

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏名 中村浩平

指導教官 五十嵐泰夫

研究題目

生ゴミ分解処理過程における複雑微生物系の構造と機能に関する研究

一般家庭やレストランなどの外食産業から排出される生ゴミ(厨芥残渣)は現在焼却や埋め立てといった方法で処理されている。しかし、こうした処理によって様々な環境への負荷が生じている。こうした中、微生物による生ゴミの分解・減量処理や有用物質の生産が再び注目されている。微生物による生ゴミ処理(または有用物質生産)の効率性向上には、複数の微生物種からなる微生物群集を用いることが有効と考えられる。また効率性向上技術の確立には、処理過程における微生物群集の構造とその機能との関係を明らかにする必要があると考えられる。微生物群集による生ゴミなどの有機性固形廃棄物の分解(減量・堆肥化)処理は古くから行われており、その処理過程における群集構造の変遷や微生物種の多様性に関する多くの報告がなされている。しかし、これらの報告に対し、微生物群集の構造と機能を関連付ける研究はほとんどなされていない。

本研究では、(1) 生ゴミ分解処理過程における生ゴミ処理物の物理化学的性状及び分解処理効率を解析し、(2) 生ゴミ分解処理過程における微生物群集遷移を、異なる原理を有する解析手法を用いて多面的解析を行い、(3) 分解処理過程に優占種として検出された *Bacillus licheniformis* 様の細菌、BLx 株の単離を行いその諸性質を明らかとし、(4) BLx 株を含む微生物群集中優占種の分解処理過程における機能について解析を行うことで、生ゴミ分解処

理過程における微生物群集の構造と機能に関する知見を得ることを目的とした。

(1) 生ゴミ分解処理過程における処理物の物理化学的性状並びに分解処理効率

実験室規模の生ゴミ分解処理槽(容量約 30L)に水分調節材としておが屑を添加し、標準生ゴミを毎日約 1kg 添加した。生ゴミ分解処理物の水分が 40%程度になるよう処理槽への空気流入量を制御し、6 週間の分解処理を行った。処理過程中処理物の温度は生ゴミの投入によって 1 日のうちにおよそ 35 から 55°C まで変化した。処理開始 1 週間で処理物の pH は弱酸性から弱アルカリ性に推移し、第 3 週目には中性となり以降第 5 週目まで続いた。処理物が弱アルカリ性を示す間は、より高いアンモニア生成が検出された。平均分解処理効率(乾重当り)は、処理開始第 2 週目では 80%であったが、以降徐々に減少し第 5 週目では 44%となった。第 5 週目では未分解の生ゴミが目立ち、処理物が塊状になっていた。処理物の成分分析の結果、第 4 週目以降のもので粗タンパク質及び炭水化物含量が増加していた。処理開始 36 日目に処理物の一部を抜取り、新しいおが屑を添加し更に 1 週間の運転を続けた。第 6 週目の処理物 pH は弱アルカリ性になり、平均分解処理効率は 85%に回復した。

(2) 生ゴミ分解処理過程における微生物群集構造の多面的解析

微生物群集構造の解析手法にはそれらの基づく原理によってそれぞれ欠点が生じる。そのため、複数の原理の異なる解析手法によってそれぞれの持つ欠点を補完する多面的解析が群集構造の解析には必要である。そこで、異なる原理を有する手法で生ゴミ分解処理過程における微生物群集構造の解析を行った。細菌の 16S rDNA 内 V3 領域を標的とした PCR-DGGE 解析の結果、処理開始 2 週間内に検出される主要なバンドは Gram 陽性 LowG+C 細菌由来であり、以降これらに加え Gram 陽性 HighG+C 細菌由来であった。Quinone profile 解析の結果は PCR-DGGE 解析で得られたものとはほぼ合致した。しかし、Quinone profile 解析ではユビキノロンが処理過程を通じて検出されたことから、PCR-DGGE 法では処理開始直後にしか検出されなかった *Proteobacteria* が処理過程を通じて存在していることが示唆された。更に Community-level physiological profile(CLPP)解析によって、微生物群集が基質代謝レベルで遷移していることが明らかとなった。特にアミノ酸の資化能が群集の遷移を特徴付けており、アンモニア産生が減り、粗たんぱく質含量が増加した処理開始第 4 から 5 週目では、微生物群集のアミノ酸資化能が低いことが示唆された。

PCR-DGGE 解析によって、処理開始 2 週間以内に検出される主要なバンドのひとつとし

て *Bacillus licheniformis* と高い相同性(96%)を示すバンドが見出された。このバンドはこれまでの生ゴミ分解処理運転で再現的に検出されており、このバンドの遺伝子配列から設計した蛍光標識プローブを用いた Fluorescent *in situ* hybridization(FISH)解析の結果から生ゴミ処理物中細菌数の 30%を占める優占種として存在していることが明らかとなっていた。更にこのバンドにほぼ完全に一致する遺伝子配列が他の有機性廃棄物の処理過程からも検出されていた。これらの事実から、このバンドの起源となる *Bacillus licheniformis* 様細菌(BLx 株と命名)は有機性廃棄物処理過程に一般的に存在し重要な役割を担っていると考えられた。

(3) BLx 株の単離と諸性質の検討

BLx 株の生ゴミ分解処理過程における機能を解明する為、BLx 株の分離を試みた。高温(50°C前後)、アルカリ(pH8 前後)の生ゴミ処理物から寒天平板法で BLx 株の分離を行った。BLx 株特異的 primer を用いた特異的 PCR によってスクリーニングを行い、およそ 300 コロニーから 2 株の特異的 PCR 陽性株が得られた。FISH 解析では BLx 株は処理物中全細菌数の数十%を占める優占種として存在するものの、寒天平板上では非常に稀有であり、平板上には *B. thermoamylovorans* に近縁の細菌(BTa 株と命名)が優占種として存在していた。単離された BLx 株の系統遺伝学的、化学分類学的、生理・生化学的性状解析の結果、BLx 株は *Bacillaceae* 科の新属新種の細菌であることが明らかとなり、*Cerasibacillus quisquiliarum* strain BLx^T と提唱した。生ゴミ分解処理過程において BLx 株は優占種として存在することから、種々の基質に対して資化能・分解能が期待されたが、数種の糖および有機酸の資化能、ゼラチン分解能を有するのみであった。

(4) 生ゴミ分解処理過程における微生物群集内優占種の機能解析

生ゴミ中に含まれる不溶性(固体)基質を微生物が利用するには、菌体外に分泌する菌体外酵素(もしくは表面酵素)によって、細胞質膜を透過できる程度まで分解する必要がある。また、微生物による固体基質の分解・可溶化は生ゴミ分解処理には極めて重要な反応である。そこで、菌体外酵素産生能を持つ微生物群集内優占種(BLx 株及び BTa 株)の生ゴミ分解処理過程 on site での機能を解明することで、微生物群集の構造と機能の関連を考察した。

BLx 株は優占種として生ゴミ分解処理過程に存在しており、その諸性質からゼラチン分解能を有していることが明らかとなった。そこで BLx 株が生ゴミ分解処理過程でゼラチン分解酵素(ゼラチナーゼ)を産出しているかどうか検討した。処理過程における BLx 株の存在

率の変遷を定量的リアルタイム PCR 法で観察し、生ゴミ処理物中のゼラチナーゼ活性の変遷と比較した。その結果、BLx 株存在率の急激な増加に伴ってゼラチナーゼ活性が増加していた。更に活性染色法により、BLx 株培養上清から得られたゼラチナーゼ活性パターンと処理物中のゼラチナーゼ活性のパターンが類似していた。これらの結果から、BLx 株が処理過程でゼラチナーゼを産出していると考えられた。さらに BLx 株および処理物中のゼラチナーゼを部分精製し、N 末端アミノ酸配列を比較した。その結果、N 末端アミノ酸 19 残基が完全に一致していることが明らかとなった。これらの事実から BLx 株がゼラチナーゼを生ゴミ処理過程で産出しており、ゼラチン分解を担っていることが示された。

生ゴミ分解処理過程から分離された *Bacillus thermoamylovorans* に類縁の菌株、BTa 株はアミラーゼ活性を有していた。また BTa 株も優占種であることが FISH 解析で明らかとなった。そこで BTa 株が生ゴミ分解処理過程でアミラーゼを産出しているかどうか検討した。BLx 株と同様に、BTa 株の存在率の変遷を定量的リアルタイム PCR 法で観察し、生ゴミ処理物中のアミラーゼ活性の変遷と比較した。その結果、BTa 株はアミラーゼを生ゴミ処理過程で産出していないことが示唆された。

まとめ

分子生物学的手法が微生物生態学研究に導入されてから、これまでに培養法では見出されてこなかった様々な微生物種の存在が明らかとなってきた。しかし、環境試料中より微生物ゲノムを直接抽出し、16S rDNA 等を標的とした PCR を用いるこの手法には、様々なバイアスが生じることが明らかとなっている。その為、微生物群集の構造解析には、異なる解析原理に基づいた手法を複数用いる多面的解析が必要とされている。本研究においても、複数の解析手法によって微生物群集構造の遷移を明らかとした。群集構造の遷移は、生ゴミ分解処理物の物理化学的性状や分解処理効率との間に密接な関連があることが示唆された。また、分解処理過程で優占種として存在する BLx 株を分離し、新属新種の細菌であることを明らかにした。BLx 株のような細菌は、その寒天培地上での出現率の低さから、従来の培養法だけの解析ではその存在や重要性について明らかにされなかったと考えられた。更に本研究では微生物群集の構造と機能の関連を酵素レベルで明らかとするため、試験管内での性状から推定された群集中優占種の機能と群集中での機能の関連を解析した。本研究によって、微生物群集の構造と機能を関連付ける際、微生物の推定された機能が本当に現場で機能しているかどうかを考慮しなくてはならないことが示された。