

# 嫌気性汚泥に生息する未培養系統分類群微生物の機能推定

水圏土壌環境制御研究室 渡邊高子  
指導教官 原田秀樹 大橋晶良 井町寛之

## 1.はじめに

近年の分子遺伝学的微生物同定・検出技術、特に 16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物群集構造解析により、自然環境および廃水処理プロセス等の人工バイオプロセスには、膨大でかつ多様な微生物が生息していることが明らかとなっている<sup>1</sup>。また、それらの多くは未だ人為的に分離培養なされたことがなく、その機能も全く不明な生物群である。これらの未培養微生物群を分離し、その詳細な生理学的特徴を調査することは、自然環境および廃水処理プロセスにおける物質の循環・分解等を理解する上で極めて重要な課題である。

それら未培養の微生物にアクセスするためのモデル系として我々は嫌気性グラニュール汚泥に着目した。既知の研究から、嫌気性グラニュール汚泥には門もしくは亜門レベルといった分類学上高い階層で培養されていない分類群が未だ数多く存在していることが明らかになっている<sup>23</sup>。加えて、嫌気性グラニュール汚泥は高濃度の微生物集塊体であるため、未培養微生物がすでに高濃度で培養されている状態にあることから、未培養微生物を解析していく上で格好の材料であるといえる。そこで、本研究は嫌気性グラニュール汚泥をモデルとして、その汚泥中に生息する門レベルで培養がなされていない微生物群をターゲットに、Fig. 1 に示した戦略をもって標的未培養系統分類群微生物を分離培養することを最終

目標とし、それらが何を基質として利用しているのか標的未培養微生物の機能を推定することを目的とした。

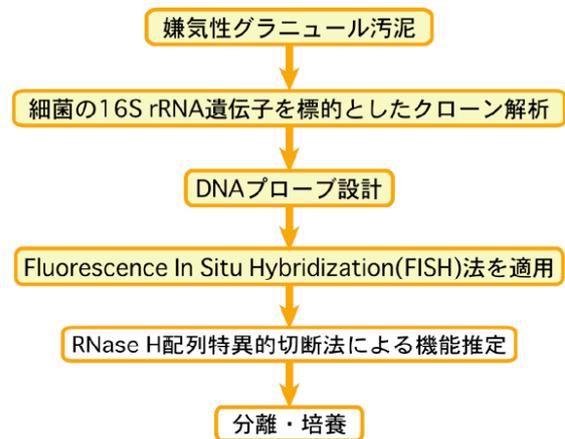


Fig.1 Strategy for isolation of uncultured microorganisms from anaerobic granular sludges in this study.

## 2.実験方法

嫌気性汚泥内に生息する未培養系統分類群微生物の解析に必要な嫌気性グラニュール汚泥を、安定的かつ容易に採取するため、高温 UASB (upflow anaerobic sludge blanket) リアクターを立ち上げた。高温 (55°C) 条件下で運転した UASB リアクターは、ショ糖、酢酸、プロピオン酸とペプトン (流入濃度: 3,500 mg-COD/L) を主要な炭素源として含む人工廃水を 200 日以上にわたり処理を行った。リアクター内には直径 2-5 mm 程度のグラニュール汚泥を安定的に保持しており、良好な有機物除去能 (COD<sub>Cr</sub> 除去率で 90% 以上) を有していた。このような条件下で運転した UASB 反応槽から解析に用いる嫌

気性グラニュール汚泥を採取した。

汚泥からの DNA 抽出にはビーズビーダー法を用い、クローン解析には細菌 (*Bacteria*) の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いた。分子系統解析は、国際塩基配列データベースに登録されている標的未培養微生物門に属すると思われる 16S rRNA 遺伝子配列を検索し、分子系統解析ソフト *Arb* のデータベースに取り込んで行った。系統樹の作成は、まず 1,000 bp 以上の配列を使った近隣結合法により基となる系統樹を作成し、その後 1,000 bp 以下の短い配列を近隣接合法で作成した系統樹に最節約的に加えた。

FISH (fluorescence in situ hybridization) 法は Amann らの方法 に準拠して行った。ターゲットとした未培養微生物門に属する配列に特異的な DNA プロブの作成には、分子系統解析ソフト *Arb* のプロブ設計機能を用いて設計した。DNA プロブには蛍光標識として Cy3 を付加した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1. 高温性嫌気グラニュール汚泥内細菌群のクローン解析

まず、本研究で用いた高温嫌気性グラニュール汚泥がどのような種類の細菌群で構成されているかを調べるために、細菌由来の 16S rRNA 遺伝子のクローン解析を行った。142 クローンを無作為的に回収してそれぞれのクローンの塩基配列を決定後、分子系統解析を行った。その結果、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門のような、既に分離培養なされている微生物を含む系統分類群に属するクローン配列や、BA024 や OP8 等の門レベルで未培養な微生物群に

属するクローン配列も検出された (Table 1)。この結果は、人工廃水というシンプルな組成の廃水の処理を行っている汚泥中にも、未だに分離培養されたことがなく機能が全く不明な微生物が存在することを示唆するものであった。

Table 1 Distribution of 16S rRNA gene clones detected in the thermophilic UASB reactor granules

Phyla	Number of clones	%
<i>Firmicutes</i>	83	58
<i>Chloroflexi</i>	12	8
<i>Synergistis</i>	5	4
<i>Proteobacteria</i>		
<i>Alpha subclass</i>	1	1
<i>Beta subclass</i>	2	1
<i>Bacteroidetes</i>	2	1
<i>Nitrospira</i>	1	1
<i>Actinobacteria</i>	1	1
BA024	25	18
OP8	7	5
EM3	3	2
Total	142	100

#### 3-2. 汚泥内に生息する未培養微生物群 BA024 に特異的な DNA プロブの作成

クローン解析において検出された門レベルで未培養な微生物群の中でも、比較的高頻度で検出された BA024 という微生物群に着目し、これに特異的な DNA プロブの設計を試みた。

まず DNA プロブを設計するにあたり、現在までに国際塩基配列データベースに登録されているすべての BA024 に属する配列を収集し、分子系統解析ソフトを用いてデータベース化した。収集したクローン配列は 36 配列あり、それら全てについて塩基配列の整列 (アライメント) を行った。また、国際塩基配列データベースには、全く異なった微生物

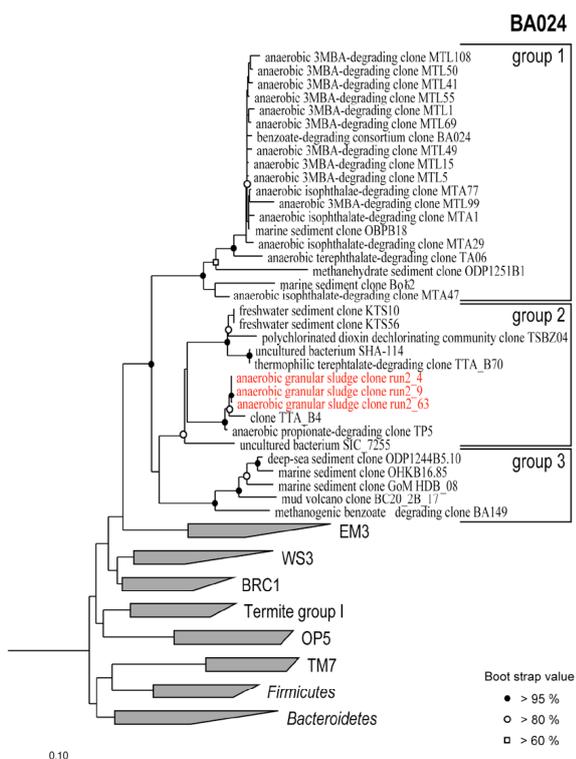
の遺伝子配列同士がハイブリッドして形成されるキメラ配列が多数登録されている。これらキメラ配列は分子系統解析や DNA プローブの設計の際に影響を及ぼすため、予め収集した配列のキメラチェックを行い、キメラ配列であると推定された配列を除く必要がある。そこで、収集した塩基配列の中でも 1,000bp 以上の比較的長い塩基配列を上流、中流、下流の 3 区間に区切り、それぞれの区間で系統樹を作成した。その結果、5 配列が BA024 と他の微生物門とのキメラ配列であると断定し、それらを除いて系統樹を作成した。作成した BA024 の系統推定ではブートストラップ解析を行うことで、その系統樹形の確かさを評価した。これら分子系統解析の結果から BA024 は 3 つのグループに分けることができ、それぞれのグループを BA024 group 1、BA024

group 2、BA024 group 3 とした。BA024 group 2 は高温環境下から得られたクローン配列を含むグループであり、本研究のクローン解析により回収されたクローン配列も BA024 group 2 に属した。また、嫌気性グラニュール汚泥内に存在する BA024 に属する微生物の視覚的検出および、機能推定を行うために BA024 を網羅するような DNA プローブ BA024\_346mix を設計した。設計した DNA プローブを用いて嫌気性グラニュール汚泥に FISH を行ったが、現在までに良好な結果は得られていない。

### 3.3. 汚泥内に生息する未培養微生物群 OP9 に特異的な DNA プローブの作成

次に、本研究で立ち上げた高温 UASB リアクターと全く同じ条件下で運転したリアクターから採取した高温嫌気性グラニュール汚泥内に、門レベルで未培養な OP9 という微生物群が生息することが既知の研究から明らかとなっている。そのため、本研究に用いた嫌気性汚泥内にも同様に OP9 が存在すると考えられた。そこで、OP9 に着目し、これに特異的な DNA プローブの設計を試みた。

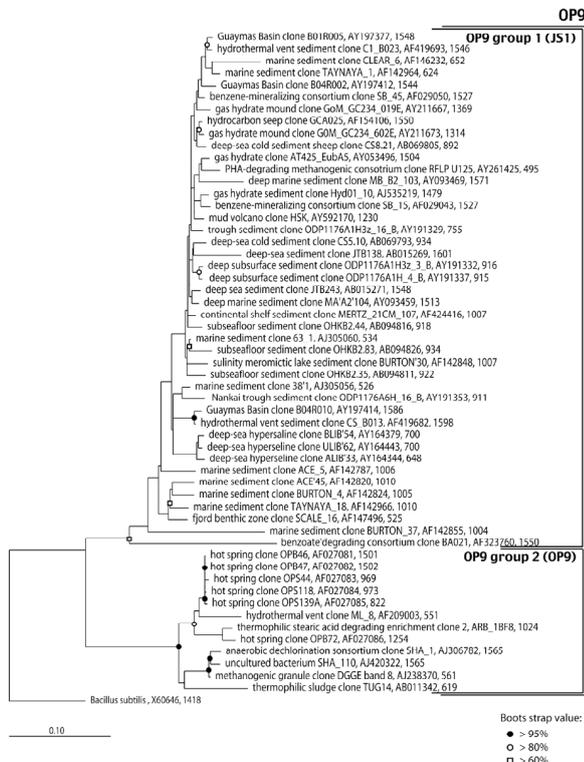
DNA プローブを設計するにあたり、BA024 と同様に国際塩基配列データベースに登録されている配列の中から、OP9 に属する 62 配列を収集した。それらについてアライメントおよびキメラチェックを行い、3 つのクローン配列がキメラ配列であると推定して分子系統解析から除き、系統樹を作成した (Fig. 3)。OP9 の分子系統解析の結果から、OP9 は 2 つのグループに分けることができ、1 つのグループを OP9 group 1 (JS1)<sup>4</sup>、もう 1 つのグループを OP9 group 2 (OP9) とした。既知の研究におけるクローン



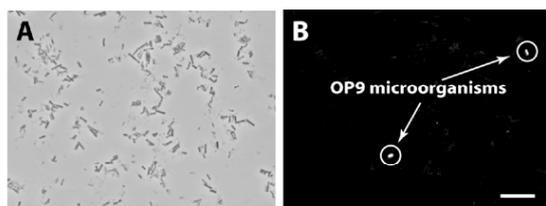
**Fig. 2** Phylogenetic tree of 16S rRNA gene the phylum BA024. The tree was constructed with the neighbor-joining method. The scale bar represents the number of changes of nucleotides per sequence position. Branch points show difference of bootstrap value obtained with 1,000 resamplings.

解析により回収されたクローン配列が OP9 group 2 に属していたことから、OP9 group 2 に特異的な DNA プローブ C2-90P828 を設計した。

続いて、本汚泥において OP9 に属する微生物が存在することを確かめるため、設計した C2-90P828 プローブを用いて FISH 法を行った。その結果、1-2 μm の桿菌が検出された (Fig. 4)。



**Fig. 3** Phylogenetic tree of 16S rRNA gene the phylum OP9. The tree was constructed with the neighbor-joining method. The scale bar represents the number of changes of nucleotides per sequence position. Branch points show difference of bootstrap value obtained with 1,000 resamplings.



**Fig. 4** In situ hybridization of dispersed cells of the thermophilic granular sludge with Cy3 labeled C2-90P828 probe. Phase contrast (A) and epifluorescent (B) micrographs are shown for an identical field. Bar represents 10 μm.

### 3.まとめ

高温嫌気性グラニュール汚泥について細菌の 16S

rRNA 遺伝子をターゲットとして解析した結果、門レベルで未培養な微生物群を多数検出し、未培養微生物門である BA024 および OP9 に特異的な DNA プローブの設計を行った。また、OP9 に特異的な DNA プローブは FISH 法へ適用することでその適用性を確認した。以上の結果より、OP9 については今後 RNase H 配列特異的切断法を用いた利用可能な基質の推定が可能であることと考えられた。また、BA024 に特異的な DNA プローブは FISH 法へ適用を試み、機能推定技術へ有用であるかを確認する必要がある。

### 参考文献

1. Rappe, M.S., & Giovannoni, S.J. The Uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 369-394 (2003).
2. Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Sytsubo, K., Ohashi, A., Harada, H. & Nakamura, K. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, **144** (Pt 9), 2655-2665 (1998)
3. Chen, C.L., Macarie, H., Ramirez, I., Olmos, A., Ong, S.L., Monroy, O. & Liu, W.T. Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate. *Microbiology*, **150**, 3429-3440 (2004)
4. Webster, G., Parkes, R.J., Fry, J.C. & Weightman, A.J. Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments. *Appl Environ Microbiol.*, **70**, 5708-5713 (2004)