

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05225

研究課題名(和文) 微生物叢を用いたバイオプロセスにおける各微生物の比増殖速度への環境因子の影響

研究課題名(英文) Effects of environmental factors on specific growth rates of individual microorganisms in bioprocess using microbial consortia

研究代表者

鈴木 市郎 (Suzuki, Ichiro)

横浜国立大学・大学院工学研究院・特別研究教員

研究者番号：90303081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、複数の微生物からなる微生物複合系(マイクロバイオーム)の研究が急速に進展している。本研究は、従来の正常な微生物叢と異常な微生物叢との比較に基づく疫学・統計学的マイクロバイオーム解析手法とは異なる、微生物叢の時系列での変遷を速度論的に捉える新しいマイクロバイオーム解析手法の確立を目的とした。硝化細菌叢によるアンモニア除去プロセスにおける各細菌の増殖への培養温度の影響を対象として解析し、個々の細菌の指数増殖期の開始期・終了期および比増殖速度を簡便に取得する手法を構築した。この解析手法により、硝化細菌叢中の個々の硝化細菌の増殖への培養温度などの影響を速度論的に検証することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性汚泥を使った廃水処理や伝統的発酵食品生産など、微生物複合系が関与するバイオプロセスの効率化に、マイクロバイオーム研究の利用が期待されている。しかし従来のマイクロバイオーム研究法は、健常者と疾病患者との微生物叢の比較など多量の検体を必要とする疫学・統計学手法であり、上記のバイオプロセスにおける時々刻々と変化する微生物叢の解析には必ずしも適していない。本研究成果は産業利用されている微生物複合系を用いたバイオプロセスにおいて、純粋培養でのバイオプロセスの解析と同様に各細菌の比増殖速度と物質生産などとの関係を速度論的に解析する新しい手法を提供し、効率化、高機能化に寄与することが可能である。

研究成果の概要(英文)：Recently, researches on microbial consortia consisted of diverse microorganisms (microbiomes) has advanced. The aim of this study is to establish a novel microbiome analysis method to assess the temporal population changes of microbial consortia in a kinetic manner, distinct from conventional method based on epidemiology and statistics by comparing microbiome compositions between normal and abnormal samples. The study was carried out by focusing on the impact of cultivation temperature on the growth of each bacterium involved in ammonia removal process, and a novel method was constructed to easily obtain three growth parameters, the start and end periods of the exponential growth phase and specific growth rate, of each bacterium involved in the nitrifying process. This method enables us to evaluate the effects of the environmental factors on the growth of each bacterium within the bacterial consortia in a kinetic manner.

研究分野：バイオプロセス工学

キーワード：マイクロバイオーム 時系列データ解析 比増殖速度 硝化細菌 16Sアンプリコン

1. 研究開始当初の背景

多様な微生物から構成される微生物叢を用いたバイオプロセスは、伝統的発酵食品生産だけでなく、廃水処理や環境浄化、エネルギー生産などに利用されてきた。近年、次世代シーケンス(NGS)の普及により、ヒト・マイクロバイオームをはじめとする微生物叢解析技術が飛躍的に発展し、微生物叢を用いたバイオプロセスにおいても微生物の組成やその増減を知ることができるようになった。しかし、NGS 解析から得られるマイクロバイオームの情報は膨大であり、その中からバイオプロセスの制御に必要な情報を効率よく取り出したり、バイオプロセスに重要な役割を持つ微生物を効率よく特定するための、簡便な方法がまだ示されていないのが現状であった。従来のマイクロバイオーム解析法は医療分野で疾病患者と健常者の多数の検体を比較する疫学・統計学的解析手法であり、廃水処理などのバイオプロセスから時系列的に連続して採取したサンプルにおける微生物叢の変化の解析には必ずしも適していない。

研究代表者らが独自に開発したマイクロバイオーム動態解析法は、細菌叢を用いたバイオプロセスにおいて、細菌叢の NGS データから個々の細菌の増減のパターン(動態)を比較して類似する動態を示す細菌群をクラスタリングし、その動態を各細菌の増殖曲線のように片対数グラフ上に可視化することで、バイオプロセスにおける培養温度や汚染物質の分解などと関連する増殖を示す細菌群を分かりやすく選抜することを可能とする手法である[1]。この手法では、細菌叢内で多数を占める優占種だけでなく、全体の 0.1%にも満たない希少種の細菌まで、その動態を見分けることができる。これまでに、培養期間全体を俯瞰しての増殖のピークの解析、例えば、トリクロロエチレン等の有機塩素化合物の嫌氣的脱塩素化を行う *Dehalococcoides* 属細菌の異なる株の優占度の順位が培養温度により変わる、という現象の発見[2]などに、本解析法が有用であることが分かっている。しかし、微生物叢を用いたバイオプロセスをより効率よく機能させるためには、微生物叢に含まれる各微生物の増殖の速度論的解析が不可欠である。例えば上述の *Dehalococcoides* の例でも、各株の比増殖速度と温度との関係を求めることで、観察された現象をより深く考察できる。これまでの研究では、各微生物の指数増殖期における比増殖速度を求めるような短期間での細かいデータ解析は、行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、上述したマイクロバイオーム動態解析法をもとに、様々な微生物を含む「微生物叢」を用いたバイオプロセスにおいて、培養温度などの環境因子の違いが個々の細菌の指数増殖期における比増殖速度などに与える影響を簡便かつ詳細に解析し、微生物叢を用いたバイオプロセスの高機能化・高度化に活用する新しい手法を確立することを目的とした。従来のマイクロバイオーム解析法が疫学的・統計学的であるのに対し、本研究で確立を目指す解析法は工学的・速度論的手法であることを特徴としている。研究対象とするバイオプロセスとして硝化細菌を含む細菌叢によるアンモニアの硝化プロセスを用い、環境因子として培養温度の異なる培養における個々の細菌の比増殖速度などへの影響を簡便に解析する手法の構築を行った。

3. 研究の方法

(1) 硝化細菌叢の培養

植種原として市販の鑑賞魚用硝化細菌添加剤(ナガオ)を用い、20 ppm のアンモニア態窒素($\text{NH}_4^+\text{-N}$)を含む人工廃水培地[3]に硝化細菌叢を加えて 25 °C で 1 週間培養した。これを前培養として新たな培地に植菌し、異なる培養温度で本培養を行った(n=3)。24 時間毎に採取した培養液中のアンモニア(NH_4^+)、亜硝酸(NO_2^-)、硝酸(NO_3^-)イオン濃度を測定するとともに、DNA を抽出(Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2, 日鉄環境)して全細菌 16S rRNA 遺伝子とアンモニア酸化細菌(AOB)のアンモニア酸化酵素遺伝子 *amoA* の濃度を定量 PCR で測定した。

(2) 細菌叢の時系列データ解析

各培養液サンプルより抽出した DNA より全細菌 16S rRNA 遺伝子の V4 領域をユニバーサルプライマー-515F と 806R [4]で増幅し(16S rRNA 遺伝子アンプリコン)、Illumina MiSeq でその塩基配列を解読した。得られた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンの各配列を微生物群集構造解析ソフト Qiime (v1.9.1)の uclust および簡易分類データベース greengenes 13_8_99 を用いて細菌の種(Species)レベルで分類し(以下、operational taxonomic unit; OTU と呼ぶ)、各温度での培養における細菌叢組成の時系列データを得た。細菌叢に含まれる各 OTU のうち、培養期間中の半数以上の培養液サンプルで検出され且つ相対優占度(存在割合)が上位の OTUs を選抜し、各 OTU の時系列での増減の類似度を Morisita-Horn の重複度指数で比較してワード法による階層的クラスタリングを行った[1]。各 OTU の相対優占度に定量 PCR で求めた全細菌 16S rRNA 遺伝子濃度を乗じて各細菌の推定 rRNA 遺伝子濃度を算出し、クラスターごとに各 OTU の経時的な量的変化を増殖曲線としてグラフ化し可視化した。

(3) 増殖パラメータの導出

各クラスターで最大量を示した OTU の増殖曲線を基に指数増殖期の期間を定め、そのクラスター内の各 OTU について定めた期間での近似曲線から指数増殖期の比増殖速度 μ_m を求めた。また、この近似曲線と各 OTU の 16S rRNA 遺伝子濃度の最小値・最大値より、指数増殖期の始期と終期である遅延期 t_L と定常期 t_S の増殖パラメータを求めた。

4. 研究成果

(1) 硝化細菌叢の培養

硝化細菌の μ_m を求めるため、 NH_4^+ と NO_2^- の枯渇までに経時的に 4 点以上のサンプル採取が可能な培養条件を検討した。硝化細菌叢を 25 で 1 週間培養した前培養液 10 mL を新しい培地 100 mL に植種して 25 で 2 週間本培養を行うことで、硝化により 5 日目で NH_4^+ がほぼ NO_2^- に酸化され、10 日目でほぼ NO_3^- に酸化される結果が得られた(図 1)。1 日ごとに採取した培養液 1 mL から硝化細菌叢の DNA を抽出し、全細菌 16S rRNA 遺伝子と AOB-*amoA* 遺伝子の濃度を定量 PCR で測定した結果、AOB-*amoA* は 0-4 日目で指数的に増加していた。

同様に 15, 20, 30, 35, 40 での硝化細菌叢の培養を行った。硝化が見られなかった 40 以外の 5 段階の温度で NH_4^+ 、 NO_2^- の酸化速度および AOB-*amoA* の濃度変化を解析した結果、本研究に用いた硝化細菌叢の NH_4^+ 酸化速度および AOB-*amoA* の比増加速度(AOB の比増殖速度に該当)は、どちらも 15~30 の間で高い温度依存性を示した(図 2)。

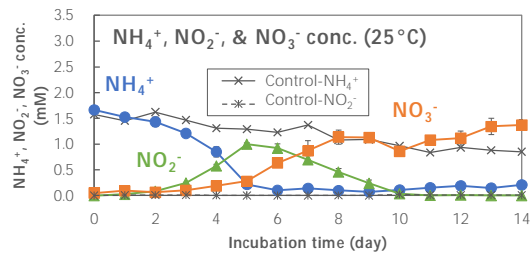


図 1. 25°C での硝化細菌叢の培養における NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 濃度の経時変化。

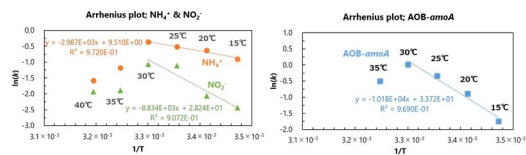


図 2. NH_4^+ 、 NO_2^- 酸化速度および AOB-*amoA* 比増加速度の温度依存性。

(2) 細菌叢の時系列データ解析と増殖パラメータの導出

硝化が見られなかった 40 以外の培養液サンプルから抽出した DNA から調製した 16S rRNA 遺伝子アンプリコンの塩基配列を NGS で解読し、培養中の時系列での細菌叢組成データを得た。このうち 25 での培養で得られた細菌叢組成の時系列データより相対優占度上位の 1,049 OTUs を選抜し、研究代表者らが開発したマイクロバイオーム動態解析法[1]を用い、個々の OTU の時系列での増減(増殖曲線)をその類似度に基づき 18 のクラスターに分割した。そのうち主な AOB は *Nitrosospira* を多く含む 3 クラスターと *Nitrosovibrio* を多く含む 2 クラスターに分けられた。またアンモニア酸化アーキア(AOA)として *Nitrososphaera* が 1 つのクラスターに存在した。NOB は *Nitrobacter* が 1 つのクラスターに存在した。

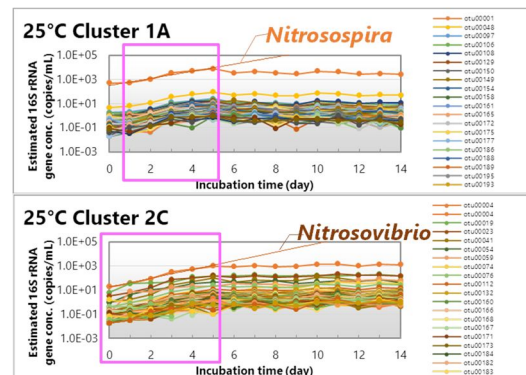


図 3. 25 での *Nitrosospira* を多数含むクラスター(1A)と *Nitrosovibrio* を多数含むクラスター(2C)の各 OTU の増殖曲線。

それぞれのクラスターの OTUs について 16S rRNA 遺伝子濃度を計算して増殖曲線を作成し、各クラスターで最大量の OTU を基準に、その指数増殖期の期間とその時の μ_m を求めた(図 3)。また作成した増殖曲線より、指数増殖期の始期(=遅延期 lag phase の終期) t_L と終期(=定常期 stationary phase の始期) t_S も各 OTU の増殖の比較、評価に必要なパラメータとして導出した。その結果、異なる AOB 同士、あるいは同じ AOB に分類されたものでもクラスターごとに、 μ_m だけでなく t_L や t_S にも違いがみられたことから、構築した手法により各細菌の増殖パラメータ μ_m 、 t_L 、 t_S を導出することで、各硝化細菌の増殖を特徴づけられることが示された。

(3) 異なる培養温度での増殖パラメータの比較

30 での培養で得られた細菌叢組成の時系列データについても同様に各 OTU の増殖パラメータの導出を行った。25、30 とともに最も多い *Nitrosospira*、*Nitrosovibrio* はそれぞれ別のクラスターを構成しており、25 と比較して 30 では、 μ_m はどちらのクラスターも大きくなり、 t_L 、 t_S はどちらのクラスターも減少していた(図 4)。従って、細菌叢に含まれる硝化細菌群は、培養温度の上昇による増殖への影響が個々の OTU でバラバラに生じるのではなく、集団全体

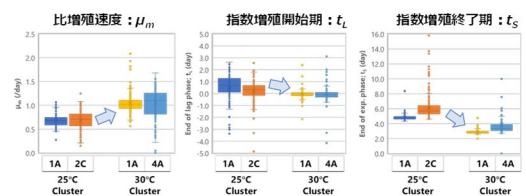


図 4. 25, 30 での *Nitrosospira*、*Nitrosovibrio* を多数含むクラスターにおける増殖パラメータの比較。

が同じ傾向で影響を受けることが判明した。

以上の結果より、本研究で構築したマイクロバイーム時系列データの速度論的評価法により、細菌叢に含まれる個々の細菌の増殖に対する環境因子の影響を速度論的に評価する、簡便な手法を構築することができた。他の培養温度における各硝化細菌 OTU の増殖への影響についても本研究で構築した手法を用いて同様に解析することで、細菌叢に含まれる個々の硝化細菌が有する増殖の温度依存性を、簡便に、速度論的に評価することが可能となった。

<引用文献>

- [1] 鈴木市郎 (2019) "マイクロバイームの利用と理解." *環境バイオテクノロジー学会誌*, **19**:13-19.
- [2] Yamazaki, Y., *et al.* (2020) "Effect of elevated temperature on *cis*-1, 2-dichloroethene dechlorination and microbial community structure in contaminated soils-A biostimulation approach." *J. Environ. Chem. Eng.*, **8**:103682. doi: 10.1016/j.jece.2020.103682
- [3] 中村 裕紀, 藤田 正憲 (1997) "無機アンモニア合成廃水で馴養した固定化担体内微生物の消長と硝化性能に関する研究." *水環境学会誌*, **20**:597-603. doi: 10.2965/jswe.20.597
- [4] Caporaso, J. G. *et al.* (2010) "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(supplement_1):4516-4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀池光
2. 発表標題 硝化細菌叢の時系列データ解析による各細菌の比増殖速度の導出
3. 学会等名 日本生物工学会東日本支部第17回学生発表討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀池光、長崎あゆ音、矢部桃子、鈴木市郎、武田穰
2. 発表標題 硝化細菌叢の時系列データ解析による各細菌の比増殖速度の導出
3. 学会等名 日本水処理生物学会第58回大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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