

微生物ダークマター*Patescibacteria* が 活性汚泥フロック内で共存する細菌を探る

広島大学 大学院先進理工系科学研究科 学生会員 ○藤井直樹
正会員 大橋晶良、尾崎則篤、金田一智規
広島大学 大学院統合生命科学研究科 青井議輝
産業技術総合研究所 成廣隆、黒田恭平

1. 目的

活性汚泥内には多種多様な細菌が存在している中で、広島県内の下水処理場には未培養細菌によって門レベルで構成されている *Patescibacteria* が安定的に存在することが分かっている。*Patescibacteria* は代謝能力が乏しく¹⁾、他の微生物の表面に寄生することで生命を保っていると考えられる²⁾。*Patescibacteria* と宿主の関係は片利共生³⁾である可能性もあることから、本研究では、*Patescibacteria* の相対存在割合と負の相関を示す細菌に注目し、相関解析と FISH 法による *Patescibacteria* の可視化、宿主の特定と代謝的相互作用の推測を行った。

2. 方法

広島県内の下水処理場から細菌構成比の異なる 7 つの活性汚泥サンプルを用意した。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 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスから QIIME 2⁴⁾を用いて細菌の存在量の推定を行なった。相対存在割合が 0.1%以上の ASV を対象にスピアマンの順位から相関係数を計算し、有意水準 5%を満たす負の相関係数を求めた。3 つの活性汚泥から抽出した DNA は、HiSeq X と PacBio Sequel を使用してシーケンシングを行った。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。メタゲノム解析から得た *Saccharimonadia*、*Gracilibacteria*、*Moranbacteria* の 16S rRNA 遺伝子を標的に、ARB を用いて FISH プローブ Sacch733、Graci665、Pac683m を設計した。ハイブリダイゼーション効率と最適ホルムアミド濃度は mathFISH を用いて推測した。Sacch733 は TM7905 と同時標識を行い、プローブの特異性を調査した。新たに設計した 3 つのプローブと、ALF1b、BET42a、GAM42a、CF319ab、ZOO834⁵⁾の同時標識を行い *Saccharimonadia*、*Gracilibacteria*、*Moranbacteria* が密着している細菌の調査を行った。また、メタゲノム解析の結果を用いて、*Gracilibacteria* と *Zoogloea* の代謝的相互作用を推測した。

3. 結果と考察

スピアマンの順位相関係数が負の値を持つ細菌に注目した結果、*Patescibacteria* は様々な細菌と負の相関を示した。その中でも、*Saccharimonadia* と *Gracilibacteria* は *Proteobacteria* と負の相関を示す傾向にあった。一方で、*Moranbacteria* は特定の細菌グループと負の相関を示さなかった。ここでは、*Gracilibacteria* と強い負の相関を示した細菌を表 1 に示す。ここで負の相関を示した細菌を参考に、*Patescibacteria* と同時標識するためのプローブを選定した。

表 1 *Gracilibacteria* と負の相関を示した細菌

Phylum/Order/Genus	r values
Gammaproteobacteria/Burkholderiales/	-0.93
Gammaproteobacteria/Burkholderiales/Zoogloea	-0.86
Bdellovibrionota/Bdellovibrionales/Bdellovibrio	-0.86
Myxococcota/Myxococcales/uncultured	-0.85
Gammaproteobacteria/Burkholderiales/B1-7BS	-0.81
Chloroflexi/Caldilineales/uncultured	-0.81
Gammaproteobacteria/Competibacterales/Candidatus_Competibacter	-0.80
Gammaproteobacteria/Burkholderiales/Sphaerotilus	-0.79
Bacteroidota/Flavobacteriales/NS9_marine_group	-0.79
Gammaproteobacteria/Burkholderiales/Zoogloea	-0.76

キーワード 活性汚泥、*Patescibacteria*、FISH 法、メタゲノム解析、寄生・共存関係
連絡先 〒739-8527 広島県東広島市鏡山 1-4-1 広島大学大学院先進理工系科学研究科 環境保全工学研究室
TEL 082-424-5718

ARB を用いてプローブの設計を行った結果、新たに 3 つのプローブを設計することができた。Sacch733 と TM7905 の同時染色を行った結果、2 つの蛍光が重なる $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の球菌を検出した。Graci665、Pac683m でも $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の球菌を検出した。新たに設計した 3 つのプローブは、FISH 観察においていずれも EUBmix、DAPI の両方で染色されており、細菌の菌体由来の蛍光であると考えられる。3 つのプローブで検出できた全ての菌体は、必ず他の細菌表面に密着していた。続いて、Sacch733、Graci665、Pac683m と ALF1b、BET42a、GAM42a、CF319ab との同時染色を行い、密着している細菌の区別を行った。観察の結果、Sacch733 は ALF1b で標識される桿菌に、Pac683m は BET42a で標識される直径 $2\ \mu\text{m}$ を超える比較的大きな球菌に、Graci665 は BET42a で標識されるグラニュールを形成する細菌に密集していた (図 1～図 3)。以上の結果から、*Patescibacteria* はそれぞれ異なる細菌に密着していることが分かった。*Gracilibacteria* が付着していた細菌は、BET42a で標識されることと、その形態的な特徴から *Zoogloea* であることが考えられたので、Graci665 と ZOO834 での同時標識を行った。FISH 観察の結果、ZOO834 で標識された菌体と Graci665 で標識された微小な菌体が密接に重なり合っていることを確認し、*Gracilibacteria* の宿主は *Zoogloea* であることが強く示唆された (図 3)。

メタゲノム解析の結果、*Gracilibacteria* には解糖系、ペントースリン経路、TCA 回路といった主要代謝経路が存在せず、アミノ酸、リン脂質、核酸の合成に関与する遺伝子も存在しなかったことから、菌体の合成に必要な物質を宿主に依存している可能性がある。また、IV 型線毛様遺伝子を保有しており、線毛を介して宿主に付着する可能性が示唆された。以上の特徴は *Patescibacteria* の既往の研究と一致する³⁾。また、PHA depolymerase も保有していた。再構築したゲノムから、*Zoogloea* は PHA 蓄積能を有しており、*Gracilibacteria* は *Zoogloea* が蓄積した PHA を利用する可能性がある。また、*Zoogloea* は脱室に関与する一連の遺伝子を保有しており、脱室菌であると考えられる。*Zoogloea* が分泌する EPS はフロック形成にも関与することから、*Gracilibacteria* が *Zoogloea* の増殖を阻害する場合、*Gracilibacteria* は排水処理にとって有用な細菌ではない可能性がある。

4. まとめ

活性汚泥内の *Saccharimonadia* は ALF1b で標識される桿菌に、*Moranbacteria* は BET42a で標識される直径 $2\ \mu\text{m}$ を超える比較的大きな球菌に、*Gracilibacteria* は *Zoogloea* に付着していることがわかった。特に、活性汚泥内での *Gracilibacteria* と *Zoogloea* の関係はこれまでに報告されておらず、新たな寄生関係を示唆するものである。今後は、*Saccharimonadia*、*Moranbacteria* が密着している細菌の特定、*Gracilibacteria* と *Zoogloea* の関係を明らかにするため、2 種の共培養系の確立を目指す。*Patescibacteria* が排水処理にとって有用な細菌か否かの知見を得ることができると考えられる。

参考文献

- 1) Fujii *et al.*, 2022. *Microbes Environ* 37: ME22012.
- 2) Kuroda *et al.*, 2022. *mBio* 13: e01711-22.
- 3) Moreira *et al.*, 2021. *Nat Commun* 12: 2454.
- 4) Bolyen *et al.* 2019 *Nat Biotechnol* 37: 852–857.
- 5) Oshiki *et al.*, 2008. *Water Sci Technol* 58:13–20.

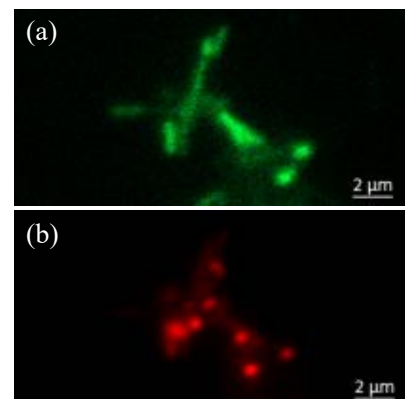


図 1 同一視野の ALF1b(a)と Sacch733(b)の FISH 画像

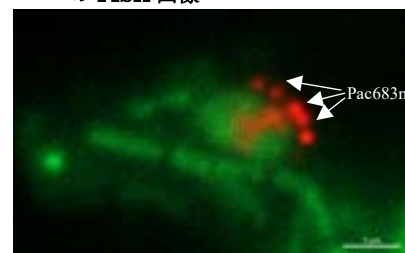


図 2 BET42a と Pac683m の FISH 画像

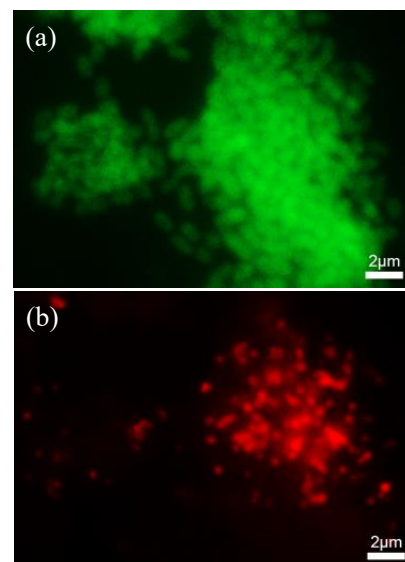


図 3 同一視野の ZOO834b(a)と Graci665(b)の FISH 画像