

論文内容の要旨

論文題目 分子生物学的手法による活性汚泥中バクテリオファージの分布および挙動の解析
Abundance and Dynamics of Bacteriophages in Activated Sludge System
Investigated by Molecular Approaches

氏名 小田和 賢一

活性汚泥法は、最も一般的に用いられている污水处理方法の一つである。ここで活躍する活性汚泥は細菌の集合体であり、その摂取活動により廃水中の有機物、リン、窒素の除去が行われている。細菌に感染し、溶菌するウイルスであるバクテリオファージはあらゆる自然環境中に広く分布する。近年、分子生物学的知見に基づくファージの解析手法が導入され、環境中におけるファージの生態や挙動が分かりつつある。海洋水 1mlあたりで最大 10^8 個のファージが含まれており、また地球規模の物質生産を担う光合成細菌シアノバクテリアは、ファージによって毎日 20%程度溶菌されていることも分かった。このように、ファージは宿主である細菌に対して重要な影響力を持っていることが認識されてきた。廃水処理においても、汚水中の有機物の浄化を細菌が担い、その細菌をファージが溶菌するため、ファージは処理を担う微生物や水処理能に対して何らかの影響を与えていることが十分予想される。しかしながら、活性汚泥に分布するファージの特徴や挙動などの知見は現在限られており、細菌群集や処理能力への影響も十分に評価されていないのが現状である。

そこで本研究では、活性汚泥におけるファージの挙動を明らかにし、この知見を基にファージの溶菌作用による宿主への影響を評価することを目的とした。「ファージの挙動」を明らかにするために、近年開発された分子生物学的手法を導入して、活性汚泥に分布するファージの濃度やコミュニティの時間的変化を調べた。「宿主への影響」を評価するために、ファージコミュニティの挙動と細菌コミュニティの挙動を比較した。また、ポリリン酸蓄積細菌 *Microcynus phosphovorius* (M.p.) の

数と *M.p.* 溶菌性ファージの数をモニタリングして、その変化からファージの溶菌作用が宿主に与える影響を評価した。さらに、ある種のファージが急激に増加するバースト現象が特定の宿主に与える影響を評価した。

第 1 章で研究の背景、目的、論文構成を述べ、第 2 章で既往の研究を整理した。

第 3 章では、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を活性汚泥中ファージのコミュニティ解析に初めて導入した。PFGE 法は、ファージのゲノムサイズが種ごとに異なる性質を利用して、試料中に含まれる複数種のファージの種数とそれぞれのゲノムサイズを調べることができる方法であり、1999 年に海洋で初めて用いられた。しかしながら、検討の結果、海洋で行われる PFGE 手順をそのまま活性汚泥に適応したのでは、DNA のスメア化が激しく生じ、良好なプロファイルが得られなかった。これは、活性汚泥には DNA を分解する作用のある物質が含まれており、ファージ DNA を分解してしまうためであると考えられた。スメア化を解決するため、サンプルに EDTA を最終濃度 100mM となるように添加して酵素活性を阻害した。その結果、良好な PFGE バンドパターンを得ることに成功し、PFGE 法を活性汚泥中のバクテリオファージ解析に適応することができた。

次に、ファージの存在数を調べるため、蛍光色素 SYBR Green I を用いた直接計数法を活性汚泥サンプルに初めて導入した。この方法は、ファージ粒子を SYBR Green I で蛍光染色し、蛍光顕微鏡でファージ粒子を直接計数する方法である。ファージの存在数を正確に測定できる最新技術である。本研究では、活性汚泥自体からファージを誘出する処理を新たに組み入れることで、活性汚泥中の全ファージを正確に定量した。

第 4 章では、PFGE 法と直接計数法を用いて活性汚泥におけるファージの濃度と挙動を調査した。実廃水処理場および活性汚泥リアクターから採取した活性汚泥におけるファージ濃度は、1ml あたり 10^8 から 10^9 個と、これまでに調査された他のいかなる自然環境よりも高濃度であることが分かった。そこで、都市下水、工業廃水、畜産排水を処理する計 14 箇所の実処理場の活性汚泥に PFGE 法を適応して、活性汚泥中のファージのゲノムサイズ分布を調べた。その結果、ファージのゲノムサイズは、40kb から 200kb 以上に分布し、とりわけ 40kb から 70kb の範囲に集中する傾向が見出された。興味深いことに、実廃水処理場間でファージゲノムサイズ分布は似通っており、畜産排水処理場を除けば各処理場間で共通して優占するファージ種の存在も示唆された。一方で、活性汚泥リアクターから経時的に採取したサンプルを解析してファージの時間的変化を調べた結果、ファージコミュニティが時間的に複雑に変化している様子が捉えられた。時には 3 日程度の非常に短い期間だけ一時的に出現するファージも捉えられた。ここまでの研究成果から、活性汚泥における役割はいまだ不明確であるものの、活性汚泥におけるファージの濃度と時間的挙動に関する知見を得た。

さらに、ある種のファージが一時的に増加する現象 (以下、バーストと呼ぶ) が捉えられた。バーストがひとたび起これば、そのファージが宿主とする細菌種は大打撃を被る可能性は高い。そのた

め、バースト時期周辺はファージの役割を解明する上で絶好の解析タイミングであると言える。ところが、このバーストはまれに起こるため、PFGE 法や計数法といった従来の煩雑な方法で検出するのは困難で、迅速で簡便な解析手法を用いて検出するのが望ましい。

そこで、第 5 章では、迅速かつ簡便なファージのモニタリング手法を確立することを目的とした。バーストの変化はファージ総 DNA 量に反映されることに着目し、高感度蛍光色素 PicoGreen により全ファージの DNA 濃度を迅速に定量するモニタリング手法 (PicoGreen 法) を新規に確立することに成功した。手法の正確性はモデルファージを用いた添加試験で確認した。この方法では、試料を 75 μ l しか必要とせず、3 時間で 10 試料のファージ DNA 濃度を定量することができた。

第 6 章では、PicoGreen 法を実廃水処理場や実験室リアクターに適応した。その結果、活性汚泥上澄み中のファージ DNA 濃度は数 ng/ml から数十 ng/ml 程度の範囲で変動し、1 日で 2 倍程度に増加する様子も捉えられた。この増加から、1 日以内に全細菌の 1% 程度が溶菌されたと試算された。

第 7 章では、これらのモニタリングツールを用いて、バースト現象をさらに詳細に調査した。長期的に複数の回分式活性汚泥リアクターにおけるファージコミュニティをモニタリングし、計 16 回のバーストを捉え、その発生頻度や生成されたファージ数、宿主細菌に対する影響を試算した。バーストにより活性汚泥混合液 1ml あたり平均して 10^5 個程度の宿主が溶菌され、 $10^6 \sim 10^7$ 個程度のファージ粒子が放出されたことが分かった。そして、単一のファージによる 1 回のバーストで活性汚泥内全細菌の 0.01%~0.35% が溶菌されていたことが明らかとなった。また、*M.p.* を例に特定の宿主に対する影響を評価した結果、活性汚泥に生息する全 *M.p.* 数のうち 0.001% から 10% がファージにより数日以内に溶菌された。

まとめると、次のような成果が得られた。

- 1) ファージのモニタリング法である PFGE 法や蛍光直接計数法、PicoGreen 法を初めて活性汚泥に導入し、活性汚泥中ファージの存在数やファージコミュニティの処理場における濃度や挙動を明らかにすることができた。
- 2) ファージの挙動を基にして、活性汚泥内でファージが宿主に与える影響を評価できた。捉えられたバースト現象から、1 回の汚水処理で 1 種のファージが溶菌する宿主の数を試算することができた。ファージがリン蓄積細菌に与える影響を試算することができた。

これらのファージのインパクトが、宿主集団にとって重大か、水処理にとって問題かについては本研究では明らかにすることはできなかった。今後、リン除去細菌や窒素除去細菌とファージ間で起こるバースト現象を捉え、これをケーススタディーとして解析していくことで、ファージのリン除去や窒素除去への影響を明らかにできる可能性がある。