

プロピオン酸を基質とする PHA 蓄積細菌の機能遺伝子と種の同定の試み

Attempt to the identification of functional gene and species of

PHA accumulating bacteria fed propionate

学籍番号 56842

氏名 村上 達也 (Murakami, Tatsuya)

指導教員 佐藤 弘泰 助教授

1. 背景と目的

プラスチックに関わる環境問題が深刻化している。廃棄プラスチック量は増え続ける一方で、ゴミ焼却能力、埋め立て地の許容範囲を大きく上回り始めている。また、野生動物がプラスチックゴミをエサと間違えて食べてしまい、消化器系を詰まらし、死に至らしめてしまうという被害が多発している。さらに、昨今、その廃棄プラスチックの問題に加えて、原材料となる石油の枯渇問題も浮上してきている。

そのような背景のもと現れたのが「生分解性プラスチック」である。生分解プラスチックとは「通常のプラスチック製品と同じように使え、使用後は自然に水と炭酸ガスに分解されるプラスチック」のことである。また、生分解性プラスチックは人体においても自然に分解され、生体適合性を併せ持つことから医療分野からも注目されている。

この生分解性プラスチックの原材料の一つである PHA (Polyhydroxyalkanoates) が下 wastewater 処理に用いる活性汚泥中において蓄積されることが確認されている。活性汚泥を用いた生分解性プラスチック生産は廃水が基質となるためこの部分にかかるコスト削減、余剰汚泥の再利用に新しい道が見つかるであろう。このような廃棄物の再資源化は、「循環型社会の構築」が重要視される今日、その一端を担うことができる技術として非常に価値がある。

PHA は様々なモノマーユニットから構成されており、異なる炭素源あるいは細菌で、合成される PHA 組成が異なると報告されている。PHA 組成の違いはプラスチックの性質にも反映するため、PHA 組成を制御することで物性を制御できる物質として注目されている。中でも、3H2MV (3-hydroxy-2-methylvalerate) というモノマーユニットは、主鎖から出る側鎖の数が 2 本あることにより分子間をつなぐエステル結合が立体的に保護され、生物分解を受けにくいことが予想され、“分解を受けにくい” という理由で注目されている。

プロピオン酸を基質として用いると、3H2MV のような物性が特徴的な PHA が生産されることが知られている。生分解性プラスチックとして利用可能な PHA を活性汚泥中で制御するうえで、生分解性プラスチックの合成のキーとなる遺伝子である *phaC* とその生分解性プラスチック生産菌種を把握しておくことは重要なことである。詳しいことは 2 章で述べるが、リン除去汚泥中にはリン除去が良好時に現れる PHA 蓄積細菌の PAO とリン除去悪化時に現れる PHA 蓄積細菌 GAO の代表的な 2 つのグループが存在する。そこ

で PAO 汚泥中のプロピオン酸を基質とする PHA 蓄積細菌、GAO 汚泥中のプロピオン酸を基質とする PHA 蓄積細菌の、*phaC* を特定し、16S rRNA の同定を試みた。

2. 実験方法

PAO リアクターおよび GAO-like リアクターの 2 つのリアクターを運転した。PAO リアクターおよび GAO-like リアクターの 2 つのリアクターの構築には基質の組成に工夫を加えた。それは PAO リアクターと比べ、GAO-like リアクターはリンの流入量を 1/50 に抑えた。表 1 中の基質 A、B、C は PAO リアクターの基質組成である。基質 A は、運転開始から 15 日目まで、16 日目から 24 日目 (7 日間) までは基質 B で運転した。25 日目以降は基質 C で運転した。GAO リアクターは基質 D のみで運転した。リアクターの汚泥の各種水質項目のモニタリング、および PCR/T-RFLP 法による *phaC* 遺伝子の群集構造の変化をおった。

続いてリアクターで馴致した汚泥 1L を用いて嫌気で 6 時間のバッチ試験を行った。

炭素源として 250mgC/L のプロピオン酸を投与した。

バッチ試験によって得られた PHA を蓄積した汚泥を用いて押木 (2006) が開発した PHA 蓄積細菌の密度勾配遠心分離法による分離によって PHA 蓄積細菌を濃縮させた。濃縮の結果、PAO 汚泥、GAO-like 汚泥それぞれ PHA 蓄積細菌が全菌のうち 83(SE±1)%、86(SE±1)% に濃縮された汚泥を獲得できた。これらの汚泥より 16 rDNA による系統解析を行った。

3. 結果及び考察

リアクターの水質モニタリングの結果、PAO リアクターでは嫌気におけるリン酸の放出が 50mgP/L 前後で維持し、EBPR は良好であった。一方 GAO-like リアクターでは吐出し量が 10mgP/L 前後であった。嫌気での炭素源の摂取量と嫌気でのリン酸の吐出し量

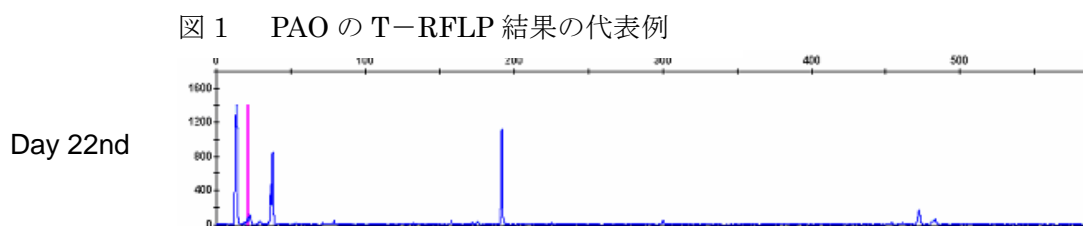
表 1 基質組成

(単位 g/L)

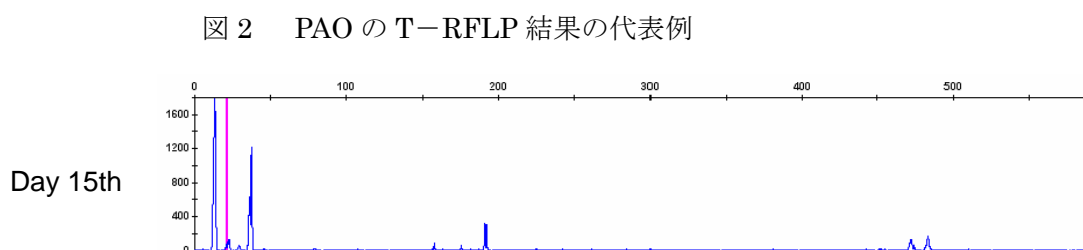
成分	基質 A	基質 B	基質 C	基質 D
CH ₃ COONa·3H ₂ O	51.25	38.44	25.63	25.63
CH ₃ CH ₂ COONa	-	6.03	12.06	12.06
Yeast extract	1.25	1.25	1.25	1.25
Peptone	1.25	1.25	1.25	1.25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.10	1.10	1.10	1.10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	11.34	11.34	11.34	11.34
KCl	5.25	5.25	5.25	5.25
NH ₄ Cl	2.20	2.20	2.20	2.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.70	2.70	2.70	2.70
K ₂ HPO ₄	2.25	2.25	2.25	0.56
KH ₂ PO ₄	1.75	1.75	1.75	0.44
Allylthiourea	0.50	0.50	0.50	0.50
Pr の割合(炭素比)	0	1/4	1/2	1/2
CP 比(mgC/mgP)	12.5	12.5	12.5	55

の比を比べてみる。PAO リアクターのこの値は、1.0mgP/mgC であった。の GAO-like リアクターのこの値は、0.23mgP/mgC である。つまり、この GAO-like リアクターは嫌気状態で約 10mgP/L のリン酸の吐き出しは認められるものの、EBPR 良好な PAO リアクターと比較して、炭素源摂取に対するリン酸の吐出し量はおおよそ 1/5 なので GAO 優占のリアクターが構築できたといえる。

PAO の T-RFLP 結果の代表例を Fig1 に示す。



GAO-like リアクターの結果の代表例を Fig2 に示す。



PAO 汚泥の *Mbo*I の結果から、リアクター立ち上げ時期から約 190bp のピークが認められ、終了時の 51 日目にもこのピークが認められた。このピークは道中 (2005) の結果においてクラスターを形成するピークとして得られていない。よって、道中ので得た *phaC* 配列とは異なる *phaC* 配列が存在していたことが考えられる。また、時系列を通してピークパターンに変化は認められなかった。つまり、実験期間を通し、*phaC* の群集構造は変化がなかったということになる。しかし、500bp 付近に切断されていない *phaC* が認められる。これは道中とは異なる *phaC* 群集構造のため切断されなかったと考えられる。つまり、*phaC* の群集構造は変化がなかったのではなく、単に今回用いた *Mbo*I では *phaC* 群集構造を把握できない可能性も考えられる。このことを検証するため、PCR-Clonig-Sequencing 法により *phaC* の塩基配列を決定し、クラスター解析を行う必要がある。

PAO 汚泥の *Acc*II の結果も *Mbo*I の結果と類似している。リアクター立ち上げ時期から約 68bp、97bp、143bp、149bp、154bp、200bp のピークが認められ、このピーク構造を変化させることなく終了時まで維持した。ただ、*Acc*II では切断されなかった *phaC* は認められないので、*phaC* 群集構造は実験期間を通して変わらず維持したことが示唆される。得られたピークを道中が得た結果と比較してみると、これらのピークが属するクローンが道中は得ていないことが分かる。このことから道中が作成した *phaC* 群集構造とは異なる *phaC* 群集構造を得られた可能性が高いので、PCR-Clonig-Sequencing 法により *phaC* の

塩基配列を決定し、クラスター解析を行う必要がある。

GAO-like 汚泥についても PAO 汚泥と同様のことが言える結果を得たため、早急に塩基配列を決定し、クラスター解析を行う必要がある。

つづいて 16S rRNA 遺伝子の系統解析結果（表 1, 2）より、プロピオン酸を基質とする PHA 蓄積細菌の中で PAO 汚泥に出現する細菌種は、PAO の第 1 候補 *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’が優先していた。また、GAO-like 汚泥に出現する細菌種は、GAO の第 1 候補 *Candidatus* ‘*Competibacter phosphatis*’が優先していた。さらに、興味深いことに、*Clostridium bartlettii* という *Firmicutes* に属する細菌群が PAO 汚泥・GAO-like 汚泥双方で優先していた。*Firmicutes* に属する細菌が PAO、または GAO 候補として検出された報告はほとんどなく、今回 PAO か GAO かは判断できないが、新たな PAO、または GAO 候補を検出することができた。

表 2 PAO リアクター各細菌種

species name	Relative abundance
<i>Candidatus</i> ‘ <i>Accumulibacter phosphatis</i> ’	27%
<i>Clostridium bartlettii</i>	15%
others	40%

表 3 GAO-like リアクター各細菌種

species name	Relative abundance
<i>Clostridium bartlettii</i>	12%
<i>Dechloromonas hortensis</i>	11%
<i>Candidatus</i> ‘ <i>Competibacter phosphatis</i> ’	11%
others	44%

今回 *phaC* の同定を行えなかったため、今後 *phaC* のクラスター解析を行い、*phaC* のクラスターと 16S rRNA 遺伝子クラスターの相関を求め、機能遺伝子 *phaC* と 16S rRNA 遺伝子を関連付けたいと考えている。

参考文献

道中敦子(2005), 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻博士論文
押木守(2006), 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻修士論文