16S rDNA-RFLP法による嫌気性処理汚泥中の メタン生成菌の同定

Identification of Predominant Methanogens in Anaerobic Wastewater Treatment Sludge on the Basis of 16S rDNA Restriction Pattern Analysis

平石 明

豊橋技術科学大学エコロジー工学系／〒441 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1

AKIRA HIRAISHI

Department of Ecological Engineering, Toyohashi University of Technology
/Tenpaku-cho, Toyohashi 441

Abstract

The predominant methanogens in an anaerobic wastewater treatment plant were studied by using a molecular technique without isolation and cultivation. The 16S rRNA genes from the bulk DNA of the anaerobic sludge were amplified by PCR, cloned, and reamplified. Of 30 clones isolated and tested, 24 clones contained a 16S rDNA insert. These positive clones were divided into four ribotypes on the basis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns with *Hae* III. The RFLP pattern of the most abundant ribotype (designated ribotype 1) was almost the same as that of *Methanosaeta soehngenii* which was computer-predicted and/or experimentally obtained. This was also supported by the results of RFLP analyses with *Hha* I and *Sma* I. Phylogenetic trees for methanogens was constructed on the basis of 16S rDNA sequences and 16S rDNA-RFLP patterns. Although there were some differences in branching patterns between the two trees, the RFLP-based tree was suggested to be used roughly as a model showing natural phylogenetic relationships among methanogens. The results of this study show that 16S rDNA-RFLP analysis with PCR cloning has a promise to identify the predominant methanogens in anaerobic wastewater treatment systems.

Key words : methanogens, 16S rDNA, RFLP, anaerobic sludge.

1. はじめに

嫌気性廃水処理あるいは嫌気消化法は、廃水中の高分子有機物の嫌気分解（いわゆる可溶化）、酸生成、メタン生成などの多段階の生化学的反応から成り立つ嫌気処理過程である¹⁾。前段の可溶化や酸生成には真性細菌 (domain *Bacteria*) の中の嫌気性従属栄養細菌が主役をなし、後半の炭酸ガスの還元によるメタン生成には古細菌

(domain *Archaea*) の一群であるメタン生成菌（以下メタン菌と呼ぶ）が関わっている。嫌気処理の研究においては、廃水成分や生成物の出力パラメータに基づく動力学的アプローチは多々みられるが、反応槽の実体である微生物活動を群集構造の面から検討した例はきわめて少ない。どのような微生物が役割を演じているのか、その質的・量的分布を知ることや、嫌気条件下における相互作用や共生関係²⁾を明らかにしていくことは嫌気処

理法の正しい理解を深めるだけでなく、今後のより良い新しい嫌気処理の開発を目指していく上でも必須の作業である。

嫌気処理においては、反応槽の中のメタン菌の動態の把握が主要な研究課題の一つである。しかしメタン菌を従来の方法で検出する場合は、以下のようないくつかの技術的問題点がある。メタン菌は絶対嫌気性であるため分離培養には高度の嫌気条件が必要であり^{3,4)}、実際分離することは好気性廃水処理系からの細菌の分離培養に比較してはるかに難しい。メタン菌の培養計数法においてはロールチューブ法あるいはMPN法が用いられている⁴⁻⁶⁾が、前者においては寒天培地中でのコロニー形成に時間がかかったり、種によってはコロニーを形成しないなどの問題があり、後者においてはメタン発生をガスクロマトグラフィーで検出する間接法であるため、正確性に欠けるなどの欠点がある。さらには多くの未知のメタン菌が現在の培養技術では検出が困難なことも考えられ、実際、現存の記載菌種は実存する全メタン菌からみればごくわずかであろう³⁾。

メタン菌の分類学的同定作業となるとさらに困難性が加わる。メタン菌の分類・同定に使える表現形質は乏しく、形態、いくつかの生理学的性質、膜脂質成分などに限られるため、その分類基準も現在16S rDNAなどの分子生物学的情報に基づいて設定されている⁷⁾。したがってメタン菌をたとえ定量的に分離できたとしても、古典的生理・生化学的技法のみによる同定は実質的に不可能である。すなわち現行の培養技術やメタン生成活性などの間接的検出法だけに頼る限りにおいては、反応槽内のメタン菌の実体を質的内容を伴って把握することは現在においては不可能であるといえよう。

これらの問題を克服するために現在では、メタン菌の16S rRNA遺伝子を標的とした非培養系の分子技法を適用することが広がりつつある。一つはPCR法を利用して嫌気処理汚泥の混合微生物群集から16S rDNAを増幅・分離し、クローン化した後、各クローンの塩基配列から元の系に存在する菌の系統を推察する方法である⁸⁾。もう一つは、メタン菌の16S rDNAの解析情報に基づく各分類群に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いて特定種を検出するやり方である⁹⁻¹¹⁾。筆者らは前記の変法として、嫌気処理汚泥から構築した16S rDNAライブラリーの各クローンの制限酵素断片パターン(restriction fragment length polymorphism [RFLP])から、優占種を推定する試みを行なった¹²⁾。また類似の技法は自然界の微生物群集構造を解析する目的で用いられている¹³⁾。

PCR増幅した16S rDNAを解析する場合、塩基配列を直接決定しなくても制限酵素処理により間接的に塩基配列のパターンを知ることができる。この方法(16S rDNA-RFLP法)はその簡便性と迅速性から、微生物の分類・同定への応用が最近盛んになっている¹⁴⁾。純粋培養の場合、少量の菌体があれば、そのcell lysateから簡単に16S rDNAがPCR増幅でき、つづくPCR産物の制限酵素処理、電気泳動または他の手段による分離を経てRFLP解析に至るまで半日で解析が終了する。この技法は比較的安価な設備でできる上、放射性標識化合物などの厄介な試薬の取り扱いもない。またDDBJ, EMBL, GenBankのデータベースにはすでに膨大な量の16S rRNA/rDNAのデータが登録されているが、これらが利用可能なことも16S rDNA-RFLP法の利点の一つである。すなわち、これらの既知データを適当な遺伝子解析プログラムを用いてパーソナルコンピュータ上で解析すれば、制限酵素断片サイトやフラグメントサイズが瞬時に得られる。試験菌株の16S rDNA-RFLPを類縁菌の理論的フラグメントパターンと比較することにより、わざわざ対照菌を実験に用いずとも同定できる可能性がある。

すでに筆者らは、PCRを利用した16S rDNA-RFLP法をメタン菌のさまざまな分類群に適用し、菌種レベルでの同定に利用可能であることを報告し、また上記したように、この方法が嫌気処理汚泥の群集構造の非培養系解析手段としても有効であることも予備的に示した¹²⁾。また16S rDNAライブラリーからのRFLPパターンを求める手段として、通常のアガロースゲル電気泳動の代わりに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、これがフラグメント分離解像度の高い方法であることも、活性汚泥の発砲スカムの解析例から示した¹⁵⁾。

本研究では、さらに実処理嫌気汚泥中の優占メタン菌を、分離・培養することなく16S rDNA-RFLP法により推定する試みを行ない、RFLP解析手段としてのHPLC法の有効性を検討した。その結果、前報¹⁵⁾同様、優占菌解析技術として本法が有用であることを認めたので報告する。

2. 実験材料および方法

2.1 汚泥試料

A社食品工場廃水(澱粉系)の上昇流嫌気性汚泥ブランケット(UASB)法によるパイロットプラント高速処理施設から採取したグラニュール汚泥を用いた。採取時までのCOD負荷率は8 kg/m³/日、汚泥濃度は22 kg VSS

／m³であった。汚泥は滅菌したポリエチレン製ビンに満杯になるように採取し、寒剤入りクーラーに入れて研究室に持ち帰り、直ちに以下の調製を行なった。汚泥混液の一定量を取り、遠心分離で汚泥を集め、3回EDTA-saline溶液 (0.15M Na₂EDTA+0.15M NaCl, pH 8.5)で洗浄した。洗浄汚泥はその都度低速遠心分離 (3,000×g, 10分) で回収した。洗浄汚泥ペレット 2g (湿重量) 当たり10mlのEDTA-saline溶液を加えて懸濁し、-20℃で保存した。

2. 2 汚泥DNAの抽出・精製

汚泥からのDNAの抽出・精製は前報¹⁵⁾に記載した方法に準じた。保存汚泥の凍結融解を3回繰り返した後、遠心分離で汚泥を集めた。この汚泥 2g (湿重量) を取り、SL (sucrose-lysis) 緩衝液 (10% sucrose, 0.7M NaCl, 40mM Na₂EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5) に懸濁し、さらにリゾチムを加え (1 mg/ml)、全体を10mlとした。この汚泥懸濁液を3回フレンチプレス (20,000 p.s.i) にかけて、汚泥を破壊した。このフレンチプレス処理液を50ml容ファルコンチューブに移し、Proteinase K (0.1mg/ml)、つづいて1%ラウリル硫酸ナトリウムを加え、それぞれ60℃、30分間溶菌処理を行なった。この処理液にさらに1%臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを添加して60℃で30分間処理し、残存の多糖やタンパクを沈澱させた。その後等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) を加え、往復振とうしながらタンパク変性処理を行ない (室温、30分)、遠心分離 (5,000×g, 10分) した後、上清をピペットで回収した。この上清に2.5倍量の冷エタノールを加え、沈澱した粗DNAを遠心回収した。分離した粗DNAは、常法通りRNase処理とクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1, v/v) による除タンパク操作を数回繰り返して、精製した。精製DNAはTE緩衝液 (50mM Tris-HCl, 10 mM Na₂EDTA, pH 8.0) に溶かし、紫外部吸収 (260nm) からその濃度を求めた。精製DNA溶液は使用時まで-20℃で保存した。

2. 3 PCRとクローニング

PCRによる16S rRNA遺伝子の増幅は既報^{12,14)}の実験プロトコールに基づいて行なった。PCR試薬はすべて宝酒造(株)より購入した。反応組成は10X Reaction Buffer (10 μl), dNTP mixture (10 μl), forward primer (60 pmol), reverse primer (60 pmol), template DNA (50 ng), Taq DNA polymerase (0.5 units), および純水 (総量を100 μ

lとする) である。正向きプライマーとして、*Methanobacterium thermoautotrophicum*および*Methanosaeta soehngemii* (= *Methanosaeta concilii*) の16S rRNAのポジション5-23 (大腸菌16S rRNAのポジション9-28に相当) にそれぞれ相同的な2種のデオキシオリゴヌクレオチド (M1f: 5'-CGTTTGATCCTGGCGGAGG-3', M2f: 5'-TGGTTGATCCTGCCAGAGG-3') を、逆向きプライマーとして、大腸菌16S rRNAのポジション1492-1510に相補的な配列をもつデオキシオリゴヌクレオチド (1492r: 5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3') を用いた。このプライマーの設計によれば、既存の多くのメタン菌種の16S rDNAを増幅できることがわかっている¹²⁾。サイクル条件 (ホットスタート) は熱変性: 95℃-1分、アニーリング: 1分、伸長反応: 1.5分で、合計30サイクルまたは40サイクルの反応を行なった。機器はPerkin-Elmer GeneAmp PCR9600 systemを用いた。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動にかけて確認した後切り出し、Takara EasyTrap Version 2を用いるガラス吸着法で精製した。精製PCR産物は、SureClone Ligation Kit (ファルマシア) を用いて3'側のdA突出部位の除去とリン酸化を行ない、プラスミドベクター (pUC18 *Sma*I/BAP) に連結させ、定法通り*E. coli* JM109コンピテント細胞を用いて形質転換を行なった¹⁶⁾。形質転換陽性クローンからSephaglas FlexiPrep kit (ファルマシア) を用いてプラスミドを抽出精製し、TE緩衝液に溶解した。このプラスミドDNAを鋳型として再度上記の通りPCRを行ない、各クローンの16S rDNAインサート増幅物を得た。これらのPCR産物はポリエチレングリコール沈澱法¹²⁾で精製し、再度TE緩衝液に溶解した。

2. 4 制限酵素処理とHPLCによる分離

前回の研究結果から、メタン菌の種の識別には*Hae*III、*Hha*Iなどの4塩基認識制限酵素や、*Sma*IIによる16S rDNA-RFLP解析が有効であることが判明している¹²⁾。そこで今回もこれらの制限酵素を用いた。上記の再増幅したPCR産物は、宝酒造から購入した*Hae*III、*Hha*I、*Sma*Iで別々に断片化処理した。これらの酵素処理はメーカーの推奨する方法にしたがった。断片化した16S rDNAフラグメントは既報に基づきHPLC法^{15,17)}で分離した。用いたHPLCの条件は以下の通りである。ポンプ: Toso CCPM-2、カラム: TSKgel DEAE-NPR column (4.6mm×3.5cm)、カラム温度: 室温 (25℃)、検出器: Toso UV-8020 (at 260nm)、移動相溶媒/グラジエント条件: 0-0.5M NaCl/20mM Tris-HCl緩衝液 (pH

8.0)、流速: 1 ml/min、サンプル量: 10 μ l。DNA 標準品として、100bp ladder maker (ファルマシア) と ϕ 174 RF I DNA *Hae*III digest (宝酒造)を用いた。これらの標準品の溶出時間との比較から試料ピークのサイズ(bp)を算出した。また平行して 2 % MetaPhor アガロースゲル (1X Tris-boric acid-EDTA buffer) とミューピッドミニゲル電気泳動装置による分析^{12,14)} も行なった。

2. 5 既知菌種からの16S rDNAの分離とRFLP解析

すでに前回の実験¹²⁾ で得られている種々のメタン菌の cell lysateを用いて16S rRNA 遺伝子を増幅し、ポリエチレングリコール沈澱法で精製した後、制限酵素処理を行なった。この反応物を上記に準じて HPLC 法で分離した。

2. 6 系統解析

データベース機関(URL, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>, <http://rdp.life.uiuc.edu/>)に登録されている代表的なメタン菌の16S rDNAをインターネットを通じて入手した。CLUSTAL W¹⁸⁾ プログラムを用いて、これらの塩基配列のアライメントと進化距離の計算を行ない、近隣結合法¹⁹⁾のアルゴリズムにより系統樹を作成した。系統樹の自動描画にはTreeViewプログラム²⁰⁾を用いた。またこれらの16S rDNAデータをGENETYX-MACプログラム(ソフトウェア開発、東京)を用いて解析し、理論上の

制限酵素断片パターンを算出した。さらに上記のようにメタン菌の純粋培養菌体を用いて、16S rDNA の RFLP の実測パターンを得た。これらの解析で得られたすべてのサイズのフラグメントおよび汚泥の16S rDNAクローンから得られたすべてのフラグメントの一次配列を作成し、この配列に対して、各々の試験サンプルにおいて存在が認められるフラグメントを“S”, 存在しない場合を“T”と記号化し、これをCLUSTAL Wプログラム上で拡張子“.aln”のファイルとして作成した。このファイルに基づいてCLUSTAL Wで系統樹作成を行なった。これらの一連の操作にはApple Macintosh パーソナルコンピュータを用いた。

3. 結果

3. 1 汚泥からの16S rDNAの増幅とクローニング

汚泥試料 2 g (湿重量) から約60 μ gのDNAを抽出精製することができた。このDNAを鋳型として、2種類の正向きプライマーと1種類の逆向きプライマーの組み合わせを用いてPCRを行ない、約1.5kbの16S rDNAを増幅した。その結果をFig. 1 に示す。正向きプライマー M1f, M2f, および M1f+M2f (混合プライマー) での3条件でPCRを行なった結果、M1fでは増幅シグナルが弱く (Fig. 1, lane 2, 3)、M2f (lane 4, 5) および混合プライマー (lane 6, 7) の場合に、明瞭な増幅バンドが

Fig. 1 Amplification of 16S rRNA genes from bulk DNA of anaerobic sludge under different PCR conditions (lanes 2-7) and from known species of methanogens (lanes 8-9). Lane 1, size marker (λ -Eco T14 I digest); lane 2, product with forward primer M1f (30 cycles); lane 3, product with forward primer M1f (40 cycles); lane 4, product with forward primer M2f (30 cycles); lane 5, product with forward primer M2f (40 cycles); lane 6, product with forward primer M1f + M2f (30 cycles); lane 7, product with forward primer M1f + M2f (40 cycles); lane 8, product from *Methanosarcina barkeri*; lane 9, product from *Methanosaeta soehngenii*. Reverse primer 1492r was used in all PCR assays. PCR products were separated by electrophoresis (1% agarose) and detected by staining with ethidium bromide.

認められた。また30サイクルと40サイクルの反応では、いずれのプライマー条件でも増幅効率に差は認められなかった。電気泳動で検出した結果、混合プライマーを用いたPCR産物においてもっとも強い蛍光シグナルを認めたことから、この16S rDNAを以後の解析に用いた。

精製した16S rDNAをSureClone Ligation Kitを用いてクローン化したところ、プラスミド1 μg 当たり、 7.5×10^7 の形質転換率が得られた。形質転換陽性クローン30個を無作為に選択し、16S rDNAインサート部分のPCRを試みたところ、24クローンから1.5 kbの断片が増幅された。この24個の16S rDNAクローンをRFLP解析に用いた。

3. 2 RFLPパターン

得られた24個の16S rDNA試料をまずHaeIIIで消化し、HPLCでフラグメントパターンを分析した。その結果得られたフラグメントのサイズをTable 1に示す。調べた24クローンは断片パターンから4つのグループ(ribotype 1~4)に分別された。この中でribotype 1に属するクローンは全体の67%にあたる部分を占め、分析した汚泥中でこのクローンに相当するメタン菌が優占していることが示唆された。コンピュータで算出した理論的RFLPパターンおよび実験による実測値から、優占するribotype 1は*Methanosaeta*属に合致することが判明した。次に17%検出されたribotype 2のRFLPパターンは*Methanosarcina*属に相当することがわかった。一方残りのribotype 3, 4については、既知属に一致するパターンが認められなかった。

上記の結果から、試験汚泥中の優占菌はribotype 1に相当するメタン菌であろうと推測し、このグループの16S rDNAクローンについてさらにHhaIおよびSmaIによるRFLPパターンを調べた。その結果ribotype 1に属

するクローンのすべてが、用いた3つの制限酵素で同様のパターンを示した。HPLCで分析したribotype 1のクローンの典型的RFLPパターンをFig. 2に示す。

優占菌と推定されるribotype 1のHaeIII, HhaI, SmaIのRFLPパターンを、既知の代表的なメタン菌のそれらと比較したものがTable 2である。フラグメントの有無による定性的分析では、ribotype 1のクローンは*Methanosaeta soehngenii*にはほぼ一致することがわかった。

3. 3 系統解析

今回得られた優占クローンと既知のメタン菌との関係を定量的により明確にするために、各菌種/クローン間のRFLPパターンの相違度(%)マトリックスデータを作成し、このデータに基づいて近隣結合系統樹を描いた。またメタン菌の16S rDNAの塩基配列そのものに基づく系統樹も比較のため作成した。その2つの系統樹をFig. 3に示す。16S rDNAの配列に基づく系統解析からは、メタン菌は大きく3系統群(I, II, III)に分かれた(Fig. 3a)。これは従来の報告にあるorderレベルの3群、Methanococcales, Methanobacteriales, Methanomicrobialesにそれぞれ該当する。一方16S rDNA-RFLPの相違度に基づく系統樹では、幾分異なる樹形を与えたものの、各order内に存在するメタン菌属同士はクラスターをつくりやすい傾向にあった(Fig. 3b)。すなわち16S rDNA-RFLPに基づく系統樹は、本来の系統関係の擬似的パターンとして解釈可能であることが示唆された。今回得られた優占クローンは*Methanosaeta soehngenii*ときわめて近距離でクラスターを形成した。この距離からみて、優占クローンは*M. soehngenii*そのものか、あるいは異なるとしても非常に近縁の菌種に由来するものと思われた。

Table 1. Fragment patterns of HaeIII digests of 16S rDNA clones from anaerobic sludge.

Ribotype	Fragment size of Hae III digest	No. of clones isolated	% of clones
1	450, 210, 179, 120, 112, 100	16	67
2	376, 313, 210, 138, 100	4	17
3	450, 313, 187, 113, 100	2	8
4	450, 217, 187, 164, 113, 100	2	8

Fig. 2 HPLC elution profiles of endonuclease-digested fragments of a major 16S rDNA clone from anaerobic sludge. (a), *Hae*III digest; (b), *Hha*I digest; (c), *Sma*I digest. Fragment sizes (bp) estimated with size markers were shown by arrows.

Table 2. 16S rDNA-RFLP patterns of representative species of methanogens and the major clones (ribotype 1) from anaerobic sludge^a

Restriction enzyme used and size (bp) of fragments determined ^b	<i>T. celer</i>	<i>Mc. janaschii</i>	<i>Mc. voltae</i>	<i>Mbr. curvatus</i>	<i>Mba. thermoauto-</i>	<i>Msp. hungatei</i>	<i>Mh. evestigatum</i>	<i>Msc. barkeri</i>	<i>Mst. soehngenii</i>	Sludge clone
						<i>trophicum</i>				
<i>Hae</i> III (GGCC)										
503	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
445-450	—	—	—	+d	—	+	—	—	+	+
385-390	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
376	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
313-315	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
306	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
267	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
243-247	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—
229	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
210-217	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+
187-194	—	+d	—	+	+d	+	—	—	—	—
171-179	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
160-164	—	+d	+	—	+	—	—	—	—	—
138	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
129-130	+d	—	—	—	—	—	—	—	—	—
120	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
116	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
111-113	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+
100-102	+	+	—	+	—	—	—	+	+	+
<i>Hha</i> I (GCGC)										
1043	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
596-598	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
566	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
492	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
418	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
403	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—
375-382	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—
321-334	+	—	+	+	+	+	+	+d	—	—
304-305	—	+d	—	—	—	—	—	—	—	—
260	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—
250	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
189-192	—	+	+	—	—	—	—	—	+	+
139-140	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
130-136	+	+d	—	+	+	+	+	+	—	—
120-125	+	—	+	—	—	—	—	+d	—	—
113	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sma</i> I (CCCGGG)										
725-736	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
707-711	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—
599-609	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
428	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+
310	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)
281-288	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+
125-130	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+

^a Symbols : +, fragment present ; +d, duplicate fragments present ; (+), fragment present as only minor peak ; —, fragment absent. For full names of methanogenic species, see Fig. 3.

^b Fragment sizes (≥ 100 bp) estimated based on HPLC analysis, computer-aided restriction analysis, or a combination of both.

Fig. 3 Distance matrix trees showing phylogenetic relationships among methanogens and related methanogenic clones from anaerobic sludge. (a), tree inferred from the 16S rDNA sequences (scale bar = one base substitution per 100 nucleotides); (b), tree based on the 16S rDNA-RFLP patterns (scale bar = 10% divergence). The 16S rDNA of *Thermococcus celer* was used as an outgroup to root the trees. Both trees were constructed by the neighbor-joining method. In the 16S rDNA sequence-based tree (a), bootstrap confidence values with 1,000 times resamplings²⁸⁾ are shown at each branching point.

4. 考 察

メタン菌は一般に増殖が遅く、コロニーを形成しない菌種、純粋分離ができない菌種なども存在する。それ故、メタン菌が主要構成メンバーである嫌気性処理系に対しては、従来の培養技術は群集構造の解析手段として機能しにくい。従来の培養法に替わる群集構造の解析法としては、非培養系のバイオマーカー法や分子技法が考えられる。しかし活性汚泥などに対して有効な実績を上げているバイオマーカー法の一つキノプロファイル法²¹⁻²³⁾は、呼吸鎖キノンを欠くメタン菌に対しては全く適用できない。メタン菌は古細菌特有の、また分類群により異なる膜脂質成分を有しており、数少ない分類指標^{24,25)}となっているが、この成分を標的とするバイオマーカー法の適用性が考えられる。しかし、これをもし適用したとしても各メタン菌種を識別できるほどの脂質成分の多様性はなく、解像度に限界があるし、菌種組成を解釈するための定量的分析もまだ十分に確立されていないように思われる。

分子技法はこれらの問題点のある程度突破できる有力な方法である。本研究ではこの中でも最近、純粋微生物菌株の簡易・迅速同定に用いられている16S rDNA-RFLP法を、嫌気混合系の優占メタン菌の同定に用いることを試みた。今回用いた方法では、PCR増幅の鋳型となるDNAを汚泥から抽出・精製するの必要があり、この部分でやや煩雑な操作が含まれる。また得られたPCR産物をクローン化するため、このための時間も余計にかかる。しかしながら、汚泥からのDNA抽出に始まって最終のHPLCによるRFLPの解析までの所要時間は3～4日であり、他の分子技法⁸⁻¹¹⁾と比較してもそれほど時間がかかるという印象はない。もちろん培養技術に基づいた検出同定法に比べれば、はるかに時間が短縮できるという利点がある。HPLCによるRFLPの解析は技術的に容易であり、通常のアガロースゲル電気泳動と比較して分離解像度が優れている。半面、サンプル数が多いときに時間がかかる欠点があるが、前報⁵⁾でも述べたように、オートサンプラーを利用して夜間の連続分析を行えばこの部分の欠点を少し補えるであろう。

今回分析した汚泥からは、*Methanosaeta soehngenii* の

16S rDNA-RFLPパターンにはほぼ一致するクローンが優占して検出された。したがってこの嫌気処理汚泥中の優占メタン菌は、*M. soehngenii*または非常に近縁の菌種であろうと考えられる。事実、試験した汚泥を位相差顕微鏡で観察してみると、本菌に形態的に類似するフィラメント状の細胞が凝集体を形成している様が頻繁に観察され、今回の結果を裏づけた。データベースからは同一のRFLPパターンを示す*Methanosaeta concilii*の16S rDNAを得ることができるが、本菌は*M. soehngenii*のsynonymであると報告されている²⁶⁾。*Methanosaeta*属には他にも*M. thermophila*²⁷⁾や未記載の菌種¹²⁾が存在するが、それらの16S rDNA-RFLPパターンは、今回得られた優占クローンのそれとは完全に識別することができる¹²⁾。

16S rDNA-RFLPによる識別・同定は、Table 2にも示したように定性的判断に委ねることもできるが、系統樹作成によってRFLPパターンの相違度を定量的に視覚化すれば、客観的判断が容易になると考えられる。今回、16S rDNAの塩基配列に基づく系統樹とRFLPパターンに基づくそれとを比較した結果、樹形が異なる部分もあるが、各系統群内でのクラスター形成は比較的一致することが認められた。今回使用した制限酵素は*Hae*III, *Hha*I, *Sma*Iの3種類と少なく、データ量（フラグメントの一次配列）が小さいため、本来の系統関係を示す樹形とは少し異なる結果になったと考えられる。制限酵素パターンの量を増やしていけば、塩基配列そのものに基づく系統樹パターンに近似的な系統樹が得られるであろう。前報¹⁵⁾で示したスカム形成菌の場合は、16S rDNAの塩基配列とRFLPの系統樹はよく一致した。16S rDNA-RFLPに基づく系統樹が、各分類群の系統関係を論じるための簡易モデルとして使用可能であることを示唆している。

結論として、PCRクローニングと16S rDNA-RFLPを組み合わせた分子技法は、廃水処理系汚泥の有力な微生物群集診断法として活用できると考えられる。今回試験したクローンはメタン菌を標的として得られた24検体であるが、原核生物に共通なPCRプライマーを用いれば、メタン菌以外の古細菌や真性細菌由来の16S rDNAも増幅することができるし、クローンの検体数を増やせば群集構造全体の解析も可能である¹³⁾と考えられる。今後、汚泥からのDNA抽出効率、PCR増幅の偏り、キメラ生成物の可否などの問題点も同時に検討して行かなければならないだろう。

5. まとめ

PCRクローニング技術と16S rDNA-RFLP法を用いて、嫌気性処理汚泥における優占メタン菌を分離培養することなく検出、同定することを試みた。この研究の実験概要と結果は以下の通りである。

1. 汚泥からDNAを抽出・精製し、このDNAを鋳型としてメタン菌の16S rDNAを特異的にPCR増幅した。
2. 得られたPCR産物をクローン化し、形質転換陽性クローンの16S rDNAインサートを再増幅した。
3. 16S rDNAクローン24検体を*Hae*IIIで断片化し、そのフラグメントをHPLCで分離したところ、67%が同一RFLPパターンを示し、またこのパターンは*Methanosaeta soehngenii*のそれに一致した。
4. いくつかの制限酵素を用いた16S rDNA-RFLPパターンに基づき、系統樹作成を行なうことによって、得られた優占クローンと既知の分類群との関係を定量的かつ客観的に判断することが可能になった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたっては、鎌形洋一、中村和憲両博士（通産省工業技術院生命工学工業技術研究所）との共同研究の蓄積が原動力となった。両氏の協力や貴重なアドバイスを深くお礼申し上げる。

【引用文献】

- 1) 園田頼和：嫌気性処理法，廃水の生物処理（高原義昌編）、地球社、167-215，東京（1980）。
- 2) 鎌形洋一：絶対嫌気環境下における微生物の共生、水環境学会誌、15，429-434（1992）。
- 3) Whitman, W. B., Bowen, T. L., and Boone, D. : The methanogenic bacteria, In *The Prokaryotes* 2nd ed. Springer-Verlag, 719-767, Berlin (1992).
- 4) Conrad, R. and Shutz, H. : Methods of studying methanogenic bacteria and methanogenic activities in aquatic environments, In *Methods in aquatic bacteriology* (B. Austin ed.), John Wiley & Sons, 301-343 (1992).
- 5) Siebert, M. L. and Hattings, W. J. : Estimation of methane-producing bacterial numbers by the most probable number (MPN) technique. *Water Res.*, 1, 13-19 (1967).
- 6) 宮原高志、野池達也：メタン生成細菌の計数方法と意義，環境微生物工学研究法（土木学会衛生工学委員会編）、技報堂出版、149-152，東京（1993）。
- 7) Boone, D. R. and Whitman, W. B.: Proposal of minimal standards for describing new taxa of

- methanogenic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38, 212-219 (1988).
- 8) 小柳津広志: 16S リボソームRNAの塩基配列による細菌の同定と細菌相の分析、微生物の生態・微生物生態学の新たな展開とその手法 (日本微生物生態学会編)、学会出版センター、51-60, 東京 (1992)。
- 9) Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. : Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1232-1240 (1994).
- 10) Raskin, L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. : Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by using oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1241-1248 (1994).
- 11) Raskin, L., Rittman, B. E., and Stahl, D. A. : Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic films. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3847-3857 (1996).
- 12) Hiraishi, A., Kamagata, Y., and K. Nakamura, K. : Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 523-529 (1995).
- 13) Moyer, C. L., Dobbs, F. C., and Karl, D. M. : Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 871-879 (1994).
- 14) 平石明: PCRを利用した16S rRNA遺伝子の解析と系統研究-1. 16S rDNAの増幅と制限酵素断片解析. 日本微生物生態学会報、10, 31-42 (1995)。
- 15) Hiraishi, A., Shin, Y. K., and Takeuchi, J. : Restriction pattern analysis by high-performance liquid chromatography of PCR-amplified 16S rDNA fragments from scum-forming bacteria in activated sludge. *Microbes & Environments*, 12, inpress.
- 16) Sambrook J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. : *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)。
- 17) Asakawa, J., Satoh, C., Yamasaki, Y., and Chen, S.-H. : Accurate rapid detection of heterozygous carriers of a deletion by combined polymerase chain reaction and high-performance liquid chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9126-9130 (1992)。
- 18) Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. : CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680 (1994).
- 19) Saitou, N. and Nei, M. : The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425 (1987).
- 20) Page, R. D. M. : *TreeView* version 1.5. University of Glasgow, U.K. (1997).
- 21) Hiraishi, A. : Isoprenoid quinone profiles for identifying and classifying microorganisms in the environment. In *Recent Advances in Microbial Ecology* (Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R. Y., and Uchida, A. eds.), Japan Scientific Societies Press, 663-668, Tokyo (1989).
- 22) 平石明: 微生物菌体キノンの分析法と生態学的研究への応用. 微生物の生態・微生物生態学の新たな展開 (日本微生物生態学会編), 学会出版センター、35-50, 東京 (1992)。
- 23) 平石明: 呼吸鎖キノンをバイオマーカーとして用いる廃水処理系微生物群集の動態解析. 水環境学会誌, 15, 558-563 (1992)。
- 24) Koga, Y., Akagawa-Matsushita, M., Ohga, M., and Nishihara, M. : Taxonomic significance of the distribution of component parts of polar ether lipids in methanogens. *Syst. Appl. Microbiol.*, 16, 342-351 (1993).
- 25) Koga, Y., Nishihara, M., Morii, H., and Akagawa-Matsushita, M. : Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 57, 164-182 (1993).
- 26) Boone, D. R. : Strain GP6 is proposed as the neotype strain of *Methanosaeta soehngenii*^{VP} pro synon. *Methanothrix concilii*^{VP} and *Methanosaeta concilii*^{VP}. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 588-589 (1991).
- 27) Kamagata, Y., Kawasaki, H., Oyaizu, H., Nakamura, K., Mikami, E., Endo, G., Koga, Y., and Yamasato, K. : Characterization of three thermophilic strains of *Methanothrix* ("*Methanosaeta*") *thermophila* sp. nov. and rejection of *Methanothrix* ("*Methanosaeta*") *thermoacetophila*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 463-468 (1992).
- 28) Felsenstein, J. : Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791 (1985).

(受付 1997. 5. 23)

(受理 1997. 7. 22)