

論文の内容の要旨

論文題目 PCR-DGGE 法を中心とする微生物群集解析手法を用いた生物学的リン除去を担う微生物の検索

氏名

小貫 元治

標準活性汚泥法の前段に嫌気プロセスを設け、汚泥を嫌気工程と好気工程の間で循環させる（嫌気好気活性汚泥法）と、排水中のリンをポリリン酸の形で菌体内に蓄積する微生物（ポリリン酸蓄積菌: Polyphosphate accumulating organisms (PAOs)) が集積することが知られている。こうしてリンを蓄積した微生物を余剰汚泥として引き抜くと、排水からリンを除去することが可能であり、嫌気好気活性汚泥法は生物学的リン除去プロセス (enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process) として提唱されている。湖沼や内湾など閉鎖性水域の富栄養化が問題となり、下水処理における栄養塩除去の必要性が叫ばれるようになって久しい今日、嫌気好気活性汚泥法は、リン・有機物の同時除去が可能な生物学的プロセスとして期待されている。すでに、都市下水処理場にも適用され、嫌気好気活性汚泥法は、今や実用段階に入っている。

しかし、多くの研究者の長年にわたる研究にもかかわらず、実際にリン除去を担っているポリリン酸蓄積微生物(本論文では脱リン菌と呼ぶ)はいまだに単離も同定もされていない。生物学的リン除去プロセスは、工学的に実用化されてはいるものの、最も基礎的な知見を欠いていると言わざるを得ない。このため、今日でも、脱リン菌の同定は重要課題である。脱リン菌が同定され、嫌気好気活性汚泥微生物群集が詳細に解明されれば、生物学的リン除去のメカニズムを、個々の微生物群の機能やそれらの間の相互作用として記述す

ることが可能となり、より精密な数学的モデルの構築や、より高度でより安定した運転法の開発につながると期待できる。

近年は、分子生物学的知見に基づく微生物群集解析手法が導入され、脱リン菌の探索も急速に進みつつある。現在は、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属が脱リン菌の有望な 1 候補として受け入れられつつある。そこで本研究ではまず、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属が本当に脱リン菌であるのか確かめることを目的とした。

研究者によっては、脱リン菌の同定は *Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属で完結したとみる向きもある。しかし、これまで *Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属の優占が確認されたのは、酢酸が主要な炭素源のときのみである。実下水は、様々な物質を含んでおり、酢酸が主要な炭素源であるとは限らない。酢酸以外の様々な基質を利用してリン除去をおこなう脱リン菌が、存在する可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属以外の脱リン菌が存在しないのか確かめることを第二の目的とした。このため、酢酸利用性にこだわらず、嫌気条件下で有機物を摂取できるという条件で、幅広く脱リン菌を検索した。

本研究ではまず、上記目的を達成するため、PCR-DGGE-シーケンシング法によって、嫌気好気活性汚泥の起ち上げ期の群集解析をおこなうことを提案した。PCR-DGGE 法は、微生物群集の各構成微生物種をゲル上のバンドとして可視化する。一度に多量のサンプルを扱うことができ、時系列サンプルを扱えば、各微生物（遺伝子型）の挙動が、分離されたバンドの挙動として表される。嫌気好気活性汚泥の起ち上げ期の群集を解析すれば、生物学的リン除去活性の発現とともに増殖した微生物（の遺伝子型）が特定できる。これにより、脱リン菌を推定することが可能となる。さらに、脱リン菌と推定された遺伝子型をもつ微生物が、実際にリンを蓄積していることを確認するため、FISH 法とリン染色法により、同一微生物を *in situ* で染色する手法を開発した。

PCR-DGGE 法により生物学的リン除去活性が発現していく過程の群集解析をおこなうためには、汚泥の運転状況を詳細に把握する必要がある。また、多種の非脱リン菌微生物が存在すると、PCR-DGGE 法を用いても、脱リン菌の推定が困難になる。以上のような観点から、本研究では、実験室スケールのリアクターで、単一基質を用いて嫌気好気活性汚泥を馴養し、その群集を解析した。幅広く脱リン菌を検索するため、これを様々な基質について繰り返した。こうした方法に基づいて、6 つの Run を運転し、以下のような結論を得た。

まず、酢酸を唯一の炭素源として嫌気好気活性汚泥を馴養したところ(Run1)、良好な生物学的リン除去が発現し、これを担う脱リン菌は PCR-DGGE 法から *Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属であることが示された。酢酸を基質として嫌気好気活性汚泥を馴養すると、東

京の都市下水処理場の汚泥を種汚泥として用いた場合も、スイスやオーストラリアの例同様 *Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属が生物学的リン除去を担うことが確認された。

また、生物学的リン除去活性が発現していく過程で、PCR-DGGE-シーケンシング法により群集をモニタリングすることは、脱リン菌の探索に有効であることが示された。

さらに、DAPI によるリン染色法と FISH 法により同一視野を染色する方法を開発したことにより、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属が実際にリンを蓄積していることを確認するのに成功した。

Run1 から、酢酸を主な炭素源として嫌気好気活性汚泥を馴養した場合、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属が生物学的リン除去を担うことがはっきりした。しかし、酢酸含有量が小さい下水を処理している嫌気好気活性汚泥も考えられるし、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属以外の脱リン菌が存在しないとは言いきれない。むしろ筆者らは、酢酸以外の基質を利用してリン除去を行う新たな脱リン菌が存在する方がむしろ自然であると考えている。そこで Run2 以降は、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属以外の脱リン菌探しを主眼とした。

まず、酢酸と同じ短鎖脂肪酸で、酢酸よりひとつ炭素鎖が長いプロピオン酸を唯一の炭素源として嫌気好気活性汚泥を馴養した (Run2)。生物学的リン除去活性は、一月弱維持された後失われた (原因は不明) ので、脱リン菌を示すバンドのみが顕著になる状態にはいたらなかった。しかし生物学的リン除去が良好だった期間は、明らかに *Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属によるバンドがはっきりしていることが確認された。FISH 法でも、この期間に *Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属が多数観察されたことから、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属はプロピオン酸を代謝して、リン除去を行う能力ももつことが示唆された。しかし、1 月ほどでリン除去が悪化した理由は不明であり、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属によるバンド以外のバンドの役割も不明である。さらなる研究、追試が必要である。

次にアミノ酸に注目し、中でも、グルタミン酸を用いて嫌気好気活性汚泥を馴養した (Run3、4、6)。すると、Run6 では良好な生物学的リン除去が発現した。この過程で一貫してバンド強度が大きくなっていったバンドは、緑色非硫黄細菌に近い配列をもつものと、*Proteobacteria* β subdivision に属する *Acidovorax* 属と近縁な配列をもつものであった。どちらも、データベース上の既知配列との相同性が、最も高いもので 90%程度だったので、新規の属である可能性が高い。一方 Run3、4 においては、生物学的リン除去は全く発現しなかった。Run6 のバンドから得られた *Acidovorax* 属に近縁な配列をもつバンドが Run4 でも同様に優占したので、Run6 のみで優占した緑色非硫黄細菌に近い配列をもつバンドが脱リン菌を示していることが示唆された。ここに、*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属以外の脱リン菌が存在し、活発に活動している可能性が強く示された。生物学的リン除去のメカニズムを微生物種ごとの機能や相互作用として理解していくためには、*Rhodocyclus* 近縁脱リ

ン菌候補属以外の脱リン菌も考慮する必要がある。

Run3、4 と Run6 とでは、種汚泥として用いた汚泥が異なっており、緑色非硫黄細菌に近い配列のバンドは、運転初期から認められたため、生物学的リン除去の善し悪しを分けたのは、種汚泥による違いであると推測された。

Run6 の 54 日目のサンプルは、さらにクローニング法により解析し、上述の 2 本のバンドによって表される微生物の 16SrDNA ほぼ全長の配列を得た。この配列を用いれば、これらの配列を特異的に検出する遺伝子プローブの設計が可能である。本研究で確立した、リン染色法と FISH 法による同一視野の染色に、このプローブを用いれば、上記の配列をもつ微生物が脱リン菌であるかどうか確認できる。早急な研究が必要である。

以上、本研究の大きな成果のひとつは、新規の脱リン菌候補もしくは、生物学的リン除去プロセスで重要な役割を担っている新しい微生物を検出したことである。*Rhodocyclus* 近縁脱リン菌候補属一辺倒に傾きつつある、脱リン菌像の見直しを迫る可能性を秘めた発見である。この新しい微生物が本当に脱リン菌なのか、すなわち典型的な生物学的リン除去代謝を示すのか早急に調べる必要があるが、今後も様々な脱リン菌を広く検索して行く必要がある。さらに、それぞれの脱リン菌のリン除去への寄与率を調べ、脱リン菌の全体像を明らかにしていく必要がある。