

## 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

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研究科 青井義輝  
 産業技術総合研究所 成廣隆、黒田恭平

### 1. 序論

現在、多くの下水処理場では活性汚泥法をはじめとする生物処理法による排水処理が行われている。活性汚泥は数千種以上の細菌を中心とした微生物によって構成されている。この細菌を中心とした微生物の働きによって下水処理場に流入した有機物や栄養塩類の除去が行われている。多種多様な細菌が存在する中で、本研究グループの予備調査によって活性汚泥内には未培養細菌によって門レベルで構成される *Patescibacteria*<sup>1)</sup>が一定の割合以上で安定的に存在することがわかった。*Patescibacteria* は他の細菌に依存し生命を保っているとされるが、その生態には不明な点が多い。この細菌群の他の細菌との相互作用や活性汚泥内の有機物・栄養塩の分解能力を見出すことが出来れば、微生物増殖メカニズム及び活性汚泥法の効率化につながると考えられる。そこで本研究では、活性汚泥内に存在する *Patescibacteria* の多様性と他の細菌との相関関係を 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスの結果を用いて調査した。また、*Patescibacteria* の代謝能力の推測をメタゲノム解析の結果を用いて行なった。

### 2. 方法

#### 2. 1 サンプル収集

以前サンプリングした広島県内の都市下水処理場で 2019 年 2 月 6 日、2020 年 4 月 13 日、2020 年 10 月 30 日、2020 年 11 月 25 日に採取した活性汚泥をサンプル 1、2、6、7 とした。また、4 月 13 日に採取した活性汚泥から 100 mL を滅菌したバイアル瓶に入れて気相部を窒素置換し、20°C で 3 日間静置したものをサンプル 3 とした。2020 年 10 月 30 日に採取した活性汚泥から 100 mL を、培養前の洗浄を行わずに 20°C で 3 日間好氣的に培養した。これを試料サンプル 4 とした。一方、2020 年 10 月 30 日に採取した活性汚泥から 100 mL を Elix 水 (Merck, Darmstadt, Germany) で洗浄した後、20°C で 3 日間静置培養した。これをサンプル 5 とした。

#### 2. 2 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析

サンプル 1、2、3、4、5、6、7 から Fast DNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) を用いて DNA を抽出した。Illumina 社の MiSeq (v.3; Illumina, San Diego, CA, USA) によって解析した 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスから、QIIME 2 core 2021.11<sup>5)</sup>を用いて *Saccharimonadia*, *Parcubacteria*, *Gracilibacteria* の存在量の推定を行なった。*Patescibacteria* と他の共存細菌との関係を明らかにするため、相対存在度が 0.1% 以上を示す操作的分類単位 (OTU) を抽出し、各 OTU についてピアソンの相関係数を算出した。5% の有意水準を満たし、*Patescibacteria* と相関のある OTU を調査した。

#### 2. 3 メタゲノム解析

サンプル 1、2、3 から Fast DNA SPIN Kit for Soil を用いて抽出した DNA を用いて、Illumina 社の HiSeq X (Illumina) でペアエンドシーケンシング (2×151 bp) を行なった。同様に Pacific Biosciences 社の PacBio Sequel CCS (Pacific Biosciences of California, Inc., Menlo Park, CA, USA) でシーケンシングを行なった。

キーワード 活性汚泥, *Patescibacteria*, *Chitinophagales*, メタゲノム解析, 相互作用, 脱窒

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

T E L 082-424-5718

シーケンシングによって得られた塩基配列データを用いてメタゲノム解析を行った。まず、HiSeq X の生データに対して Trimmomatic v.0.39 (Bolger *et al.*, 2014) でトリミングを行った。トリミング後の HiSeq X のデータと PacBio Sequel による CCS リードを用いて SPAdes v.3.13.1 (Bankevich *et al.*, 2012) でアセンブルを行なった。その後、アセンブルによって得られたコンティグを MetaBAT2.0 (Kang *et al.*, 2019) でビンニングを行った。得られたゲノムビンの Completeness 及び Contamination は CheckM v1.1.2 (Parks *et al.*, 2015) を用いて Brown *et al.* (2015) が用意した 43 個の *Patescibacteria* に特異的なマーカーセットにより評価した。また、再構築したゲノムビンは Prokka v1.13 (Seeman *et al.*, 2014)、KEGG Blast/KEGG Orthology And Links Annotation (BlastKOALA) (Kanehisa *et al.*, 2016) と DRAM v1.2.2 (Shaffer *et al.*, 2020) を用いてアノテーションを行なった。

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析

QIIME2 による菌叢解析の結果、AS202004 を除くすべての活性汚泥サンプルにおいて、*Proteobacteria*、*Bacteroidota* の次に *Patescibacteria* が優占しており、平均相対存在割合は 12.1% であった (図 1 左)。*Patescibacteria* の中で最も優占していたグループは、すべてのサンプルで *Saccharimonadia* であり、サンプル 4 の相対存在割合が最も高く、13.7% であった。*Parcubacteria* と *Gracilibacteria* は、それぞれ 2 番目と 3 番目に多いグループであった (図 1 右)。上記のグループに加えて *Patescibacteria* の他系統が存在したが、その相対存在割合は 0.2% 未満であった。未処理活性汚泥試料 (サンプル 1,2,6,7) の *Saccharimonadia*、*Parcubacteria*、*Gracilibacteria* の平均相対存在割合は 9.5%、3.5%、1.1% であり、処理試料 (サンプル 3,4,5) の平均相対存在割合は 5.5%、2.8%、0.6% であった。本研究で用いた処理は、*Saccharimonadia*、*Parcubacteria*、*Gracilibacteria* の平均相対存在割合の減少をもたらすこととなった。この減少は、共存する他の微生物の代謝産物による増殖促進効果など、微生物間の相互作用の結果であると考えられるが詳細は不明である。

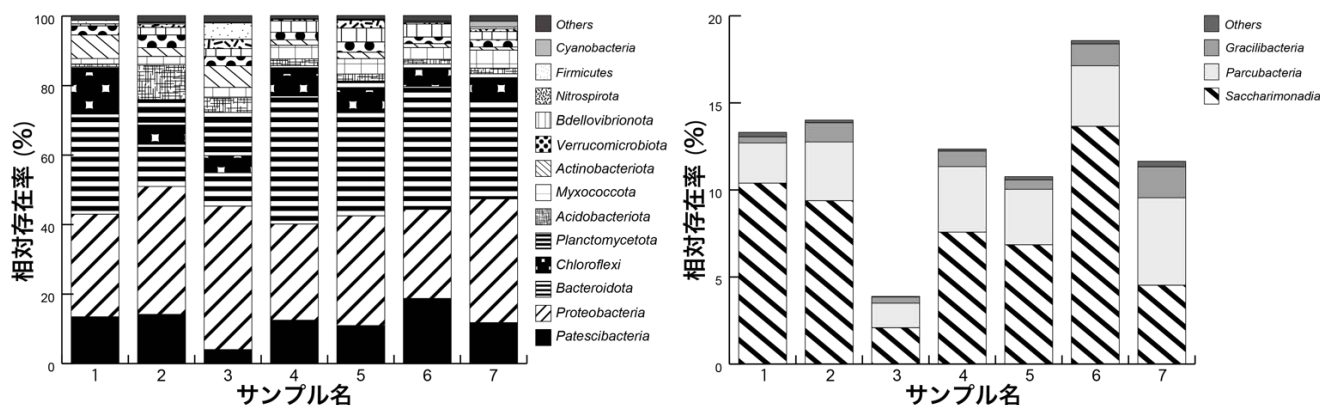


図 1 活性汚泥内の門レベル細菌の分布(左)と *Patescibacteria* の内訳(右)

相関解析の結果、*Patescibacteria* と *Bacteroidetes* 門に属する *Chitinophagales* は強い正の相関を示した。図 2 にはそれらの OTU の中から、再構築したゲノムビンと配列が 100% 一致する OTU を抽出した。ほとんどの *Chitinophagales* の OTU は、*Patescibacteria* の OTU と相関があった。

Phylum/Order/Genus	<i>Saccharimonadia</i>	<i>Saccharimonadia</i>	<i>Parcubacteria</i>	<i>Parcubacteria</i>	<i>Gracilibacteria</i>
Bacteroidota/Chitinophagales/Ferruginibacter	1.0	1.0	-	1.0	-
Bacteroidota/Chitinophagales/Niabella	0.94	0.94	-	0.94	-
Bacteroidota/Chitinophagales/Taibaiella	0.77	-	0.83	-	0.84
Bacteroidota/Chitinophagales/uncultured	1.0	1.0	-	1.0	0.71

図 2 *Patescibacteria* と *Chitinophagales* との相関解析の結果

#### 3. 2 メタゲノム解析

3 つの活性汚泥サンプルの HiSeq X と PacBio CCS シーケンスから *Saccharimonadia*、*Parcubacteria*、*Gracilibacteria* からなる 10 の *Patescibacteria* のゲノムビンを再構築した (表 1)。

タンパク質配列に基づく 10 ビンの系統樹を図 3 に示す。図の太字斜体は活性汚泥由来の *Patescibacteria* のゲノムを表している (Singleton *et al.*, 2021)。

*Saccharimonadia* に属するビンは 3 つのグループに分類された。HHAS3 と HHAS4 を含むグループは、*Saccharimonadia* の種 *Candidatus Saccharimonas aalborgensis* と関連していた。この種は球形の形態を示すため、HHAS3 および HHAS4 も球形であると考えられた。HHAS1、HHAS5 は活性汚泥サンプル由来のゲノムに関連していた。16S rRNA 遺伝子に基づく配列類似性によると、このグループの形態は主に糸状菌であった (Kindaichi *et al.*, 2016)。HHAS2 は活性汚泥由来のゲノムで他の *Saccharimonadia* とは異なるクレードを形成していた。

*Parcubacteria* のビンは 3 つのグループに分類された。HHAS7 は *Nomurabacteria* に分類され、地下水サンプルからのゲノムに関連していた (Brown *et al.*, 2015)。グループ HHAS6 と HHAS9 は *Moranbacteria* に属した。また、HHAS6 と HHAS9 は活性汚泥試料からのゲノムからなるクレードを形成していた。HHAS8 はどの *Parcubacteria* のグループにも属さなかった。HHAS10 は *Gracilibacteria* に分類された。*Gracilibacteria* のゲノムは活性汚泥サンプル由来のゲノムとは近縁ではなく、ヒト口腔サンプルからのゲノムを含むクレードを形成していた (Dudek *et al.*, 2017)。

本研究におけるメタゲノム解析から予測される *Saccharimonadia*、*Parcubacteria*、*Gracilibacteria* の代謝能力、および *Patescibacteria* と *Chitinophagales* の代謝相互作用の推測を図 4 に示した。*Patescibacteria* は、核酸合成、アミノ酸合成、リン脂質合成、完全な TCA 回路を持たないことがわかった。また、*Patescibacteria* は機能未知の ABC トランスポーター、ペプチドグリカン生合成経路、IV 型繊毛を有している。アミノ酸合成経路がないことから、ペプチダーゼがアミノ酸を獲得することが示唆された。また、ペプチダーゼを保有していることを確認した。これらの共通の特徴は、活性汚泥サンプルだけでなく、他の環境からのサンプルのゲノムとも一致する (Albertsen *et al.*, 2013 ; Rinke *et al.*, 2013)。不完全な核酸合成経路と *comE* 遺伝子の存在、そして IV 型繊毛から DNA は細胞外から獲得していると考えられる。*Saccharimonadia* と *Parcubacteria* は解糖系とペントースリン酸経路を保有していたが、

表 1 再構築した *Patescibacteria* のゲノム

Bin ID	Taxonomy	Bin Size (bp)	Completeness (%)	Contamination (%)	Number contig
HHAS1	<i>Saccharimonadia</i>	0.91	88.37	0	3
HHAS2	<i>Saccharimonadia</i>	0.83	97.67	0	3
HHAS3	<i>Saccharimonadia</i>	1	93.02	0	2
HHAS4	<i>Saccharimonadia</i>	0.73	90.7	0	3
HHAS5	<i>Saccharimonadia</i>	0.71	88.37	0	6
HHAS6	<i>Moranbacteria</i>	0.53	90.7	0	8
HHAS7	<i>Nomurabacteria</i>	0.6	62.79	0	2
HHAS8	<i>Parcubacteria</i>	0.6	90.7	0	5
HHAS9	<i>Moranbacteria</i>	0.96	79.07	0	6
HHAS10	<i>Gracilibacteria</i>	1.3	97.67	0	3

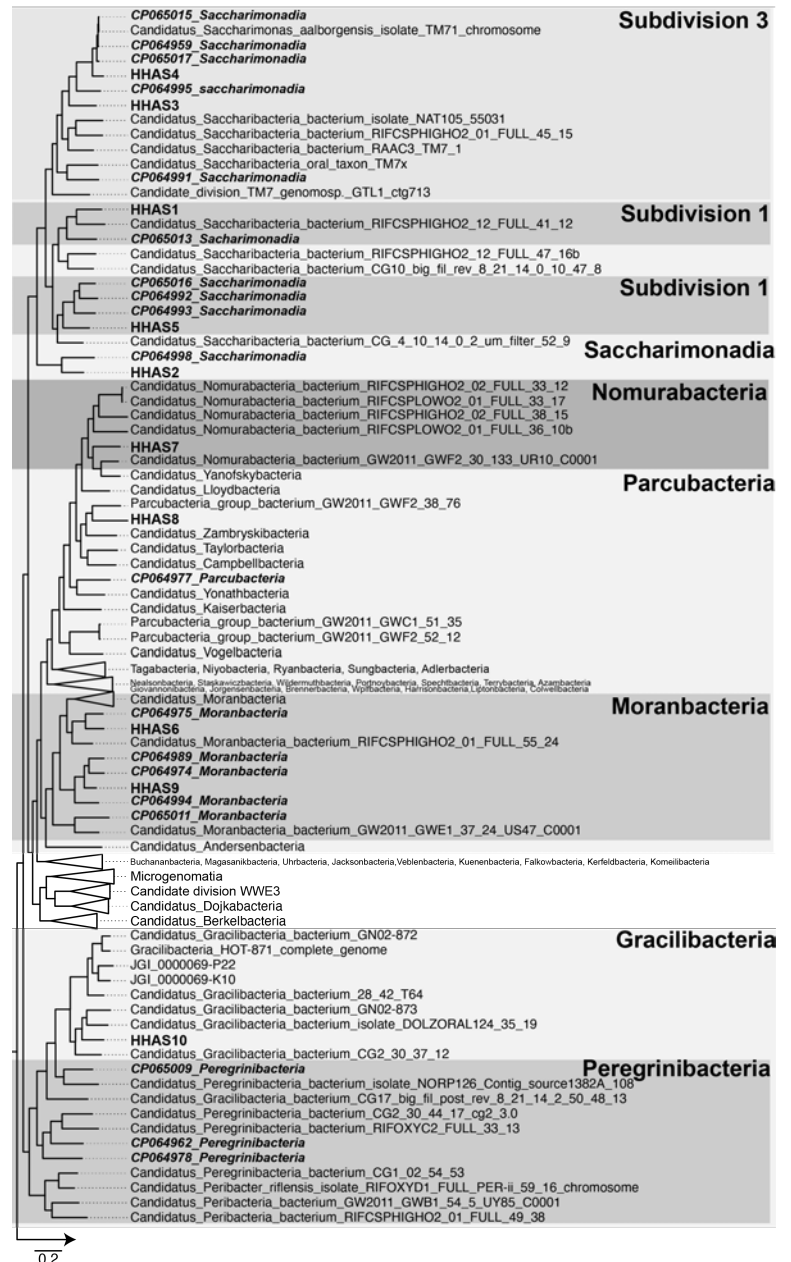


図 3 *Patescibacteria* の系統樹

*Gracilibacteria* は解糖系の一部しか保有していなかった。また、*Saccharimonadia* はピルビン酸を乳酸、酢酸に変換する遺伝子を保有しており、*Parcubacteria*、*Gracilibacteria* はピルビン酸を酢酸、リンゴ酸に変換する遺伝子を保有していた。これらの特徴と TCA サイクルを持たないことから発酵代謝が推測される。また、*Patescibacteria* が生成した酢酸は活性汚泥内に存在する細菌が利用していると考えられる。酢酸はリン除去を担う細菌が利用する重要な基質であることからシステム全体の処理性能の向上に寄与している可能性がある。

これら *Patescibacteria* の中でも、糸状性 *Saccharimonadia* (HHAS1, HHAS5) は好気的条件下で N-アセチルグルコサミンを取り込むことが確認されている。*Chitinophagales* に属すゲノムビンは、キチナーゼ及びβ-アセチルヘキサミダーゼを保有していたことから、キチンからキトビオースを介して N-アセチルグルコサミンに変換する能力を有する (図 4)。また *Chitinophagales* は、ポリ-β-1,6 N-アセチル-d-グルコサミン合成酵素 (PgaC) を保有していた。この酵素は、ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミンの重合を触媒して、ポリ-N アセチルグルコサミン (PGA) を生成する。これらの特徴は、*Chitinophagales* と *Saccharimonadia* の代謝的相互作用を強く支持するものであり、*Saccharimonadia* は細菌が生産する PGA の一部を利用している可能性がある。糸状性細菌は、過剰発生すると汚泥の沈降性を低下させるバルキングを発生させるが、一方で汚泥フロック形成の役割も果たす。そのため、活性汚泥内で *Saccharimonadia* は汚泥フロック形成に寄与している可能性がある。また、*Nomurabacteria* は銅含有亜硝酸還元酵素遺伝子 (*nirK*) を保有していた (図 4)。さらに、*Chitinophagales* は一酸化窒素還元酵素サブユニット B/C (*norB/C*) と亜酸化窒素還元酵素 (*nosZ*) を保有していた。したがって、活性汚泥プロセスにおいて、*Nomurabacteria* は *Chitinophagales* とともに脱窒の一部を担っていることが明らかとなった。

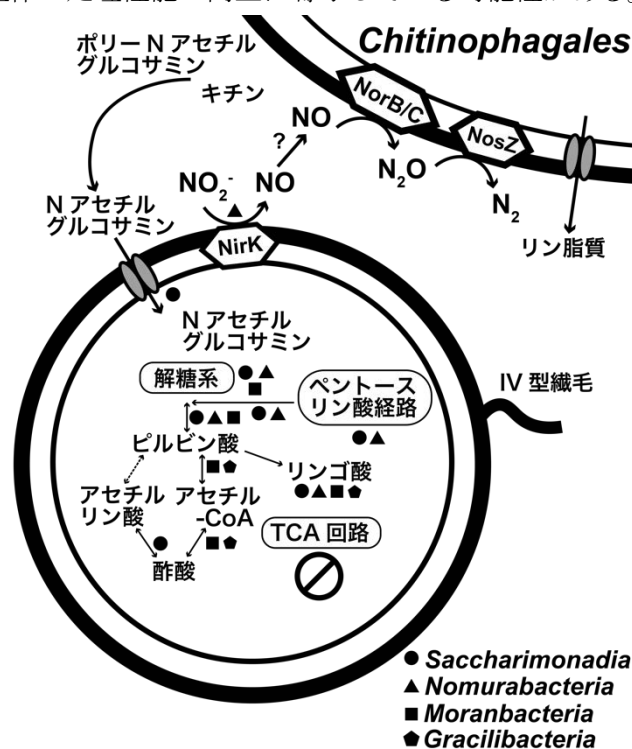


図 4 *Patescibacteria* の代謝能力と相互作用

#### 4. 結論

菌叢解析の結果、活性汚泥内での *Patescibacteria* の平均相対存在割合は 12.1% であり、相関解析の結果から *Chitinophagales* と強い正の相関関係を示すことがわかった。また、*Saccharimonadia* の中には糸状性細菌の種が存在していることを確認し、*Chitinophagales* が生成した N-アセチルグルコサミンを利用している可能性がある。この細菌はゲノムから酢酸を生成する発酵代謝を行っていることが推測され、菌体の形状だけでなく代謝産物によってシステム全体での処理性能の向上に寄与している可能性があることが示唆された。また、*Parcubacteria* に属す *Nomurabacteria* は *Chitinophagales* とともに脱窒に寄与していることが判明した。

#### 5. 参考文献

- 1) Rinke et al. (2013) *Nature*, **499**, 431-437.
- 2) Albertsen et al. (2013) *Nat Biotechnol* **31**: 533-538.
- 3) Kindaichi et al. (2016) *FEMS Microbiol. Ecol.*, **92**, fiw078.
- 4) Bolyen et al. (2019) *Nat Biotechnol* **37**: 852-857.
- 5) Bolger et al. (2014) *Bioinformatics* **30**: 2114-2120.
- 6) Bankevich et al. (2012) *J Comput Biol* **19**: 455-477.
- 7) Kang et al. (2019) *PeerJ* **7**: e7359.
- 8) Parks et al. (2015) *Genome Res* **25**: 1043-1055.
- 9) Seemann (2014) *Bioinformatics* **30**: 2068-2069.
- 10) Shaffer et al. (2020) *Nucleic Acids Res* **48**: 8883-8900.
- 11) Brown et al. (2015) *Nature* **523**: 208-211.
- 12) Singleton et al. (2021) *Nat Commun* **12**: 2009
- 13) Dudek et al. (2017) *Curr Biol* **27**: 3752-3762.