

## 論文内容の要旨

論文題目 亜硝酸還元酵素遺伝子に着目した脱窒細菌解析手法の確立及び  
その活性汚泥微生物群集解析への適用  
(Development of Methodology for Denitrifying Bacterial  
Community Analysis Using Nitrite Reductase Gene (*nir*) and Its  
Application to Activated Sludge Systems)

氏名 新田見 匡

排水処理施設で多用される活性汚泥法では、微生物の硝化・脱窒という酸化還元反応を利用して、アンモニアを硝酸イオンから窒素へと変化させ、排水中の窒素分を大気中へと除去する。これまで様々な切り口で活性汚泥法に関する研究がなされてきたが、従来の研究の多くは、排水処理槽の運転条件と処理水質の相関にのみ目を向けたもので、処理槽内部の微生物について調べたものは少なかった。活性汚泥法が微生物による処理であり、処理槽内に生息している多種多様な微生物の代謝が処理性能を決定していることを考えれば、このような実状を無視した研究では得られる成果に限界があった。

しかし近年、分子生物学の発達により、微生物の持つ遺伝情報をもとに群集を解析する手法が開発され、活性汚泥のより詳細な微生物群集構造が報告されるようになった。そこで本研究では、これまで研究対象とされることが少なかった、窒素除去に関わる細菌グループである、脱窒細菌の群集構造の解析に着目した。

脱窒を行う細菌は系統的に多岐に分布している。1992年の調査では50属130種に属することが確認されている。この脱窒細菌の系統学的な多様性が、これまで研究対象とされなかった理由の一つであるといえる。従来の分子生物学的手法のほとんどが、16SrDNAを標的としたものであった。しかしrDNAを標的とした手法は、目的の機能が系統学上多岐に分布し、またその機能を同種内の数株のみが保有する、脱窒細菌のような微生物を解析する場合には不向きであった。

そこで脱窒細菌のような微生物を解析するにあたり、近年注目されるようになったのが、機能

遺伝子を標的とした分子生物学的手法である。脱窒細菌の解析においても、脱窒の酵素をコードする機能遺伝子の配列から、PCRのプライマーをデザインする研究が報告されるようになった。特に報告が多いのは、亜硝酸還元酵素(NIR)をコードする *nir* 遺伝子を標的としたものである。これは、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>をN<sub>2</sub>まで還元する一連の脱窒反応において、亜硝酸還元以降の生成物が気体となることから、溶存体の窒素を気体状の窒素に変換する工程を担う酵素として重要視されていることが一因であると言える。

亜硝酸還元酵素には、機能は同じだが構造の全く異なる2種類の酵素が存在する。1つは活性中心に銅をもつ *nirK* 遺伝子にコードされる酵素(Cu NIR)で、もう1つは活性中心にヘム鉄をもつ *nirS* 遺伝子にコードされる酵素(*cdh* NIR)である。脱窒細菌は、これら2種類の酵素のいずれか一方のみを保有するとされ、遺伝子も細菌のゲノム中にはどちらか1つしか見つかっていない。

そこで本研究では、この *nirK*, *nirS* 遺伝子を解析することで、排水処理を担う活性汚泥中の脱窒細菌群集を解析しようと考えた。処理槽内に存在する脱窒細菌グループはそれぞれ、排水中のどの基質を電子受容体、または電子供与体として利用しているのかを詳細に解明することを目的とした。また微生物群集の解析には、群集構造の変化をバンドパターンの変化として観察できる、簡便な動態解析手法である DGGE 法と T-RFLP 法の適用を考え、手法を確立することとした。

まず DGGE 法を検討した。Braker *et al.*がデザインした、*nir* 遺伝子を増幅するプライマーセットを使い、純菌株相手に実験を行った。その結果、*nirK* 遺伝子を標的とした DGGE から、バンドの変遷を解析できるような、鮮明なパターンを得ることができなかった。一方 *nirS* 遺伝子を標的とした実験では、バンドパターンは鮮明であったが、Braker *et al.*のプライマーをそのまま適用すると、プライマーの混合塩基配列に由来した、多数の非特異バンドを検出してしまふことが分かった。そこで混合塩基配列部分で場合分けを行い、混合塩基配列を含まない単一の塩基配列を持つ24通りのプライマーセットとして適用した。次に T-RFLP 法を検討した。*nir* を標的とした T-RFLP 法には既存の研究があったため、その実験条件を参考にして、純菌株相手に実験を行ったところ、両 *nir* 遺伝子を解析することができた。

以上、*nirS* 遺伝子に対しては DGGE 法と T-RFLP 法、*nirK* 遺伝子に対しては、T-RFLP 法を確立することができた。そこで確立した手法で活性汚泥中の脱窒細菌群集を解析することとした。

最初に解析対象とした活性汚泥は、製鉄所排水(安水)を処理する活性汚泥であった。この汚泥の解析は、新日鐵(株)との共同研究の一環であった。共同研究では、パイロットプラント(以下 PP とする)、およびミニプラント(以下 MP とする)という、硝化脱窒型活性汚泥法を採用した2機のプラントを立ち上げた。PP は実際の安水を処理し、安定した窒素除去を続けた。一方 MP は人工安水を処理し、途中人工安水の組成を変化させ、窒素除去能を変化させた。PP および MP の活性汚泥解析における目的は、安水という特殊な排水処理系に存在する *nir* 遺伝子を把握すると共に、安水中の特殊な基質(フェノール、チオシアン、チオ硫酸)と各 *nir* 遺伝子との因果関係を示すことであった。PP の解析は *nirS* 遺伝子を標的とした DGGE 法で行い、MP の解析

は *nirS* 遺伝子を標的とした DGGE 法と *nirK* 遺伝子を標的とした T-RFLP 法で行った。

PP の解析において、*nirS* 遺伝子を標的としたプライマー24 セットを適用したところ、*nirS* 遺伝子を増幅できたのは 8 セットのみであった。また 8 セットのうちの 2 セットを使用することで、8 セットで解析する遺伝子の 7 割近くを解析できることが分かった。安水処理系の *nirS* 遺伝子を保有する脱窒細菌群集は、下水処理系に比べ単純であることが予想できた。なお PP より検出した *nirS* 遺伝子(DGGE バンド)の中には、脱窒条件下でのみフェノールを分解する単離株について報告のある、*Azoarcus*, *Thauera* 属の *nirS* 遺伝子に近縁な配列が存在した。

MP の解析では、*nirS* 遺伝子だけでなく、T-RFLP 解析により *nirK* 遺伝子の挙動を追跡することができた。また cloning 法を併用することで、T-RFLP 法で挙動を追跡した遺伝子の塩基配列を推定することができた。そして MP においては、特定の電子供与体(基質)を一定期間添加しないことにより、*nirK*, *nirS* 遺伝子ともに、挙動に大きな変化が生じた。特に *nirS* 遺伝子の挙動は、各基質の添加条件に対応したものが多く、基質と遺伝子の因果関係を定性的に示す詳細な結果をまとめることができた。プラント内において、どの遺伝子(細菌)がどの基質を使って脱窒を行っているかを定性的にはあるが、詳細に記述することができた。

次に解析したのは、酢酸を主な電子供与体とした人工下水を処理する実験室規模の脱窒リアクター(NR1, NR2)の活性汚泥であった。PP および MP の解析では、電子供与体を変化させることで、電子供与体と遺伝子の挙動の関係について考察したが、NR1 および NR2 の解析では、電子受容体を変化させることで、電子受容体と遺伝子の挙動の関係について考察し、各遺伝子を電子受容体の利用特性に基づき分類することを目的とした。

2 台のリアクターにはまず、 $\text{NO}_3^-$  を脱窒の電子受容体として等量添加した。この間、両リアクターは同様の処理性能を示した。同条件での運転が安定した後、NR1 では、添加する電子供与体を  $\text{NO}_3^-$  から  $\text{NO}_2^-$  に切り替えた。一方 NR2 では、より高濃度の  $\text{NO}_3^-$  を添加したところ、系内に  $\text{NO}_2^-$  の蓄積が生じ、電子供与体として  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{NO}_2^-$  が共存する条件となった。NR1, NR2 の活性汚泥の解析には、*nirS* 遺伝子を標的とした DGGE 法、T-RFLP 法、cloning 法のほか、*nirK* 遺伝子を標的とした cloning 法、T-RFLP 法を適用した。また 16SrDNA を標的とした DGGE 法による解析も行った。

両リアクターの *nirS* 遺伝子解析において、DGGE 法と T-RFLP 法を併用した結果、T-RFLP 法は系統樹のクラスター単位での解析を行う際に有用であり、DGGE 法はクラスター内の個々の遺伝子解析において有用である結果が得られた。一方 *nirK* 遺伝子解析においては、T-RFLP 法による遺伝子単位での解析が可能であった。また 16SrDNA と *nir* 遺伝子の解析結果からは、*nir* の解析のほうが、群集構造の細部を解析できる可能性が示唆された。

両リアクターより検出した、16SrDNA および *nir* 遺伝子の挙動は、 $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  の変化と相関を示すものであった。その相関に基づいて遺伝子を分類した結果、 $\text{NO}_2^-$  利用能に優れた細菌由来の遺伝子の候補として、多数の配列情報を得ることができた。またその一部は *Thauera*, *Flavobacteria*, *Aquaspirillum* の細菌の遺伝子に近縁であることも分かった。

以上本研究では、脱窒細菌の機能遺伝子の挙動を基質の変化と比較し、基質と遺伝子の関係を

定性的に説明することができた。これは本研究で確立した *nir* 遺伝子を標的とした手法が有用であったことを示す結果であった。また各手法により検出した多くの遺伝子については、その塩基配列を解読した。しかしながら *nir* 遺伝子のデータベースの貧弱さにより、特徴的な挙動を示す遺伝子の配列の多くが、系統的な分類を予測できない情報となってしまった。*nir* 遺伝子の解析より得られた配列情報を有用なものとするためには、今後徹底的な脱窒細菌単離株の遺伝子配列の解読、およびデータベースの構築が今後の課題であると言える。