

高度な遺伝子発現解析の環境研究・複合微生物研究への応用による 革新的な環境技術の創出



産業技術総合研究所 環境創生研究部門 佐藤 由也

はじめに

自然環境中では微生物が単一種で存在していることは稀で、ほとんどの場合は多種が混在するコミュニティ（微生物生態系）を形成しており、異種と協力したり競合したりと、微生物同士は複雑に影響し合っている。そのような環境では、多種で構成される微生物生態系の単位で機能が発揮されるため、生態系を構成する微生物群の個々の性質や役割だけでなく、その複雑な関係性をも理解する必要がある。近年のDNAシーケンサー技術の飛躍的な発展に伴い、当分野の研究は大きく進展してきた。菌叢解析技術（16S rRNA遺伝子のアンプリコンシーケンシング等）によって、環境中に「どのような微生物がどれだけいるか」を知ることができるようになり、ショットガンメタゲノム解析によって、それら微生物が「どのような遺伝子を持ちどのような代謝反応を起こしうるか」を予想できるようになった。しかしながら、そこに誰がいてどのような遺伝子を持つかが分かったとしても、実際にそれら微生物が「何をしているか」を知ることは難しい。この課題に対する強力なツールが遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析、RNA-seq）である。

微生物は周囲の環境変化に応じて、必要な遺伝子を必要な量だけRNAとして発現することで、必要な代謝反応を促進して環境適応している。つまり、どのような遺伝子がどれだけRNAとして作られているかを知ることができれば、その環境で微生物がどのような代謝反応を起こしているか理解できる。これが遺伝子発現解析である。遺伝子発現解析はもともと、単一の生物種を対象に開発され発展してきたが、近年、この技術は微生物生態系をも対象に適用できるようになってきた。ここでは、遺伝子発現解析を環境研究に適用し、それによって得られた研究成果についていくつか紹介する。

1. 進化的起源が古い好熱性細菌の特徴的なエネルギー代謝・酸化ストレス防御機構

進化的起源が古い好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* は、近縁種と比べて例外的に酸化ストレス耐性が高く、なぜか還元的な代謝を酸素存在下で利用できる。この疑問を解くために、当該細菌のエネルギー代謝および酸化ストレス防御機構の研究に取り組んだ。遺伝子発現解析を行った結果、エネルギー（還元力）の獲得系としては高効率な水素酸化系ではなく、効率は低いが基質として手に入りやすい硫黄化合物酸化系が恒常的に発現しており、効率よりも安定性を重視する、当該細菌の代謝戦略が明らかになった¹⁾。さらに、酸化ストレスに弱い近縁種とのゲノム比較をきっかけに、当該細菌のもつ新規酸化ストレス防御酵素を見出し、機能を解明し、それが好氣的生育に必須であることを明らかにした²⁾。この新規酵素を中心とした酸化ストレス防御酵素群により、本菌は高い酸化ス

トレス耐性を獲得し、酸素存在下でも還元的な代謝系を使うことができると考えられる。

2. 遺伝子発現解析の環境研究への応用①：水処理複合微生物系への遺伝子発現解析の適用

2-1. 複雑な微生物生態系への遺伝子発現解析の適用

前述の通り、環境中には数千種以上の微生物が混在しているが、その多くがゲノム未解読菌である。そのため、対象微生物のゲノム配列情報（参照配列）が必要な遺伝子発現解析は、微生物生態系に適用することは難しい。現在ではいくつかの方法が確立されているが、著者は、ゲノム未解読の非モデル生物を対象にした *de novo* assembly-based RNA-seq 法に着目した。この方法では試料中のRNA配列だけを解読し、その断片的なRNA配列データを *in silico* でつなぎ合わせることで、元の遺伝子配列を復元し、遺伝子発現解析の参照配列を自前で作ることができる。当時は複合微生物系への応用例はほとんどなかったが、著者は当該手法を複雑な水処理微生物生態系（活性汚泥）に適用することに挑んだ。

2-2. 活性汚泥による重油分解メカニズム解明

上記解析技術により、難分解性の重油を処理する水処理装置を解析したところ、通常は好氣的に分解される重油が嫌氣的に分解されていることを見出した。さらに、重油分解は主に脱窒菌（酸素の代わりに硝酸イオンを呼吸基質に使うことができる）が担っていたこと、そして、重油分解菌だけでは活性が維持できず硝酸イオンを供給する硝化細菌の協力が必要であることを見出した。硝化細菌の存在量は全体の0.1%程度と極めて小さいが、興味深いことに、このマイナー種の活性によって全体の分解活性が左右されることが明らかとなった³⁾。



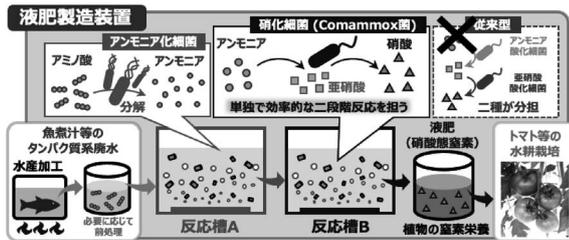
2-3. 廃水からの液肥生産技術

著者は、企業（株式会社アイエイアイ）と共同で、水産加工廃水を原料にして高効率で硝化性窒素液肥を製造する装置の開発・運転管理技術の確立に取り組んだ。当該装置は、タンパク質（アミノ酸）を分解してアンモニアを生成する工程と、アンモニアを原料に硝酸イオンを生成する工程の2つに分かれており、両工程はそれぞれ異なる微生物により駆動される。しかし、数千種以上が混在する装置内で重要な働きをする微生物が不明だったため、運転条件が最適化できていなかった。そこで、菌叢解析やショットガンメタゲノム解析、遺伝子発現解析等を用いて重要微生物を調べたところ、Comammox という近

年発見されたユニークな微生物により効率的な硝酸生成反応（従来2種の協業によってのみ進むとされていた2反応を1種が担う）が進んでいたことがわかった⁴⁾。この解析結果に基づき、重要微生物群を長期（数年以上）安定的に維持する運転条件を見出し、当該技術の発展に貢献した。なお、本液肥は既にトマト等の水耕栽培に利用されており、事業化が進んでいる。

2.4. その他廃水処理技術・環境技術

国内産業廃棄物の実に約20%を、廃水処理場からの微生物廃棄物（余剰活性汚泥）が占めており、その処理には莫大なコストがかけられている。候補者は、遺伝子発現解析や菌叢解析などにより活性汚泥内を調べることで、活性汚泥内に一定量の捕食性細菌が存在することや、細胞残渣等を原料にしてエネルギーを獲得する巧みな代謝戦略等を明らかにし、廃棄物減容を目指す研究を進めている。他にも、食品廃棄物である米ぬかを栄養源に用い硫酸還元菌の活性を利用して、重金属を含む硫酸酸性の鉱山廃水を処理する装置の開発を、独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構（JOGMEC）と共同研究で進めている^{5,6)}。また、高分子分解能を有する海洋性細菌についても、特徴的な多細胞集合体形成や⁷⁾、種内（株間）の協力・競合関係について⁸⁾、米国マサチューセッツ工科大学（MIT）のグループと共同で研究を進め、海洋での物質循環に資する知見を深めている。



3. 遺伝子発現解析の環境研究への応用②：害虫の農業抵抗性化メカニズムの解明

次に、遺伝子発現解析を農業害虫と共生細菌の研究に適用した例を紹介する。害虫カメムシの一種では、農薬分解菌が共生することで宿主カメムシまで農薬抵抗性を得るものが知られていた。しかしそのメカニズムは謎が多く、共生細菌の農薬分解経路さえわかっていなかった。候補者は遺伝子発現解析により共生細菌の農薬分解経路を調べ、他の微生物が使っている3つの経路を組み合わせた特徴的な経路により農薬を分解していることを明らかにした。さらに、農薬それ自体はカメムシに有毒で共生細菌には無毒だが、農薬の第一分解産物はその反対にカメムシには無毒で共生細菌に有毒であることを明らかにした。カメムシに共生させた状態で細菌の遺伝子発現解析を行うことで、カメムシに有毒な農薬は共生細菌が分解し、それによって生じる分解産物（細菌に有毒）はカメムシが体外に排出することがわかり、互いに助け合うような興味深い関係性を明らかにした⁹⁾。現在は、これらの成果等に基づき新しいコンセプトの農薬の研究開発を進めている。



おわりに

次世代シーケンサー技術の発展に伴い、環境微生物および微生物生態学分野の研究は近年急速に進展しており、それまで技術的に知り得なかった事実が次々に解明されている。特に、微生物生態系の中で微生物同士がどのように影響し合っているか、そしてその結果、微生物生態系だけでなく、周囲の動植物にどのような影響を及ぼすのかまでわかるようになってきた。このような流れの中で、著者は特に廃水処理や環境浄化に関する微生物群の解析を行い、それぞれの生態系における微生物の機能や役割の一端を明らかにしてきた。微生物生態系は非常に複雑で難解だが、その分、微生物同士の予期せぬ協力関係や競合関係を見つけられたときや、その関係性が系全体に影響を与えることを見出したときなどは大きな喜びになった。今後は、微生物の働きや関係性をただ知るだけでなく、それらを制御するような研究も進めていきたい。

(引用文献)

- Sato Y et al., (2012) Transcriptome analyses of metabolic enzymes in thiosulfate-and hydrogen-grown *Hydrogenobacter thermophilus* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*
- Sato Y et al., (2012) A novel enzymatic system against oxidative stress in the thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus*. *PLoS One* 7, e34825.
- Sato Y et al., (2019) Transcriptome analysis of activated sludge microbiomes reveals an unexpected role of minority nitrifiers in carbon metabolism. *Commun. Biol.* 2, 179.
- Sato Y et al., (2021) Efficient conversion of organic nitrogenous wastewater to nitrate solution driven by comammox *Nitrospira*. *Water Res.* 197, 117088.
- Sato Y et al., (2019) *Desulfosporosinus* spp. were the most predominant sulfate-reducing bacteria in pilot-and laboratory-scale passive bioreactors for acid mine drainage treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7783-7793.
- Sato Y et al., (2022) Optimal start-up conditions for the efficient treatment of acid mine drainage using sulfate-reducing bioreactors based on physicochemical and microbiome analyses. *J. Hazard. Mater.* 423, 127089.
- Schwartzman JA et al., (2022) Bacterial growth in multicellular aggregates leads to the emergence of complex life cycles. *Curr. Biol.* 32, 3059-3069. e7.
- Pollak S et al., (2021) Public good exploitation in natural bacterioplankton communities. *Sci. Adv.* 7, eabi4717.
- Sato Y et al., (2021) Insecticide resistance by a host-symbiont reciprocal detoxification. *Nat. Commun.* 12, 6432.

謝辞 本研究は、産業技術総合研究所（産総研）、東京大学大学院、MITで実施されたものです。産総研で一緒に研究を進めさせて頂き、多くのご助言や示唆をくださった羽部浩様、堀知行様、稲葉知大様、青柳智様、菊池義智様、山本京祐様に深く感謝いたします。また、在学中からご指導頂いた、五十嵐泰夫先生、石井正治先生、新井博之先生、亀谷将史先生、和地正明先生（東京工業大学）、Otto X. Cordero先生（MIT）に心より御礼申し上げます。なお、本研究はこちらには書ききれない多くの皆様のご協力やご支援により成り立っております。産総研および他機関の共同研究者の皆様、実験を進めてくださった技術職員の皆様、日頃から交流を介し切磋琢磨してきた同世代の研究者の皆様に、改めて深く感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・松島芳隆先生に厚く御礼申し上げます。