特集1・ニューバイオテクノロジーによる環境解析

生ゴミ分解過程の微生物群集の解析

春 田 伸*

1. はじめに

古来、自然界で発生した有機物（動植物遺体、糞便等）は、微生物により分解され土へと還っていた。しかし人間活動によって生み出される有機性廃棄物（生ゴミ、農林畜産廃棄物、食品工場廃棄物など）は膨大な量にのぼる。世界各地で古くから有機性廃棄物の分解・再利用が行われており、いくつかの処理システムが考案されている。本稿では、堆肥化を含め広く有機性廃棄物の分解に関わる微生物群集の分子生物学的解析について概説する。また個々の解析結果については成書（文献1等）を参照いただきたい。

2. 分子生物学的手法の利点

文献をさかのぼると、1960年代から堆肥化過程の微生物に関する論文が報告されており、培養法を中心とした研究が数多く行われてきている。また特に近年、廃棄物の処理・再利用という点から注目されているのはもちろんのこと、その複雑な微生物の代謝は幅広い微生物学者・微生物生態学者の興味を集めている¹⁾。一般環境（土壌、海洋等）では顕微鏡下で観察される微生物細胞のうち培養できるのは1%以下と言われている。有機物分解過程は栄養分が豊富であることから、「生きているが増殖速度が極度に遅い」または「一般的な栄養豊富な培地では増殖できない」といった微生物の存在量は低いと予想される。実際、いくつかの有機物分解過程の解析で、全菌数の数%から10%以上の微生物は培養可能であると報告されている。この値は一般環境に比べれば大きな値ではあるが、やはり難培養微生物の存在は無視できないと考えられる。なぜなら他微生物

物との共生関係が増殖に重要であるために、純粋培養が困難な例がいくつも報告されている。また有機物分解過程は複雑・不均一な固体培養系と考えられるが、それらを実験室で忠実に再現することは難しい。このように、固体との相互作用により性質が変化するという微生物の報告もあることなどから培養法での微生物群集解析には限界がある。

1990年代になって分子生物学の手法が環境微生物の研究にも導入されるようになり、培養することなく微生物群集を解析できるようになってきた²⁾。核酸（DNA、RNA）解析法や化学的バイオマーカー（呼吸鎖キノン、リン脂質脂肪酸）を利用した方法など多岐にわたる手法が開発・適用されており、微生物群集の変遷や構成微生物種に関して多くの情報が得られてきている。またその手法の簡便性から数多くのサンプルを解析できるようになり、時間的変遷（数日毎、数時間毎など）や空間分布（表面、深部など）に関して多くの結果が報告されてきている（図-1）。

3. 有機物分解過程への分子生物学的手法の適用

多くの分子生物学的手法が開発され、様々な環境に適用されている。しかし他の環境サンプルと異なり有機物分解過程では、

- ①大量に混在する有機物、
 - ②腐熟が進むにつれ増加してくる腐植酸、
 - ③固体培養系、
- という点でしばしば解析が難しくなっている。①、③は特に顕微鏡観察の妨げになる。一般的に微生物細胞数の顕微鏡での直接計数には蛍光核酸染色試薬（4', 6-diamidino-2-phenylindole, ethidium bromide, acridine orange など）が用いられるが、混在する有機物の多くは蛍光顕微鏡下で自家蛍光を示

*東京大学大学院農学生命科学研究科
Shin HARUTA

図-1 フィールドスケールコンポスターの処理過程を解析した例³⁾

16S rDNAを対象とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)のプロファイル。約1ヶ月の処理過程でバンドパターン(微生物群集)の変化は少ない。ただしいくつかのバンド(微生物種)については特異的に検出されている時期がある。遺伝子塩基配列解析の結果、それぞれのバンドは以下の微生物由来と推定される。

バンドA; *Propionibacterium acnes*, バンドB; *Clostridium sticklandii*-like, バンドC; *Clostridium ultunense*, バンドD; *Bacillus infernus*-like, バンドE; *Bradyrhizobium elkanii*, バンドF; *Methylobacterium radiotolerans*, バンドG; *Bacillus thermocloacae*, バンドH; *Caulobacter bacteroides*, バンドI・J; *B. licheniformis*, バンドK; *Pseudomonas stutzeri*-like

培養法では微生物群集の変遷を解析することは非常に時間と手間を要するのに対し、分子生物学的手法は簡便性が高い。またここでも既知微生物との類似性が低い配列が見出されており(バンドB, D, K), これも分子生物学的手法の大きな利点のひとつである。

図-2 生ゴミ分解処理物の蛍光顕微鏡像

(環境技術研究協会ホームページ <http://www3.osk.ne.jp/~riet/>にてカラー写真公開)

同一視野を各種励起波長で観察。特に長波長側で強い自家蛍光が観察される。左のパネルの矢印で示したのが微生物細胞。

すため細胞観察を強く阻害する(図-2)。固体に付着した微生物細胞の観察も困難である。これらは顕微鏡を利用する他の手法(direct viable count法やfluorescence *in situ* hybridization(FISH)法など)でも大きな問題となる。また②は核酸抽出に

影響を与える。腐熟堆肥からの核酸の精製は難しく、腐植酸はPCRなどいくつかの酵素反応等を阻害することから核酸解析の障害となっている。さらに有機物(植物、動物細胞)由来の核酸が共抽出され、微生物群集解析の妨げになる場合もある。

以上の点を回避・克服し、各種分子生物学的手法、ARDRA, T-RFLP, ARDRA, DGGE, SSCP, FISH, SSC-PCR, クローンライブラリー, 定量PCRなどが適用されている（各手法の詳細については本特集の基礎編参照）。その工夫としては、例えば、顕微鏡観察条件の最適化、核酸抽出・精製法の改良、固体基質からの細胞抽出技術などが挙げられる（例；文献4）。一方、化学的バイオマーカーを利用した微生物群集解析法（キノプロファイル法や脂肪酸プロファイル法）は①～③の影響を受けにくい手法として利用されている⁵⁾。

4. 解析対象の拡大

先にも述べたように操作の簡便性から多数のサンプルを解析できるようになり、解析対象も広がっている。また特異的遺伝子配列を指標とした特定微生物の検出・定量や遺伝子の分布なども解析されるようになってきている。

・エアロゾルの解析：空气中に散乱する微生物が処理システム環境の人間をはじめ生物に与える影響を評価する必要がある。フィルター上に回収した微生物群集の解析、病原微生物などの検出結果などが報告されつつある。

・病原性菌（ヒト・植物）：迅速かつ簡便な検出・定量に加え、その存在と微生物群集との間の相関関係が調べられている。

・微生物製剤の効果：多くの微生物製剤が市販されているが、添加微生物の残存性または添加による既存微生物群集の変化について解析が進んでいる。

・遺伝子伝播：有機物分解システムでは、微生物が密にそして活発に代謝していると考えられるため、生物間の遺伝子伝播も高頻度で起こっている可能性がある。有用遺伝子の伝播による処理システムの効率化のほかに薬剤耐性遺伝子の広範囲拡散なども危惧される。そこでこれら遺伝子に注目し、その伝播の頻度や拡散度について研究が始まっている。

5. お わ り に

生ゴミ分解や堆肥化は比較的身近な環境であり、その研究の歴史も古いが、最近でも新規微生物が発見・単離されている。また同時に、培養を経ない核酸解析法によって新規遺伝子配列も検出されており、現在、既に遺伝子データベースに「uncultured

compost bacterium」由来として多くの配列が登録されている。多種多様な未知なる微生物が存在している可能性もある。細胞数の少ないマイナー種も含め、すべてを把握するにはまだまだ時間がかかるが、分子生物学的手法の導入により培養法での解析だけでは見えていなかった全体像が見えつつある。ただし現在の分子生物学的手法の問題点として、主に以下の三点が挙げられる。

①各種のバイアスを避けられない（核酸抽出、PCRなど）

②検出される微生物をその代謝活性と結びつけるのは難しい（生死または活性・不活性の区別がつかない）

③マイナー種（全体の1%を切るような微生物種）の検出は困難

今後も各種手法の改良および新規手法の開発は進んでいくと期待される。さらに未だ充分な手法は確立されていないが、「微生物間相互作用」、「微生物固体間相互作用」、「群集中での各微生物の活性」、などが明らかになることで、微生物群集の理解は深まると考えられる。また本稿では触れなかったが、いくつかの有機物分解過程では原生動物の寄与も考えなければならない。これらを総合的に解析することにより機能的な微生物群集の構築・制御に近づけると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Insam, H., N. Riddech, and S. Klammer (eds.) : Microbiology of composting. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (2002)
- 2) Akkermans, A. D. L., J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (eds.) : Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1999)
- 3) Pedro, M. S., S. Haruta, M. Hazaka, R. Shimada, C. Yoshida, K. Hiura, M. Ishii, and Y. Igarashi. : Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. J. Biosci. Bioeng., 91: 159-165 (2001)
- 4) Haruta, S., M. Kondo, K. Nakamura, H. Aiba, S. Ueno, M. Ishii, and Y. Igarashi. : Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. Appl. Microbiol. Biotechnol., (2002) accepted
- 5) 平石明：植木鉢を利用した家庭生ゴミのコンポスト化処理に及ぼす天候およびその他の環境要因の影響，生工学会誌，78：301-310（2000）