

論文審査の結果の要旨

氏名 道中 敦子

本論文は「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」と題し、都市下水の排水処理法として最も一般的に使われている活性汚泥法において、処理機能を担う微生物（活性汚泥）の中に存在するPHA（ポリヒドロキシアルカン酸）蓄積細菌の群集構造を遺伝子レベルで解析することを試みたものである。PHAの蓄積は、活性汚泥による有機物除去において中核的なプロセスであるにもかかわらず実際の活性汚泥法に於いてPHA蓄積を担っている細菌群集の構造と機能に関する知見はきわめて限られている。また、PHAは生物分解性プラスチックの一つであり、活性汚泥を利用して生産することができれば、排水中の有機物を再資源化できる新たな技術開発につながる可能性があり、その点からも活性汚泥中のPHA蓄積細菌群集構造を解析する意味がある。本研究はそのような背景のもとに、PHA合成の鍵となる酵素であるPHA合成酵素をコードするPHA合成酵素機能遺伝子(*phaC*)を標的遺伝子として、活性汚泥内に存在する*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点を目的として解析を行ったものである。

本論文は10章から構成される。第1章は「研究の背景と目的」であり、2章は「既存の研究」、3章は「手法」である。第4～9章に研究結果を記している。第10章に「総括」として得られた結果の総括と今後の展望・課題について記している。

本研究で得られた研究結果は以下のようにまとめられる。

まずはじめに、実下水処理場を対象とした*phaC*遺伝子のクローン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。それぞれの試料から構築されたクローン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を検討した。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、PCR-DGGE法により調べて真正細菌群集構造に著しい変化が見られ、さらにT-RFLP法で解析した*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。以上のことから、リアクターの処理能力の変化・微生物群集構造の変化に伴い、*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。

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ところ、3H2MV を 40%程度含まれる PHA が合成される時期と 8 割以上が 3HV で構成される PHA が合成される時期があり、T-RFLP 法で調べた PHA 蓄積細菌群集構造もこの 2 つの時期で明らかに異なることがわかった。

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。

以上、本論文は、これまで研究事例のきわめて限られていた活性汚泥法内の PHA 蓄積細菌群集の構造を解析するために、*phaC* を標的とした分子生物学的手法を確立し、これを用いて *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を示した。また、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を示した。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・アミノ酸配列の一部を解読した。その成果は、排水処理技術としての活性汚泥法の有機物除去機構に関する理解を深める上で、また PHA を生物分解性プラスチックとして回収するシステムを構築する上での重要な基礎を与えており、環境学の発展に大きく寄与するものである。したがって、博士（環境学）の学位を授与できると認める。