

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04317

研究課題名(和文) 新たな実験モデル構築による嫌気性廃水処理システム活性化を担う嫌気性原虫の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of anaerobic ciliates responsible for the activation of anaerobic wastewater treatment systems by building a new experimental model.

研究代表者

塩浜 康雄 (Shiohama, Yasuo)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40715017

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)：嫌気性廃水処理システムとは、廃水に含まれる有機物を無酸素環境下で嫌気性細菌やメタン菌の働きによりメタンガスと炭酸ガスへ分解処理するシステムであり、省エネルギーで運用が可能であり、メタンガスを回収して燃料に使用できることから、持続可能な循環型社会へ適応可能な廃水処理システムとして注目されている。嫌気性廃水処理システムのメタンガス産生プロセスを担う嫌気性細菌やメタン菌に加えて、最近、嫌気性原虫も重要な役割を担うことが明らかとなってきた。本研究では、メタンガス産生プロセスの実験モデルを新たに構築して、嫌気性原虫が嫌気性廃水処理システムのメタンガス産生プロセスで果たす役割について詳細な解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果が基盤的データとなることで、メタン産生効率のより高い新たな嫌気性廃水処理システムの構築が期待される。また、本研究では亜熱帯に位置する沖縄県の下水(廃水)処理場嫌気槽の細菌叢メタゲノム解析を行うことから、亜熱帯地域の廃水処理に関わる嫌気性微生物の生態系が明らかとなり、こうした地域に適した嫌気性廃水処理システムの構築が期待される。これらのシステムが発展途上国における農業廃水処理等で広く運用できれば、廃水処理のみでなくエネルギー問題といった持続可能な開発目標(SDGs 6と7に対応)の課題解決への貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)：An anaerobic wastewater treatment system is a system that decomposes organic matter contained in wastewater into methane gas and carbon dioxide gas by the action of anaerobic bacteria and methanogens in an oxygen-free environment. It is attracting attention as a wastewater treatment system that can be adapted to a sustainable recycling-oriented society because it can be operated in an energy-efficient manner and methane gas can be recovered and used as fuel. In addition to anaerobic bacteria and methanogens, it has recently become clear that anaerobic protozoa also play an important role in the methane gas production process of anaerobic wastewater treatment systems. In this study, a new experimental model of the methane gas production process was constructed, and a detailed analysis of the role of anaerobic protozoa in the methane gas production process of anaerobic wastewater treatment systems was conducted.

研究分野：応用微生物学

キーワード：嫌気性繊毛虫 嫌気性微生物 嫌気性廃水(排水)処理 メタン生成 ゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嫌気性廃水処理システムとは、廃水に含まれる有機物を無酸素環境下での嫌気性細菌やメタン菌(古細菌)の働きにより、メタンガス(CH₄)と炭酸ガス(CO₂)へ分解処理(メタン発酵)するシステムである。従来の好気性排水処理システムと比較して、省エネルギーで運用が可能であることや、メタンガス(再生可能エネルギー)が回収可能という観点から注目されている(DJ Batstone. Current Opinion in Biotechnology 2014)。

近年、上昇流嫌気プランケット法(USAB法)をはじめとする処理システムの技術革新により、設備の小型化やメタンガス産生の効率化が行われている。その中で、嫌気性原虫(繊毛虫、アメーバおよび鞭毛虫)の存在する嫌気槽にメタンガス産生量の増加が見られることが分かってきた。このことから、今まで直接的に寄与しないと考えられていた嫌気性原虫もメタン発酵に重要な役割を果たすことが示唆された。現在、その役割としては大きく3つの仮説が提唱されている(P Prabhakaran. Renewable Energy 2016, Y Hirakata. Microbes Environ 2016)。

仮説

嫌気性原虫の細菌捕食による嫌気性細菌とメタン菌の多様性維持(細菌環境の維持)
嫌気性原虫内に共生するメタン菌(共生メタン菌)によるメタン産生(メタン発酵の場の提供)
嫌気性原虫の代謝産物による嫌気性細菌とメタン菌の活性化(メタン発酵の活性化)

しかし、これらの役割の解明は、メタン発酵が嫌気槽という複合的な環境下での現象であることによる解析の困難さ等から明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、実験室環境で培養樹立した嫌気性細菌、メタン菌および嫌気性繊毛虫を用いて新たにメタン発酵槽モデルを構築・利用して、仮説、の検証実験を行うことで嫌気性繊毛虫が実際の嫌気性廃水処理システムのメタン産生量を増加させるメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

初年度では、まず新規メタン発酵槽モデルの構築に使用する嫌気性細菌とメタン菌を選別するために、実際の下水(廃水)処理場より採取したサンプルの菌叢と嫌気ボトル(窒素・炭酸混合ガス充填バイアル瓶)を用いて継代培養したサンプルの菌叢を16S rRNA メタゲノム解析により明らかにする。継代培養サンプルが下水処理場採取サンプルに近い菌叢の場合は継代培養サンプルをメタン発酵槽モデル構築に用いる。また、継代培養サンプルと下水処理場採取サンプルの菌叢が大きく異なる場合は、複数の継代培養サンプルの混合培養により下水処理場採取サンプル菌叢を再現したものや、新たに下水処理場より採取したサンプルを直接使用して、最終的にメタン産生量の再現性が高い新規メタン発酵槽モデルを構築する。

次年度では、構築したメタン発酵槽モデルを用いて仮説 および仮説 の検証実験を行う。具体的には、まずメタン発酵槽モデルで「嫌気性繊毛虫が存在する場合」と「嫌気性繊毛虫が存在しない場合」のメタン産生量をガスクロマトグラフィーで定量解析して比較して、「嫌気性繊毛虫が存在する場合」でメタン産生量の増加が見られることを確認する(メタン発酵槽の再現性確認)。確認後、それぞれのメタン発酵槽モデルの嫌気性細菌およびメタン菌の菌叢を16S rRNA メタゲノム解析により同定して、嫌気性繊毛虫の存在による菌叢の変化とメタン産生量との関係を明らかにする。また、平行して同一の親株に由来する「共生メタン菌を保持する嫌気性繊毛虫」と「共生メタン菌を保持しない嫌気性繊毛虫」をそれぞれ用いて共生メタン菌によるメタン産生量を明らかにする。共生メタン菌によるメタン産生量は、新たに開発した嫌気性繊毛虫のセルソーター単離培養法を用いて検量線の作成ができるように一定数の嫌気性繊毛虫を嫌気ボトルへ採取・培養して、嫌気ボトル中のメタン産生量をガスクロマトグラフィーで定量解析することにより共生メタン菌単位あたりのメタン産生量を算出する。また、本実験に使用する共生メタン菌については未同定であるため、16S rRNA 遺伝子解析による系統樹作成および16SrRNA 遺伝子特異的配列を用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH解析)により同定する。

最終年度は、仮説 の嫌気性繊毛虫による代謝産物による嫌気性細菌とメタン菌の活性化を検証するために、嫌気性繊毛虫の mRNA シーケンス解析と嫌気性繊毛虫培養液の高速クロマトグラフィー(HPLC)解析を組み合わせを行い、嫌気性細菌とメタン菌の活性化に寄与する嫌気性繊毛虫の代謝産物(加水分解酵素や脂肪酸など)を同定する。

最終的に、仮説、の検証実験より得られた結果を総合的に考察して、嫌気性繊毛虫が嫌気性廃水処理システムのメタン産生量増加で果たすメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

初年度では、モデル構築を目指す実際のメタン発酵槽の細菌叢を明らかにするために、下水(廃水)処理場採取サンプルと嫌気ボトル(窒素・炭酸混合ガス充填バイアル瓶)継代培養サンプルの 16S rRNA メタゲノム解析を行い、97%相同性による OTU (Operational Taxonomic Units) 解析を実施した。また、嫌気性繊毛虫 GW7 株の共生メタン菌に加えて、共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* のメタゲノム解析により、その全ゲノムとコードされる遺伝子を明らかにした。これらの成果は多くの嫌気性微生物に関する研究へ活用できるように DDBJ データベースへ登録を行い、さらにオープンアクセスジャーナルでその詳細を報告した(Y Shiohama. *Microbiol Resour Announc* 2022)。

次年度では、初年度で明らかにした嫌気性繊毛虫の共生メタン菌に加えて、共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* の完全長ゲノムにコードされる遺伝子より、共生細菌が宿主嫌気性繊毛虫へ与える影響についてバイオデータベースならびにバイオインフォマティクスツールを用いて解析した。その結果、共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* のゲノム上にコードされる ATP/ADP translocase が構造的な健全性を保ち、酵素活性を有している可能性が高いことを明らかにした。また、共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* は ATP 合成オルガネラであるヒドロゲノソームに密着して存在していることや、そのジーン・レパートリーより糖やアミノ酸の発酵代謝、水素や低級脂肪酸等の利用も困難であることから、宿主嫌気性繊毛虫の ATP を搾取して生育している可能性が高いと考えられた。その一方で、抗生物質で共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* を除くと宿主嫌気性繊毛虫は生育できないことから、共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* は宿主嫌気性繊毛虫の生存に必須のなんらかの機能を担っていることが推測された。

最終年度では、初年度と次年度で得られた知見を基に、共生メタン菌および共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* の代謝経路に加え、共生メタン菌および共生細菌 *Ca. Hydrogenosomobacter endosymbioticus* が宿主嫌気性繊毛虫の生存や代謝に果たす役割について詳細な検証実験を行った。さらに、本研究の実施により、1.26Mb の Rickettsiales 目バクテリアのドラフトゲノムもアセンブルされた。本ゲノムに含まれる 16S rRNA 遺伝子による系統推定を行った結果、海洋性繊毛虫である *Euplotes octocarinatus* の細胞内共生体として報告されている *Candidatus Anadelfobacter* 属に最も近縁であることが明らかとなった。また、Rickettsiales 目バクテリアについて蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) に加えて超薄切片の電子顕微鏡観察を行った結果、細胞数は少ないものの、該当する原核細胞が宿主細胞の辺縁部に分布している事が確認できた。これらの結果より、本研究で用いた宿主嫌気性繊毛虫 GW7 株が 1 つのメタン生成アーキアと、2 つのバクテリアを共生体として保持する 3 つの原核共生体というより複雑な共生系を構築している事が新たに明らかになった。今後、本研究成果と合わせ、これらの研究成果をオープンアクセスジャーナルによる報告を予定している。

参考文献

1. Damien John Batstone et al. The role of anaerobic digestion in the emerging energy economy. *Curr Opin Biotechnol*, 2014.
2. Priya Prabhakaran et al. Community dynamics and significance of anaerobic protozoa during biomethanation of lignocellulosic waste. *Renewable Energy*, 2016.
3. Yuga Hirakata et al. Effects of Predation by Protists on Prokaryotic Community Function, Structure, and Diversity in Anaerobic Granular Sludge. *Microbes Environ*, 2016.
4. Yasuo Shiohama et al. Complete Genome Sequence of "*Candidatus Hydrogeosomobacter endosymbioticus*," an Intracellular Bacterial Symbiont of the Anaerobic Ciliate Scuticociliate GW7. *Microbiol Resour Announc*, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiohama Yasuo, Takeshita Kazutaka, Hirakata Yuga, Nobu Masaru K., Ito Michihiro, Shinzato Naoya	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of “Candidatus Hydrogeosomobacter endosymbioticus,” an Intracellular Bacterial Symbiont of the Anaerobic Ciliate Scuticociliate GW7	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 438-447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01150-21	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩浜 康雄、竹下 和貴、平片 悠河、延 優、伊藤 通浩、新里 尚也
2. 発表標題 嫌気性繊毛虫共生体Ca. Hydrogeosomobacter endosymbioticusのゲノム性状
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 塩浜 康雄、山崎 玲、森 祥太、伊藤 通浩、新里 尚也
2. 発表標題 フローサイトメトリーを用いたメタン生成菌共生嫌気性繊毛虫の検出と分取
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 塩浜 康雄、竹下 和貴、平片 悠河、延 優、伊藤 通浩、新里 尚也
2. 発表標題 嫌気性繊毛虫 Scuticociliate GW7 株のゲノム解析より示されたリケッチア様共生体
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

〔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	新里 尚也 (Shinzato Naoya) (00381252)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授 (18001)	

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