

## 〈特集〉

# 下水・廃水処理場の微生物叢解析の現状と未来

佐藤 弘 泰<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学大学院新領域創成科学研究科  
(〒277-8563 千葉県柏市柏の葉5-1-5 E-mail: hiroyasu@k.u-tokyo.ac.jp)

### 概要

微生物叢解析は、次世代シーケンサー (NGS) の登場と進歩により急速に低価格化してきている。医療健康分野ではすでに個人向けの低価格なサービスが提供されはじめている。多くの人々が NGS 解析を利用することで始めて、情報を大量に収集することが可能となり、有用な情報を提供するシステムが構築される。さらなる低価格化や新技術の開発により、下廃水処理の分野においてもユーザーが増え、研究開発の場面だけでなく日常の運転管理においても NGS が活用される日が、遠からず訪れるだろう。

キーワード：下廃水処理、微生物叢解析、NGS 解析、大衆化  
原稿受付 2017.12.17

EICA: 22(4) 31-35

## 1. はじめに

スライドガラスに活性汚泥をスポイトで一滴垂らし、カバーガラスをかけて顕微鏡で覗いて見る。多くの微生物が活動しているのを即座に観察できるだろう。見慣れない世界の生物を童心にかえて眺めるのは楽しいことである。楽しいだけではない。原生動物や後生動物の生物相から、活性汚泥微生物の健康状態について、過負荷であるとか過曝気であるとか、有用な情報を得ることができる。

一方、顕微鏡観察に加えて実に様々な技術を用いて下廃水処理プロセス中の微生物相を解析することができる。キノンや脂肪酸をマーカーとした化学的な方法もあるが、微生物が持つ DNA や RNA 分子の塩基配列を調べることで微生物を調べる、いわゆる分子生物学的手法が微生物学の標準的な手法として花開いている。その中でも特に次世代型シーケンサー (NGS) を用いての解析は、これまで困難だった種の同定とその存在割合の定量を同時に実施してくれるので、特に有望である。また、技術の進歩は著しく、将来的にはさらなる価格低下や使い勝手の改善がなされるものと予想される。微生物叢を解析することが容易になり、そこから有用な知見が得られると期待したいところである。

ここでは下水・廃水処理場の分子生物学的手法を用いての微生物叢解析の最新の技術動向について、私見も交えつつ述べさせていただきたい。

## 2. これまでの微生物叢解析手法

すでにほぼ実用化されている分子生物学的手法として、蛍光遺伝子プローブ法 (FISH 法) や定量 PCR 法がある。

FISH 法は最新の技術というわけではないが、対象微生物が試料中に存在するかどうか、半定量的に把握するために非常に便利な手法である。自動化しにくいのが欠点ではあるが、蛍光顕微鏡と恒温槽があれば、あとはわずかな消耗品だけで実施することができる。

定量 PCR 法は、以前は装置そのものが非常に高価だったが、現在はだいぶ値段がこなれてきている。例えば近年注目されている窒素除去プロセスとしてアナモックスプロセスがあるが、立ち上がりが遅いことが知られている。運転開始初期、アナモックス細菌はごくわずかなので、順調に立ち上がっているのかどうか、処理水質からは判断できない。定量 PCR 法を用いれば、ごくわずかにしかいないアナモックス細菌が増えていることを確実に確認できる。

定量 PCR 法とよく似た方法で、逆転写定量 PCR 法もある。PCR 法が DNA 分子を対象とするのに対して、逆転写 PCR 法は RNA 分子を対象とする。RNA 分子はタンパク質合成の活性と関連が強く、逆転写 PCR 法では微生物の活性を把握することができる。アナモックス細菌を例にとると、定量 PCR 法では何らかの原因で活性を失ったアナモックス細菌も定量されてしまうが、逆転写定量 PCR 法を用いると活性を保っているものだけを定量することができる。

一方、ある機能を担う微生物を特定するためには、同位体標識した化合物を用いることが多い。例えば

$^{13}\text{C}$  で標識した化学物質を活性汚泥に投与する。その化合物を利用する微生物の核酸は  $^{13}\text{C}$  で標識され、少しだけだが比重が大きくなる。試料から核酸を回収し、超遠心法を用いて比重の大きな核酸だけを回収し分析すると、その化合物を利用した微生物が特定できるというわけである。同位体標識法あるいは SIP (stable isotope probing) 法と呼ばれる。SIP 法は研究レベルでは広く用いられているが、計測・制御とはすぐにはつながらない。注目すべき微生物や遺伝子を SIP 法により特定し、そのあと、当該遺伝子・微生物を検出するための FISH 用プローブや PCR 用プライマーを設計することとなる。また、FISH 法と組み合わせて、放射性標識した基質を取り込んだ細胞を顕微鏡下で確認することで基質利用特性を確認する MAR-FISH 法も使われている。

これら手法に加えて近年は NGS が使われるようになってきている。NGS は、大量の DNA 断片の塩基配列を一度に解析することができる装置であり、例えば試料中の 16S リボソーム RNA 遺伝子を対象とする PCR 反応産物を解析することで、試料中の微生物の種類とそれぞれの割合を同時に知ることができる。しかも、種類については種レベルでの同定まで可能である。

### 3. NGS を用いた解析

NGS とひとくくりに言ってもさまざまな機種が販売されている。それぞれ売り物にしている特徴があり、一度に解読できる DNA 断片数 (リード数) が多いもの、長い塩基配列を解読できるもの、導入コストやランニングコストの点で有利なもの、維持管理や試料の作成が容易なものなど、様々な機種がある。なお、「リード」という言葉を出したが、NGS とともに使われるようになってきた言葉である。例えば初期に登場した NGS の Roche 社の 454 FLX では一度の解析で 100 万リード程度を得ることができた。一方、今日広く用いられている Illumina 社の MiSeq という機種では、2500 万リードを得ることができる。NGS の機器本体は高額であり、また、一度の分析にかかる消耗品も決して安くはない。機器を保有し受託分析を引き受ける業者がたくさん存在している。

また、通常は、限られた予算でできるだけたくさんの試料を分析したい。それに対して、NGS を用いての解析は、一度の解析でたくさんのデータを得られる代わりに一回あたりの分析にかかる費用は高価であり、なおかつ、分析できるサンプルの数はごく限られている。そこで、試料中の分析対象の DNA 分子にバーコード (識別子) と呼ばれる DNA 塩基配列をあらかじめ付加し、複数の試料を混合してから NGS による

解析に供することも多い。NGS 解析の結果、目的配列にバーコードの配列が付加されたリードが得られる。そのリードに含まれるバーコードの配列に基づいて、その配列がどの試料から得られたのか特定できる。

NGS の使用目的としては、大きくは (1) 試料中の特定の遺伝子の多様性を調べる、また、(2) 試料中の全塩基配列を調べる、のふた通りに分けられる。

(1) の例として、試料中の 16S リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列を標的として解析する手法があげられる。この手法はメタ 16S 解析とも呼ばれ、試料中に存在する微生物の種類とその構成比を一度に知ることができる。NGS を用いたメタ 16S 解析では、試料からの DNA の抽出、および 16S リボソーム RNA の部分塩基配列の PCR 法による増幅などが前処理として必要である。PCR 法による増幅においては、ユニバーサルプライマーとも呼ばれるプライマーを用いる。ユニバーサルプライマーはほぼ全ての細菌、あるいはほぼ全ての原核生物、というように、非常に広い範囲の生物の対象配列を増幅する事ができる。ただし、ユニバーサルプライマーをそのままの塩基配列で用いるのではない。実際に用いるのは、その上流部にバーコードや NGS 解析の際に必要な配列を加えたプライマーである。

メタ 16S 解析は、DNA の抽出のところで多少のバイアスが生じるし、また、ユニバーサルプライマーといってもカバーできない微生物も決して少なくない。しかし、従来の分子生物学的手法では困難だった同定と定量を一度にできるのは大きな魅力である。定量 PCR 法と比べると、標的微生物の検出感度では劣るかもしれないが、標的以外の微生物の増減も広く捉える事ができるという点で魅力的な方法である。例えば水処理プロセスの運転条件に対して微生物叢がどのように反応したのか、容易に把握することができる。

なお、一度に何万本も生成される塩基配列データ解析をするのは当然大変なことではあるが、QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)<sup>1)</sup> を用いると比較的に簡単に処理することができる。今年に入り QIIME2 にバージョンアップされ、さらに使い勝手や機能が向上した。

メタ 16S 解析の可能性は後でさらに議論する。

(2) の例として、純粋培養した微生物の全ゲノムの塩基配列を決定するために用いることができる。また、全塩基配列を決定できるだけでなく、その DNA から生産される蛋白質の種類が予想でき、その微生物の性質を推測することができる。同様の手法は混合微生物系から取りだした DNA に対しても適用することができる。メタゲノム解析というと、広義には先に述べたメタ 16S 解析も含むが、狭義には混合微生物系から得た DNA の全体を PCR 反応を介さずに NGS 解析す

ることを意味する事が多い。メタゲノム解析では、試料中の主要な微生物のゲノムの大部分を決定することもできる。また、解読されたDNA塩基配列に対応する遺伝子の種類を推定し、どのような機能をつかさどる遺伝子が何パーセントぐらい含まれているのか、調べあげる事ができる<sup>2)</sup>。さらに、試料に含まれる16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列もわかるので、先に述べたメタ16S解析の際に用いるユニバーサルプライマーを選定するために役立つ情報が得られる。

#### 4. メタ16S解析の運転管理への利用の可能性

先に述べたようにメタ16S解析は下処理プロセス中の原核生物の種類やその増減を知るためにとても有用な技術である。また、シーケンシングにかかるコストは年々低下してきている。そのことを考えると、現在は学術的な研究用途がほとんどだが、いつかは水処理プロセスの計測制御あるいは運転管理に利用できるようになる日が来るかもしれない。

ここで、NGSの利用が進んでいる医療健康の分野に目を転じてみよう。株式会社サイキンソーが提供する「マイキンソー」は個人の腸内細菌叢を解析するサービスである。同社のホームページ上にはマイキンソーによる分析結果が掲載されている。分析結果には健康増進のためのアドバイスも含まれており、個人消費者の需要をくすぐる配慮がなされている。価格設定は2万円弱であり、個人にとっては決して安くはないが、手の届かない価格ではない。また、マイキンソーでは、試料が届いてから結果をユーザーに返すまでに6週間程度かかるとのことである。健康面に悩みがあり自分の腸の状態が気になる人にとっては、マイキンソー分析で自分の腸のタイプを知り、日常生活上注意すべき点がわかれば、2万円の価格も6週間の時間も許せるかもしれない。同様のサービスはウンログ株式会社からも提供されており、ユーザーは腸内細菌叢を機能や体質への影響から知ることができる。iPhoneやAndroidのアプリ「ウンログ」も提供している。これらサービスは、ユーザーに検査結果を返すだけではない。ユーザーの健康状態についての情報を得ることで、腸内細菌叢と健康との関連について情報を蓄積することができる。すなわち、ユーザーがデータの蓄積を促し、その結果、検査の信頼性・有用性が高まっていくのである。

わざわざお金を出して腸内細菌叢を調べるまでもなく、本人が一念発起して生活習慣を改善すれば、体質が改善され健康な毎日を送ることはできるかもしれない。しかし、客観的な指標なしで手探りに努力するよりも、客観的に「あなたの腸内細菌叢は着実に改善しつつあります。あともう一踏ん張りです。」というよ

うな情報を示された方が、ユーザーは取り組みやすいだろう。また、fecal transplantation (糞便移植) とよばれる療法もある種の消化管疾患に対して有効性が示されている。検査結果に基づいて腸内細菌叢を改善することの有用性は、広く認識されつつある。

さて、マイキンソーやウンログが実施している分析は、データ解析の部分を除けば下処理プロセスの微生物叢解析とほぼ同じである。だから、下処理プロセスの微生物試料を1つあたり2万円以下の値段で分析することは可能だし、またユーザーが増え、技術がさらに進歩すれば、価格も所用日数ももっと低下するだろう。PCR反応までの前処理を自前でやることにすれば、さらに安価にすることができる。

では、例えば活性汚泥微生物をメタ16S解析したとして、実用面でどのように活用できるだろうか？今までブラックボックスとして扱われてきたものの中身がかなりはっきりわかるようになるので、いろいろなことを期待したいところである。

活性汚泥のメタ16S解析からは、冒頭で述べた原生動物の顕微鏡観察と同程度の情報、すなわち曝気不足であるとか過曝気であるとか、糸状菌が多い、といったような情報は得られるはずである。メタ16S解析では顕微鏡観察では簡単にはわからないさらに詳しい情報を得ることができる。すなわち、窒素除去やリン除去に関わる細菌、糸状菌、放線菌など、まとめて種類と量を知ることができる。しかも、顕微鏡観察と異なり、だれがやっても結果を得ることができる。無人運転されている処理施設の状態を評価するためには、便利に使うことができるだろう。

なお、MiDAS Field Guide (Field Guide to the Microbes of Activated Sludge and Anaerobic Digesters)<sup>3)</sup> は、下処理プロセスのメタ16S解析の結果を解釈するために提案されているデータベースの一つであり、インターネットで公開されている。下水や活性汚泥、嫌気性消化プロセスなどから検出される微生物の種類ごとに、糸状性か否か、硝化や脱窒、ポリリン酸の蓄積、発酵やメタン生成などの機能について知ることができる。

メタ16S解析は、工場排水の流入の影響を把握するためにも活用できるだろう。特定の有害成分が微生物叢におよぼす影響は大きいはずだからである。さらに、微生物製剤のようなものを添加している処理施設もあると聞いているが、その効果を評価するために、メタ16S解析はうってつけの手法であろう。

#### 5. 水処理微生物叢解析のこれから

メタ16S解析は、価格が安くなってきているとはいえ、水処理分野では日常の運転管理に用いるのはま

だまだ高価だと思ふかもしれない。価格を低下させるには、腸内細菌叢の解析を始め、様々な分野で需要が高まる必要がある。水処理分野だけでは需要は知っているだろうから、他の分野でも需要を掘り起こしたいところである。個人的には環境水全般について定期的にメタ 16S 解析を実施し、水環境の健全性の評価に役立てると良いと思っている。本来は、その水域に固有の微生物叢があり、その上に水系生態系が成り立っているのだから、生態系の健全性を把握するためにメタ 16S 解析は非常に頼りになるツールであるはずである。農業関係でも、土壌や堆肥の管理で需要があつて良いと思う。需要が高まり価格が下がれば、水処理分野でも使いやすくなる。

とはいえ、メタ 16S 解析やそれを含めた NGS の水処理微生物への応用は、しばらくは学術研究や技術開発分野での利用が中心ということになるだろう。ここでは研究開発分野での今後の可能性について述べたい。

通常メタ 16S 解析は 16S リボソーム RNA 遺伝子に対して実施するが、第 2 節で述べたように逆転写反応を組み合わせることで 16S リボソーム RNA そのものを対象として実施することもでき、その場合には微生物の活性を反映させた菌相情報を得ることができる。通常メタ 16S 解析の結果と、逆転写反応を介してのメタ 16S 解析の結果とを比較すると、高い活性を保っている種と、存在はしているが活動はほとんどしていない種とを見分けることができる。

このような解析は、例えば運転条件を変更したのち、微生物叢が思わしい方向に変化しようとしているのかどうか早期に把握するために使うことができるだろう。また、特定の基質や薬品に反応する微生物を抽出するためにも有用だろう。RNA を対象とする分析は DNA を対象とするよりもやや敷居が高いと考える向きもあるが、リボソーム RNA は扱いやすい。手法の詳細は別誌に紹介した<sup>4)</sup>。

また、Oxford Nanopore Technologies 社の MinION という製品について紹介しておきたい。この製品は価格 1000 ドル（本体込みの価格）で、ノートパソコンから供給される USB 電源で稼働する。100 g にも満たない重さのポケットサイズの NGS である。使い勝手も、マイクロピペットさえ扱えば誰でも使うことができるほど簡単だと聞く。現時点では読み取りの誤りが多く（読み取りのエラーは 10% 程度といわれる）用途に限られるが、2014 年から 2015 年にかけてのエボラ出血熱ウイルスの解析の現場では、採取した試料をその場で直ちに分析できる強みでウイルスの系統を把握するために活躍したそうである。使い次第では、試料採取から結果を得るまで、1 日を優に切ることが可能である。もちろんバーコードを用いれば複数の試料を一度にメタ 16S 解析することも

可能である。また、200 kb 程度の長さまで解読できるので、処理水中に出現するバクテリオファージの遺伝子のほぼ全長を解読できる。

MinION は、現場で実施可能だし、メタ 16S 解析にも用いることができる。価格的にもとても魅力的である。メタゲノム解析に使うこともでき、特定の種類の微生物の持っている機能について、詳しく知ることができるだろう。また、水処理微生物生態系においてバクテリオファージの影響を把握するために、強力なツールとなりそうである。読み取りエラーが改善されるとより使いやすくなるが、現状のままでも用途によっては有用である。MinION は、もし成功すれば、NGS 解析の大衆化を非常に促進しそうな気がしないだろうか？

## 6. 終わりに

NGS 解析は大衆化しようとしている。21 世紀に入った頃、ヒトゲノム解析は国家プロジェクトだった。それが、今や 1000 ドル未満で分析するサービスが出現している。腸内細菌叢の分析も、自分へのご褒美と思えば手が出るくらいの値段でできる。水処理微生物叢の分析にはまだ少し高価だが、日常の運転管理のために使えるような価格にまで低下する日がやがて来るだろう。

こうした技術はもちろん水処理技術の研究開発においては役立つし、日常の運転管理にも有用な情報をもたらすだろう。

データの蓄積や活用の仕組みについては本稿で十分に触れることができなかった。

微生物の名前はどうしてもとっつきにくい。和名のついているものは少なく、また、水処理系に出現するものの多くは学名さえもついていない。また、機能が明確にわからない微生物も多数いる。正式名称とは別に、ニックネームをつけることができると親しみもわくだろう。

また、試料が採取された水処理装置をどのように記述し記録すると良いか。どうしても網羅的に入力してもらおうという方向になりやすいが、データ入力の手間が膨大だと、それだけで嫌になってしまう。かつては、一つ一つの研究に多額のコストをかけて実施するのだから、しっかり記録するのが当たり前である、というような感じだったと思う。しかし、もっと気楽にデータを記録できた方が良い。そうでなければ、データは集まらない。あとでデータをながめ直した時に、何か気がついたことがあれば、あらためて関連する情報をデータベースに入力し直せば良い。

NGS 解析やメタ 16S 解析が顕微鏡ほどに水処理の実務に広く役立てられる日は遠からず訪れるだろう。

大勢のユーザーに使ってもらえるようなシステムとすることが成功のカギとなるだろう。

#### 参考文献

- 1) J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello et al.: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, Vol. 7, No. 5, pp. 335-336. (2010)
- 2) 服部正平：個人差を生むマイクロバイオーーム, *日経サイエンス*, Vol. 42, No. 10, pp. 50-57, 2012.
- 3) S. J. McIlroy, A. M. Saunders, M. Albertsen, M. Nierychlo, B. McIlroy, A. A. Hansen et al., 2015. MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. Database (Oxford), bav062.
- 4) 佐藤弘泰：下水処理を担う複合微生物系「活性汚泥」のメタ16S解析, *NGS アプリケーション 今すぐ始める！メタゲノム解析実験プロトコール*, 服部正平編, 実験医学別冊, 羊土社, 2016.