

アナモックス集積培養系に共存する従属栄養細菌の機能解析

広島大学 学生会員 ○細川 傑

広島大学 正会員 大橋 晶良

広島大学 正会員 尾崎 則篤

広島大学 正会員 金田一 智規

1. はじめに

現在、従来の硝化脱窒法に代わるアナモックスプロセスに注目が集まっている。アナモックスプロセスは、亜硝酸を電子受容体とし、アンモニアを酸化して窒素ガスを生成する反応であり、曝気のエネルギーが少なく済むことや、有機物質の添加の必要がないなどのメリットがある。しかし、アナモックス細菌の純粋培養株は得られておらず、共存する従属栄養細菌は何か、どのような代謝を行なっているかも不明のままである⁽¹⁾。

従来、微生物を解析するには、微生物を培養して増殖させる必要があった。しかしメタゲノム解析を行うことで、培養という過程を経ずとも環境中の微生物それぞれが持つ遺伝子群を網羅的に明らかにし、代謝や分類学的同定に関する有益な情報が得られるようになってきている⁽²⁾。そのため、メタゲノム解析を行うことでアナモックス細菌群全体の解析を行うことが可能であると考えた。

そこで本研究では、アナモックス集積培養系における細菌群のメタゲノム解析を行うことにより、共存する他の従属栄養細菌の分類および機能を明らかにすることを目的とする。

2. 実験方法

集積培養を行っているアナモックス細菌の一種である *Ca. Brocadia sinica* のリアクターから、6/27, 8/31, 9/19 の三日分のバイオマスを採取し、メタゲノム解析を行った。DNA 抽出には、FastDNA SPIN Kit for Soil を用いた。抽出された DNA は TruSeq DNA PCR Free[350]ライブラリーキット(イルミナ社)により 350bp に断片化され、HiSeqX(次世代シーケンサー)により両側から 150bp ずつ(ペアエンド 150bp)解析された。シーケンシングによって得られた rawdata を、fastp を用いたフィルタリングによって解析を行うにあたって不十分であるリードを除いた後、SPAdes によるアセンブルを行うことでコンティグを作成した。次に MaxBin2 を使用し、作成したコンティグを分類ごとに分割してまとめるビンニングを行なった。さらにそのビンニングの評価を CheckM によって行い、各ビンの完全性やビンに含まれる配列の汚染であるコンタミネーションを確認した。コンティグの最低の長さの設定値を変更しながら評価を行い、本研究では minimum length 5000 と設定したものを使用することとした。

本研究では、構成比の大きなビンターゲットとしてそれらの 16S rRNA 遺伝子を使用して系統樹を作成することで、近縁種より各ビンの機能を推定した。系統樹の作成には ARB を使用した。

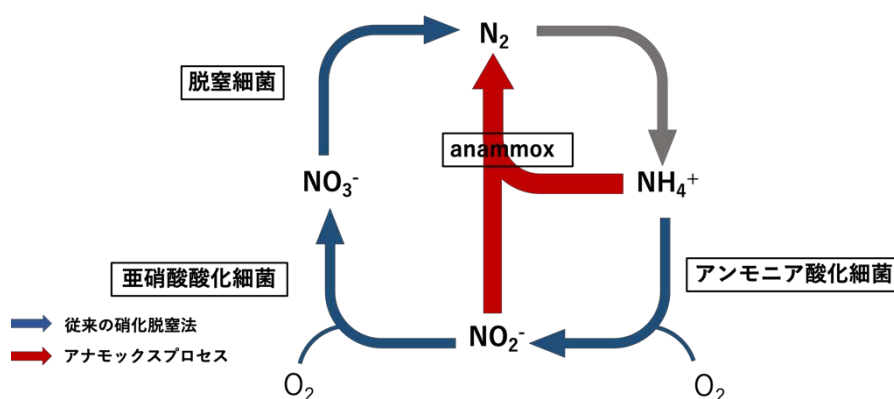


Fig.1 アナモックスプロセス

キーワード メタゲノム解析, アナモックス細菌, 窒素除去

連絡先 〒739-0046 広島県東広島市鏡山 1 丁目 3-2 広島大学工学研究科 A2-441 環境保全工学研究室
TEL080-1494-3143

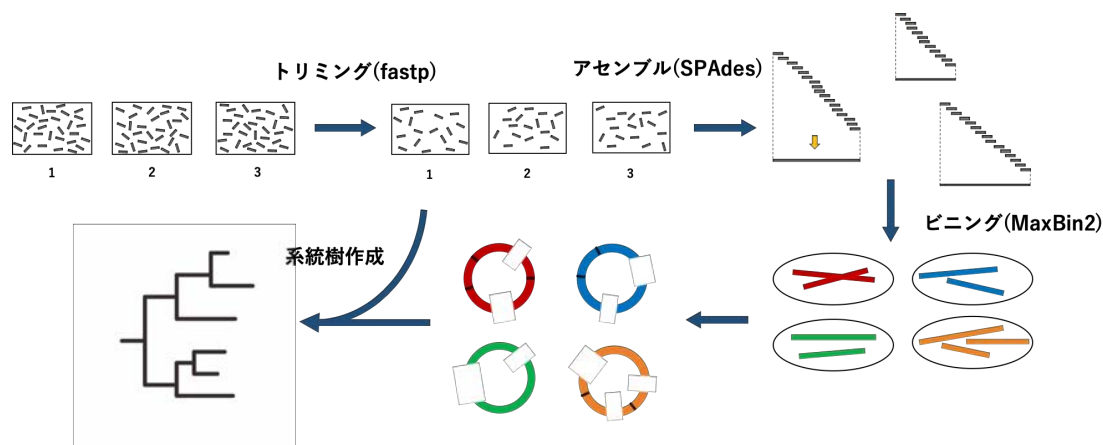


Fig.2 解析手順

3. 実験結果および考察

シーケンシングにより, 6/27, 8/31, 9/19 由来の rawdata が得られた. それぞれの total reads, GC 含量および Q30 base は, 252.1Mbp・57.4%・85.4%, 269.5Mbp・54.8%・86.9%, 237.4Mbp・50.1%・87.5% であった. GC 含量の差より, サンプルごとの微生物の存在比が異なっていることが考えられる.

fastp によって, クオリティの低いリード, 読み取ることができなかった塩基である N

を多く含むリード, 長さの短すぎるリードがフィルタリングされ, 2018/6/27, 2018/8/31, 2018/9/19 のサンプルの total reads と Q30 base はそれぞれ, 220.7M・90.7%, 241.9M・91.4%, 214.5M・91.7% となり, クオリティの高いリードの占める割合が大きくなった. これらに SPAdes を用いると, total length, Largest contig がそれぞれ 421.7Mbp・3.0Mbp のコンテイングを含む fasta ファイルとなった. さらに, このファイルから 5000bp 未満の配列を除き, ビニングを行うと 72 個のビンとなった. この 72 個のビンのうち, 6/27 において構成比の大きなビンに注目した. それらのビニングおよび CheckM の結果を Table1 に示した. 構成比や分類の他, コンタミネーションが存在するビンが複数存在していることがわかった. Bin2 は運転日数が経つにつれて構成比が大きくなっており, アナモックス細菌であると考えられる (Fig.3(左)). また, 各ビンとその近縁種の系統樹 (Fig.3(右)) から Bin2 は *Ca. Brocadia sinica* であることが確認できた. また, その他の各ビンの近縁種を推定した.

Table 1 ビニングおよび CheckM の結果

Bin Id	Taxonomy (contained)	Lineage: GC Completeness	Contamination	6.27構成比	8.31構成比	9.19構成比
HosoBro5000.001	k__Bacteria;p__Chloroflexi	56.3	80.91	2.18	22.52	8.12
HosoBro5000.002	k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__	40.5	97.8	1.71	14.64	38.69
HosoBro5000.003	k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__	53.3	87.59	0	13.03	17.92
HosoBro5000.004	k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__	53.3	95.39	0	12.37	1.72
HosoBro5000.005	k__Bacteria;p__Ignavibacteriae;c__	37.6	96.65	0	10.10	3.25
HosoBro5000.006	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__	65.9	65.94	1.01	5.53	16.96
HosoBro5000.007	k__Bacteria;p__Chloroflexi	56.3	98.18	0	5.21	1.92
HosoBro5000.008	k__Bacteria (root)	49.3	78.74	0	1.98	0.12
HosoBro5000.009	k__Bacteria	56	93.98	1.85	1.39	0.36
HosoBro5000.010	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__	64.9	91.01	1.5	1.26	0.51
HosoBro5000.012	k__Bacteria;p__Chloroflexi	56.3	95.45	5.45	1.09	0.37
HosoBro5000.011	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__	65.9	86.43	1.95	1.23	3.40
HosoBro5000.013	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__	62.5	97.46	2.23	0.89	0.30

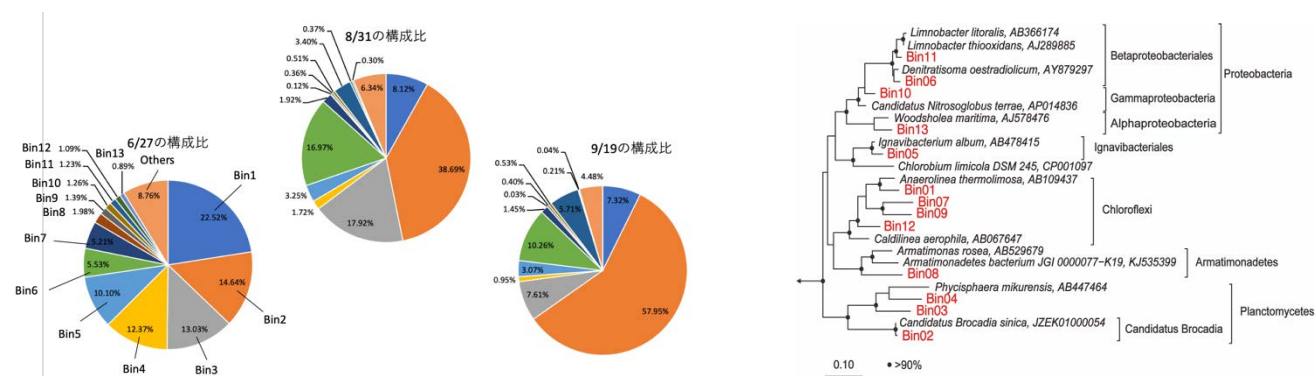


Fig.3 (左)ビニング後の細菌の構成比, (右)作成した系統樹

構成比の大きな細菌の窒素に関する物質のやり取りは Fig.4(左)のようであると推定した。 *Phycisphaera mikurensis* は亜硝酸を硝酸へ変換し、 *Candidatus Nitrosoglobus* はアンモニアを硝酸へ変換する。 このように、アナモックスプロセスを助けるような働きを行なっている *Phycisphaera mikurensis* や *Candidatus Nitrosoglobus* のような細菌が存在している一方で、窒素除去やアナモックスプロセスの面で、必要のない働きを行なっている細菌も存在した。 一方、構成比の大きな細菌のうち窒素代謝に関わらないものも存在しており、それらの特徴は Fig.4(右)のようであった。 これらの細菌は、アナモックス細菌の出すりポ多糖や、アナモックス細菌の死骸由来の糖を取り込むことで生存していると考えられる。

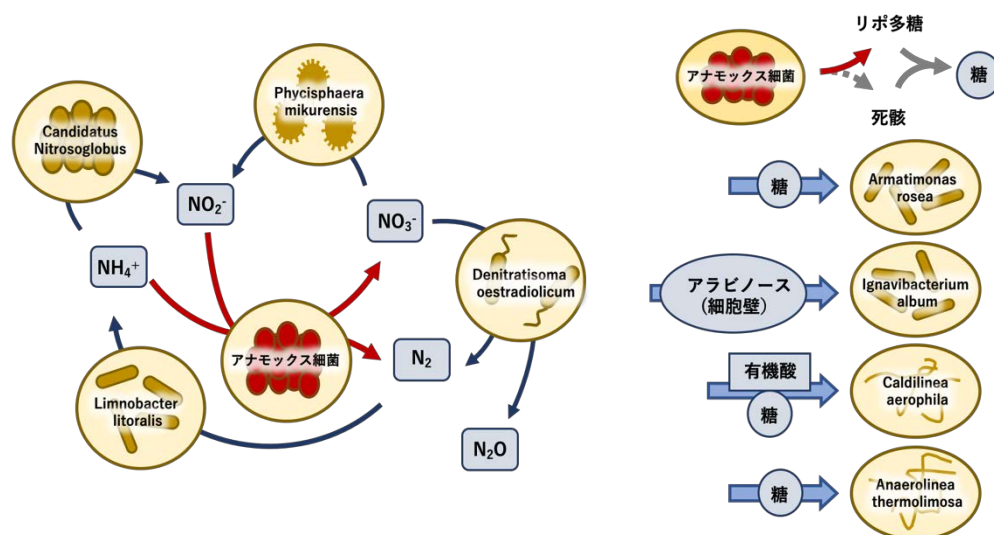


Fig.4 (左)細菌の窒素に関する物質のやり取り, (右)その他の細菌の特徴

4. 結論

アナモックス集積培養系には、およそ 70 種類の細菌が存在しており、その存在比は採取日により異なっていた。メタゲノム解析により、その構成比および分類を同定した。またアナモックス集積培養系において、アナモックス細菌の周囲に存在している細菌のうちの数種類は大きな割合で存在しており、さらにそのうちの数種類は窒素代謝に関わりを持ち、アナモックスプロセスと関連する代謝を行なっていることが考えられる。

5. 今後の課題

Table1 より、ビンにコンタミネーションが多く存在していることがわかるが、このコンタミネーションは、メタゲノム解析の結果に悪影響を及ぼす恐れがあるため、できる限り除く必要がある⁽³⁾。そのため、コンタミネーションである配列を感知するソフトや web サービスの検討が必要である。コンタミネーションを検出することができれば、その部分の配列を除き、評価を行うという工程を繰り返す必要がある。

参考文献

- 1) Tang, X., Guo, Y., Jiang, B. and Liu, S.: Metagenomic approaches to understanding bacterial communication during the anammox Reactor start-up, Water Research, 136, pp.95-103, 2018.
- 2) 松田知成：環境微生物学におけるビッグデータ, 水環境学会誌, 41, pp.65-67, 2018.
- 3) 孫建強, 清水謙多郎, 門田幸二：世代シーケンサーデータの解析手法第 5 回アセンブル、マッピング、そして QC, 日本乳酸菌学会, 26, 3, pp.193-201, 2015.