

システム論的アプローチによる複合微生物系の解析と制御

松本 慎也¹・常田 聡*

地球上のあらゆる場所に生息している細菌は極めて多様性の高い複合微生物系を形成しており、現在のところ分離培養されているものは全細菌種のうち1%以下であると考えられている。人為的に培養できなければその細菌の性質を調べることは不可能であり、したがって従来は複合微生物系の中身はブラックボックスとして扱われていた。しかし、1990年代以降の分子生物学的手法の発達により、培養を介さずに細菌の系統分類に基づいた群集構造解析や機能の推定が可能となった。上記手法が積極的に適用された結果、複合微生物系内では多種多様な細菌が相互に影響し合い、そこに存在する細菌の機能を単に足し合わせた以上の高次の機能を発揮していることが明らかになってきた。未培養細菌を含む複合微生物系の高次な機能をコントロール可能になれば、産業利用の観点からそのポテンシャルは計り知れない。しかしながら、複合微生物系の解析データを実際にバイオプロセスの管理に応用した例はほとんどない。その理由の一つとして、複雑多岐にわたる生態内の現象に対して、分子生物学的手法で得られる情報はいまだ限定されており、要素還元型の実験的アプローチのみでは複合微生物系全体の機能に結びつけることが困難なことが挙げられる。したがって、複合微生物系全体を一つの複雑なシステムとして捉え、分子生物学で得られたさまざまな情報をシミュレーションにより再構築し、複合微生物系の機能の全体像を明らかにするシステム論的アプローチが必要である。

自然科学の研究の発展は実験と理論の両輪に支えられてきた。そして、20世紀半ばのコンピューターの誕生以来、実験で測定することが難しい量の情報を得るため、あるいは理論的に手では解けない非線形問題などを解くために、多くの分野で実験・理論に次ぐ第3の手法としてシミュレーションが使われ始めた。たとえば、燃焼効率が低い航空機エンジンの設計のため、あるいは安全性の高い車体設計に向けた自動車の衝突解析のためのシミュレーションがある。また、大気中の二酸化炭素濃度の変化予測、あるいは銀河の生成・消滅に関するメカニ

ズム解明にもシミュレーションが使われている。前者では、実際に実験で検証するには大がかりな設備と膨大な費用がかかるためシミュレーションによる仮想実験で補完する。後者では現象が起こるのに時間がかかりすぎるものをシミュレーションによって理解している。さらに、シミュレーションには、出力結果を画像にすることで現象を可視化し、人間にとってわかりやすい状態にする、という利点もある。たとえば、シミュレーションおよびコンピューターグラフィックスソフトを用いて炎の温度分布や酵素の反応機構など、目では見えないものを可視化し新たな考察を行うことを可能にしている。

以上の点を鑑みると、複合微生物系解析でシミュレーションを行う意義は、①目では直接見えない複合微生物系内の微生物生態構造を可視化することで考察を行う、②大規模かつ長期運転を要する複合微生物系バイオリアクターの性能評価および処理能力を予測する、という2つが考えられる。本稿では、複合微生物系の一例としてバイオフィームを取り上げ、上記2つの意義を立証するシミュレーション研究を解説する。

バイオフィームシミュレーションモデル

Individual-based Model 筆者らは、複合微生物によって構成されるバイオフィームのシミュレーションを行うにあたり、Picioreanuら¹⁾が開発したIndividual-based Model (IbM)を使用した。IbMは、細菌をある一定の大きさを持つ粒子として表現した多次元モデルである。個々の粒子はMonod式によって増殖・死滅し、一定の大きさ(質量)に達したら分裂し、バイオフィームとして成長すると仮定している。モデルではバルク液、境膜、バイオフィームの3つの領域を定義している。バルク液の領域では完全混合と仮定しており、そのため各溶存物質は均一に分布している。境膜の領域はバイオフィーム表面から一定の厚み(100 μm)とし、物質移動は拡散のみと仮定している。バイオフィームの領域では細菌による基質の消費・生成のマスバランスを計算し、物質移動は拡散により起こると仮定している。以上のア

*著者紹介 早稲田大学理工学術院(教授) E-mail: stsuneda@waseda.jp

¹⁾日本学術振興会特別研究員

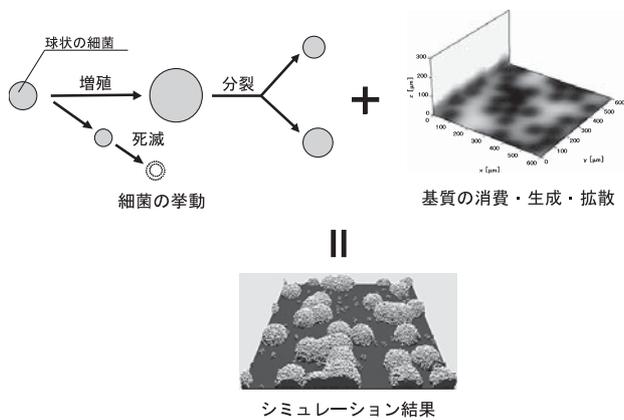


図1. バイオフィーム微生物生態構造を再現するシミュレーションアルゴリズムの概念図

ルゴリズムを経ることで一つのバイオフィームについてのシミュレーション結果が得られる(図1)。また、1個のバイオフィームの計算結果をリアクター内に存在するバイオフィームに拡張し、バルク液の基質濃度変化を計算している。筆者らは、IbMを窒素除去バイオフィームに適用し微生物生態構造の解析を行った。その結果、酸素濃度およびアンモニア酸化細菌(AOB)・亜硝酸酸化細菌(NOB)のプロファイルは実験結果と一致していることを明らかにし、IbMが実際のバイオフィームの微生物生態構造を再現可能であることを示した²⁾。

IbMには、細菌粒子の増殖や基質消費といった挙動が解析可能であること、およびボトムアップ方式で計算されるため自己組織的に細菌がニッチを形成する様子を再現可能であるという特徴がある。一例として、排水中のアンモニアの生物学的除去におけるバイオフィーム内の細菌の挙動について示す。一般的に生物学的アンモニア除去は、AOB・NOBによるアンモニア→亜硝酸→硝酸という酸化反応から始まる。図2に、ある設定でバルク液からアンモニアおよび酸素を基質として供給し、AOBおよびNOBを含めてシミュレーションを行った結果の例を示す。Aの部位に存在するNOBは、基質(亜硝酸)が近傍のAOBから供給されるため活性が高く、多くの硝酸を生成しており次第に増殖していく。一方、Bの部位に存在するNOBは、亜硝酸の供給を受けられないため活性が低く、したがって硝酸の生成量も少なく次第に死滅していく。この様に、シミュレーションでNOBのニッチ形成を観察することが可能である。さらにAOBは一般に数十 μm のクラスターを形成して存在

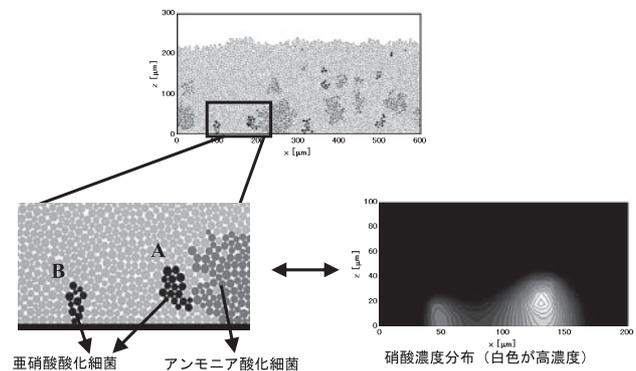


図2. 亜硝酸酸化細菌活性の分布

することが知られている³⁾。なぜAOBがこの様な形態のニッチを形成するかはいまだ明らかになっていないが、多次元バイオフィームモデルではこのクラスター形成を再現することが可能であることがわかった(図2)。以上のように、多次元のシミュレーションモデルを用いることでバイオフィーム内の微生物生態構造の可視化が可能になる。

「理解」を目指したシミュレーション

硝化グラニュール 一般的に排水中からの窒素の生物学的除去は、独立栄養細菌である硝化細菌(AOB・NOB)によるアンモニアから硝酸への酸化、その後の脱窒細菌による硝酸から窒素ガスへの還元の2段階反応によって達成される。しかしながら、硝化工程を担う硝化細菌は増殖速度が遅いため、滞留時間の短い活性汚泥法では十分な増殖ができず、硝化工程が律速となる。そこで、微生物固定化法として粒状のバイオフィームである硝化グラニュールがアンモニア含有無機排水からの効率的なアンモニア除去法として期待されている⁴⁾。生物学的排水処理プロセスでは、反応槽内の微生物量と処理速度は比例するので、グラニュールを用いることで処理速度を従来法に比べて大幅に向上させることが可能である(図3)。これまで、硝化グラニュール内の微生物生態構造に関する実験的解析が行われ、無機基質流入条件下で形成された硝化グラニュール内に、有機物を消費する従属栄養細菌も存在することがわかってきた⁵⁾。この硝化細菌と従属栄養細菌の共生の機構についての解析例を紹介する。

基質経路 これまでに、無機基質供給下における硝

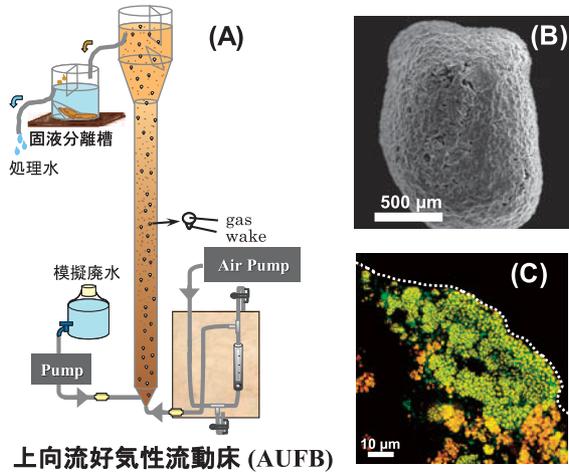


図3. (A) リアクター概略図, (B) 硝化グラニュールのSEM画像, (C) 硝化グラニュールの切片 (白色: AOB).

化細菌と従属栄養細菌との相互作用についていくつか報告例がある⁶⁻⁸⁾。硝化細菌は溶解性微生物代謝物 (SMP) を多く産出するといわれている⁶⁾。SMPは微生物の代謝に由来する有機物 (UAP) と菌体の死滅により放出される菌体成分に由来する有機物 (BAP) から構成されている。Okabeらはマイクロオートラジオグラフィ (micro-autoradiography) とFISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法とを組み合わせたMAR-FISH法を利用して、UAPは主に *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteoides* (CFB) が、BAPは主に *Chloroflexi* がそれぞれ優先的に利用すること、そして α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* は酢酸やアミノ酸などの低分子の有機物 (Org) を利用すると報告している⁸⁾。

シミュレーション結果と実験結果の比較 シミュレーションでは、図4のように基質の流れを仮定し、UAP, BAP, Orgを消費する細菌をそれぞれHetU, HetB, HetOと定義した。それぞれの細菌分布のシミュレーション結果を図5に示す (この図では粒状グラニュールの断面における各細菌分布量を色の違いで表現している)。HetUは、硝化細菌によってUAPが産出されるグラニュール表面に主に存在している (図5a)。HetBは、酸素の枯渇のために死滅菌体が多く、したがってBAPが多く放出されているグラニュール内部に主に存在している (図5b)。HetOは、分解されてOrgとなるEPS (extracellular polymeric substance) がグラニュール全体に広く分布しているため、グラニュール全体に存

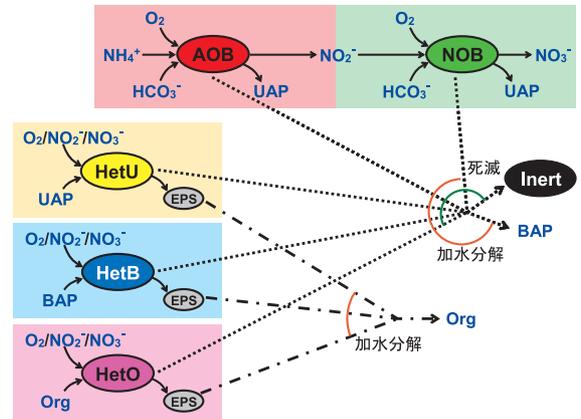


図4. 硝化グラニュールモデルに組み込んだ基質経路

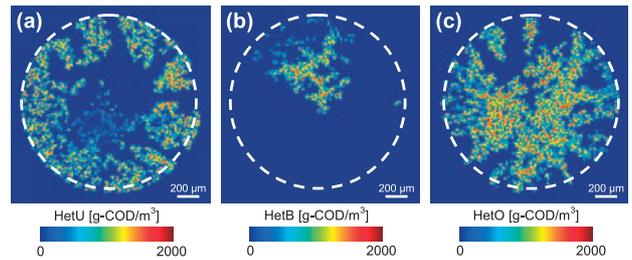


図5. グラニュール内における従属栄養細菌の空間分布のシミュレーション結果. (a) HetU, (b) HetB, (c) HetO.

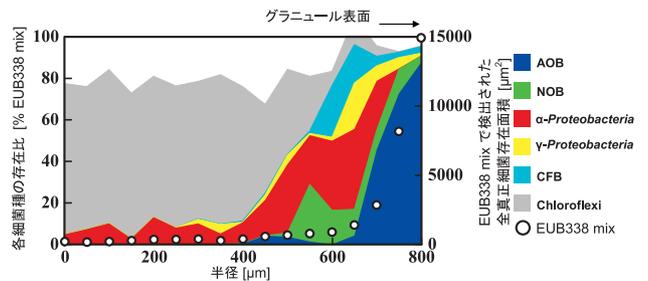


図6. FISH法によるグラニュール内微生物空間分布の測定結果

在している (図5c)。

一方、実験的アプローチとして、硝化グラニュール内の各細菌の空間分布をFISH法により測定した (図6)。グラニュール表面に存在する細菌のほとんどは硝化細菌であり、AOBがグラニュール表面から200 μ mまで、NOBはグラニュール表面から200~300 μ mで割合が高かった。CFBは硝化細菌の多いグラニュール表面に、*Chloroflexi*はグラニュール内部に多く存在した。

*Proteobacteria*はグラニュール全体に存在した。

シミュレーションおよび実験によって得られた各細菌種の空間分布を比較すると、HetUはCFBに、HetBは*Chloroflexi*に、HetOは*Proteobacteria*にそれぞれ相当することがわかる。各細菌の基質消費特性は前出の既往の報告とよく合致し、シミュレーションで仮定した基質の流れも結果として正しかったと言える。以上のように、シミュレーション結果と実験結果との比較から、硝化グラニュール内での硝化細菌と従属栄養細菌の共生の機構が細菌・基質のレベルで明らかになった⁹⁾。

「予測」を目指したシミュレーション

好気性グラニュール 半回分式反応槽内で有機物・窒素・リン同時除去を行う好気性グラニュールを対象とした解析例を紹介する。本処理法では、単一槽内で嫌気・好気・無酸素条件を逐次的に与えるという操作を行う。このとき、嫌気条件で摂取し蓄積した炭素源を、無酸素条件での脱窒とリン取り込みに重複して使えるという特徴を持つ脱窒性リン蓄積細菌(DNPAOs, denitrifying polyphosphate accumulating organisms)の性質を利用する(図7)。筆者らは、微小電極によるグラニュール内部の酸素、亜硝酸、硝酸濃度の測定、およびFISH法によるグラニュール内部の微生物空間分布の解析を行った。その結果、グラニュール表面に硝化細菌が、グラニュール内部の無酸素部位にDNPAOsが存在する微生物生態構造により、好気条件下における硝化、脱窒の同時反応およびリン除去が達成されていることを明らかにした¹⁰⁾。しかしながら、好気条件下で硝化細菌がDNPAOsとの酸素を巡る競合に敗れてアンモニア処理が悪化するため、微生物生態構造を維持したまま長期安定的に処理を行うことは困難であった。そこでシミュ

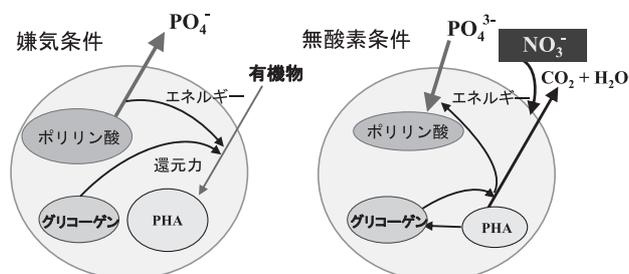


図7. DNPAOによる有機物・窒素・リンの代謝イメージ

レーションにより微生物生態構造を考慮しつつ、リアクター操作条件、特に酸素濃度を変化させた際の処理効率の予測を行い最適操作条件の探索を行った。

リアクター最適操作条件の探索 微生物生態構造を保つには、アンモニア処理が悪化しないように硝化細菌に十分に酸素を供給することが必要である。そこで、シミュレーションでは1サイクル(嫌気・好気・無酸素工程)の運転終了時にアンモニア除去率が90%を下回っていたら次回以降のサイクルでの好気条件での酸素濃度を1.1倍上昇させるというフィードバック条件でシミュレーションを行った。その結果、100日間にわたって安定的に処理が行われることを明らかにした(図8)。また、このときの微生物生態構造も適切に保たれていることがわかった。以上はあくまでシミュレーションの結果であり実際のリアクターで実現性を確認する必要があるが、シミュレーションがバイオフィルムリアクターの処理能力予測に適用可能であることを示す好例である。

シミュレーションを用いたシステム論的アプローチにおいては、図9に示すようなモデルの構築・理論および仮説の検証・実験データの取得というサイクルを、測定技術・分子生物学・計算機科学など複数の分野のテクニックを駆使して実行していく必要がある。ここで注意しな

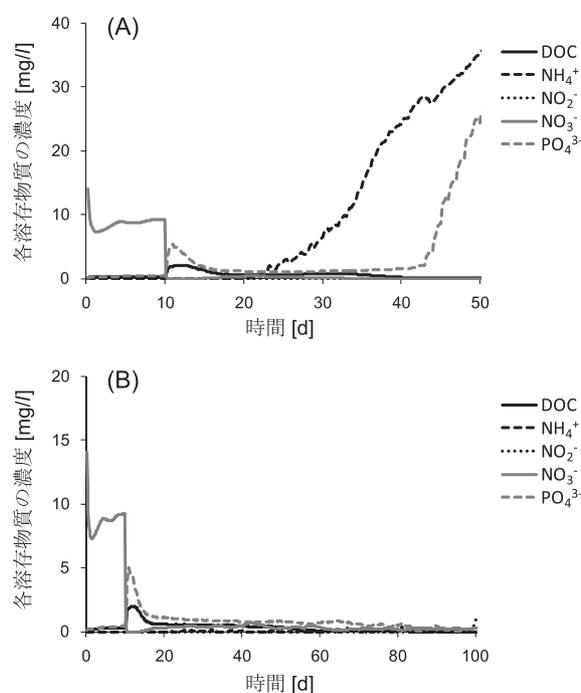


図8. シミュレーションによる処理予測。(A) フィードバックなし(B) フィードバックあり(DOC: 溶存有機炭素)。

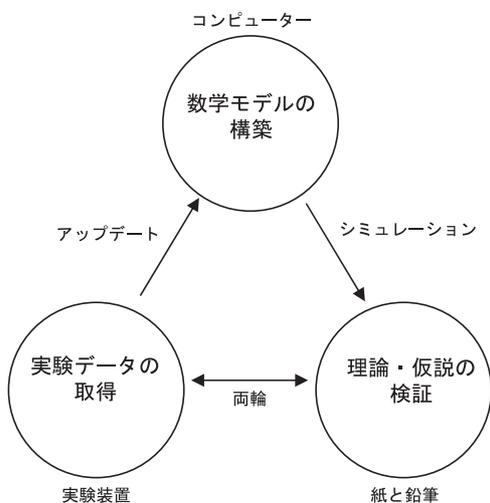


図9. シミュレーションを用いたバイオフィルム解析の研究サイクル

なければならないのは、シミュレーションはそれによって対象がすべて理解できるというような万能な技術ではなく、あくまで一つの方法論であるということである。しかし、複雑なシステムの挙動解析にシミュレーションが不可欠であることは、エンジニアリング分野においてシステム設計をする場合に、必ずシミュレーションを用い

ることからも明らかである。生物学の分野ではシミュレーションに対する懐疑的な見方もあるが、シミュレーションは生物学の仮説を証明するための方法論であり、その適用範囲および利点を認識する必要がある。これまで開発されてきた分子生物学的手法と同様に、シミュレーションを用いた研究アプローチが今後普及することで、複雑な複合微生物系の理解に基づいた制御技術に応用されることが期待される。

文 献

- 1) Picioreanu, C. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3024 (2004).
- 2) Matsumoto, S. et al.: *Water Sci. Technol.*, **55**(8-9), 283 (2007).
- 3) Okabe, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3182 (1999).
- 4) Tsuneda, S. et al.: *Water Res.*, **37**, 4965 (2003).
- 5) Matsumoto, S. et al.: *Microbes Environ.*, **25**, 164 (2010).
- 6) Rittmann, B. E. et al.: *Water Sci. Technol.*, **30**(6), 1 (1994).
- 7) Kindaichi, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1641 (2004).
- 8) Okabe, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3987 (2005).
- 9) Matsumoto, S. et al.: *Environ. Microbiol.*, **12**, 192 (2010).
- 10) Kishida, N. et al.: *Water Res.*, **40**, 2303 (2006).