

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02287

研究課題名（和文）活性汚泥内に存在する微生物ダークマターCPR細菌群の代謝機能の解明と分離培養

研究課題名（英文）Elucidation of metabolic function of microbial dark matter CPR bacterial population in activated sludge and its isolation

研究代表者

金田一 智規（Kindaichi, Tomonori）

広島大学・先進理工系科学研究科（工）・教授

研究者番号：10379901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：Patescibacteriaが比較的多く存在する活性汚泥を選定し、活性汚泥サンプルからDNAを抽出し、メタゲノム解析を行うことで10個の高品質なPatescibacteriaのゲノムを再構築することができた。さらにPatescibacteriaのゲノムに含まれる16S rRNA遺伝子配列の全長を抽出し、系統樹作成ソフトARBを用いてPatescibacteriaに特異的なFISH（蛍光 in situ hybridization）プローブの設計を行った。FISH法による観察結果では、BD1-5門の細菌はZoogloea属細菌と近接して存在しており、寄生・共生関係を構築していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既往のメタゲノム解析では、あるPatescibacteriaはゲノムサイズが非常に小さく、生命に必須の呼吸や核酸合成などの遺伝子群が欠落していることが分かっているPatescibacteriaが活性汚泥を含めてどのように生存しているかを解明することは、38億年前の地球上の初期生命の進化の理解へとつながり、微生物ダークマターの謎にせまることができる。メタゲノム解析は環境微生物学の分野で主流になっているが、ゲノム情報からの推察では不十分な点が多い。特に本研究のように可視化することで細胞サイズや他細菌との共生関係など分離培養へと繋がる情報が得られたことの意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We selected activated sludge with relatively high Patescibacteria abundance, extracted DNA from activated sludge samples, and reconstructed 10 high-quality Patescibacteria genomes by metagenomic analysis. Furthermore, the full length of the 16S rRNA gene sequence in the Patescibacteria genome was extracted, and fluorescent in situ hybridization (FISH) probes specific for Patescibacteria were successfully designed using the phylogenetic tree generation software ARB. by FISH method. The results suggest that bacterial cells in the phylum BD1-5 exist near the cells hybridized with Zoogloea spp. present in activated sludge, suggesting that they have established a parasitic-symbiotic relationship.

研究分野：排水処理工学

キーワード：微生物ダークマター CPR細菌群 Patescibacteria 分離培養

## 1. 研究開始当初の背景

環境中には、分離培養が存在しないために正しく学名記載されていないが、ゲノムの塩基配列に基づく系統分類では門レベルを構成する CPR 細菌群が存在し、微生物ダークマターと呼ばれている。これらの CPR 細菌群は現在まで提案されている細菌門のうち約半分を占めるといわれている (Rinke *et al.* Nature 2013)。CPR 細菌群は土壌、海洋、活性汚泥など様々な環境中から検出されているが、分離培養の報告はほとんどない。これは CPR 細菌群最適培養条件 (有機炭素源、温度、pH、好気/嫌気条件など) が不明なことが一因となっている。申請者らの予備的調査の結果、CPR 細菌群は都市下水処理場の活性汚泥内に年間を通して安定的に一定割合存在することがわかっている (Kindaichi *et al.* FEMS Microbiol. Ecol. 2016)。CPR 細菌群は下水中有機物や活性汚泥の菌体由来有機物を利用して増殖していると考えられるが、活性汚泥内での存在割合を上回る集積培養系はこれまでに実験室で再現できていない。

CPR 細菌群の培養が困難である具体的な理由 (仮説) として以下のことが考えられる。

- (a) CPR 細菌群の定量的・視覚的な把握ができていない (ゲノム解析による推定のみ)。
- (b) CPR 細菌群の培養条件 (培地組成や環境条件) が発見されていない。
- (c) 従来の分離培養方法では、原理的に獲得が不可能または時間がかかりすぎる。
- (d) 培養条件以外の増殖因子 (休眠・覚醒・シグナル物質・共生関係) が存在する。

したがって、CPR 細菌群の培養が鍵となり、微小テクノロジーを活用することで新しい微生物反応場 (微生物間相互作用) が創出でき、従来法 (希釈法や平板培養法) とは一線を画する新規コンセプトに基づく分離培養法を適用することで、CPR 細菌群の代謝機能の解明と分離培養が達成可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は活性汚泥から高頻度で検出される CPR 細菌群である TM7 (*Saccharibacteria*) 門、SR1 (*Asconditabacteria*) 門、BD1-5 (*Gracilibacteria*) 門、OD1 (*Parcubacteria*) 門を対象とし、CPR 細菌群の代謝機能と下水処理プロセス内での生態学的役割を解明し、集積培養系の確立および分離培養を試みることを目的とする。具体的には①活性汚泥中の CPR 細菌群の存在量・細胞形状の把握、メタゲノム解析による代謝機能の推定を行い、②MAR-FISH 法により CPR 細菌群が増殖可能な有機物を特定し、理想的な培養条件を把握する。③これまでに実績のある高濃度微生物保持バイオリアクターを用いて CPR 細菌群の集積培養を行う。④微小テクノロジーを活用した新規微生物反応場 (微生物間相互作用) に基づく分離培養手法を適用する。

## 3. 研究の方法

### 研究項目① CPR 細菌群の代謝機能・存在量・細胞表面形態の解析

CPR 細菌群が存在する活性汚泥から DNA を抽出し、メタゲノム解析を行う。メタゲノムのカバレッジ (重複解読率) の違いを利用したベニング (読まれた塩基配列を細菌種ごとのクラスターに分類する) することで視覚的に CPR 細菌群のゲノム構築が可能となる。メタゲノム解析に平行して CPR 細菌群に特異的な FISH (蛍光 *in situ* hybridization) プローブを用いて CPR 細菌群の細胞の大きさ、形状 (球菌・桿菌・糸状菌)、他細菌との共存関係などを詳細に観察する。特に細胞の形状および他細菌との共存関係は研究項目④のセルソーターによる生きたままの分離に不可欠な情報となる。

### 研究項目② CPR 細菌群の増殖可能な有機物の特定

MAR-FISH 法は目的微生物の FISH 法による特異的検出・同定と同時に、放射性同位体元素標識の基質をトレーサーとしたマイクロオートラジオグラフィ (MAR) により、目的微生物の基質利用特性を把握できる手法である。放射性同位元素の取り込みは高感度で測定できるために培養時間は 3 時間程度でよく、培養期間中の細菌叢の変化なしで、CPR 細菌群の有機物利用特性が把握できる。本研究では入手可能な各種単糖類、低分子有機酸、アミノ酸、脂肪酸等の放射性標識基質を用い、好気・嫌気条件および温度や有機物濃度を変化させた条件下で MAR-FISH 法を行う。CPR 細菌群の利用可能な有機物が決定した後、活性汚泥を採取した処理場の水質データ (温度、pH、活性汚泥濃度、溶存酸素濃度) から最適集積培養条件を決めるための回分試験を行う。この時、一定期間培養後に各 CPR 細菌群に特異的なプライマーセットを用いて定量 PCR 法を行い、CPR 細菌群の培養前後での増殖量および構成比を評価する。

### 研究項目③ CPR 細菌群の高濃度集積培養

研究項目②で決定した最適培養条件にて連続式バイオリアクターにより CPR 細菌群の高濃度集積培養を行う。CPR 細菌群の培養が難しい理由として、流入基質濃度が高いと他細菌が優占化することが予想される。このため、低濃度基質の高流量連続供給でバイオリアクターを 2 年半運転する。高流量供給で CPR 細菌群がウォッシュアウトしないように膜を用いたメンブレンバイオリアクターにて培養を行う。CPR 細菌群が生物膜やグラニュールを形成する場合は、微生物の高濃度保持が可能な不織布・スポンジを担体としたカラムリアクターを用いる。CPR 細菌群の優占度は FISH 法により適宜観察する。

#### 研究項目④ 新しいコンセプトに基づく分離培養

活性汚泥から CPR 細菌群を選択的に分離する。活性汚泥をセルソーターに供試し、2 種類の散乱光（大きさと複雑さの指標）の強度比に基づいて分画し、細胞の形態学的な特徴に基づいて CPR 細菌群を選択的に分離する。その際、FISH 解析を各分画に対して行い、CPR 細菌群だけを含む分画（エリア）を導き出す。その後、分離した CPR 細菌群を増殖させるために、セルソーターによって 1 細胞（または任意の細胞数）ずつ、液体培地や平板培地などに植菌し、培養を試みる。この時、研究項目②で明らかとなる基質特異性に基づいて複数の培地組成をデザインする。

増殖を開始しない微生物を培養化する新手法を適用する。多数の微小ゲル粒子（1 細胞ずつ封入）が油相中に凝集した状態を意図的に作り出し、従来法の 1 万倍以上の植菌密度が実現する。CPR 細菌群はゲル粒子内で独立しているが、培養開始時から他細菌との微生物相互作用が促進され、従来法では増殖を開始しない微生物の培養化が期待できる。

#### 4. 研究成果

広島県内の都市下水処理場で採取した活性汚泥をサンプルとした。DNA は Fast DNA SPIN Kit for Soil を用いてサンプルから抽出した。Illumina 社の MiSeq によって解析されたアンプリコンシーケンスを用いて *Patescibacteria* の存在量の推定を行ない、相対存在率 0.1% 以上の OTU を対象にピアソン解析で相関関係を推測した。Illumina 社の HiSeq X および、Pacific Biosciences 社の PacBio Sequel II によって DNA 断片から解析された塩基配列データを用いてメタゲノム解析を行った。メタゲノム解析は、生データに対してトリミングを行った後、アセンブル、ビニングを行い、ゲノムを再構築した。再構築したゲノムはクオリティチェックとアノテーションを行った。

アンプリコンシーケンス解析の結果、活性汚泥内には *Patescibacteria* が約 13~14% 存在しており、7 つの系統を確認できたがそのほとんどを *Saccharimonadia*、*Parcubacteria*、*Gracilibacteria* の 3 つが占めていた（図 1）。*Saccharimonadia* はサンプル 1、2 のどちらでも約 10% 存在しており、非常に高い割合で存在していた。16S rRNA 遺伝子による細菌の相関解析の結果、優占していた *Saccharimonadia* が、*Parcubacteria* と *Gracilibacteria* に属する OTU と同じ挙動をとっていた。また、最も優占していた *Thermoanaerobaculaceae* も前述の OTU3 つと同じ挙動をとっており、正の相関を示していたことから、*Patescibacteria* との関係性が示唆された（表 1）。

メタゲノム解析の結果、*Saccharimonadia*、*Parcubacteria*、*Gracilibacteria* のゲノムを再構築した（表 2）。16S rRNA 遺伝子から HHAS1、HHAS9、HHAS10 はサンプル 2 で優占していた糸状性の *Saccharimonadia* および相関のある *Parcubacteria* と *Gracilibacteria* と非常に近縁であり、同一の種である可能性が高いことが確認できた。HHAS1 は好気環境下で N-acetylglucosamine を取り込むことが予想される。また HHAS9 が Chitinase、*Thermoanaerobaculaceae* が beta-N-hexosamidase を持つことがゲノムから確認されたことから Chitin を起点とする有機物の分解フローが解明できた。このことは、糸状性の *Saccharimonadia* が N-acetylglucosamine を取り込むことができる状態にあり、優占化した可能性を示している。

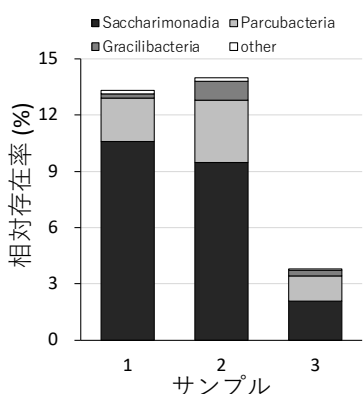


図 1 *Patescibacteria* の存在割合

表 1 OTU の相関関係

OTU taxonomy	Thermoanaerobaculaceae	
	r値	p値
Saccharimonadia	0.9985	0.0351
Parcubacteria	0.9988	0.0307
Gracilibacteria	0.9999	0.0111

表 2 再構築した *Patescibacteria* のゲノム

ID	Taxonomy	Completeness (%)	Contamination (%)	No.contigs	Bin size (Mbp)
HHAS1	<i>Saccharimonadia</i>	88.4	0	3	0.91
HHAS2	<i>Saccharimonadia</i>	97.7	0	3	0.83
HHAS3	<i>Saccharimonadia</i>	93.0	0	2	1.00
HHAS4	<i>Saccharimonadia</i>	90.7	0	3	0.73
HHAS5	<i>Saccharimonadia</i>	88.4	0	6	0.71
HHAS6	<i>Parcubacteria</i>	90.7	0	8	0.53
HHAS7	<i>Parcubacteria</i>	62.8	0	2	0.60
HHAS8	<i>Parcubacteria</i>	90.7	0	5	0.60
HHAS9	<i>Parcubacteria</i>	79.1	0	6	0.96
HHAS10	<i>Gracilibacteria</i>	97.7	0	3	1.30

次にメタゲノム解析によって回収された *Gracilibacteria* に着目し、FISH 法による可視化を試みた。*Gracilibacteria* を検出するために新たに 2 つのプロープ GRA665 と GRA686 を設計した。プロープの設計には ARB を使用し、設計したプロープの評価には mathFISH を使用した。FISH 観察には、LSM700 共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

GRA665 と GRA686 でハイブリダイズした細胞は、直径 0.5 μm 以下の小さな球菌（図 2A、赤色）は、細菌特異的プロープである EUBmix でもハイブリダイズした（図 2B）。したがって、GRA665 と GRA686 に陽性の細胞は *Gracilibacteria* であると判断した。*Gracilibacteria* は、EUBmix プロープ（青色）とハイブリダイズする密集したクラスターを持つ桿菌の細胞に、密集する形で存在していた（図 2B）。これらの桿菌は、*Zoogloea* 標的プロープ ZOO834 とハイブリダイズした（図 2C、緑色）。したがって、GRA665/GRA686 と ZOO834 プロープの組み合わせから、ほとんどの *Gracilibacteria* 細胞が *Zoogloea* の密集したクラスターにあることが観察された（図 2C）。

活性汚泥フロックにおいて、*Gracilibacteria* の有無における *Zoogloea* の蛍光輝度の変化を測定した (図 3)。*Zoogloea* 細胞の輝度値は、ImageJ を使用して 8-bit グレースケールに変換後、定量した。*Zoogloea* の輝度値の平均値の差の検定は、R を使用して student の t 検定を行った。GRA665/GRA686 プローブを用いて FISH 観察をしたところ、*Gracilibacteria* が密接に結合している *Zoogloea* 細胞の平均蛍光輝度は、*Gracilibacteria* が結合していない細胞よりも有意に低かった ( $p < 0.05$ )。

メタゲノム解析の結果、*Gracilibacteria* は IV 型線毛様遺伝子を保有しており、線毛を介して宿主への付着および、特異的認識をおこなっている可能性が示唆された。また、ComEC 遺伝子を保有しており、IV 型線毛と共役して DNA 取り込みをおこなっている可能性がある。*Zoogloea* は EPS の生成と分泌、PHA 蓄積、脱窒、硫黄代謝、グリコーゲン蓄積の多くの機能遺伝子を保有しており、汚泥内での物質循環やフロック形成に寄与していると考えられる。FISH 観察の結果も考慮すると、*Gracilibacteria* が *Zoogloea* の増殖阻害等を引き起こすことで、活性汚泥フロックの性状変化に関与する可能性が考えられた。本研究で得られた成果により、*Zoogloea* との共培養について検討することが重要であると考えられる。もし、*Gracilibacteria* の増殖に *Zoogloea* との共生関係が必要であれば、研究項目③のバイオリアクターによる集積培養を経ずとも研究項目④の分離培養が達成できると考えられる。

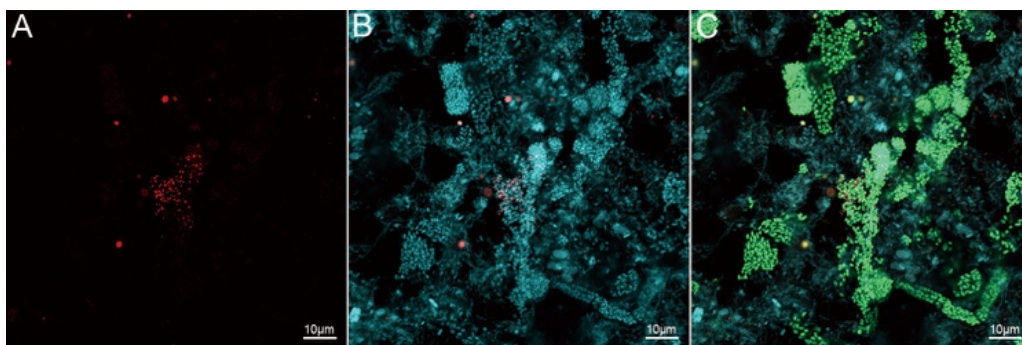


図 2 同一視野での FISH 観察画像

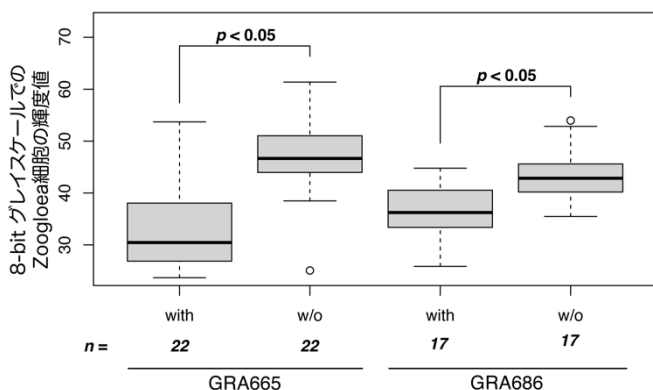


図 3 FISH 画像の輝度値の定量結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujii Naoki, Kuroda Kyohei, Narihiro Takashi, Aoi Yoshiteru, Ozaki Noriatsu, Ohashi Akiyoshi, Kindaichi Tomonori	4. 巻 37
2. 論文標題 Metabolic Potential of the Superphylum Patescibacteria Reconstructed from Activated Sludge Samples from a Municipal Wastewater Treatment Plant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME22012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/j sme2.ME22012	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 Hosokawa Suguru, Kuroda Kyohei, Narihiro Takashi, Aoi Yoshiteru, Ozaki Noriatsu, Ohashi Akiyoshi, Kindaichi Tomonori	4. 巻 13
2. 論文標題 Cometabolism of the Superphylum Patescibacteria with Anammox Bacteria in a Long-Term Freshwater Anammox Column Reactor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 208 ~ 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/w13020208	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤井 直樹, 尾崎 則篤, 大橋 晶良, 金田一 智規
2. 発表標題 活性汚泥に存在する未培養細菌Patescibacteriaと宿主との関係
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Naoki Fujii, Kyohei Kuroda, Takashi Narihiro, Yoshiteru Aoi, Noriatsu Ozaki, Akiyoshi Ohashi, Tomonori Kindaichi
2. 発表標題 Biological Characteristics of the Superphylum Patescibacteria Stably Present in Activated Sludge.
3. 学会等名 12th Asian Symposium on Microbial Ecology ASME 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 直樹, 青井 謙輝, 大橋 晶良, 金田一 智規
2. 発表標題 活性汚泥内に優占する未培養細菌の宿主特定の試み
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 直樹, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良
2. 発表標題 活性汚泥内に存在するPatescibacteriaのFISH法を用いた特異的検出
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金田一 智規, 藤井 直樹
2. 発表標題 活性汚泥内に存在する微生物ダークマターPatescibacteriaの生態学的役割
3. 学会等名 第29回衛生工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 直樹, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 金田一 智規
2. 発表標題 未培養細菌門の活性汚泥内での役割を塩基配列から推測する
3. 学会等名 第59回下水道研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 直樹, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 金田一 智規, 青井 謙輝, 成廣 隆, 黒田 恭平
2. 発表標題 活性汚泥内に安定的に存在する未培養細菌群の多様性とその代謝特性
3. 学会等名 第74回土木学会中国支部研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井直樹, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 金田一 智規, 青井 義輝, 成廣 隆, 黒田 恭平
2. 発表標題 活性汚泥内で定常的に存在するPatescibacteriaの生物学的特徴
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 直樹, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 金田一 智規
2. 発表標題 活性汚泥内に存在するPatescibacteriaの代謝特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井直樹, 尾崎則篤, 大橋晶良, 金田一智規
2. 発表標題 活性汚泥内に存在するPatescibacteria のメタゲノム解析
3. 学会等名 第24回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 直樹, 大橋 晶良, 尾崎 則篤, 金田一 智規
2. 発表標題 下水処理場の活性汚泥内に存在するPatescibacteria門のメタゲノム解析
3. 学会等名 第73回土木学会中国支部研究発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 青柳秀紀 (藤井直樹・金田一智規 分担執筆, 青井 議輝 分担執筆)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 263
3. 書名 未培養微生物研究の最新動向	

〔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	青井 議輝  (Aoi Yoshiteru)  (40386636)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授   (15401)	

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