより解析した。その結果、*Sphingobium* 属、Myxococcales 目、Bacillales 目、Rhizobiales 目に属する多様な細菌群が、微生物死細胞成分に由来する  $^{13}\text{C}$  を有意に取り込んでいることが明らかになった。その中でも Myxococcales 目細菌は、土壌などに生息し、生きた微生物細胞を栄養源にする捕食細菌として知られている。このことは、同定された新規微生物が細胞成分を基質とする食物連鎖に深く関与していることを強く支持するものである。以上から、堆肥中において微生物死細胞成分を効率的に分解・利用する様々な微生物 (レアバイオスフィア) が共存することで、病原菌の増殖が抑えられている可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Aoyagi Tomo, Morishita Fumiaki, Sugiyama Yutaka, Ichikawa Daisuke, Mayumi Daisuke, Kikuchi Yoshitomo, Ogata Atsushi, Muraoka Kenji, Habe Hiroshi, Hori Tomoyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of active and taxonomically diverse 1,4-dioxane degraders in a full-scale activated sludge system by high-sensitivity stable isotope probing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 2376 ~ 2388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-018-0201-2	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 Narihiro Takashi, Nobu Masaru Konishi, Hori Tomoyuki, Aoyagi Tomo, Sato Yuya, Inaba Tomohiro, Aizawa Hidenobu, Tamaki Hideyuki, Habe Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of the Wastewater Flow Rate on Interactions between the Genus <i>Nitrosomonas</i> and Diverse Populations in an Activated Sludge Microbiome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 89 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/j sme2.ME18108	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 Navarro Ronald R., Hori Tomoyuki, Sato Yuya, Tanaka Ryoichi, Ogata Atsushi, Habe Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 High susceptibility of aerobic microbiota in membrane bioreactor (MBR) sludge towards olive oil as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA genes	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Chemical Engineering	6. 最初と最後の頁 4392 ~ 4399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jece.2016.09.037	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 Hanajima Dai, Aoyagi Tomo, Hori Tomoyuki	4. 巻 133
2. 論文標題 Dead bacterial biomass-assimilating bacterial populations in compost revealed by high-sensitivity stable isotope probing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environment International	6. 最初と最後の頁 105235 ~ 105235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envint.2019.105235	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 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 堀知行
2. 発表標題 環境微生物の機能強化による新たな環境修復技術の開発
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会2018年度大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀知行
2. 発表標題 環境微生物群のモニタリング・環境微生物群のモニタリ機能強化による新たな環境バイオ技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳 智、堀 知行、田中亮一、Navarro Ronald、眞弓 大介、羽部 浩、柳下 宏、納崎克也、尾形 敦
2. 発表標題 有機性廃水を処理する活性汚泥中のパルミチン酸分解微生物群の同定
3. 学会等名 日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青柳 智、Cuong Tu HO、成廣 隆、眞弓 大介、尾形 敦、羽部 浩、堀 知行
2. 発表標題 超高感度安定同位体追跡法の適用による笹侵食湿地土壌におけるメタン生成抑制機構の解明
3. 学会等名 日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀知行
2. 発表標題 Identifying the elusive but key microbes in wastewater treatment systems by cutting-edge molecular ecological tools
3. 学会等名 The 59th seminar on water environments (Tsinghua University, Shenzhen) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳智、羽部浩、堀知行
2. 発表標題 High-sensitivity stable isotope probing of elusive microbes that actively dissimilate but marginally assimilate substrate- <sup>13</sup> C in natural environments
3. 学会等名 MEWE2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青柳 智、羽部 浩、堀 知行
2. 発表標題 高感度rRNA-SIPと動態解析で探る環境微生物の代謝様式
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 堀知行
2. 発表標題 Identifying the elusive 1,4-dioxane degraders in activated sludge by high-sensitivity stable isotope probing
3. 学会等名 The 3rd National Conference on Water Treatment and Reuse of China (ChinaWTR-2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 青柳 智、森下史朗、杉山豊、市川大輔、眞弓 大介、菊池 義智、尾形 敦、村岡健次、羽部 浩、堀 知行	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一般社団法人日本環境測定分析協会	5. 総ページ数 11
3. 書名 環境と測定技術：高感度Stable Isotope Probing (SIP)による廃水処理槽内の1,4-ジオキサン分解菌の同定	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----