

## 論文内容の要旨

題目 活性汚泥中に存在するポリヒドロキシアルカン酸合成遺伝子  
(*phaC*)の多様性とその挙動  
(Diversity and behavior of polyhydroxyalkanoate (PHA)  
synthase gene (*phaC*) in activated sludge)

学籍番号 27628  
氏名 道中 敦子  
指導教官 味塙 俊教授

下水処理システムで活躍する複雑微生物群集(以下、活性汚泥)では、様々な微生物間で競争・共生が存在する。競争を勝ち抜く一つの戦略として摂取した炭素源を即座に繁殖に用いるのではなく、まず、エネルギー源として体内に蓄積する細菌の存在が明らかとなった。このような炭素蓄積機構は活性汚泥モデル ASM No.3 にも組み込まれており、ポリヒドロキシアルカン酸(以下、PHA)はその炭素蓄積物質の一つである。PHA 蓄積は、生物学的リン除去法で活躍するポリリン酸蓄積細菌、また、窒素除去に利用される細菌群にも報告されており、PHA は活性汚泥の炭素源代謝だけでなく、リン除去や脱窒にも深く関わっている。

一方で、廃棄プラスチックによる被害の深刻さが増す近年、PHA は生物分解性プラスチックの原料となることから注目され、現在では、活性汚泥から単離された *Wautersia eutropha* を用いた純菌培養による PHA 生産が工業化されている。また、PHA は構成するモノマーの組成によって異なる物性を持たせることができることから、様々なモノマーや共重合体の探索が試みられている。活性汚泥でのみ合成されるモノポリマーとして、3-ヒドロキシ-2-メチル吉草酸(3H2MV)や 3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸(3H2MB)が発見されており、活性汚泥には更なる新しい PHA 合成細菌、新しいモノポリマーが発見される可能性が期待されている。

このように、活性汚泥中の PHA 蓄積細菌は、廃水処理の面からも、廃棄物の新しい利用という面からも、非常に興味深い。しかしながら、活性汚泥中に存在する(または優占す

る)PHA 蓄積細菌は誰か、活性汚泥でのみ発見された 3H2MV や 3H2MB を含むポリマーを合成する PHA 蓄積細菌は誰か、またそれらのシステム内での挙動など、基礎的な情報すらわかっていない。そこで、本研究では活性汚泥中に存在する PHA 蓄積細菌の基礎的知見を得るために、PHA 合成のキーとなる酵素である PHA 合成酵素をコードする PHA 合成酵素機能遺伝子(*phaC*)について、分子生物学的手法を用いて活性汚泥内での *phaC* の多様性や挙動を調べることにより①活性汚泥中の *phaC* の系統的な情報を得る(多様性とその分布)、②系内の *phaC* 遺伝子群集の挙動を把握する、の 2 点について解析を行った。

はじめに、活性汚泥中に存在する *phaC* 遺伝子の基礎的情報を得るために実下水処理場を対象としたクローニングライブラリを構築した。異なる 3 つの処理場(A : 嫌気無酸素好気法、M : 嫌気好気法、N : 標準法)を対象として用いた。

クローニングの結果、得られたクローンには既知の PHA 合成酵素のアミノ酸配列と 98% 以上一致する配列が確認され、それらはいずれも一般的に処理場で観察される細菌が持つ PHA 合成酵素だった。また、*Alcaligenes* 属に代表されるクラス I の PHA 合成酵素と、*Pseudomonas* 属に代表されるクラス II の PHA 合成酵素が存在することがわかった。しかしながら、その他のクローンは既知の PHA 合成酵素と約 50-80% の相同意で、活性汚泥中にはこれまで解析されていない *phaC* が存在することが予想された。

それぞれの試料から構築されたクローニングライブラリは処理場ごとの特徴が示され、N は他のものより比較的多様性に富んでいた。嫌気・好気運転を行っている処理場から得た A、M と標準法から得た N では優占しているグループが異なっており、系統解析の結果、プラント A、M で優占していた配列はクローンのみから構成されるクラスターでこれまで知られていた *phaC* とは異なる配列を持つものが優占している可能性が示唆された。

次に、系内の *phaC* 遺伝子群集構造の挙動を捉える方法として、クローニング法・T-RFLP 法を検討した。解析対象として、酢酸・プロピオン酸を基質として与え、嫌気好気運転を行った実験室連続回分式リアクター(AR3)を用いた。真正細菌群集構造については、16srDNA(V3 領域)を標的とした PCR-DGGE 法によりその挙動を解析した。

その結果、基質の変化やバルキング等リアクターの運転の変化に伴い、真正細菌群集構造に著しい変化が見られ、さらに *phaC* 遺伝子群集構造についても同時期に著しい変化が見られた。このことから微生物群集構造が変化すると、それに伴い、*phaC* 遺伝子群集も変化することが示唆され、T-RFLP 法でその推移を確認することができた。

以上のことから、リアクターの処理能力の変化・微生物群衆構造の変化に伴い、*phaC* の群集構造も変化することが T-RFLP 法を用いた解析から確認することができ、その挙動を捉えることが出来た。しかしながら、リアクターの処理能力と遺伝子群集構造を結びつけるような情報は得られなかった。

そこで、実験室リアクターから得られた活性汚泥について、*phaC*遺伝子群集構造と、そのとき合成される PHA の組成・物性との関係性について調べた。

プロピオン酸・酢酸を主な基質として与えた嫌気好気連続式回分リアクター(AR5)を対象とし、T-RFLP 法により *phaC* の経時的挙動をモニタリングした。合成される PHA の特性については、バッチ実験により PHA を合成し、組成・融点・ガラス転移点・分子量・分子量分布・生分解性を測定した。同時に真正細菌群集構造については、16S rDNA (V3 領域) よりその経時的变化を調べた。

T-RFLP の結果、*MboI* では 17 個、*AccII* では 16 個、長さの異なる末端断片(T-RF)が得られた。*phaC* 群集構造は、運転開始 2 日目から 30 日目まで(第 1 安定期)と、49 日目以降(第 2 安定期)ではその構造が大きく異なっており、30 日目以降から 43 日目までは変動していた。*phaC* 遺伝子群集の挙動を解析した結果、同様に第 1 安定期と第 2 安定期ではそのフィンガープリントが異なっており、これは *MboI*、*AccII*、どちらで処理した結果も同じことが示された。

合成された PHA の組成を調べたところ、第 1 安定期では、3H2MV を 40% 程度含まれる PHA が合成され、第 2 安定期ではほぼ 8 割以上が 3HV で構成される PHA が合成された。どちらも 2 週間程度の短い間であったが安定した PHA 生産を維持することができた。測定された融点・ガラス転移点の値から、第 1 安定期の PHA と第 2 安定期の PHA では物性が異なることがわかった。さらに、第 1 安定期から第 2 安定期へ遷移する期間では、第 1、第 2 安定期で見られたポリマー混合物が合成されている可能性が示唆された。

PCR-DGGE 法による真正細菌群集構造解析の結果、合成される PHA が第 1 安定期から第 2 安定期へ推移した期間ではそのバンドパターンが変化していた。

以上の結果から、第 1 安定期と第 2 安定期では *phaC* 遺伝子群集構造が異なり、そのとき合成される PHA 組成も同様に異なっていることがわかった。よって、第 1 安定期から第 2 安定期で合成される PHA の組成・物性が異なる原因として、微生物群集構造の違いが考えられた。また、*phaC* 群集構造の変化はそのとき合成される PHA 組成と関連している可能性があることが示され、T-RFLP 法により系内の *phaC* 遺伝子群集構造の変化を捉えることができた。

さらに、合成された PHA の組成変化と T-RFLP 法による *phaC* 遺伝子群集構造の変動を比較した結果、含まれる 3H2MV の割合の変化と相関を示す T-RFs があった。クローニング法によりその T-RFs を同定したところ、グループ OTU[AR5#4]であり、3H2MV の合成になんらかの関係がある可能性が示される *phaC* 遺伝子の遺伝子配列、アミノ酸配列の一部を解明することができた。この OTU[AR5#4]に属していた *phaC* 遺伝子は、系統樹上においてクローンのみから成るユニークなクラスターを構成しており、未知の *phaC* であると推測された。そのアミノ酸配列は、クラス I の PHA 合成酵素に 52-54% 類似すると共に、クラス II の PHA 合成酵素にも 48-50% 類似していた。

また、異なる基質を与えたとき、その系に存在する微生物相に著しい違いが見られるところから *phaC* 遺伝子群集構造に影響があるだろうと考え、アミノ酸を基質とした系のクローニングライブラリを構築した。しかしながら得られたクローンは他の実験室リアクター汚泥と大きな差は見られなかった。

最後に、本研究を通して(合計 6 つの異なる系から)得られたクローンライブラリから得られた知見をまとめた。モチーフ構造が非常によく保存されていることから、得られたクローンは *phaC* 遺伝子であることが確認された。また、活性汚泥中には  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -proteobacteria に属する細菌が持つ PHA 合成酵素に類似のものが存在していた。実下水処理場標準法、嫌気好気法、実験室リアクター、それぞれ優先するグループが異なっていた。

以上、*phaC* を解析することで、活性汚泥中にはまだまだ未知の PHA 蕪積細菌が多く存在していることがわかった。また、*phaC* 遺伝子群集構成と合成される PHA の組成の変化と対応することが明らかとなり、合成される PHA 組成を評価する指標なりうる可能性があることが示された。さらに活性汚泥特有に合成される 3H2MV を合成する新しい PHA 合成酵素の DNA 配列・アミノ酸配列について手がかりが得られた。

PHA 組成は生産されるプラスチックの性質が決定されるため、PHA の組成を制御することで各用途にあったプラスチックを生産することができるようになる。よって、このようなシステムにおいて、生産される PHA 組成のモニタリングツールとして TRFLP 法が有益であることがわかった。