

多摩川の微生物生態系モデル構築による  
下水処理水の影響や季節変動の解析

2020年

山村雅幸

東京工業大学・教授

共同研究者

西田 暁史

## 目次

第一章 導入 .....	2
第二章 手法 .....	4
2.1 細菌群集の数理モデル .....	4
2.2 細菌群集形成の数値計算 .....	5
2.3 採取場所と採取方法 .....	7
2.4 DNA 抽出、PCR 増幅、シーケンシングについて .....	8
2.5 16S rRNA 遺伝子を用いた分類、多様性解析、機能遺伝子予測 .....	8
2.6 イオンクロマトグラフィーによる河川水の分析 .....	8
2.7 細菌群集の Ex situ 培養 .....	9
2.8 偶発性の定量化 .....	9
第三章 結果 .....	10
3.1 適応した種の豊富さによって発生する偶発性 (in silico) .....	10
3.2 細菌群集を決定論的にする環境変化 (in situ) .....	11
3.3 細菌群集を決定論的にする非適応環境 (ex situ) .....	15
第四章 考察 .....	20
第五章 成果のまとめ .....	22
(1) 助成開始時には計画していたが、実施・実現できなかったこと .....	22
(2) 今後に向けての課題 .....	22
(3) 調査研究・活動の結果が、どのように社会に還元 (活用) されるか .....	22
(4) 成果公表 .....	23
謝辞 .....	24
参考文献 .....	24

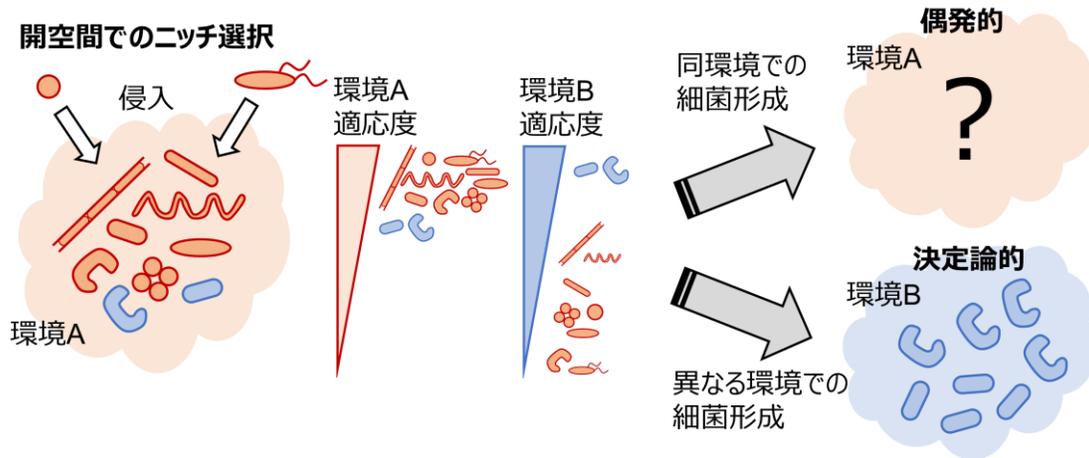
# 第一章 導入

多摩川の微生物生態系モデルを構築することで、下水処理水や季節変動の微生物生態系への影響を解析・予測することは有用である。多摩川では下水処理水が放流されており、下流では処理水の割合が5割にも達する。この処理水は各指標が基準値以下になるように処理されているが、多摩川の悪臭や環境汚染などの問題に関与している微生物生態系に対し影響を与えていることが過去の採択課題で示唆されている。そこで、複数の採取地点と時系列のデータから多摩川の上流から下流までを統合した微生物生態系モデルを構築したいが、微生物、特に細菌の群集では群集形成に再現性がなく、予測がつかない細菌構成を形成する偶発性が問題となる。

この偶発性により、生物腸内や環境中では、同じ環境であっても形成される細菌群集が異なることが報告されている(1,2)。この偶発性のルールを探るために、2-3種の微生物から構成される少数種共生系を実験室内で構築し、環境がコントロールされた状態での *ex situ* 実験が行われてきた(3-5)。しかし、細菌群集は構成する種数が多くなるにつれ安定性が特定のルールに則ることが数理モデルを用いた研究で示唆されているように(6,7)、多種群集では少数种群集では観測できないルールの存在が考えられ、多種共生系から偶発性のルールを探る必要がある。10種を優に超える多種共生系を用いたこれまでの研究で、腸内細菌群集に偶発性があることや(1,8)、葉表面の細菌群集では系統階級によっては特定のグループに属する細菌が常に支配的になる決定論性が調べられている(2)。これらの研究では細菌構成を次世代シーケンサーを用いて測定しているように、菌叢解析が可能になって多種共生系の偶発性に着眼できるようになったが、偶発性が生じるルールはまだ未知の部分が多い。

そこで、菌叢解析を用いた *in situ*、*ex situ* 実験と、細菌群集を計算機内で構築しシミュレーションを行う *in silico* 実験を組み合わせ、環境適応が生み出す細菌群集の偶発性を提案した (Fig 1)。*in situ* 実験では多摩川の上流と下流の細菌群集でどちらがより偶発的に形成されているのかを類似度を計算することで推測し、途中で混入する排水処理水の影響を考えた。そして、何が偶発性を起こす原因となるのかを、上流細菌群集と下流細菌群集をそれぞれ高濃度と低濃度の有機物培地で培養し偶発性の度合を計算した

ex situ 実験と、細菌群集を構成する種数を変更し偶発性の度合を計算した in silico 実験で確かめた。



**Fig 1** 提案する「環境適応による偶発性」の概念図 開空間のある環境では、細菌が絶え間なく系に侵入し、その環境に対して適応度が高い細菌が多く集まっている。この細菌群集をソースとした新たな細菌群集の形成を考える。このとき、ソースとなる細菌群集と似た環境で細菌群集が形成されたとき、適応度の高い細菌種数が豊富なため、その形成は偶発的になるという仮説である。一方で、ソースとなる細菌群集と異なる環境で細菌群集が形成されたときは、適応度の高い細菌種数が限られるため、その形成は決定論的になるという考え。

## 第二章 手法

### 2.1 細菌群集の数理モデル

本研究での数理モデルは J. E. Goldford らによって改良されたマッカーサーの資源消費者モデルを用いた(2) (Fig 2A)。さらに我々はこのモデルに、必須細菌の存在と特定の資源濃度に対する適応を要素として加えた。改良した数理モデルは以下のとおりである。

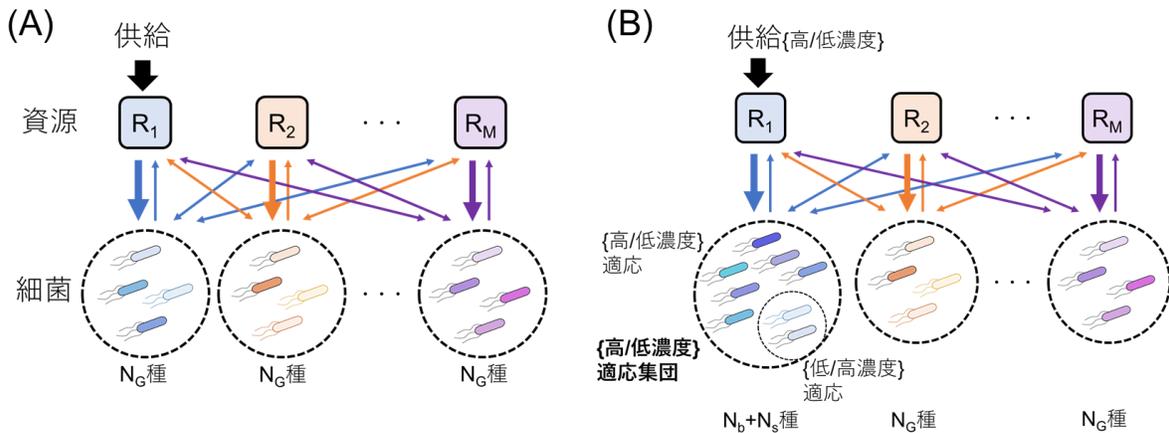
$$\frac{dN_i}{dt} = N_i \left( \sum_{\alpha} F_i(s_i) G_{i\alpha} C_{i\alpha} R_{\alpha} - m_i \right) \quad (1)$$

$$\frac{dR_{\alpha}}{dt} = H_{\alpha}(R_{\beta}) - \sum_i F_i(s_i) G_{i\alpha} C_{i\alpha} R_{\alpha} N_i + \sum_{\beta, i} F_i(s_i) G_{i\alpha} D_{\alpha\beta}^i C_{i\alpha} R_{\alpha} N_i \quad (2)$$

$N_i$  と  $R_{\alpha}$  は細菌種  $i$  と資源  $\alpha$  の量を表している。式 (1) の第一項は資源を消費することによる細菌の成長を、第二項は細菌の死や休眠を意味している。資源消費・細菌成長率は必須細菌存在による代謝の活性化  $F_i(s_i)$ 、特定の資源濃度への適応  $G_{i\alpha}$ 、そして種固有のベースとなる資源消費率  $C_{i\alpha}$  で表されている。 $F_i(s_i) = \frac{s_i}{K_i + s_i}$  の  $s_i$  は細菌種  $i$  にとっての必須細菌の合計量、 $K_i$  はミカエリス定数で、この関数は必須細菌合計量  $s_i$  が少なくなると種  $i$  の資源消費代謝を抑制することを意味している。簡単のため、必須細菌はそれぞれ代替可能な存在であることを仮定し、いずれかの必須細菌がある程度存在すれば成長できるようになっている。多くの細菌が未だに単離培養できていない原因の一つとして、他の細菌が分泌する物質の必要性が考えられており(9)、必須細菌の存在が直接成長に影響するこの関数を追加した。 $G_{i\alpha} = \frac{I_{\alpha} L_i}{L_i + I_{\alpha} L_i + I_{\alpha}}$  の  $I_{\alpha}$  は資源  $\alpha$  の培地への供給量、 $L_i$  はミカエリス定数で、この関数は特定の資源供給濃度で細菌種  $i$  の資源消費代謝を活性化することを意味している。式 (2) の第一項は資源供給を、第二項は資源消費を、そして第三項はある資源から別の資源が代謝産物として生産されることを意味している。

$H_{\alpha} = \frac{I_{\alpha} - R_{\alpha}}{\tau_{\alpha}}$  の  $\tau_{\alpha}$  は変換率で、この関数はその資源が外部から供給される場合に存在する。

$D_{\alpha\beta}^i$ は資源  $\beta$  から  $\alpha$  への化学量論行列である。



**Fig 2 in silico モデルデザイン** (A) 全ての資源にはそれぞれ、その資源を得意とする、いくつかの細菌種が存在する。それぞれの細菌は資源を消費し、代謝産物を細胞外に分泌する。(B) 高/低資源濃度に適応した細菌群集に高濃度もしくは低濃度の資源が供給される。高濃度資源に適応した細菌群集とは、高濃度資源に適応した多くの細菌種と、低濃度資源に適応した少数の細菌種で形成されている。低濃度資源に適応した細菌群集は、その逆である。

## 2.2 細菌群集形成の数値計算

上記の数値モデルを用いて数値計算するために、モンテカルロ法を用いた。テストベッドとして、10 資源の内の 1 資源が恒常的に供給され、細菌は資源を消費し代謝産物を分泌することを想定した。J. E. Goldford らと同じく(2)、細菌種  $i$  の資源  $\alpha$  に対するベースとなる消費率  $C_{i\alpha}$  は、それぞれの種は 1 つの資源  $f_i$  の消費を得意としているというルールに則って決めた。まず、 $C_{i,\alpha=f_i}$  を以下の通りに定めた。

$$C_{i,\alpha=f_i} \sim \text{Normal}(\mu, \sigma^2)$$

ここで、 $\text{Normal}(\mu, \sigma^2)$  は平均  $\mu$ 、標準偏差  $\sigma$  の正規分布である。 $C_{i,\alpha=f_i}$  は 0 から 1 の間の値である。次に、 $C'_{i,\alpha=f_i}$  を一様分布で定める、 $C'_{i,\alpha=f_i} \sim \text{Uniform}(0, 1)$ 。そして、 $C_{i,\alpha \neq f_i}$  は以下の通りに定めた。

$$C_{i,\alpha \neq f_i} = (1 - C_{i,\alpha = f_i}) \frac{C'_{i,\alpha \neq f_i}}{\sum_{\gamma \neq f_i} C'_{i,\gamma}}$$

全ての計算で、 $\mu = 0.4$ 、 $\sigma = 0.01$ とした。

供給資源濃度を変更した計算機実験では、高濃度資源と低濃度資源それぞれに適応した2つの細菌群集を想定した (Fig 2B)。適応資源濃度として $L_i = 100$ を高濃度用、 $L_i = 1$ を低濃度用として採用した。簡単のため、種群  $i_s$  のみ供給資源  $f_s$  の消費を得意としており、供給資源に対して $G_{i=i_s, \alpha=f_s} = \frac{I_\alpha}{L_i+I_\alpha} \frac{L_i}{L_i+I_\alpha}$  という要素を持っている。他の資源に対してもしくは他の種では、 $G_{i=i_s, \alpha \neq f_s} = 1$ と $G_{i \neq i_s, \alpha} = 1$ となっている。高資源濃度に適応した細菌群集は供給資源に対して45種の高資源濃度に適応した細菌と、5種の低濃度資源に適応した細菌、その他の資源に対してそれぞれを得意とする10種ずつの細菌で構成されている。必須細菌の効果 $F_i(s_i) = \frac{s_i}{K_i+s_i}$ は偶発性のために必要である。それぞれの細菌にとっての必須細菌は10種で、この必須細菌は他の資源を得意とする細菌の中からランダムに選択されている。その他のパラメータは、 $K_i = 0.01$ 、 $m_i = 0.05$ 、 $\tau_\alpha = 1$ とした。供給資源に関しては、高供給資源濃度は $I_\alpha = 100$ 、低供給資源濃度は $I_\alpha = 1$ とした。それぞれの数値計算は初期細菌量を0.01から1の間でランダムに決定した上で10回行った。この繰り返し計算は資源消費率 $C_{i\alpha}$ 、化学量論行列 $D^{i\alpha\beta}$ 、必須細菌を変えた上で更に100回繰り返した。

種数を変更した計算機実験は、ほとんどは供給資源濃度を変更した上記実験と同じであるが、しかし、特定の資源濃度への適応は考えていない (Fig 2A)。細菌群集は100種の細菌で構成されており、細菌10種ごとに10資源の内の1資源に適応するようにしている。

## 2.3 採取場所と採取方法

多摩川は東京都と神奈川県の間を流れる主要な河川である。川は 138 km にも渡り、上流は自然の多いエリア、下流は都市エリアを流れる。この環境が大きく変わる川において、8カ所から2ヵ月に1度、1年に渡って河川水を採取した (Fig 3)。環境の変化は、地点4と5の間にある2つの排水処理場と地点5と6の間にある4つの排水処理場から排出される下水処理水の河川への流入によって起こる。採取期間は2018年8月31日から2019年7月21日である。採取日は、当日と前日に雨が降らない日とした。ひも付きバケツを共洗いした後、岸から5mほどの所に投げ入れ河川水を採取した。DNA回収用に河川水300 mLを共洗いしたポリプロピレン製ボトル (AS ONE, Osaka, Japan) に、イオンクロマトグラフ測定用に20 mLを0.22  $\mu\text{m}$  フィルタリング (Merck, Darmstadt, Germany) し滅菌済み遠沈管 (AGC, Tokyo, Japan) に加えた。300 mL 河川水は氷上で保管し、遅くとも10時間以内にDNAを抽出した。川の水温、溶存酸素はDO200A (Xylem, New York, USA) で、pHはPH-6600 (CUSTOM, Tokyo, Japan) で測定した。



Fig 3 採取場所の情報

## 2.4 DNA 抽出、PCR 増幅、シーケンシングについて

多摩川水中のゲノム DNA は DNeasy PowerWater Sterivex DNA Isolation kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した。50 mL を用いて使用する器具を共洗いし、残りの 250 mL を用いて DNA を抽出した。ex situ 実験でのゲノム DNA 抽出には NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を用いた。ゲノム DNA の総量は、PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) と U16SRT primers(10)を用いた RT-PCR によって定量した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域の PCR 増幅と MiSeq Reagent Kit v3 (600 Cycles) (Illumina, California, USA) を用いた MiSeq (Illumina, California, USA) によるシーケンシングの手法は(11)と同じである。

## 2.5 16S rRNA 遺伝子を用いた分類、機能遺伝子予測

QIIME2 docker (qiime2-2019.10) を用いて 16S rRNA 遺伝子解析を行った(12)。in situ での 300 nt ペアエンドリードはトリムし、フォワード側は 18-296 nt、リバーズ側は 18-250 nt を *qiime dada2 denoise-paired* コマンドによって残した。ex situ でのリードはトリムすることでフォワード側は 20-296 nt、リバーズ側は 20-250 nt を残した。リードは 99% operational taxonomic units (OTUs) にまとめ、SILVA 132 の 99% データ(13)を用いて細菌情報を割り当てた。16S rRNA 遺伝子解析を基にした予測メタゲノム解析も、PICRUST を用いて行った(14)。PICRUST によって出力される代謝データをまず相対値へ変換し、標準化した後に主成分分析を行った。

## 2.6 イオンクロマトグラフィーによる河川水の分析

アニオン濃度は島津イオンクロマトグラフ (Shimadzu, Kyoto, Japan) と Shodex SI-90 4E アニオンカラム (Showa Denko, Tokyo, Japan) を用いて測定した。カチオンの測定には Shim-pack IC-C4 (Shimadzu, Kyoto, Japan) は用いていない。

## 2.7 細菌群集の ex situ 培養

細菌群集として 300 mL の河川水を、上流として地点 2、下流として地点 8 から採取した。これらのサンプルは運搬のために氷上に 5 時間置かれ、その後、150  $\mu$ L を 3 mL の M9 培地に加えた。M9 培地は A. Geerlof のプロトコルに従って作製したが(15)、炭素源となるグルコース濃度は 0.4%、0.04%、0.004%と用意した。それぞれのグルコース濃度に調整された培地が入った培養チューブを 5 本ずつ用意した。培養には、14 mL ポリプロピレン培養チューブ (Cornig, New York, USA) を 180 rpm で振とう培養した。J. E. Goldford らが行ったように培養液は 48 時間ごとに植え継ぎ(2)、25  $^{\circ}$ C で培養し、150  $\mu$ L の培養液を 3 mL のフレッシュな M9 培地へ植え継いだ。培地は 12 回植え継ぎされ、はじめと 2 回目の培地には真核生物の成長を阻害するために 200  $\mu$ g/mL のシクロヘキシミドを加えた。細菌濁度は波長 600 nm で CO8000 cell density meter (Harvard Bioscience, Massachusetts, USA) を用いて、植え継ぎ直前に測定した。最後にそれぞれのチューブから 2.5 mL を取り出し DNA 抽出に用いた。

## 2.8 偶発性の定量化

細菌群集形成の偶発性を定量化するために、葉表面の細菌群集の偶発性を定量化するためにも使われた Renkonen 類似度を用いた(2)。

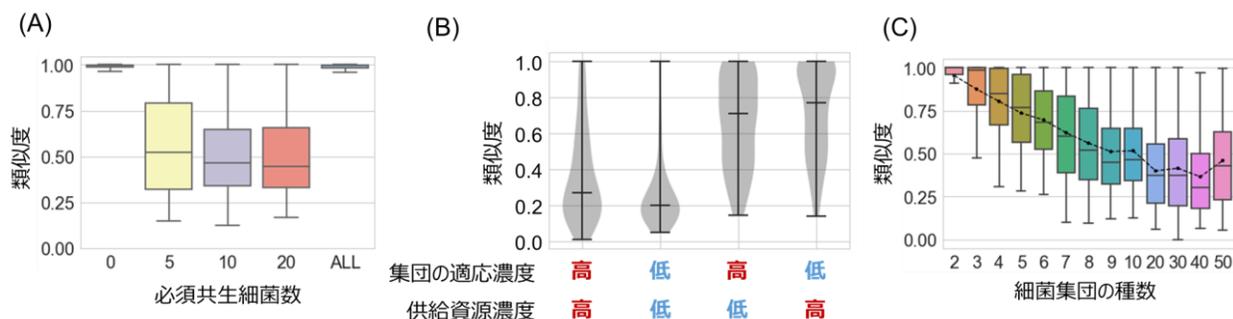
$$D(x, y) = 1 - \frac{1}{2} \sum_i |x_i - y_i|$$

$x_i$  と  $y_i$  は 2 つの比較する細菌群集にそれぞれ含まれる細菌種の相対量である。全てのペア間の類似度を計算することで偶発性を定量化した。大きな類似度は細菌群集の形成が決定論的であることを示し、逆は偶発的であることを示している。

## 第三章 結果

### 3.1 適応した種の豊富さによって発生する偶発性 (in silico)

どのような細菌で構成されるのか予測ができない偶発性を細菌群集がどのように生み出すのかを包括的に理解するために、数理モデルを用いた数値計算は有用である。しかし、過去の数理モデルでは初期細菌量をランダムに決定したとしても同条件ではいつも細菌群集が同じ構成になってしまい、偶発性を生み出すことができていない(2)。そこで我々は、それぞれの細菌が持つ生存に必須な細菌を想定し、それが偶発性を生み出した (Fig 4A)。もし全ての細菌種が共生細菌を必要としない場合、細菌群集の形成は決定論的になった (類似度~1)。一方でそれぞれの細菌種にとって他の全ての種が代替のきく必須共生細菌であった場合にも、細菌群集の形成は決定論的になった (類似度~1)。しかし、必須共生細菌の種数がある程度の数の場合に偶発性が発生した。必須共生細菌の種数を 5、10、20 とした場合に 100 種の細菌群集の類似度中央値は約 0.5 となった。偶発性が確かめられたので、次に我々は高濃度と低濃度にそれぞれ適応した細菌群集を計算機上に用意し、環境中の資源濃度が変わったときの偶発性に及ぼす影響を調べた (Fig 4B)。高濃度と低濃度にそれぞれ適応した細菌群集に高濃度と低濃度の資源がそれぞれ供給されたときに、類似度は中央値で 0.27 と 0.20 にそれぞれなった。一方で、細菌群集の適応濃度とは逆の資源濃度が供給されると、細菌群集の形成は決定論的になった (高濃度と低濃度への適応群集の類似度中央値は 0.71 と 0.77)。高濃度と低濃度へ適応した 2 つの細菌群集の違いは高濃度や低濃度に適応した細菌種の数であり、それぞれの群集ではその資源濃度に適応した細菌種がより多くいる。よって、何が偶発性の度合を変えているのか理解するために、細菌群集を構成する種数を変更してみることにした (Fig 4C)。全 10 資源それぞれを得意とする細菌種が 2 種ずつしか存在しないとき、その細菌群集の形成は決定論的であった (類似度中央値~1)。構成する種数が増えるごとに細菌群集は偶発的になり、我々の計算機実験では種数が 10 種に到達するまで偶発性は進行した。この結果は、細菌種数の豊富さが細菌群集の形成を偶発的にすることを示している。

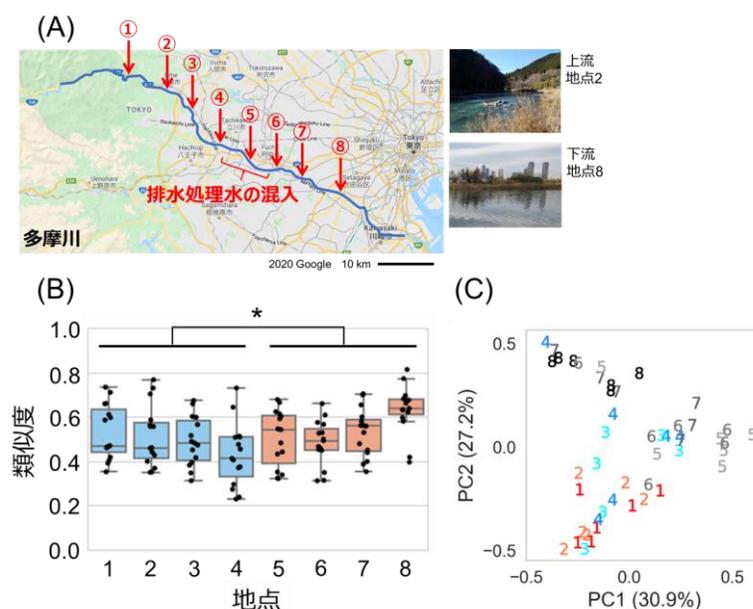


**Fig 4 in silico** での細菌群集の偶発性 (A) 必須共生細菌の種数を変えられている。(B) 高／低濃度に適応した細菌群集に高濃度または低濃度の資源が供給されている。(C) 細菌群集を構成する種数を変えられている。

### 3.2 細菌群集を決定論的にする環境変化 (in situ)

計算機実験で細菌群集の偶発性とその原因として細菌種数が重要であることが確認できたので、自然条件下での偶発性のルールも調査した。in situ 実験のために、我々は自然エリアも都市エリアも流れる多摩川を対象とした。なぜなら、地点4から6の間にある排水処理施設からの排水処理水の混入による劇的な変化が生じ、異なる環境での偶発性を調査できる絶好の対象だからである (Fig 5A)。イオンクロマトグラフによる分析結果は、窒素、リン、硫黄のイオン成分の増加を示した (Fig 6)。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>は地点4と5の間で10倍以上という劇的な増加を示し、地点5以降はその濃度が保持された。細菌から抽出したゲノムDNAの量も河川下流で増加した ( $p < 0.001$ 、地点1-4 vs 5-8、Wilcoxon signed-rank one-sided test) (Fig 7)。このように環境が大きく変化する多摩川で、我々は6時点で細菌構成を測定した (Fig 8、9)。この6時点、8カ所での細菌構成を用いて、それぞれの地点での類似度を計算し、in situ での細菌群集形成の偶発性を定量化した (Fig 5B)。上流細菌群集の類似度 (平均 0.49) は下流細菌群集の類似度 (平均 0.54) よりも小さく ( $p < 0.05$ 、地点1-4 vs 5-8、Mann-Whitney  $U$  one-sided test)、下流

の細菌群集形成がより決定論的なことが示唆された。16S rRNA 遺伝子解析を基にして予測された群集機能によって、上流と下流で細菌群集の機能が異なることが示された (Fig 5C)。上流では *Sporichthyaceae* 科や *Ilumatobacteraceae* 科の細菌の相対量が大きかったが、下流では *Flavobacterium* 属や *Limnohabitans* 属が支配的になり、上流で支配的だった *Sporichthyaceae* 科の細菌の相対量が減少していた。気温の低い 1 月と 3 月では *Sporichthyaceae* 科の細菌や *Limnohabitans* 属は相対量が著しく減少していた。



**Fig 5 in situ** での細菌群集の偶発性と機能 (A) 細菌コミュニティは自然エリアから都市エリアにいたる多摩川 8 カ所から 6 回採取された。(B) それぞれの地点での細菌群集の類似度を計算し、排水処理水の混入前後でその類似度を比較した ( $p \sim 0.05$ )。(C) 細菌群集の機能データの主成分分析した。それぞれの数字は採取地点を示す。

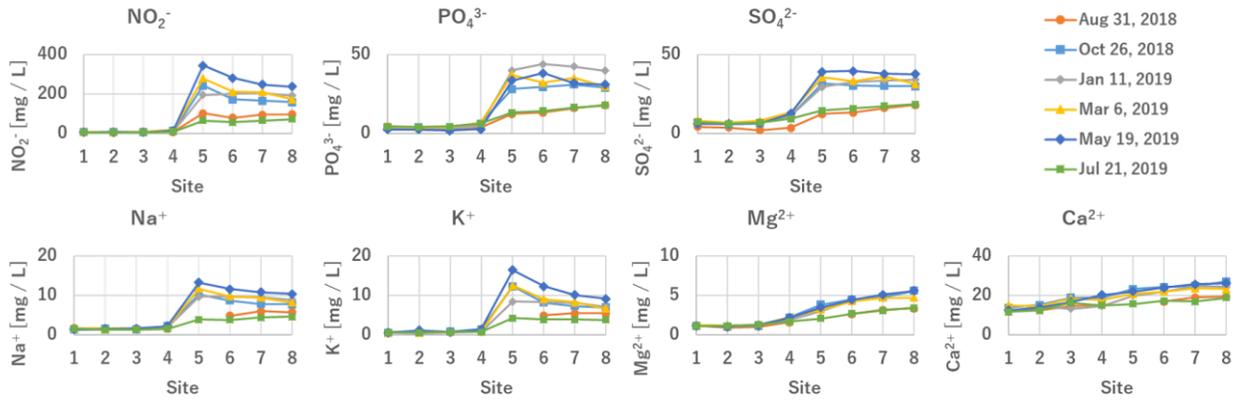


Fig 6 各地点でのイオン濃度

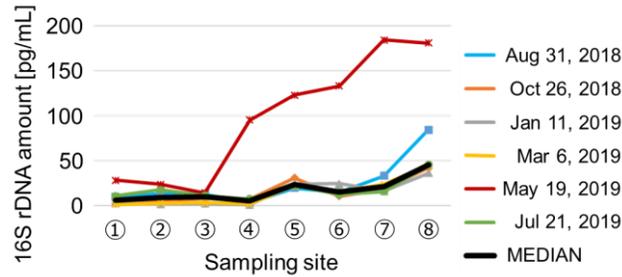


Fig 7 各地点での 16S rDNA 量

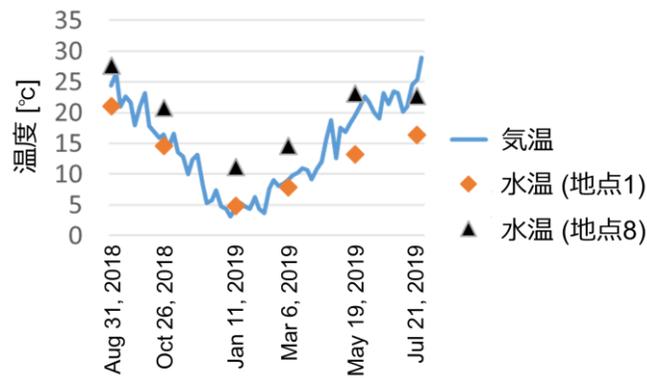
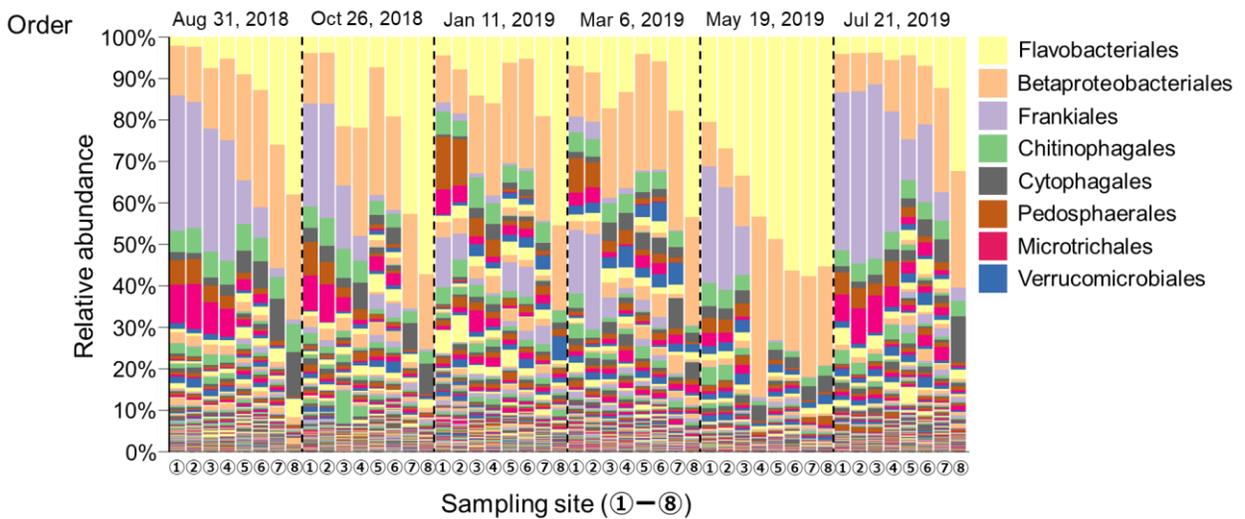
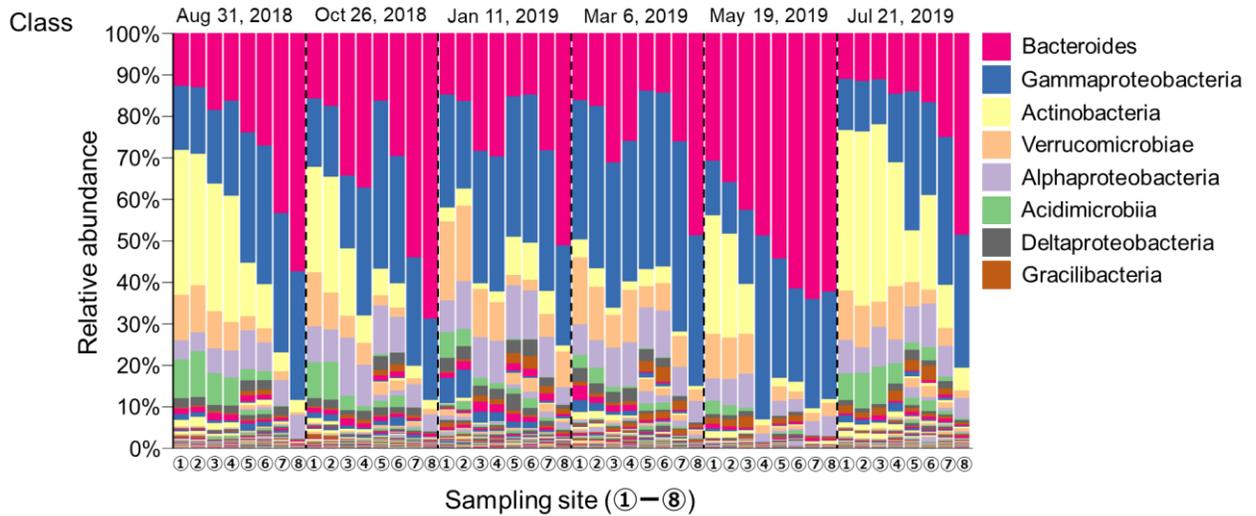
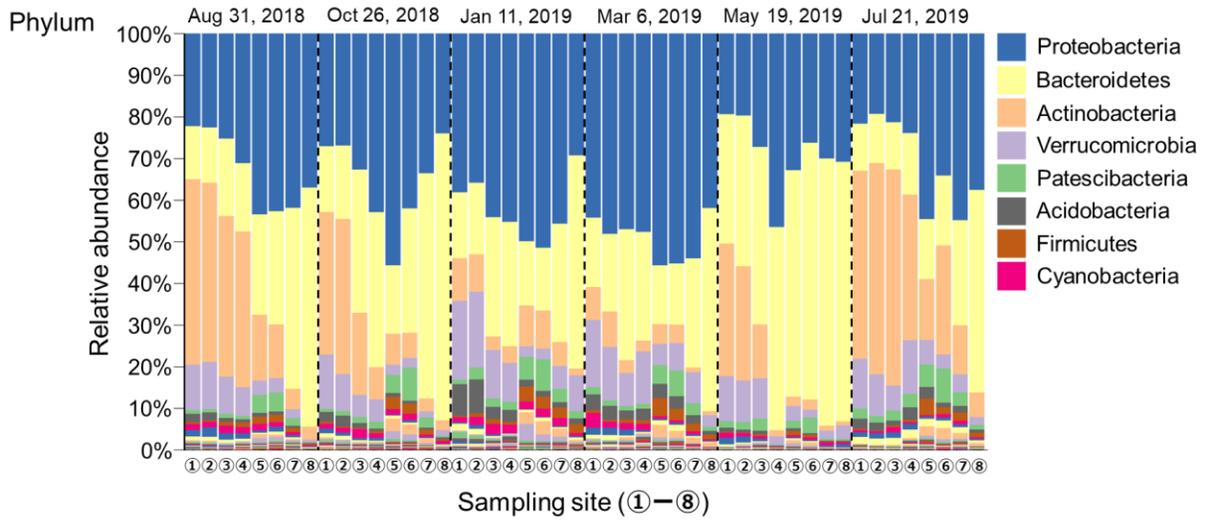


Fig 8 各採取日での気温と水温



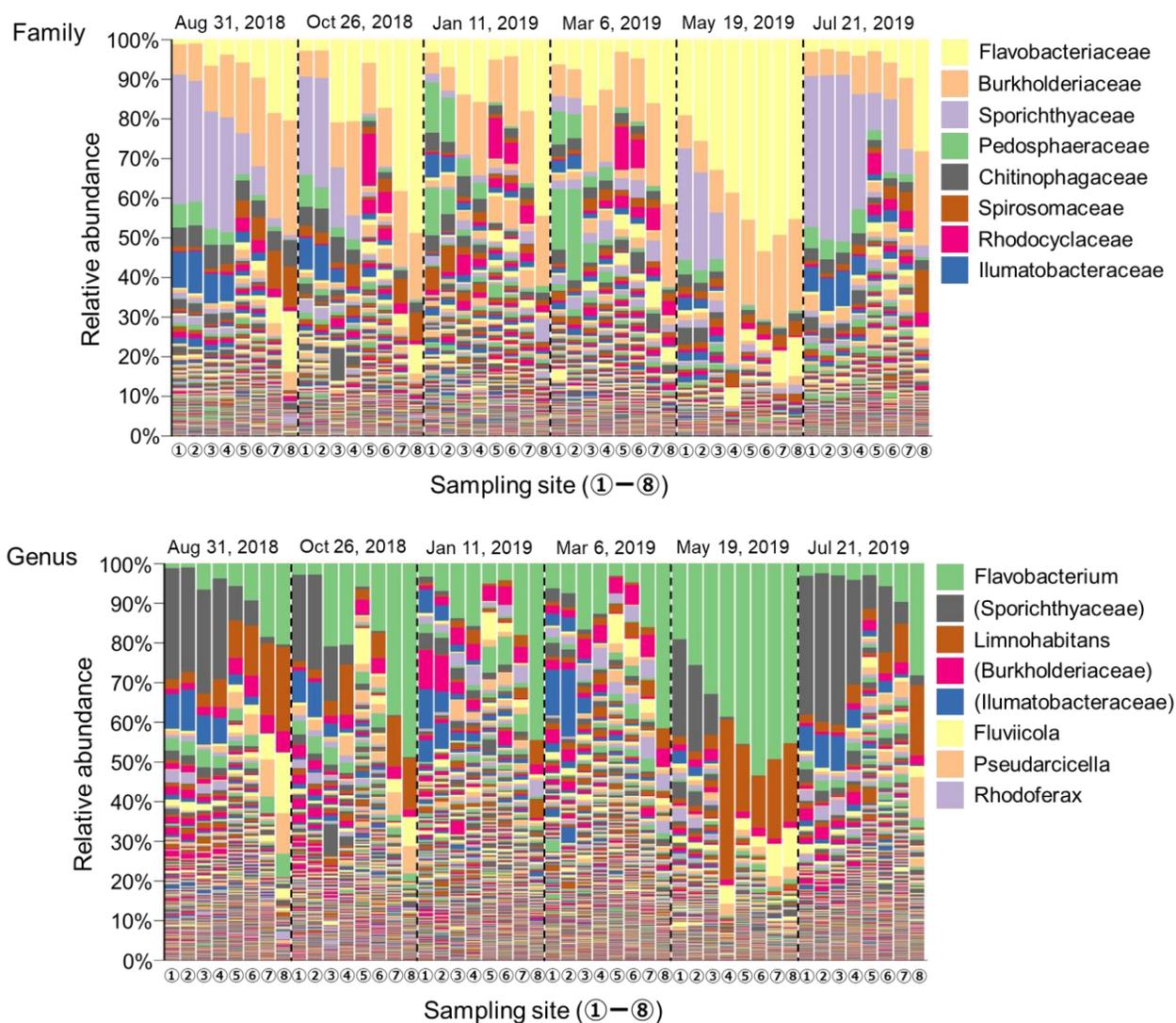
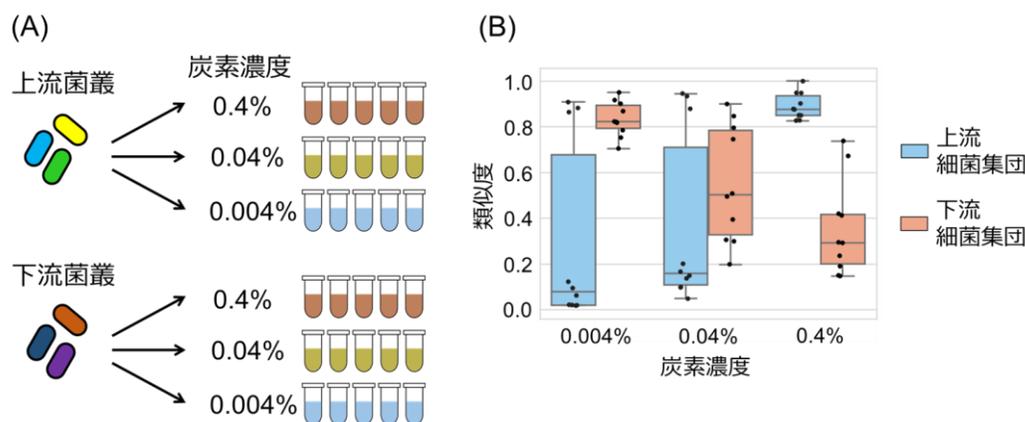


Fig 9 各系統レベルでの in situ 細菌構成

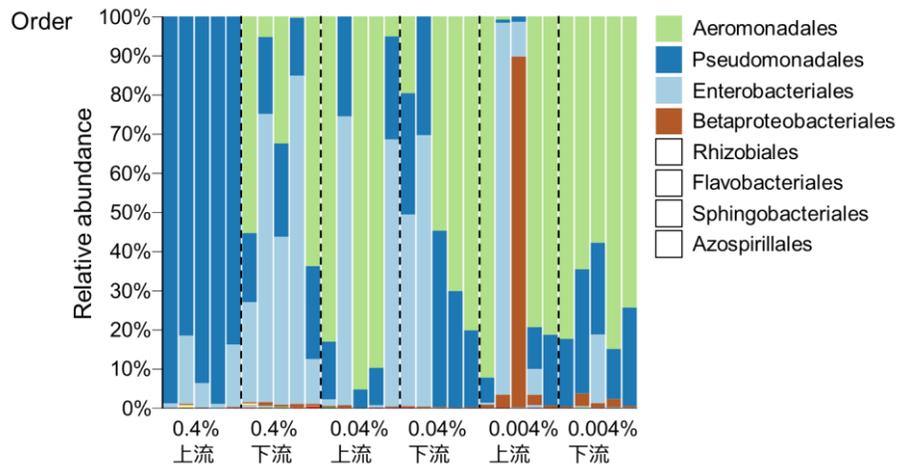
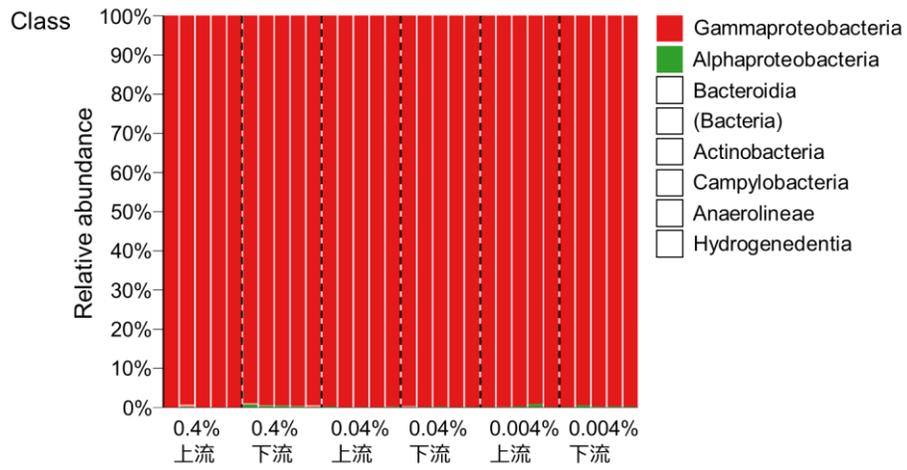
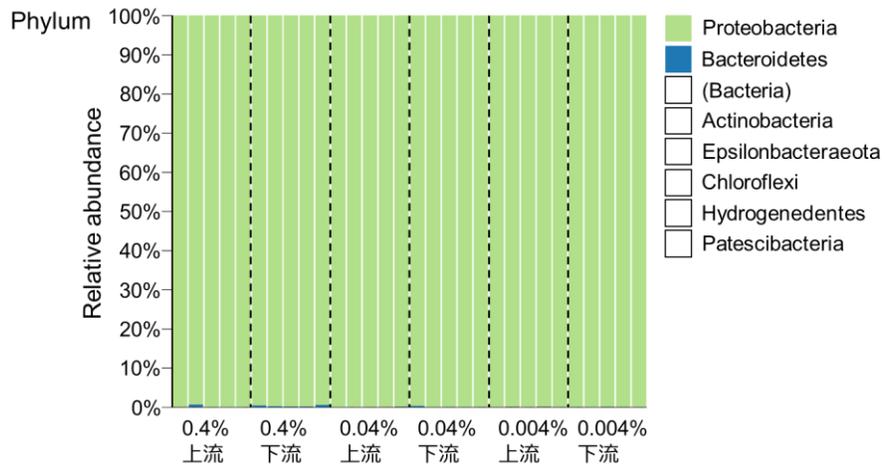
### 3.3 細菌群集を決定論的にする非適応環境 (ex situ)

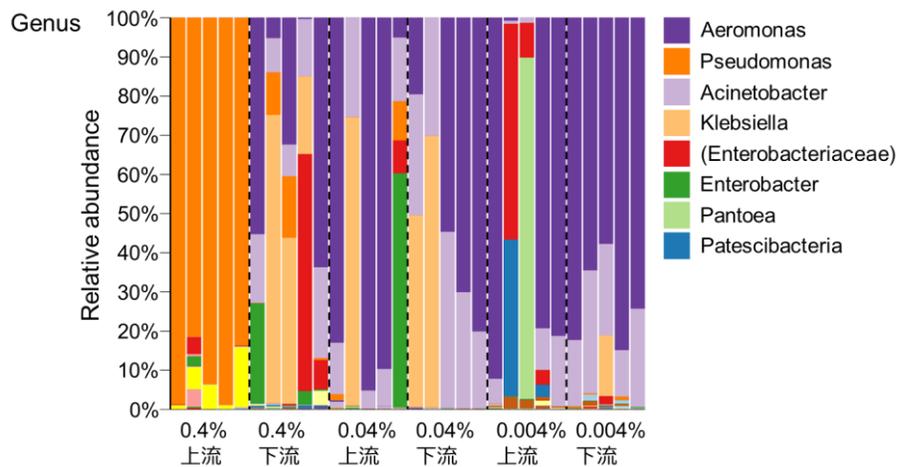
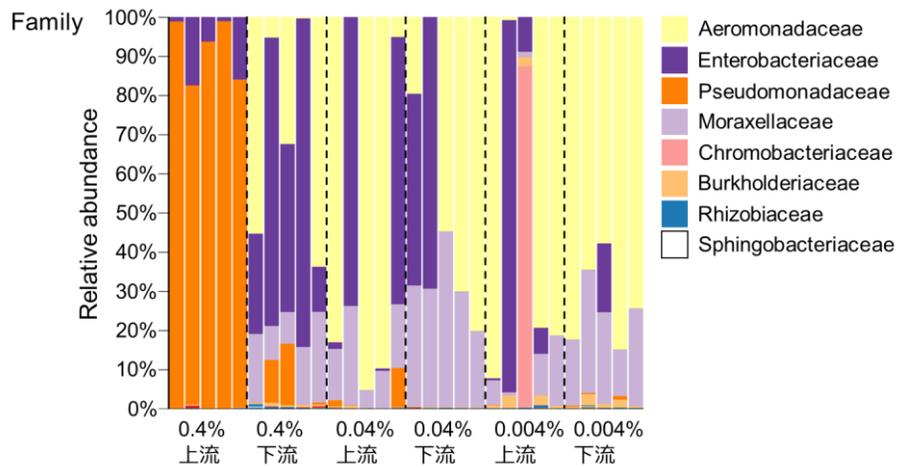
多摩川での実験は上流と下流で環境が大きく異なることを示し、上流では下流よりも細菌群集が偶発的であることを示唆した。次のステップとして、環境と偶発性の因果関係を調べるために、実験室で上流と下流の細菌群集に対して培養栄養濃度を変えた実験を行った (Fig 10A)。栄養濃度として炭素源の濃度を変え、細菌構成を測定した (Fig 11)。上流細菌群集では、低濃度培地よりも高濃度培地で群集形成が決定論的になった。

一方で下流細菌群集では、逆の結果となった (Fig 10B)。上流細菌群集も下流細菌群集も濁度は、貧栄養状態であるグルコース濃度 0.004% 培地では濁度測定器の測定限界値に近かった (Fig 12)。上流細菌群集の富栄養状態であるグルコース濃度 0.4% 培地ではどの試験管でも *Pseudomonas* 属が支配的になった。一方で上流細菌群集の貧栄養条件であるグルコース濃度 0.004% では *Aeromonas* 属、Enterobacteriaceae 科の細菌、*Patescibacteria* 属、*Pantoea* 属が支配的になった試験管が確率的に出現した。下流細菌群集は富栄養状態では *Aeromonas* 属、*Klebsiella* 属、Enterobacteriaceae 科の細菌が互いに排他的に支配的であったが、貧栄養状態ではどの試験管でも *Aeromonas* 属が支配的であった。富栄養状態でも貧栄養状態でも下流細菌群集では *Acinetobacter* 属がある程度の相対量を示していた。



**Fig 10** *ex situ* での細菌群集の偶発性 (A) 地点 2 から採取した上流細菌群集と地点 8 から採取した下流細菌群集をグルコース濃度 0.4%、0.04%、0.004% で 5 本ずつ培養した。(B) 炭素濃度が変わっている。





**Fig 11** 各系統レベルでの *ex situ* 細菌構成 上流と下流から採取した細菌群集を 0.4%、0.04%、0.004%グルコース濃度で 5 本ずつ培養した。

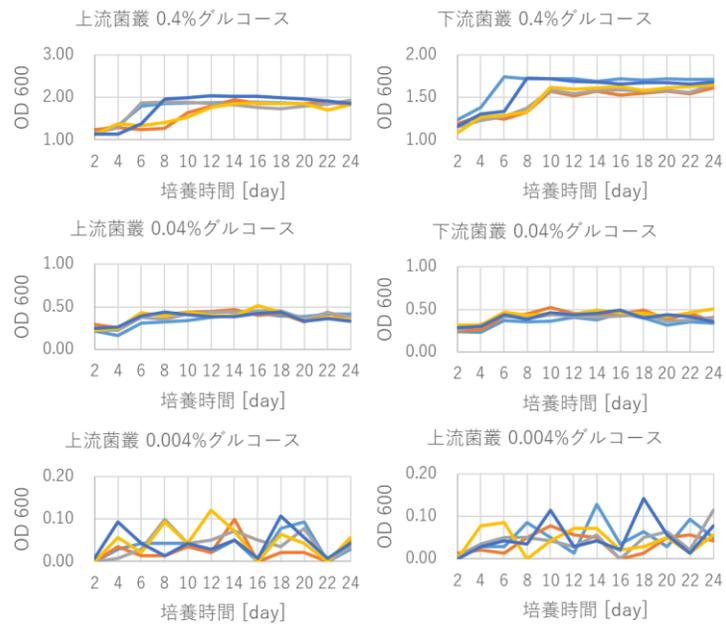


Fig 12 ex situ 実験での細菌濁度

## 第四章 考察

本研究では *in silico*、*in situ*、*ex situ* の実験を通じて、多摩川の細菌群集の偶発性が生じる条件を解明した。*in silico* 実験では必須共生細菌の存在が偶発性を生じさせること、そして細菌群集を構成する種数が多くなると偶発性が生じることを示した。*in situ* 実験では排水処理水が加わることで環境が劇的に変化する多摩川で、環境変化後に細菌群集が決定論的に形成されていることを確認した。*ex situ* 実験では、その多摩川の上流と下流の細菌群集は栄養濃度が低い環境と高い環境にそれぞれ適応していると仮定し、その適応外の環境において細菌群集が決定論的に形成されていることを確認した。有機物が豊富な河口や港の堆積物にいる細菌群集と、有機物が貧しい浜辺の堆積物にいる細菌群集を比較し、有機物が豊富な環境の細菌群集の方がその処理能力に優れていることが *in situ* と *ex situ* 実験を組み合わせて確かめられており(16)、この仮定は妥当であると考えている。

多摩川の細菌群集を用いて *in situ* と *ex situ* 実験で群集にとって適応外の環境変化が群集形成を決定論的にするというを示唆したが、腸内の細菌群集でも同様の偶発性があるかもしれない。高脂肪食に適応した *Lactococcus* 属の細菌が、高脂肪食を与えられたマウスの腸内で増殖し主要な細菌の1つになっており、低脂肪食を与えられたマウスと比べ細菌群集の形成が決定論的になっていることがメタ解析で確かめられている(1)。我々の *ex situ* 結果では、上流細菌群集を富栄養環境で培養したときにどの試験管でも *Pseudomonas* 属が支配的になっている。下流細菌群集の富栄養環境での培養では *Pseudomonas* 属はどの試験管にも存在するがとてもマイナーであり、増殖競争に負けている。腸内では高脂肪食に相対的に高い適応力を示す細菌種が限られており、それが細菌群集の形成を決定論的にしたのかもしれない。他の細菌群集の偶発性研究としては、葉表面の細菌群集に対して実験室で同条件で複数培養し、*order* レベルや *species* レベルでは細菌構成が複製ごとに異なるが、*family* レベルでは細菌構成が複製ごとに似通っていたことが確認されている(2)。しかし、我々の多摩川細菌群集では、このような *family* レベルでの群集形成の決定論性は確認できなかった (Fig 11, Fig 13)。*phylum* や *class* レベルではそもそも、その細菌の種類数が少ないこともあり類似度はほぼ1で決定論的に

群集が定まっているが、order、family、genus レベルでは似た群集形成の偶発性傾向が確認できている。葉上と多摩川の細菌群集では各系統レベルでの機能の多様性に違いがあることが示唆され、より多様な環境での細菌群集を用いて実験するとともに、メタトランスクリプトーム解析をはじめとした機能面の解析も今後は進めていく必要がある。

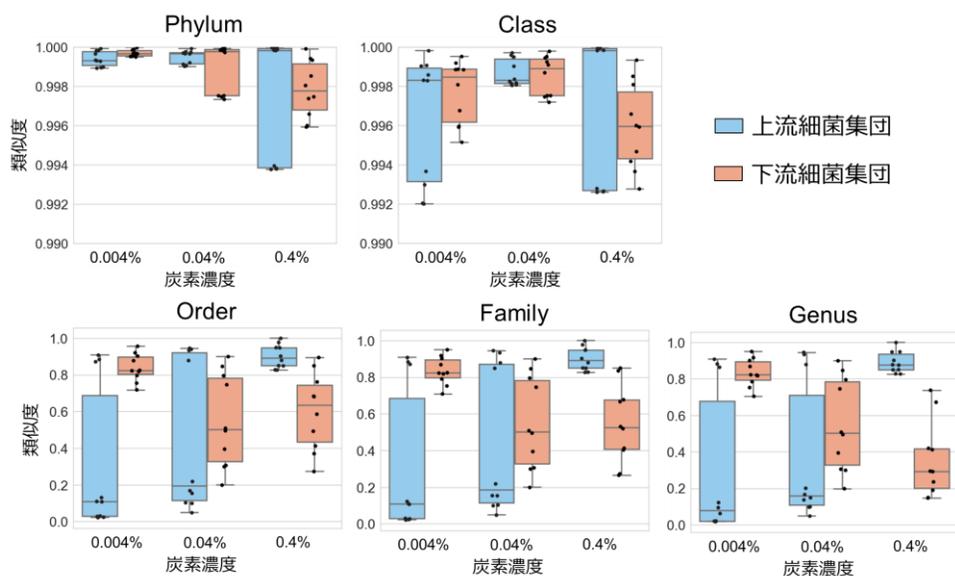


Fig 13 各系統レベルでの類似度 (ex situ)

## 第五章 成果のまとめ

### (1) 助成開始時には計画していたが、実施・実現できなかったこと

もともとは毎月多摩川の各地点の細菌群集を 16S rRNA 遺伝子解析によって調べ、集めたデータから微分方程式でできた数理モデルを構築し、細菌群集に及ぼす排水処理水や季節変動の影響を調べる予定であった。しかし、細菌群集から偶発的な挙動を見出し、偶発性の度合いが強いと数理モデルを構築できないので、まずはその原理を研究し、数理モデルは構築できるのか目途を立てることとした。

その他に、多摩川のいくつかのサンプルに対して 16S rRNA 遺伝子解析だけでなくメタゲノムショットガン解析も行い遺伝子を測定する予定であったが、実施はしているところであるが助成期間内には間に合わなかった。

### (2) 今後に向けての課題

上流よりも排水処理水が加わった下流で細菌群集の偶発性の度合いは弱くなるので、下流の方がモデルによる予測をしやすく、排水の影響は解析しやすいことが示唆できた。よって、今後は細菌群集のデータをより集め、数理モデルを構築することが課題となる。しかし、細菌ベースで考えると、今回提案したように偶発性の影響が出る可能性がある。そこで、メタトランスクリプトーム解析のように機能面を測定し、偶発性を受けにくい機能ベースのモデルを構築する必要もあるかもしれない。

2019 年 10 月の台風による影響で、多摩川の地形は大きく変化した。これが細菌群集にもどのような影響を及ぼしたのか調べる必要がある。この前後の記録はとっているもので、この報告書には間に合わなかったが、採取したサンプルの解析を進める予定である。

### (3) 調査研究・活動の結果が、どのように社会に還元（活用）されるか

排水処理水の混入前の上流と混入後の下流の細菌群集を比較していった結果、排水処理場由来の細菌種が新たに多数混入するということは確認できなかった。排水処理場の殺菌がしっかりと機能していることが分かった（雨量が多いと排水が垂れ流しにな

り、多摩川はその状況では水量多いから問題ないが、東京湾で問題となる)。一方で、窒素・硫黄・リンの成分は排水処理水混入後に劇的に増加しており、微生物によって異臭や濁りを引き起こす可能性はある。

2019年10月の台風で多摩川の岸の地形は大きく変化した。その他にも河川沿いでは多くの工事がされている。こういった自然災害や人間活動の影響を評価するために、まず影響を受けるであろう細菌群集の現時点の記録をとっていることは有意義である。

#### **(4) 成果公表**

(発表会)

1. 「環境適応が生み出す細菌コミュニティの偶発性」、西田暁史・中川麻悠子・山村雅幸、第9回日本生物物理学会関東支部会、2020年3月、理化学研究所 和光研究所
2. ”Contingency of bacterial community”, A. Nishida, M. Nakagawa, M. Yamamura, The 5<sup>th</sup> Annual Meeting of Living Systems Design Research, March 2020, OIST (紙面開催)

## 謝辞

早稲田大学の木賀大介教授には数理モデルに関してご意見をいただきました。また、東京工業大学の中川麻悠子博士には化学分析でお世話になりました。感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Bisanz JE, Upadhyay V, Turnbaugh JA, Ly K, Turnbaugh PJ. Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet. *Cell Host Microbe*. 2019;26(2):265-272.e4.
2. Goldford JE, Lu N, Bajić D, Estrela S, Tikhonov M, Sanchez-Gorostiaga A, et al. Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science* (80- ). 2018;361(6401):469–74.
3. Friedman J, Higgins LM, Gore J. Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms. *Nat Ecol Evol*. 2017;1(5):1–7.
4. Vega NM, Gore J. Stochastic assembly produces heterogeneous communities in the *Caenorhabditis elegans* intestine. *PLoS Biol*. 2017;15(3):1–20.
5. Hekstra DR, Leibler S. Contingency and statistical laws in replicate microbial closed ecosystems. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1164–73.
6. Allesina S, Tang S. Stability criteria for complex ecosystems. *Nature*. 2012 Feb 19;483(7388):205–8.
7. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science*. 2015 Nov 6;350(6261):663–6.
8. Oliphant K, Parreira VR, Cochrane K, Allen-Vercoe E. Drivers of human gut microbial community assembly: coadaptation, determinism and stochasticity. *ISME J*. 2019;13(12):3080–92.
9. Pande S, Kost C. Bacterial Unculturability and the Formation of Intercellular Metabolic Networks. *Trends Microbiol*. 2017 May;25(5):349–61.
10. Clifford RJ, Milillo M, Prestwood J, Quintero R, Zurawski D V., Kwak YI, et al.

- Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PLoS One*. 2012;7(11):7–12.
11. Nishida A, Thiel V, Nakagawa M, Ayukawa S, Yamamura M. Effect of light wavelength on hot spring microbial mat biodiversity. *PLoS One*. 2018;13(1):1–30.
  12. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852–7.
  13. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D590-6.
  14. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):814–21.
  15. [https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/Protocols/M9-medium\\_150510.pdf](https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/Protocols/M9-medium_150510.pdf).
  16. Fodelianakis S, Moustakas A, Papageorgiou N, Manoli O, Tsikopoulou I, Michoud G, et al. Modified niche optima and breadths explain the historical contingency of bacterial community responses to eutrophication in coastal sediments. *Mol Ecol*. 2017;26(7):2006–18.

多摩川の微生物生態系モデル構築による下水処理水の影響や季節変動の解析

(研究助成・学術研究 VOL. 49—NO. 349)

著 者 山村 雅幸

発行日 2020年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>