

Title	変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による地下水中の細菌群集構造解析
Author(s)	岩本, 朋忠
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169330
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

甲 7402

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による
地下水中の細菌群集構造解析

岩本 朋忠

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による
地下水中の細菌群集構造解析

岩本 朋忠

目次

緒論	1
本論	
第一章 地下水中の細菌群集の多様性を解析するための 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の条件検討	4
第二章 バイオレメディエーション実証試験における 地下水中の細菌群集構造の変化	10
第三章 バイオレメディエーション実証試験における 地下水中のメタン資化菌の挙動	23
総括	31
結論	33
謝辞	34
引用文献	35

Abbreviations

A.T.	atmospheric temperature
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DO	dissolved oxygen
EC	electric conductivity
PI	propidium iodide
W.T.	water temperature

緒論

人間活動の増大に伴い、大量の生活排水、工場廃水、畜産排水、肥料・農薬等が河川や地下水をはじめとする陸水中に流入し、深刻な水質汚濁を引き起こしている。水は全ての生命活動の源となるだけに、その汚染の拡大防止、修復は人類の緊急課題である。そのためには、工学的な対応のみならず、人為的な負荷の生態系への影響を評価し、根本的な解決を図らなければならない。

生態系の根幹部を構成する細菌は、分解者として有機化合物を無機化する役割を果たしていると同時に、腐食連鎖の第一次生産者として上位の生物に栄養源として利用されており⁽¹⁾、物質循環において中心的な役割を担っている。その世代交代時間は短く、多様な機能を持っていることから⁽²⁻⁴⁾、環境変化に速やかに応答した群集を形成する。また、その変化は上位の生態系に影響を及ぼす。したがって、人為的負荷に対する細菌群集の応答は、生態系への影響を早期に見出すための優れた生物指標となる。

群集の種構成の変化パターンを示すのに、種多様性が生態学において広く用いられている。種多様性は一般に、種の豊かさと均等性に基づいて評価される⁽⁵⁾。例えば、河川では有機物汚染の進行に伴い、水生生物の多様性は低下し、イトミミズ科に代表される特定の種により優占されることが知られている⁽⁶⁾。環境負荷の細菌群集への攪乱を評価するにあたっては、細菌群集の多様性の変化を解析することが有効になると考えられる。しかしながら、自然環境中の細菌の大部分は培養できない⁽⁷⁻¹⁰⁾という手法的な制約や細菌の種の同定は容易ではないという問題から、環境負荷に対する細菌群集の多様性の変化については十分な解析がなされていない。

培養操作に依存することなく自然環境中の細菌群集構造を解析するに当たっては、細菌群集を多様な遺伝子の集合体として捉え、個々の遺伝子を解析するというアプローチが有効である。種々の遺伝子情報の中でも16S rDNAは、変異領域と保存領域が確認されており、特定の種間での保存性が高いことから⁽¹¹⁾、系統分類および進化系統の指標分子として広く利用されている。したがって、自然環境中の細菌の16S rDNAを標的とすることで、培養操作に依存することなく、細菌群集構造の解析が可能となる。代表的な手法として、環境試料中の細菌から抽出したDNAの16S rDNAをPCR増幅したのち、クローンライブラリーを作成し、塩基配列を決定するという方法が土壌や水圏サンプルの細菌群集構造解析に広く用いられている⁽¹²⁻¹⁸⁾。本手法

を用いることで、群集を構成する細菌の種・属に関する情報を得ることができ、細菌群集構造の詳細な解析が可能となるが、1つの環境サンプルの解析に多くの労力と時間を要することから、細菌群集の多様性の変化を継続的にモニタリングするには適当な手法とは言えない。そこで、簡便に細菌群集の多様性の変化をモニタリングする手法として、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE法)が注目されている⁽¹⁹⁻²⁶⁾。DGGE法で得られる各バンドの輝度は個々の種の存在量を、バンドの数は種の数と反映していると考えられる⁽²⁷⁾。したがって、本手法では、種の同定を行うことなく細菌群集の多様性の変化をゲル上のバンドパターンの変化として解析できる。また、環境試料から得られる複雑なバンドパターンから、多様性指数の算出⁽²⁷⁾やバンドパターンの類似性評価⁽²⁸⁻³⁰⁾を行うことで、細菌群集の多様性の変化を客観的に評価することが可能である。さらに、機能遺伝子を標的とすることで、特定の機能を持つ細菌の多様性解析も可能となる^(31,32)。本研究では、環境負荷の地下水中の細菌群集に対する攪乱を、継続的にモニタリングできる手法として、DGGE法に着目した。

地下水中には、多種多様な細菌が存在するので、その多様性の解析にDGGE法を適用するにあたっては、適切な泳動条件を検討する必要がある。そのためには、変性剤濃度勾配の設定と泳動時間の決定が重要となる。そこでまず、標準株、地下水サンプル、および河川水サンプルを用いて、地下水中の細菌群集構造の解析に適したDGGE泳動条件を検討した。

次に、千葉県君津市で行われたバイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化をDGGE法によりモニタリングし、処理の細菌群集への攪乱について検討した。バイオレメディエーションとは微生物の持つ物質分解能力を利用して、汚染した環境を修復する技術である。汚染現場でのバイオレメディエーションの運用にあたっては、技術の有効性を微生物学的側面から評価すること、および実施に伴う環境への影響評価を行うことが重要となる。そのためには、まず汚染物質の分解に関与する特定の微生物をモニタリングする必要があるとともに、現場の微生物群集構造の変化を解析する必要がある。しかしながら、自然環境中の細菌の大部分は培養できないという手法上の制約から、バイオレメディエーションにおける微生物の寄与については、ブラックボックスとして扱われてきた。そのために効率的な浄化が見られない場合の原因解明や解決策について、浄化の中心的役割を担う微生物面からの検討ができないという問題がある。また、微生物群集に対す

る影響について理解されていないため、バイオレメディエーションの生態系への負荷を客観的に評価・確認することが難しいという問題も抱えている。

そこで本研究では、DGGE法を用いてバイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化をモニタリングし、処理の細菌群集への攪乱についての知見を得た。

バイオレメディエーションにおいて、微生物が浄化の中心的役割を担っているにもかかわらず、その寄与の解明についての研究は始まったばかりである。バイオレメディエーション技術の有効性を微生物面から評価するためには、まず汚染物質分解菌の挙動についての理解を深めなければならない。

そこで、バイオレメディエーション実証試験現場の地下水試料に対して、メタン資化菌を標的とするプライマー⁽³³⁻³⁵⁾を用いたDGGE解析を行い、処理による分解菌の挙動を解析した。

本論

第一章 地下水中の細菌群集の多様性を解析するための変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の条件検討

環境負荷による地下水中の細菌群集への攪乱を、その多様性の変化から評価する上で、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE 法)は有効な手法であると考えられる。地下水中には、多種多様な細菌が存在し、DGGE のバンドパターンは複雑になることから、その適用にあたっては、用いるプライマーにより得られる PCR 産物の分離条件を検討しなければならない。そのためには、解析する DNA 断片の 2 本鎖から 1 本鎖への解離度を求め、適切な変性剤濃度勾配の設定が必要となる。また、複数の DNA 断片の分離度を最大にするためには、全ての DNA 断片のゲル上での泳動が完了する泳動時間を決定する必要がある。そこで、本研究では、地下水中の細菌群集構造解析に DGGE 法を適用するための条件検討を行った。

材料および方法

採水地点

地下水は、千葉県君津市久留里市場の 2 本の井戸より深度約 4m の地点から、採水器(井戸用採水器 形式;SY-IK-B, 400 ml 容, 吉野計器)を用いて、1997 年 12 月 24 日に採取した。河川水は大阪府内を流れる神崎川の神崎橋より 1997 年 10 月 27 日、猪名川の桑津より 1997 年 12 月 10 日に表層水を採取した。河川水、地下水の採取時に採水現場で測定した気温、水温、pH、EC、DO を Table 1 に示した。

細菌株

DGGE の条件検討にあたっては、*Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 23055, *Escherichia coli* K-12 W3110, ならびに *Flavobacterium johnsoniae* ATCC 17061 を用いた。これらの菌株は LB 培地(1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl [pH 7.9])中で定常期まで培養し、実験に用いた。

DNA 抽出

試料 1.5 ml を 4℃, 15,000 x g, 45 分間遠心し、細菌を沈殿させ回収した。

遠心後の上清を別のチューブに移し、再び4℃、15,000 x g、45分間遠心し、再度細菌の回収を行った。それぞれの沈殿を25 μ lの滅菌水で懸濁し、液体窒素による凍結、室温での融解を3回繰り返したのち、懸濁液を1本のチューブにまとめた。

Table 1. Physico-chemical characteristics of river water and groundwater

Sampling stations	Sampling date	A.T. (°C)	W.T. (°C)	pH	EC (μ S/cm)	DO (mg/l)
Kanzakibashi	Oct. 27, '97	16.0	17.6	7.7	1600	7.7
Kuwazu	Dec. 10, '97	7.5	11.5	7.9	220	6.3
Kimitsu-C	Dec. 24, '97	3.1	13.5	7.0	213	3.4
Kimitsu-M5	Dec. 24, '97	3.2	12.8	7.1	279	1.7

A.T., atmospheric temperature; W.T., water temperature; EC, electric conductivity; DO, dissolved oxygen.

プライマー

当研究室で設計した真正細菌の16S rDNAに特異性を示す neo EUB プライマーを用いた。また、DGGE解析を行うために、933 f プライマーの5'末端にGCクランプを付した。プライマーおよびGCクランプの塩基配列をTable 2に示した。

Table 2. Primer sequences and positions

Primer	Positions ^a	Sequence
neo EUB 933f-GC-clamp	933 - 955	5'-GC-clamp-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3'
neo EUB 1387r	1368 - 1387	5'-GCCCCGGAACGTATTCACCG-3'

GC-clamp, CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG

^aThe numbers used for the position are the numbers in the corresponding *E. coli* sequence.

PCR

PCR反応液の組成は、3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, neo EUB プライマー各0.4 mM, 耐熱性 DNA Taq ポリメラーゼ(パーキンエルマ)1.25Uとした。アニーリング温度を各サイクル毎に0.5℃ずつ減少させるタッチダウンPCRを行った。反応条件は、95℃ 9分間で hot start し、94℃ 1分(denaturation), 65℃から55℃まで各サイクル毎に0.5℃

ずつ減少させ 1 分(primer annealing), 72°C 3 分(primer extension)を 20 サイクル行ったのち, 94°C 1 分(denaturation) 55°C 1 分(primer annealing) 72°C 3 分(primer extension)を 10 サイクル, 72°C 7 分(final extension step)で行った。

DGGE

グラディエントフォーマーを用いて, アクリルアミド総濃度 6.5% (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=37.5:1) で, 変性剤濃度に直線勾配ができるようにポリアクリルアミドゲルを作製した。40% ホルムアミドと 7M 尿素を含む溶液を変性剤濃度 100%としている。泳動後のゲルは, SYBER Gold (Molecular Probe)を用いて 20 分間染色したのち, FluorImager (Molecular Dynamics)で 488 nm アルゴンレーザーを用いてスキャンし, デジタルイメージを得た。

結果および考察

淡水中に多く存在することが報告されている⁽³⁶⁻³⁹⁾*Acinetobacter calcoaceticus*, *Flavobacterium johnsoniae* および, し尿汚染の指標菌である *Escherichia coli* を用いて変性剤濃度勾配の検討を行った。*Acinetobacter calcoaceticus* および *Escherichia coli* は, とともにプロテオバクテリアの γ サブクラスに属しており, 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析上, 比較的近いグループに分類されている。一方, *Flavobacterium johnsoniae* は, *Acinetobacter calcoaceticus* および *Escherichia coli* とは離れたグループに分類されている。系統的に近い細菌と, 離れた細菌の組み合わせとして, これら 3 株を用いた。*Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium johnsoniae* から PCR 増幅して得た 16S rDNA 断片の解離度を求めるために, 泳動方向と垂直方向に 40%から 80%の変性剤濃度勾配をもつゲルを用いて, 55°C, 100V で 3 時間泳動を行った(Fig.1)。いずれの DNA 断片も変性剤濃度勾配により, S 字型の泳動パターンを示した。変性剤濃度 45%では, いずれの DNA 断片も, その塩基長に応じた泳動を示しており, 2 本鎖構造が完全に維持されているものと考えられる。変性剤濃度勾配が 50%以上になると, 泳動距離に違いが現れ, 部分的な 1 本鎖への解離が進んでいることを示している。変性剤濃度約 55%以上で, *Flavobacterium johnsoniae* の泳動はほとんど停止していることから, GC クランプ以外の全ての配列が 1 本鎖に解離したことが分かった。*Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli* では, 約 60 - 65% で泳動が停止した。したがって, 今回用いたプライマーから得られる 16S rDNA 断

片の DGGE 解析には、これら 3 株が完全な 2 本鎖構造を維持する変性剤濃度である 45% から、ターゲット配列の全てが解離する濃度である 65% の変性剤濃度勾配をもつゲルが適当であると考えた。

次に、泳動方向と平行方向に 45% から 65% の変性剤濃度勾配を持つゲルを用いて、泳動時間の検討を行った (Fig. 2)。 *Escherichia coli*, 地下水 (Kimitsu-M5), さらに、地下水との比較のための河川水 (Kuwazu) より抽出した DNA から PCR 増幅して得た 16S rDNA 断片を一定時間毎にアプライし、泳動時間とバンドパターンの変化を追

跡した。 *Escherichia coli* では 10 時間、地下水、河川水サンプルでは 12 時間で全 DNA 断片の泳動がほぼ完了した。以上のことから、本プライマーを用いた地下水試料の DGGE 解析条件としては、55°C, 100V, 変性剤濃度勾配 45% から 65% で 12 時間泳動が適当であることがわかった。

環境中の細菌の解析に分子生物学的手法を適用するにあたっては、DNA の抽出効率ならびに再現性を十分考慮しなければならない。 Gillan ら⁽⁴⁰⁾ は、バイオフィルムの細菌群集構造解析において、DNA 抽出法の違いによる DGGE バンドパターンの違いを比較し、凍結・融解法が有効であると報告している。そこで、地下水および河川水試料中の細菌からの DNA 抽出に凍結・融解法を用いて、その再現性を確認した。河川水 (Kanzakibashi), 地下水 (Kimitsu-C, Kimitsu-M5) 試料を用いて、細菌の回収、DNA 抽出および PCR を各試料 3 回繰り返し、DGGE 解析を行った結果を Fig. 3 に示した。いずれのサンプルにおいても、同様のバンドパターンがみられ、今回用いた、細菌の回収法および DNA 抽出法の高い再現性が確認された。

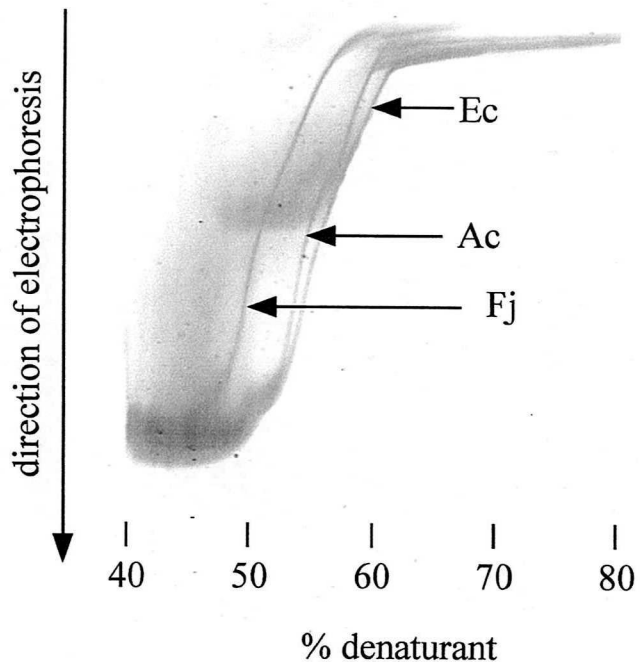


Fig. 1. Perpendicular DGGE separation pattern of a mixture of PCR-amplified 16S rDNA fragment from *A. calcoaceticus* (Ac), *E. coli* (Ec), and *F. johnsoniae* (Fj).

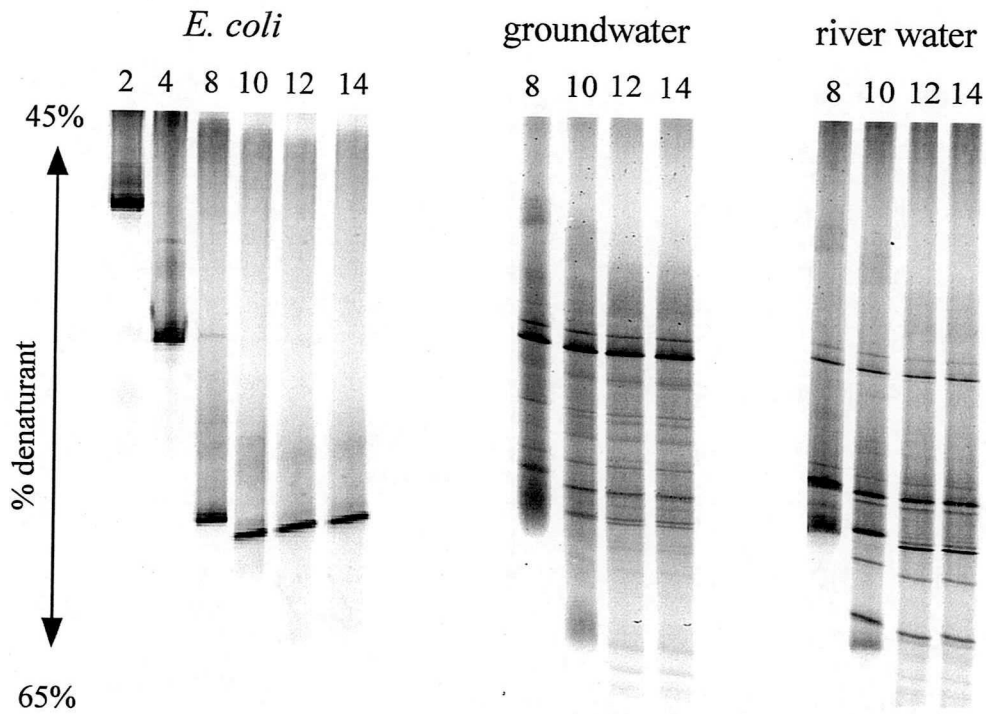


Fig. 2. Time travel experiment of DGGE separation pattern of PCR amplified 16S rDNA from *E. coli*, groundwater sample (Kimitsu-M5), and river water sample (Kuwazu). The time course of the experiments is indicated above the lanes in hours.

自然環境中の細菌群集構造解析への DGGE 法の適用は, Muyzer らによって, 1993 年にはじめて報告された⁽¹⁹⁾. 約 200bp の 16S rDNA 断片を増幅するプライマーを用いることで, バイオフィルムの細菌群集構造を DGGE のバンドパターンとして解析している. しかしながら, 彼等の用いたプライマーでは, 標的とする塩基長が短すぎるため十分な解析ができず, より長い領域を標的としたプライマーを用いる必要性が報告された⁽⁴¹⁾. そこで

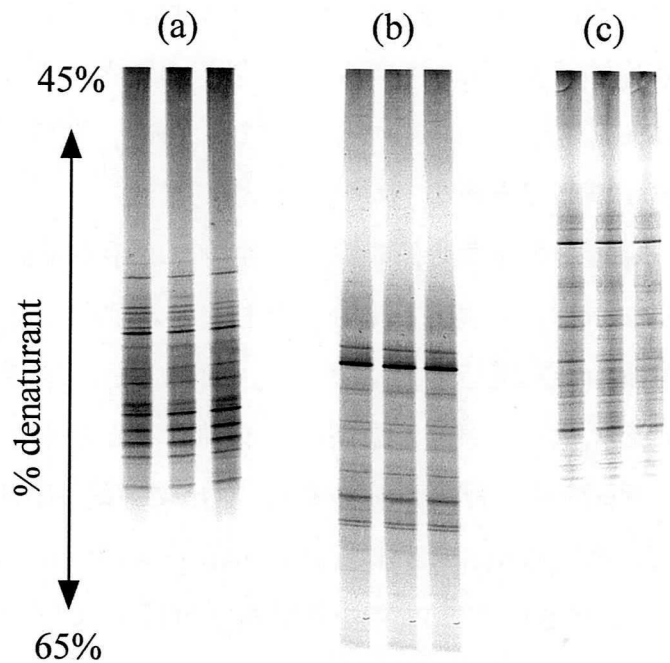


Fig. 3. DGGE analysis of triplicate samples taken from (a), Kankakibashi; (b) Kimitsu-M5; (c) Kimitsu-C. Condition for DGGE is 55°C, 100V, 12h.

今回、DGGE 法の地下水試料への適用を検討するにあたっては、当研究室において新たに設計した、真正細菌の 16S rDNA に特異性を示すユニバーサルプライマーを用いた。

DGGE 法は、細菌群集の多様性の変化をバンドパターンの変化として捉えることのできる優れた手法である。しかしながら、菌種により 16S rDNA のコピー数が異なる⁽⁴²⁾、PCR 増幅によるバイアス^(43,44)がかかる、さらに、存在量が全細菌数の 1% 以下であるマイナーな細菌についてはバンドとして検出できない⁽⁴⁵⁾などの問題から、DGGE バンドパターンは細菌群集構造を忠実に表現したものではないという点に注意しなければならない。同一地点において細菌群集の多様性の連続的な変化を解析する場合には、これらの問題が全てのサンプルに一樣に影響することから、DGGE 解析結果は元の細菌群集の多様性の変化をよく反映したものであると考えることができる。一方、異なる地点で得た DGGE 解析結果から細菌群集の多様性の違いを述べる場合には、上述の問題点について十分に考慮する必要がある。

小括

地下水中の細菌群集の多様性を解析するための DGGE 法の変性剤濃度勾配を検討するにあたっては、*Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium johnsoniae* を用いた。泳動方向と垂直方向に変性剤濃度勾配を持つゲルを用いて 55℃, 100V, 3 時間泳動を行った結果、*Flavobacterium johnsoniae* で約 55 %, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli* では 60 - 65% で一本鎖に解離することが分かった。また、いずれのサンプルも 45% では、完全な 2 本鎖 DNA 構造を維持することが分かった。このことから、本プライマーを用いた DGGE 解析には、45 % から 65 % の変性剤濃度勾配が適当であると考えた。次に、*Escherichia coli*, 地下水, 河川水試料を用いて、泳動時間の検討を行った。泳動方向と平行方向に 45 % から 65% の変性剤濃度勾配をもつゲルを用いて泳動した結果、*Escherichia coli* では泳動時間 10 時間、地下水, 河川水試料では泳動時間 12 時間で DNA 断片の泳動がほぼ完了することが示された。また、今回用いた細菌回収法および DNA 抽出法の再現性が確認された。

以上のことから、本プライマーを用いた DGGE 法を地下水中の細菌群集構造解析に適用するにあたっては、変性剤濃度勾配 45 % から 65 %, 55℃, 100V, 12 時間泳動が適当であると考えられた。

第二章 バイオレメディエーション実証試験における地下水中の細菌群集構造の変化

微生物の持つ多様な化学物質分解能を利用するバイオレメディエーションが、有害化学物質で汚染された土壌や地下水などを浄化する技術として世界的に注目されている。本技術は、現場での運用が可能なことから、環境中に広く拡散した汚染物質を低コストかつ効率的に除去しうるものとして期待されている。しかしながら、バイオレメディエーションにおいて微生物がその浄化の中心的役割を担っているにもかかわらず、処理における微生物の寄与については手法上の制約から、未だブラックボックスとして扱われている。そのため、効率的な浄化が見られない場合の原因解明や解決策について、微生物学的な面からの検討ができないという問題がある。さらに、バイオレメディエーションの生態系への影響を評価する上で必須となる、微生物に対する影響について理解されていないため、バイオレメディエーションの環境、また生態系への負荷を客観的に評価・確認することが難しいという問題を抱えている。

そこで、本研究では DGGE 法を用いて、バイオレメディエーション実証試験における細菌群集構造の変化を客観的・定量的に解析し、処理の細菌群集に対する攪乱についての知見を得た。

材料および方法

バイオレメディエーション実証試験

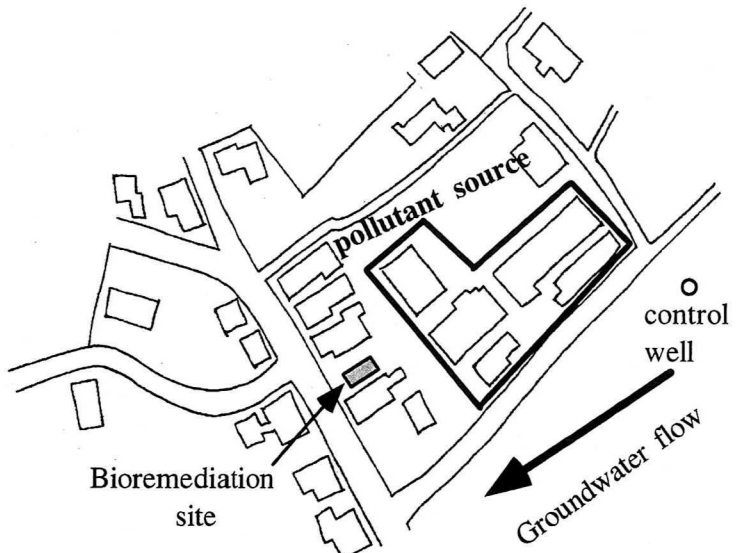
千葉県君津市久留里市場で行われたバイオレメディエーション実証試験現場周辺の概況を Fig.4 に、実証試験現場の概要を Fig.5 に示した。Fig.4 中の工場が汚染源であり、地下水流に沿ってトリクロロエチレン汚染が広がっている。実証試験現場の地下水は約 $200 \mu\text{g l}^{-1}$ のトリクロロエチレン汚染がみられた。第一帯水層は、地表面下約 8 から 18m (標高 34 から 44m) に分布し、地下水温度は 15 - 16°C, pH 6 - 7, 溶存酸素濃度は 4 - 6 mg l^{-1} である。原位置バイオレメディエーション実証試験は 1998 年 9 月 25 日より 1999 年 1 月 19 日まで行われた。揚水井戸から汲み上げた地下水にメタン、酸素、栄養塩を添加して注入井戸から 1.5 l min^{-1} の流量で戻すという、循環式の方法が用いられた。バイオレメディエーション装置の運転条件は、メタン(10mg l^{-1}) 190 分注入、水 50 分注入、酸素 30 mg l^{-1} と栄養塩(KNO_3 30 mg l^{-1}),

KH_2PO_4 15 mg l^{-1}) 190 分
 注入, 水 50 分注入とい
 うパルス注入であった。
 1998 年 12 月 21 日まで
 メタン, 酸素, 栄養塩の
 注入を継続したのち,
 1999 年 1 月 19 日まで
 は, 地下水の循環のみを
 行った。 採水地点を
 Fig.5 に示す。 サンプリ
 ング井戸 S1, S2, S3 お
 よびコントロ
 ール井戸より

採水器 (井戸
 用採水器 形
 式 ;SY-IK-B,
 400 ml 容, 吉
 野計器) を用
 いて, 地下水
 500 ml を採取
 した。 サンプ
 リングは, 実
 証試験開始前
 日, 実証試験
 10, 31, 40, 45,
 52, 60, 66, 73, 80, 87 日目, および処理終了後 29 日目に行った。

細菌数測定

全菌数測定には, PI (propidium iodide; Sigma)を用いた⁽⁴⁶⁾。 90℃, 3 分間で熱固定した試料に対し, PI を終濃度 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ となるように加え, 室温, 遮光下で 15 分間染色した。 蛍光染色した試料を孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のポリカーボネートフィルター(東洋



10 m Fig. 4. Sampling site in Kimitsu city.

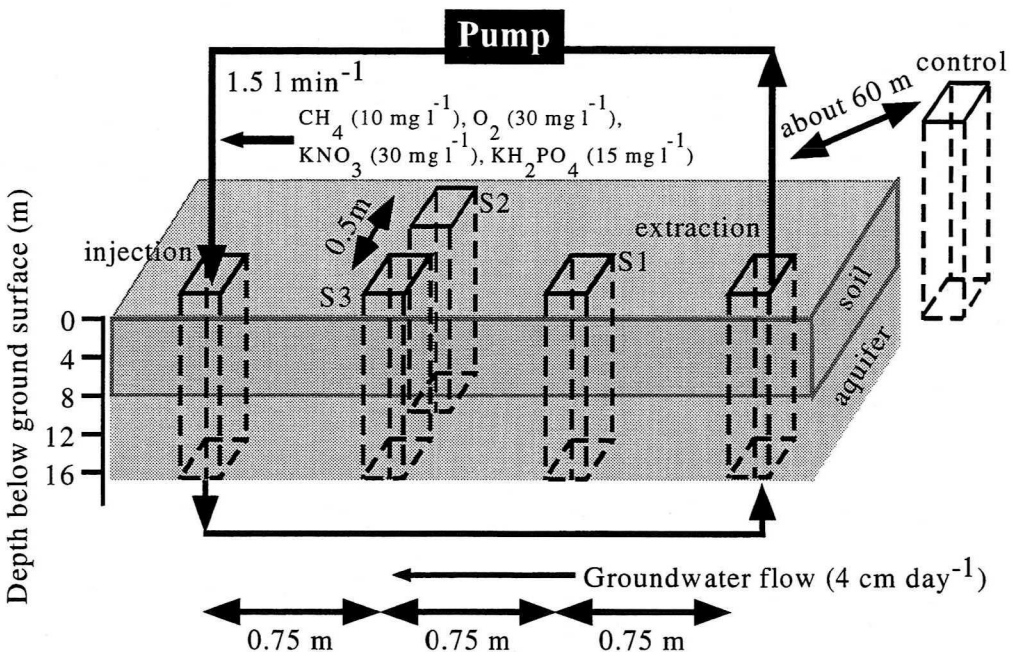


Fig. 5. Scheme of the location of sampling well S1, S2, S3, injection well, extraction well, and control well at Kururi test site.

濾紙)上に捕集し、プレパラートを作成後、蛍光顕微鏡 AX70(オリンパス)で観察した。光学フィルターは、M-WIG cube を使用した。各試料について細菌数が 1 視野あたり 80 個以上になるように調整し、1 試料当たり 30 視野以上を計数した。

コロニー形成菌数の測定には、R2A 寒天平板培地⁽⁴⁷⁾(酵母エキス, Difco Proteose Peptone No.3, カサミノ酸, グルコース, 可溶性デンプン各 0.5g; ピルビン酸ナトリウム, K_2HPO_4 各 0.3g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g; 寒天 15.0 g l⁻¹)を用いた。各試料を滅菌蒸留水で段階希釈し、その 100 μ l を R2A 寒天平板培地に塗抹した。25 $^{\circ}$ C で 1 週間培養したのち、生じたコロニーを計算した。

DNA 抽出, PCR

DNA 抽出および PCR は第一章に示した条件で行った。

DGGE 解析

第一章で決定した DGGE 条件を用いた。

DGGE バンドパターン解析

SYBER Gold (Molecular Probe)を用いて 20 分間染色したゲルを、FluorImager (Molecular Dynamics)で 488 nm アルゴンレーザーを用いてデジタルイメージを得た。デジタルイメージを Image QuaNT(ver.4-2-J)を用いて各バンドの輝度を数値化し、多様性指数である Shannon index の算出⁽²⁷⁾とバンドパターンの差異度の算出に用いた。

以下の式に基づき各レーンのバンドパターンより Shannon index を算出した。

$$P_i = n_i / N$$

(n_i ; 各バンドの輝度, N ; 全バンドの輝度の総和)

$$\text{Shannon index (H)} = - \sum P_i \log P_i$$

(P_i ; レーン内での各バンドの持つ重要度)

次に、対応するバンドの輝度の違いから各レーン間のバンドパターンの差異度を求め、計量的多次元尺度法⁽⁴⁸⁾を用いて解析することで、各バンドパターンの差異度を 2 次元上のプロット間の距離として表現した。解析には、SPSS 9.0J for Windows (SPSS Japan)を用いた。以下にその手順を示す。

(1) レーン内での全バンド輝度に対する各バンド輝度の割合を求める。

$$A_i = \frac{\text{レーンAにおけるバンドiの輝度}}{\text{レーンAにおけるバンドの輝度の総和}}$$

($i = 1 \sim P$, P ; 泳動距離の異なるバンドの総数, バンドの欠損は0として扱う)

(2) 各レーン間の P 次元空間における差異度を求める。

$$D_{AB} = \sqrt{\sum_{i=1}^P (A_i - B_i)^2}$$

D_{AB} : レーンA, B間の P 次元空間における差異度

(3) Stress をできるだけ小さくするように(X_i, Y_i)を決定する。

$$\text{Stress} = \sum_{k=1}^{n(n-1)/2} (\alpha_k^{(P)} - \alpha_k^{(2)})$$

$\alpha_k^{(P)}$; P 次元空間における n 個のレーン間の距離
($k = 1 \sim n(n-1)/2$)

DGGE バンドのシーケンス解析

目的とするバンドを切り出し, Centrilutor (Amicon)を用いて 150V, 3時間通電し, ゲル切片中の DNA を回収した。回収した DNA の一部を用いて再び PCR 増幅したのち DGGE 解析を行い, 元のバンドの位置と同じ位置であることを確認した。回収した DNA が元のバンド由来であることを確認したのち, GC クランプを付加していない neo EUB プライマーを用いて, PCR 増幅し, シーケンス解析に用いた。シーケンス解析は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PR Applied Biosystems)のプロトコールに基づいて行った。

結果および考察

注入井戸から 1.5m 離れたサンプリング井戸 S1, 注入井戸から半径 1m 以内に位置するサンプリング井戸 S2, S3, および汚染現場の上流部に位置し, バイオレメディエーション処理の影響を受けないコントロール井戸より採取した地下水試料の全菌数とコロニー形成菌数を Fig.6 に示した。いずれの地点においても, 全試験期間を

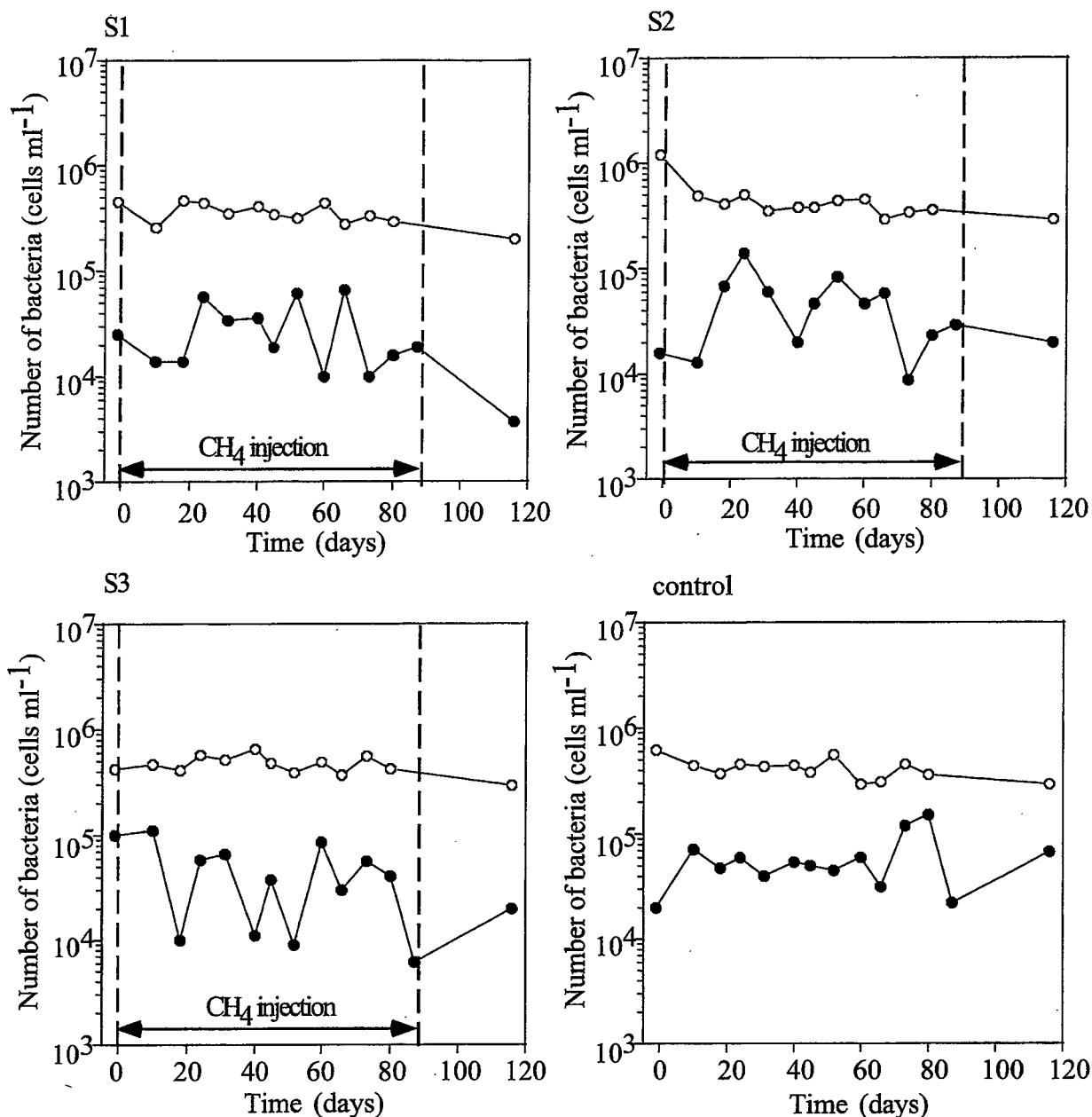


Fig.6. Changes in number of bacteria at four sampling wells. ○, Total direct counts determined by PI staining; ●, Colony forming units on R2A medium.

通じて全菌数はコロニー形成菌数に比べて約 10 倍高い値を示した。このことから、バイオレメディエーション処理現場地下水においても、通常の方法では、培養困難な細菌が多く存在することが確認された。また、実証試験中、全菌数、コロニー形成菌数の変化に一定の傾向は見られなかった。

S1, S2, S3, およびコントロール井戸から採取した地下水サンプルを用いた DGGE 解析結果を Fig.7 に示した。全てのサンプルにおいて多数のバンドが見られ、多種多様な細菌の存在を示した。S1, S2, S3 において、メタン注入処理後にバンドパターンの大きな変化が見られた。一方、コントロール井戸では、全試験期間を通じて、比較的安定したバンドパターンが示された。

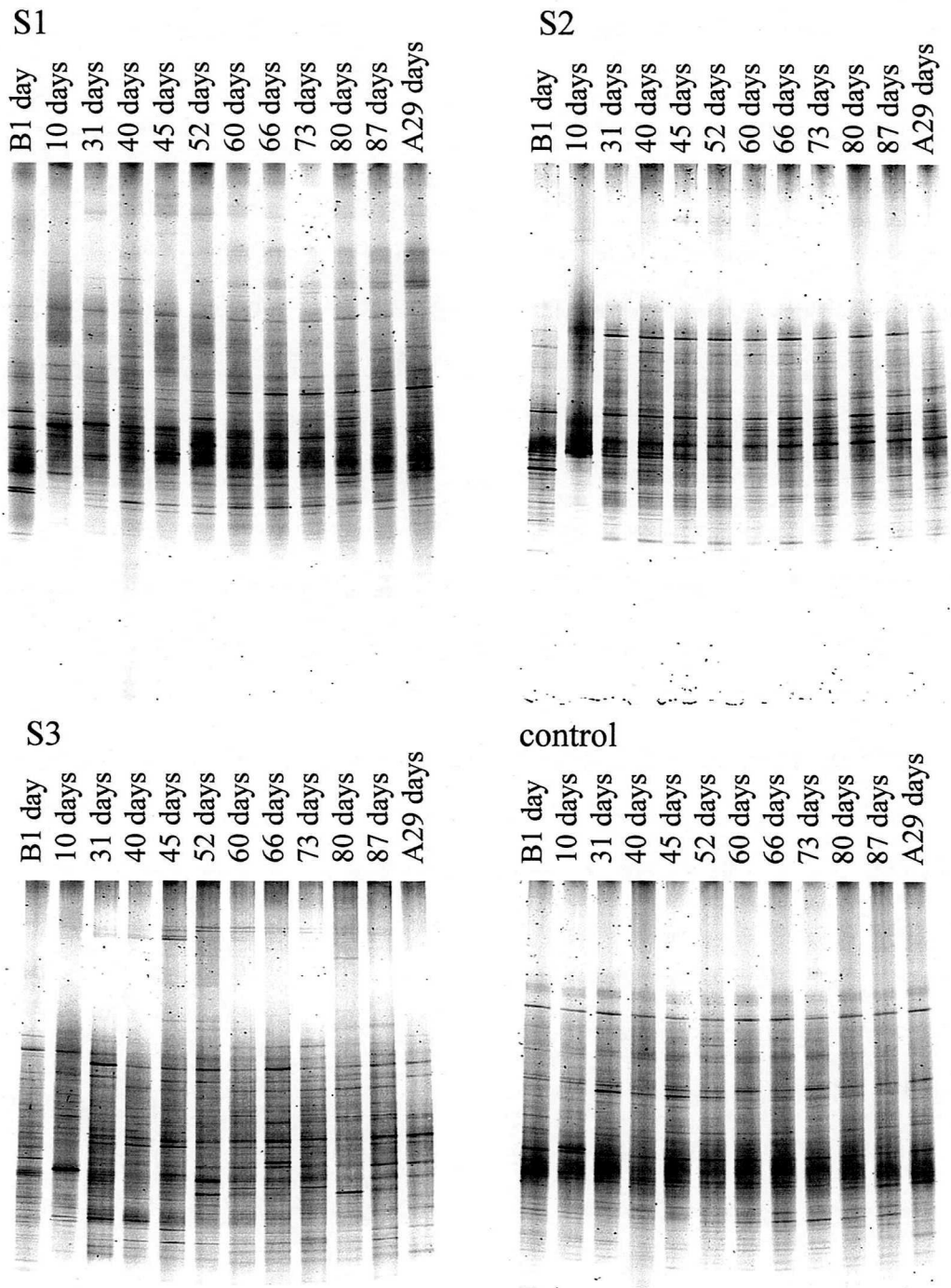


Fig. 7. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from sampling well S1, S2, S3, and control well. The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day, one day before the start of treatment; A29 days, 29 days after the end of treatment.

DGGE バンドパターンの変化を客観的に示した方法として、Eichner ら⁽²⁷⁾が報告した多様性指数の算出と Van Hannen ら⁽³⁰⁾による非計量的多次元尺度法を用いた類似性評価がある。Eichner らは活性汚泥サンプルより得た DGGE バンドの輝度と数に基づいて多様性指数の 1 つである Shannon index を算出した。細菌群集の多様性の量的変化を解析できる優れた手法であるが、変化の内容すなわち質的な変化を知ることができないため、Shannon index は同じであるが細菌群集構造は異なる 2 つの群集を区別することができない。Van Hannen らは湖水マイクロコズム試料を用いて得た DGGE バンドパターンの比較において、泳動距離が一致したバンドの数に基づく類似度を算出し、非計量的多次元尺度法を用いて解析することで、バンドパターンの類似度を 2 次元上のプロット間の距離として表現した。サンプル間の類似性を容易に知ることのできる優れた手法である。しかしながら、バンドパターンの類似度の算出において各バンドの輝度を考慮に入れていないため、個々の種の存在量の変化による細菌群集の違いを結果に反映することができない。そこで本実験では、DGGE バンドパターンを、デジタルイメージとして取り込み、各バンドの輝度を数値化したのち、Shannon index の算出と類似性評価を同時に行い、細菌群集の多様性の変化を量的・質的に解析した。バンドパターンの類似性評価にあたっては、各バンドの輝度を用いることで、個々の種の存在量の違いを反映した差異度を算出し、計量的多次元尺度法による解析を行った。

Shannon index を算出した結果を Fig.8 に示した。S2, S3 で処理 10 日目に Shannon index はそれぞれ 1.10 から 0.89, 1.33 から 1.13 へと減少し、多様性の急激な減少が示された。しかしながら、その多様性は、処理 31 日目には元のレベルに回復し、その後も高い多様性を維持した。一方、S1 においては、処理直後の急激な減少は見られず、処理前と同様もしくは、やや高い多様

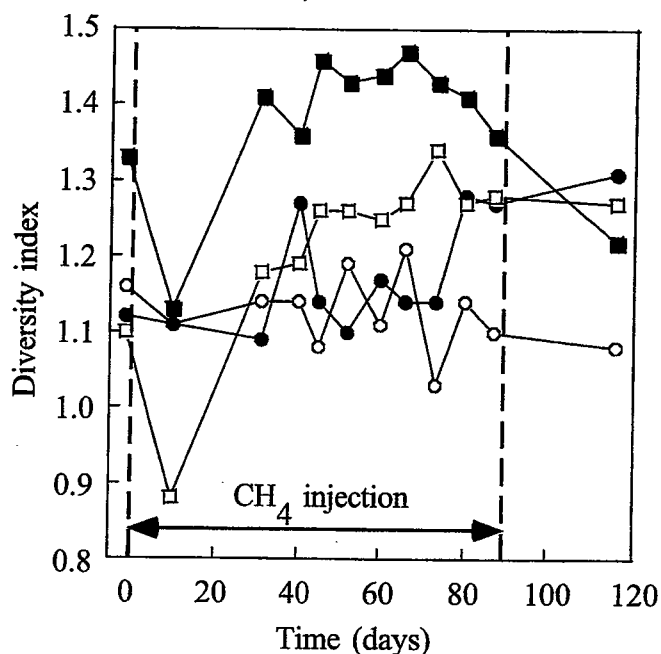


Fig. 8. Shannon index of the DGGE banding pattern from Fig. 7. ●, S1; □, S2, ■, S3; ○, control.

性が示された。この違いの理由としては、S1 は、注入井戸から最も離れた地点に位置しており、S2、S3 に比べて処理の影響が弱かったためではないかと推察される。

メタン注入停止後のサンプルでは、S3 において減少する傾向がみられたが、S1、S2 の多様性はほとんど変化が見られなかった。バイオレメディエーション処理停止後の細菌群集の多様性の変化を調べるためには、さらに、長期間にわたるモニタリングが必要であると思われる。コントロールでは、実証試験期間中 Shannon index は 1.03 から 1.21 の間で変動しており、一定の傾向は認められなかった。また、その変動の大きさは、処理区のサンプルに比べて小さいものであった。本結果から、バイオレメディエーション実証試験現場の地下水では、処理により一時的に細菌群集の多様性は減少するものの、短期間のうちに回復し、処理開始前とほぼ同じレベルを維持することが示された。このことは、バイオレメディエーションは、細菌群集の極端な単純化、すなわち不可逆的な多様性の減少を引き起こすものではないことを示している。Macnaughton ら⁽⁴⁹⁾は、海岸部でのオイル汚染をシミュレートしたバイオレメディエーション実証試験から、バイオレメディエーション処理により、現場の細菌群集の多様性が高まることを報告している。一般には、強いストレスを受けた環境中の細菌群集の多様性は減少することが知られている⁽⁵⁰⁻⁵²⁾。しかしながら、バイオレメディエーションでは、基質とともに、酸素および栄養塩の注入を行っていることから、分解菌以外の一般細菌の生育が同時に促され、その結果、多様性の高い細菌群集が形成されたのではないかと考えられる。

Shannon index の結果からは、急激な多様性の増減、および回復を確認できるものの、その質的变化については知ることができない。そこで、細菌群集の多様性の質的な変化を解析するために、各レーン間のバンドパターンの差異度を求め、多次元尺度法を用いて解析し、細菌群集構造の類似性を 2 次元上のプロット間の距離として示した(Fig. 9)。S2、S3 では、メタン注入処理 10 日目、31 日目、40 日目、45 日目とバンドパターンは大きく変化したのち、破線円内に示した類似性の高いグループへと収束する傾向が見られた。したがって、S2、S3 での細菌群集は処理後 45 日目まで大きく攪乱され、その後、比較的安定した群集構造を形成するものと考えられる。また、最終的に形成された細菌群集構造は、処理開始前の構造とは大きく異なっていることが分かった。S1 においても変化に遅れが見られたものの、60 日目で類似性の高いグループへと収束した。S1 におけるこの細菌群集の反応の遅れは、S1 が注入井戸から最も離れた地点に位置しているためであると推察される。

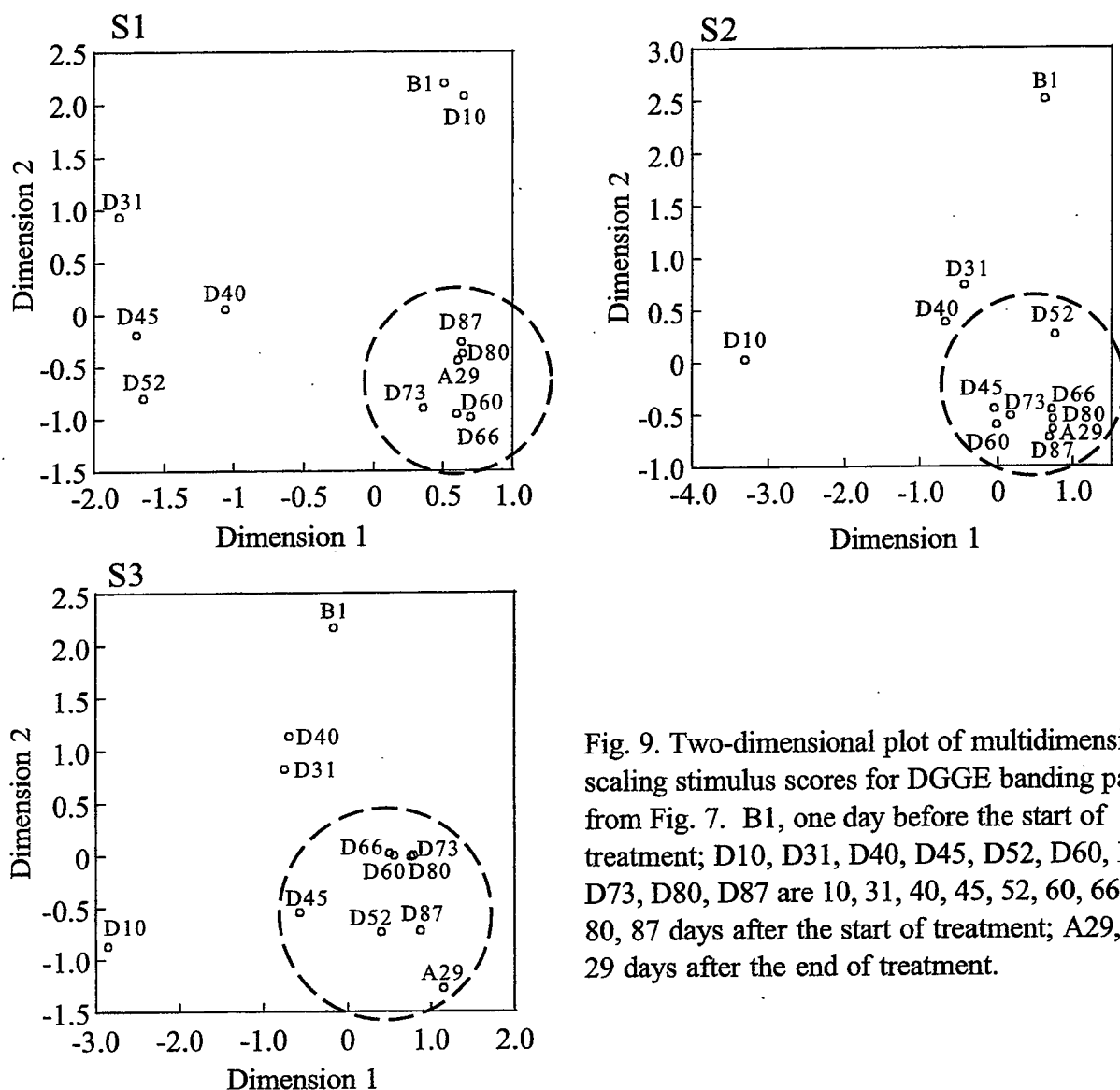


Fig. 9. Two-dimensional plot of multidimensional scaling stimulus scores for DGGE banding pattern from Fig. 7. B1, one day before the start of treatment; D10, D31, D40, D45, D52, D60, D66, D73, D80, D87 are 10, 31, 40, 45, 52, 60, 66, 73, 80, 87 days after the start of treatment; A29, 29 days after the end of treatment.

図中の X 軸, Y 軸に示した数字はデータをプロットするために用いたものであり, 異なる figure 間での距離の比較に用いることはできない. 異なる井戸間での細菌群集構造の変化の大きさを比較するためには, 同一ゲル上で DGGE 泳動し, 多次元尺度法で解析する必要がある. そこで, 処理区における群集構造の変動がコントロールでみられる自然の状態での変動に比べて大きいことを確認するために, S2 とコントロールから得たサンプルを同一ゲル上で DGGE 解析した. 得られた DGGE バンドパターンを Fig.10 に, その差異度を求め多次元尺度法で解析した結果を Fig.11 に示した. Fig.11 の結果は, コントロール井戸でのデータのばらつきは S2 でのばらつきに比べて小さいことを示した. したがって, 処理区で見られた細菌群集構造の変化は, バイオレメディエーションにより引き起こされたものであるといえる.

以上, 多様性指数とバンドパターンの類似性を評価した結果から, バイオレメデ

イエーション実証試験現場の地下水中の細菌群集構造は、処理開始後一時的に大きく攪乱されたのち、処理に伴い、多様性が高くかつ安定した群集が形成されることが分かった。多様性が高く安定した細菌群集は、外乱に対する適応性が高いと考えられている⁽⁵⁾。したがって、本結果は、バイオレメディエーションにより変化した細菌群集構造は、環境に適応したものであり、多様性の観点からは、健全な状態にあることを示しているものと考えられる。

実証試験期間中、各サンプリング井戸において毎日測定されたトリクロロエチレン濃度の結果を Table 3 に示した⁽⁵³⁾。処理開始後 1 ヶ月間は、トリクロロエチレン濃度に大きな変動が見られた。この期間は、細菌群集構造が大きく攪乱された期間でもある。一方、細菌群集構造が比較的安定した、45 日目以降では、トリクロロエチレン濃度も安定していることが示されている。実証試験期間中、注入井戸より注入された地下水中のトリクロロエチレン濃度は、 $192 \pm 10 \mu\text{g l}^{-1}$ であった。このことから、本実証試験現場では、処理 45 日目以降、約 10 - 15% のトリクロロエチレン

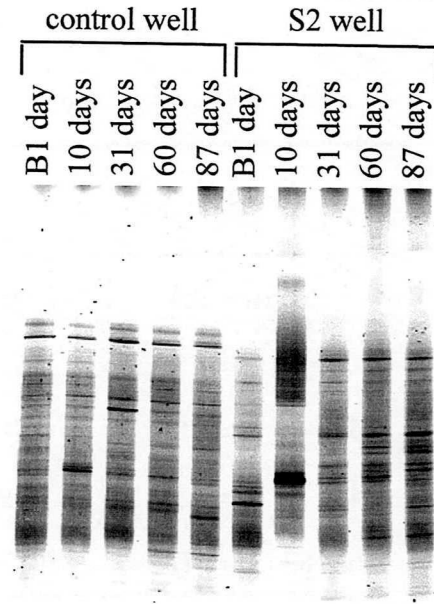


Fig. 10. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from sampling well S2 and control well. The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1, one day before the start of treatment.

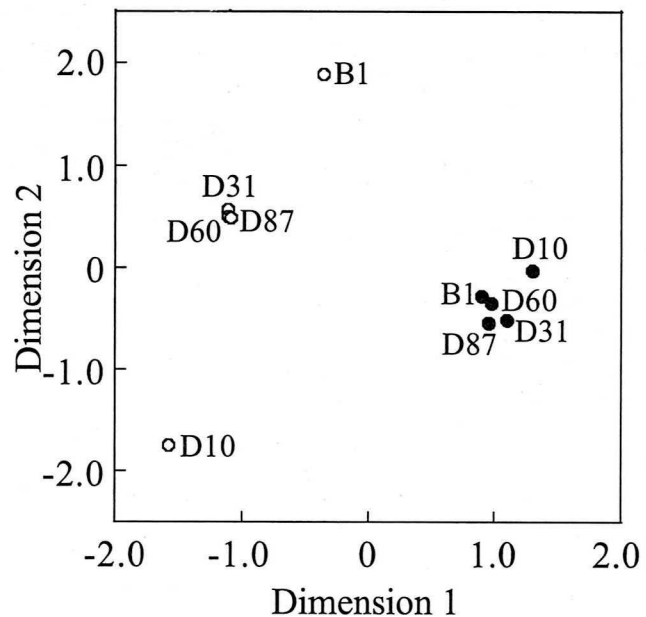


Fig. 11. Two-dimensional plot of multidimensional scaling stimulus scores for DGGE banding pattern from Fig. 10. ○, sampling well S2; ●, control well; B1, one day before the start of treatment; D10, D31, D60, D87 are 10, 31, 60, 87 days after the start of treatment.

Table 3. Concentration of trichloroethylene during field experiment

days of operation	S1 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	S2 ($\mu\text{g l}^{-1}$)	S3 ($\mu\text{g l}^{-1}$)
1 - 15 (n = 15)	178 \pm 16*	174 \pm 16	180 \pm 17
16 - 30 (n = 15)	177 \pm 17	173 \pm 14	175 \pm 14
31 - 45 (n = 15)	178 \pm 6	178 \pm 6	179 \pm 10
46 - 60 (n = 15)	169 \pm 4	166 \pm 4	166 \pm 4
61- 87 (n = 27)	167 \pm 5	165 \pm 7	170 \pm 6

* Values, Means \pm SD.

が安定して除去されたものと考えられる。これらの結果は、効率的なトリクロロエチレン除去への細菌群集構造の多様性およびその安定性の関与を示すものである。

今回の実証試験では、メタン資化菌の増殖を目的として、現場地下水へのメタンの注入が行われた。そこで、本処理によるメタン資化菌と優占種との関係を調べた。サンプリング井戸 S2 で得た DGGE 泳動後のゲルより、強い輝度を持つ 9 本のバンド (Fig.12) すなわち、優占種として存在

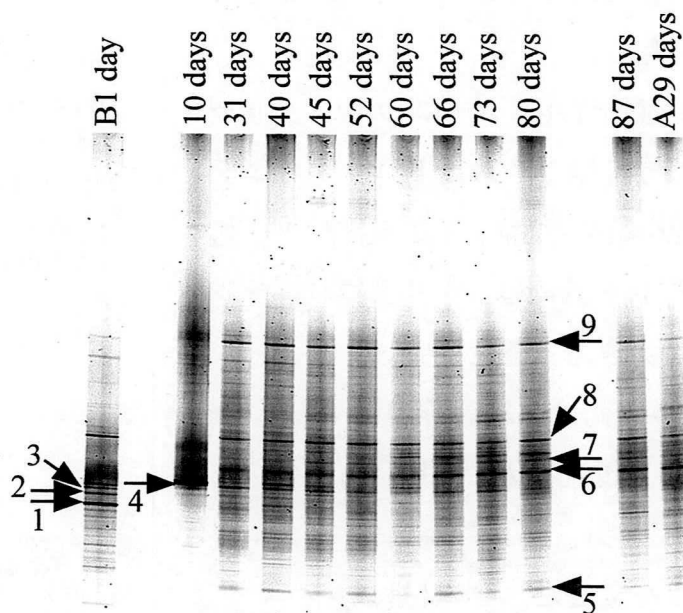


Fig. 12. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from sampling well, S2. The numbered allows refer to the excised and sequenced bands.

The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day, one day before the start of tretment. A29 days, 29 days after the end of treatment.

する細菌の 16S rDNA に由来するバンドを切り出し、その塩基配列を決定したのち、FASTA を用いて GeneBank 上の全塩基配列に対するホモロジー検索を行った。ホモ

Table 4. Sequence similarities of the excised bacterial bands that appear in Fig. 12.

Band No.	% Similarity	Closest relative	Taxonomic description
1	93	<i>Agrobacterium sanguineum</i>	α - <i>Proteobacteria</i>
2	87	<i>Aquaspirillum delicatum</i>	β - <i>Proteobacteria</i>
3	92	<i>Acidovorax delafieldii</i>	β - <i>Proteobacteria</i>
4	96	<i>Methylobacter psychrophilus</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>
5	87	<i>Methylobacterium</i> sp. GK118	α - <i>Proteobacteria</i>
6	85	<i>Methylocystis</i> sp. EB1	α - <i>Proteobacteria</i>
7	70	Uncultured ACE-27	not classified
8	84	Unidentified BD5-13	not classified
9	90	Unidentified BD5-13	not classified

ロジー検索の結果を Table 4 に示した。処理 10 日目に優占種として存在した細菌に由来するバンド 4 の塩基配列は、タイプ I のメタン資化菌である *Methylobacter psychrophilus*⁽⁵⁴⁾ と 96% の相同性を示した。このことから、現場では本菌が、メタン注入に速やかに反応して増殖したものと考えられる。バイオレメディエーション実証試験期間中の細菌群集構造の変化をモニタリングした DGGE 解析結果では、このバンドは処理 31 日目を以降消失しており、本菌が一時的に優占種となるものの定着しなかったことを示した。処理 31 日目を以降存在したバンド 5, 6 の塩基配列は、タイプ II のメタン資化菌と比較的高い相同性を示した。それぞれ、バンド 5 は *Methylobacterium* GK118 株⁽⁵⁵⁾ と 87%、バンド 6 は *Methylocystis* EB1 株⁽⁵⁶⁾ と 85% の相同性を示した。処理前のサンプルのみで存在したバンド 1 から 3 は、それぞれ、プロテオバクテリアの α サブクラスあるいは β サブクラスに属する細菌に由来するものと考えられる。また、処理 10 日目を除く全てのサンプルで存在したバンド 8, 9 の塩基配列は、BD5-13 株と比較的高い相同性を示した。本株は、深海の底泥サンプルよりクローニングされたものである。メタン注入処理にともない出現したバンド 7 の塩基配列については、現在のところ相同性の高いものは見つからなかった。本結果から、実証試験現場地下水へのメタン注入により一時的にタイプ I のメタン資化菌が優占種となり、その後、タイプ II のメタン資化菌を含む複数の細菌が優占種として存在することが示された。

以上、DGGE バンドパターンから Shannon index の算出および類似性評価を行うことで、環境負荷の細菌群集への影響を客観的・定量的に解析することが可能となった。また、強い輝度を示すバンドの塩基配列を決定することで、優占種の解析が可能であることが示された。細菌群集の多様性の変化を指標とした環境影響評価に寄与するものと期待される。

小括

DGGE 法を用いてバイオレメディエーション実証試験における現場地下水中の細菌群集の多様性の変化を解析した。また、強い輝度を示すバンドの塩基配列を決定し、実証試験期間中、優占種として存在した細菌の 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析を行った。

DGGE バンドパターンより算出した Shannon index から、メタン注入処理により現場地下水中の細菌群集の多様性は、一時的に減少するものの、処理に伴い多様性は高まり安定した状態になることが分かった。また、バンドパターンの差異度を多次元尺度法を用いて解析したところ、メタン注入処理に伴い細菌群集構造は大きく変化したのち、処理 45 から 60 日目以降で安定することが分かった。さらに、効率的なトリクロロエチレン除去への細菌群集構造の多様性および安定性の関与が示された。一方、処理の影響を受けないコントロール井戸では、全試験期間を通じて比較的安定した細菌群集構造が維持された。

強い輝度を示すバンドの塩基配列を決定し、優占種の解析を行ったところ、メタン注入処理開始直後にタイプ I のメタン資化菌が優占種となり、その後、タイプ II のメタン資化菌を含む複数の細菌が優占種となることが示された。

本実験より、DGGE 法を用いることで、環境負荷の細菌群集への影響を、そのバンドパターンの変化から客観的・定量的に評価できることが示された。

第三章 バイオレメディエーション実証試験における地下水中のメタン資化菌の挙動

バイオレメディエーションの実施における汚染物質分解菌の挙動を把握することにより、バイオレメディエーションはより確かな技術となる。しかしながら、その挙動については手法的制約からほとんど理解されておらず、効率的な浄化が見られない場合の原因解明や解決策を微生物学的側面から検討することができないという問題がある。

そこで本研究では、メタン資化菌を標的とする3種類のプライマーを用いて DGGE 解析を行いバイオレメディエーション実証試験現場におけるメタン資化菌の挙動を解析した。

材料および方法

細菌株

実験には、*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* K12 W3110, *Flavobacterium breve* GIFU 3159, *Methylomonas* sp. KSW III, *Methylomonas* sp. KSW III, *Methylocystis* sp. M, *Methylosinus trichosporium* OB3b を用いた。

地下水試料

第二章で示したサンプリング井戸 S2 より、処理開始1日前、10日目、24日目、31日目、40日目、45日目、52日目、60日目、66日目、73日目に採取した地下水を用いた。

DNA 抽出

200 ml の地下水サンプルを孔径 0.2 μ m のポリカーボネートフィルターを用いて濾過し、細菌をフィルター上に捕集した。フィルターを遠心管 (15 ml 容) に移し sodium-EDTA 緩衝液 (1 mM EDTA-2Na, 20 mM sodium acetate, pH 5.5) を 1 ml 加えて液体窒素で凍結したのち、室温で融解した。Tris-EDTA で平衡化した Phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) 6 ml と 25% SDS (sodium dodecyl sulfate) 60 μ l を加え、60 $^{\circ}$ C で 5 分間振とうしたのち、氷上で 3 分間放置した。3,500 x g, 5 分間遠心後、水層を別の遠心管に移し、2.5 倍量の 100% ethanol と 2 M sodium acetate (pH

5.2) 250 μ l を加え-20 $^{\circ}$ C で3時間以上静置したのち, 3,500 x g , 1時間遠心後, 上清を捨てた. 70% ethanol で沈殿を洗浄したのち, 沈殿を乾燥させ 50 μ l のろ過滅菌水で懸濁した.

PCR プライマー

本実験で使用したプライマーの塩基配列を Table 5 に示した. タイプ I のメタン酸化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーを独自に設計し, MI F, MI R とした. タイプ II のメタン酸化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーを独自に設計し, MII F, MII R とした. *mmoX* 遺伝子の検出には, Miguez ら⁽³³⁾が設計した *mmoX* 531, Shigematsu ら⁽³⁴⁾が設計した *mmoX* 901 および McDonald ら⁽³⁵⁾が設計した *mmoX* 1403 を用いた.

Table 5. Primer sequences and positions

Primer	Positions ^a	Sequence
MI-f-GC-clamp	423 - 442	5'-GC-clamp-GGGTTGTAAAGCACTTTCAA-3'
MI-r	984 - 1001	5'-CTGGATGTCAAGGGTAGG-3'
MII-f-GC-clamp	437 - 455	5'-TTTCGCCAGGGACGATAAT-3'
MII-r	973 - 995	5'-GTCAAAAGCTGGTAAGGTTCTGA-3'
<i>mmoX</i> 531	531 - 560	5'-CGGTCCGCTGTGGAAGGGCATGAAGCGCGT-3'
<i>mmoX</i> 901-GC-clamp	901 - 926	5'-GC-clamp-TGGG TSAARACSTGGAACCGCTGGGT-3'
<i>mmoX</i> 1403	1381 - 1403	5'-TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCTC-3'

GC-clamp, CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG

^aThe numbers used for the position of MI-f, MI-r, MII-f, and MII-r are the numbers in the corresponding *E. coli* sequence. The numbers for positions of *mmoX* primers are the number of bases for the beginning of *mmoX* gene in *Methylomonas* sp. KSWIII.

PCR

PCR 反応液の組成は, いずれのプライマーを用いた場合も, 3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, プライマー各 0.4mM, 耐熱性 DNA Taq ポリメラーゼ(パーキンエルマ)1.25U とした. MI F, MI R を用いた PCR 反応条件は, 95 $^{\circ}$ C 9分間 (hot start), 94 $^{\circ}$ C 1分 (denaturation), 51 $^{\circ}$ C 1分 (primer annealing), 72 $^{\circ}$ C 3分 (primer extension)を 35 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 7分 (final extension)で行った. MII F, MII R を用いた PCR 反応条件は, 95 $^{\circ}$ C 9分間 (hot start), 94 $^{\circ}$ C 1分 (denaturation), 53 $^{\circ}$ C 1分 (primer annealing), 72 $^{\circ}$ C

3 分 (primer extension)を 38 サイクル, 72°C 7 分 (final extension)で行った.

mmoX 遺伝子の増幅には semi-nested PCR 法を用いた. 1st PCR を 95°C 9 分間 hot start, 94°C 1 分(denaturation), 65°C 1 分(primer annealing), 72°C 3 分(primer extension) を 30 サイクル, 72°C 7 分(final extension step)で行った. 1st PCR 後の反応液 0.5 μ l を 2nd PCR に用いた. 2nd PCR では, touch down PCR を行った. 反応条件は, 95°C 9 分間で hot start し, 94°C 1 分(denaturation), 67°C から 57°C まで各サイクル毎に 0.5°C ずつ減少させ 1 分(primer annealing), 72°C 3 分(primer extension)を 20 サイクル行ったのち, 94°C 1 分(denaturation) 57°C 1 分(primer annealing) 72°C 3 分(primer extension)を 10 サイクル, 72°C 7 分(final extension step)で行った.

DGGE

MIF, MIR プライマーを用いて PCR 増幅した 16S rDNA 断片および MII F, MII R プライマーを用いて PCR 増幅した 16S rDNA 断片の解析には, 変性剤濃度勾配 45% から 65%のポリアクリルアミドゲル (総アクリルアミド濃度 6.5%, アクリルアミド:ビスアクリルアミド=37.5:1) を用いて 55°C, 100V で 12 時間泳動した. *mmoX* 遺伝子の PCR 増幅産物の解析には変性剤濃度勾配 40%から 80%のポリアクリルアミドゲル (総アクリルアミド濃度 6.5%, アクリルアミド:ビスアクリルアミド=37.5:1) を用いて 55°C, 100V で 12 時間泳動した.

DGGE バンドのシーケンス解析

目的とするバンドを切り出し, Centrifuge (Amicon)を用いて 150V, 3 時間通電し, ゲル切片中の DNA を回収した. 回収した DNA の一部を用いて, 再び PCR 増幅したのち DGGE 解析を行い, 元のバンドの位置と同じ位置であることを確認した. 回収した DNA が元のバンド由来であることを確認したのち, GC クランプを付加していないプライマーを用いて, PCR 増幅した. 16S rDNA 断片は, そのままシーケンス解析に用いた. *mmoX* 遺伝子断片は, TA cloning kit (Invitrogen)を用いてクローニングを行い, 得られたクローンよりプラスミドを抽出し, シーケンス解析に用いた. シーケンス解析は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PR Applied Biosystems) のプロトコールに基づいて行った.

結果および考察

メタン資化菌はホルムアルデヒドの代謝経路や膜構造の違いなどの特徴により、タイプ I と II に分類される⁽⁵⁷⁾。また、可溶性メタンモノオキシゲナーゼを持つ一部のメタン資化菌はトリクロロエチレンを共代謝的に分解できることが知られている⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾。そこで、本実験では、第二章で述べたバイオレメディエーション実証試験現場におけるメタン資化菌の挙動を各タイプ別に追跡するために、タイプ I のメタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーとタイプ II のメタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーを独自に設計し、DGGE 法に用いた。また、トリクロロエチレン分解能を持つメタン資化菌の挙動を追跡するために既知のプライマーを組み合わせた semi-nested PCR を行い、DGGE 法による解析を行った。

今回用いたプライマーの特異性を Fig.13 に示した。実験に用いた 4 株のメタン資化

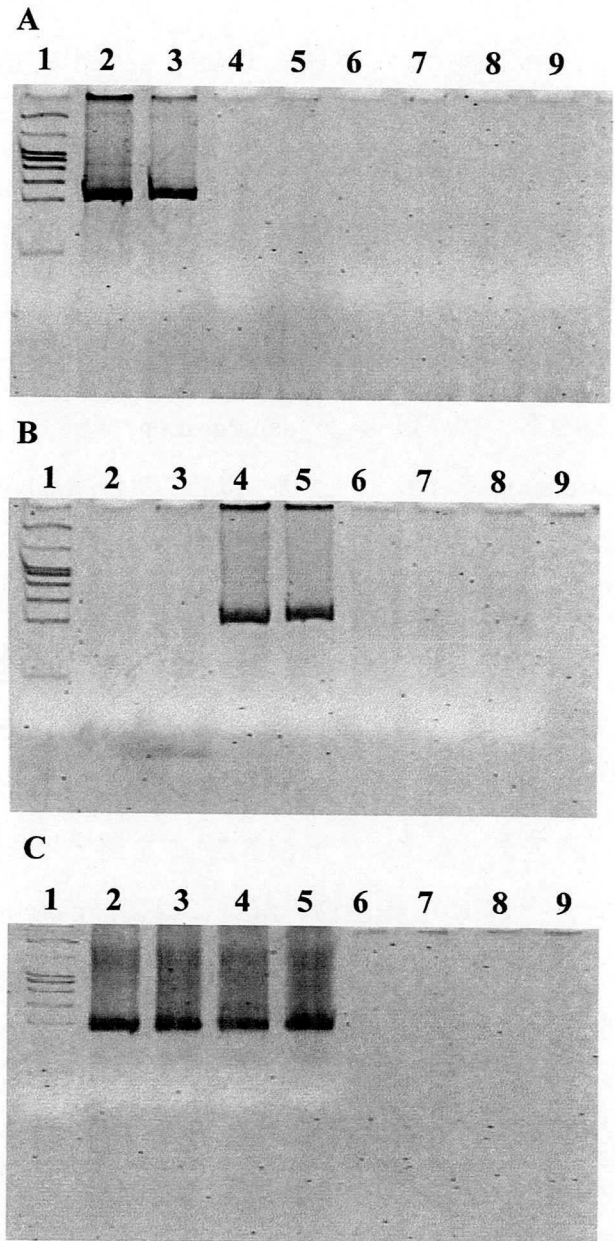


Fig. 13. PCR amplification of methanotroph DNA with type I methanotroph 16S rDNA specific primers (A), type II methanotroph 16S rDNA specific primers (B), and *mmoX* specific primers (C). Lane 1 contained pHY size marker. Lane 2 to 9 contained PCR products obtained after amplification of methanotroph and non-methanotroph DNA template. Lane 9 contained no template DNA. Lane 2, *Methylomonas* sp. KSP III; lane 3, *Methylomonas* sp. KSW III; lane 4, *Methylocystis* sp. M; lane 5, *Methylosinus trichosporium* OB3b; lane 6, *Aeromonas hydrophila*; lane 7, *Escherichia coli*; lane 8, *Flavobacterium breve*.

菌はいずれも可溶性メタンモノオキシゲナーゼを持つメタン資化菌である。各プライマーが標的とする細菌でのみ PCR 増幅が見られ、今回のプライマーの特異性が確認された。

タイプ I およびタイプ II のメタン資化菌を標的とした DGGE 解析結果を Fig.14 に示した。試料には、第二章で述べたサンプリング井戸 S2 から採取した地下水を用いた。いずれの結果も単純なバンドパターンを示しており、特定の種のみが優占種として存在することが分かった。タイプ I のメタン資化菌を標的とした DGGE 解析結果では、メタン注入 10 日目に強い輝度を持つバンド 1 が一時的に出現し、その後消失した。一方、タイプ II を標的とした結果では、処理 31 日目にバンド 2 が出現しその後強い輝度を示した。本結果はバイオレメディエーションにより、まずタイプ I のメタン資化菌が増殖し、その後タイプ II のメタン資化菌が優占種として存在したことを示しており、第二章で得た結果と一致した。

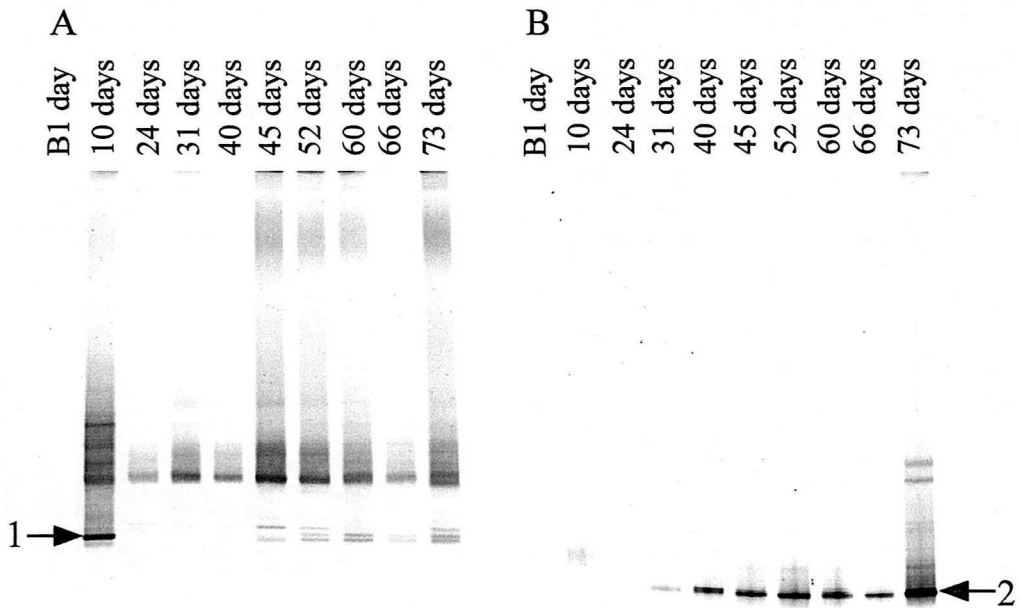


Fig. 14. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments generated with primers specific for type I methanotrophs (A) and for type II methanotrophs (B) from sampling well S2 groundwater. The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day, one day before the start of treatment.

バンド 1, 2 を切り出し, 塩基配列を決定したのち, ホモロジー検索を行った. メタン注入処理直後に増加したバンド 1 の塩基配列は, *Methylobacter psychrophilus* および *Methylobacter* T20 株と 98% の相同性を示したことから, バンド 1 の由来となる菌は *Methylobacter* 属であると考えられる. また, バンド 2 の塩基配列は, *Methylocystis* M 株⁽⁶²⁾, *Methylocystis* EB1 株, および LR1 株⁽⁶³⁾と 98%の相同性を示したことから, バンド 2 の由来となる菌は *Methylocystis* 属であると考えられる. *Methylocystis* 属のメタン資化菌は可溶性メタンモノオキシゲナーゼを持っており, トリクロロエチレンを共代謝的に分解することが知られている⁽⁶⁴⁾. したがって, バンド 2 の由来となる細菌は, トリクロロエチレン分解能を持っているものと考えられる. また, その出現時期は, 第二章で示されたトリクロロエチレン除去が安定化した時期と一致することから, 本菌は効率的なトリクロロエチレン除去に寄与しているものと推察される. 一方, *Methylobacter* 属については, 現在までのところメタンモノオキシゲナーゼを持つ菌の存在は報告されていない.

次に, *mmoX* 遺伝子を標的とした DGGE 解析結果を Fig.15 に示した. バンド 1 はメタン注入処理開始前から処理 66 日目まで強い輝度を持って存在した. 処理 31 日目からはバンド 1 に加えバンド 2 も強い輝度を持って存在し, 処理 73 日目にはバンド 2 のみが強い輝度を持つバンドとして存在した. このことから, 本実証試験における, 可溶性メタンモノオキシゲナーゼを持つメタン資化菌の優占種の変化が示された. 次に, バンド 1, 2 を切り出し, 塩基配列を決定したのち, ホモロジー検索を行った. バンド 1 の塩基配列は, タイプ I のメタン資化菌である *Methylococcus*

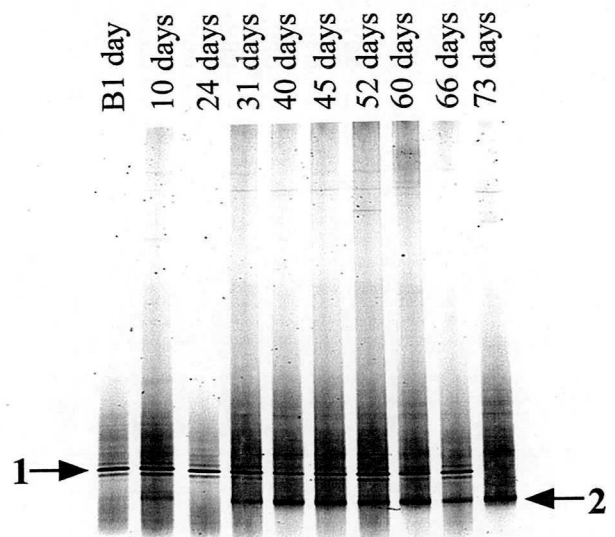


Fig. 15. DGGE analysis of PCR-amplified *mmoX* gene fragments generated with DNA from sampling well S2 groundwater.

The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day, one day before the start of treatment.

capsulatus bath 株⁽⁶⁵⁾の *mmoX* 遺伝子と 90%の相同性を示した。バンド 2 の塩基配列は、タイプ II のメタン酸化菌である LR1 株の *mmoX* 遺伝子と 95%の相同性を示し、16S rDNA を標的とした解析結果と一致した。より正確な系統解析のためには、それぞれのバンドの由来となる細菌の 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析が必要である。しかしながら、現在までに報告されている *mmoX* 遺伝子の配列に基づく系統解析は、16S rDNA に基づく系統解析を良く反映していることから、バンド 1 の由来となる細菌はタイプ I のメタン酸化菌、バンド 2 の由来となる細菌はタイプ II のメタン酸化菌に属するものと考えられる。以上のことから、バイオレメディエーション処理の初期の段階でのトリクロロエチレン除去に関与したのは、処理前から優占種として存在したタイプ I のメタン酸化菌であるものと推察される。その後、タイプ II のメタン酸化菌が増殖し、より安定したトリクロロエチレン除去に関与したものと考えられる。

処理開始前に行われた、培養法に基づく微生物解析では、現場地下水からはタイプ II のメタン酸化菌のみが検出され、タイプ I のメタン酸化菌は検出されなかった⁽⁵⁶⁾。今回の結果は、培養法では検出されなかったタイプ I のメタン酸化菌の存在を確認するものであり、培養に依存しない本手法の有効性を示すものであるといえる。

以上の結果から、バイオレメディエーション実証試験現場地下水へのメタン注入は、タイプ II のメタン酸化菌を優占的に増殖するものであることが示された。

小括

タイプ I メタン酸化菌、タイプ II メタン酸化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーを用いた DGGE 解析を行い、バイオレメディエーション実証試験現場地下水中のメタン酸化菌の挙動を解析した。また、可溶性メタンモノオキシゲナーゼをコードしている *mmoX* 遺伝子に特異的なプライマーを用いた DGGE 解析を行い、トリクロロエチレン分解能を持つメタン酸化菌の優占種の変化を追跡した。

タイプ I、タイプ II のメタン酸化菌を標的とした DGGE 解析結果からメタン注入に対してまずタイプ I のメタン酸化菌が速やかに増加したのち、タイプ II のメタン酸化菌が増加してくることが分かった。16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析を行ったところ、メタン注入処理直後に増加した菌は、*Methylobacter psychrophilus* および *Methylobacter* T20 株と 98%の相同性を示した。また、処理開始 31 日目以降に増加した菌は、*Methylocystis* M 株、*Methylocystis* EB1 株および土壌より単離された LR1

株と 98%の相同性を示した。

mmoX 遺伝子を標的とした DGGE 解析の結果から、本実証試験における可溶性メタンモノオキシゲナーゼを持つメタン資化菌の優占種の変化が示された。*mmoX* の塩基配列に基づく系統解析を行ったところ、実証試験開始前から 60 日目まで優占種として存在した菌はタイプ I のメタン資化菌である *Methylococcus capsulatus* Bath と 90%、31 日目以降優占種として存在した菌は、土壌より単離されたタイプ II のメタン資化菌である LR1 株と 95%の相同性を示した。したがって、バイオレメディエーション実証試験の初期の段階でのトリクロロエチレン除去に関与したのは、処理前から優占種として存在したタイプ I のメタン資化菌であるものと考えられる。その後、より安定したトリクロロエチレン除去が見られた期間では、タイプ I のメタン資化菌に加えて、タイプ II のメタン資化菌の増殖が認められた。

総括

過度な人間活動は、地球規模で見られる水環境汚染を引き起こし、我々人類の生存を脅かしている。河川、地下水などの淡水資源の汚染の拡大防止、修復のためには環境負荷の生態系への影響を的確に評価し、根本的な解決を図らなければならない。そのためには、環境負荷の生態系への影響を速やかに検出する必要がある。

生態系の根幹部を構成する細菌は、世代交代時間が短く、多様な機能を持っていることから、環境変化に速やかに応答した群集を形成する。また、その変化は上位の生態系に影響を及ぼす。したがって、負荷に対する細菌群集の応答は、生態系への影響を早期に見出すための、優れた生物指標になり得る。

環境負荷の細菌群集への攪乱を客観的・定量的に評価するにあたっては、細菌群集の多様性の変化を解析することが有効になると考えられる。しかしながら、自然環境中の細菌の大部分は培養できないという手法上の制約や細菌の種の同定は容易ではないという問題から、環境負荷に対する細菌群集の多様性の変化については、十分な解析がなされていない。そこで本研究では、種の同定を行うことなく細菌群集の多様性の変化をゲル上のバンドパターンの変化として解析できる、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法に着目し、環境負荷の地下水中の細菌群集に及ぼす影響評価に適用した。

地下水中には多種多様な細菌が存在するので、その多様性の解析にDGGE法を適用するにあたっては泳動条件の最適化を検討する必要がある。そこで、真正細菌の16S rDNAに特異的なプライマーを用いて標準株、地下水、河川水サンプルより得た16S rDNA断片を分離するための変性剤濃度勾配、および泳動時間の検討を行った。その結果、地下水中の細菌群集構造の解析には、55℃、100V、変性剤濃度勾配45%から65%で12時間泳動が適当であることが示された。

次に、DGGE法を用いて、千葉県君津市で行われたバイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化をモニタリングし、処理の細菌群集への影響について調べた。バイオレメディエーションにおいて微生物が汚染物質の浄化の中心的役割を担っているにもかかわらず、処理における微生物の寄与については手法上の制約から、未だブラックボックスとして扱われている。したがって、処理の微生物群集への影響について理解されていないため、バイオレメディエーションの環境、また、生態系への負荷を客観的に評価・確認することが難しいという問

題を抱えている。DGGE法を用いて、バイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化を解析した結果、メタン注入処理により、細菌群集は一時的に大きく攪乱され、急激な多様性の減少が見られたものの、処理に伴い多様性は元のレベルに回復し、かつ安定した群集構造が形成されることが分かった。多様性が高く、安定した細菌群集は外乱に対する適応性が高いと考えられることから、本結果は、バイオレメディエーションにより変化した細菌群集構造は、多様性の観点からは健全な状態にあることを示していると考えられる。また、比較的安定した細菌群集構造が形成された、処理45日目以降では、約10-15%のトリクロロエチレンが安定して除去されており、汚染物質の除去と細菌群集の多様性および群集構造の安定性との関係が推察される。

バイオレメディエーションの実施における汚染物質分解菌の挙動を把握することにより、バイオレメディエーションはより確かな技術となる。しかしながら、その挙動については手法的制約からほとんど理解されておらず、効率的な浄化が見られない場合の原因解明や解決策を微生物学的側面から検討することができないという問題がある。そこで、本バイオレメディエーション実証試験現場におけるメタン資化菌の挙動を解析するために、タイプIのメタン資化菌の16S rDNAに特異的なプライマー、タイプIIのメタン資化菌の16S rDNAに特異的なプライマー、および可溶性メタンモノオキシゲナーゼをコードしている *mmoX* 遺伝子に特異的なプライマーを用いたDGGE解析を行った。その結果、バイオレメディエーション処理により、メタン資化菌の優占種はタイプIからタイプIIのメタン資化菌にシフトすることが分かった。したがって、バイオレメディエーション処理の初期の段階でのトリクロロエチレン除去に関与したのは、処理前から優占種として存在したタイプIのメタン資化菌であり、その後、タイプIIのメタン資化菌が増殖し、より安定したトリクロロエチレン除去に関与したのと考えられる。

今回の研究により、DGGEバンドパターンから多様性指数の算出と類似性評価および強い輝度を持つバンドの塩基配列の決定を行うことで、環境負荷の細菌群集への影響を多様性の変化、優占種の変化、および特定の機能を持つ細菌の挙動として客観的に捉えることが可能となった。今後、異なるゲル間でのバンドパターンを比較するための内部標準の使用や、定量的な解析を行うための定量的PCRの適用を検討することで、細菌群集の多様性の変化をより詳細に解析できるものと考えられる。細菌群集を生物指標とした環境影響評価の確立に寄与するものと期待される。

結論

1. DGGE法を用いることで，地下水中の細菌群集の多様性を解析することが可能となった。
2. DGGEバンドパターンを基準とする多様性指数の算出，類似性評価および塩基配列決定により，環境負荷の細菌群集への影響を，多様性の変化，優占種の変化および特定の機能を持つ細菌の挙動として客観的に捉えることが可能となった。
3. バイオレメディエーションにより，細菌群集の多様性は一時的に減少するものの，処理に伴い多様性は回復し再び安定することが分かった。
4. バイオレメディエーションにより細菌群集構造は大きく変化したのち，もとの細菌群集構造とは異なる，比較的安定した群集構造が形成されることが分かった。
5. 地下水へのメタン注入処理により，タイプ IIのメタン資化菌が優占的に増殖することが分かった。

謝辞

本研究の遂行にあたり，終始温かい御指導と御鞭撻を賜りました，大阪大学大学院薬学研究科教授・恩師 那須正夫先生に篤く御礼申し上げます。

研究途上，終始暖かい御指導を賜りました，大阪大学大学院薬学研究科講師，谷佳津治先生，大阪大学大学院薬学研究科助手，山口進康先生に感謝します。

また，本研究にご協力をいただきました，大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野の諸氏に御礼申し上げます。

最後に，常日頃より暖かい励ましをくれた妻の夕香里に心から感謝する。

引用文献

- 1) Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., and F. Thingstad. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257 (1983).
- 2) Belser, L. W. *Annu. Rev. Microbiol.* 33: 309-333 (1979)
- 3) Wolin, M. J. and T. L. Miller. *Geomicrobiol. J.* 5: 239-260 (1987)
- 4) Lovley, D. R. *Microbiol Rev.* 55: 259-287 (1991)
- 5) Atlas, R. M. and R. Bartha. Microbial communities and ecosystems. In *Microbial ecology: Fundamentals and applications, fourth edition*, pp. 173-209. California: Benjamin/Cummings Science Publishing (1998)
- 6) 那須 正夫, 山口 進康, 牧野 和夫, 田窪 芳博, 近藤 雅臣. 日本微生物生態学会報 7: 1-7 (1992)
- 7) Colwell, R. R., P. R. Brayton, D. J. Grimes, D. B. Roszak, S. A. Huq, and L. M. Palmer. *Bio/Technol.* 3: 817-820 (1985).
- 8) Nobuyasu, Y., T. Kenzaka, and M. Nasu. *Microbes and Environments.* 12:1-8 (1997)
- 9) 谷佳津治, 山本 かおり, 山口進康, 那須正夫. 防菌防黴. 26:415-421 (1998)
- 10) Kawai, M., N. Yamaguchi and M. Nasu. *J. Appl. Microbiol.* 86:496-504 (1999)
- 11) Woese, C. R., and G. J. Olsen. *Syst. Appl. Microbiol* 7: 161 (1986)
- 12) Ward, D. M., R. Weller, and M. Bateson. *Nature.* 345: 63-65 (1990)
- 13) Weller, R., J. W. Weller, and D. M. Ward. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1146-1151 (1991)
- 14) Gray, J. P., and R. P. Herwig. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4049-4059. (1996)
- 15) Liesack, W., and E. Stackebrandt. *J. Bacteriol.* 174: 5072-5078. (1992)
- 16) Borneman, J., P. W. Skroch, K. M. Osullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis, and E. W. Triplett. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1935-1943 (1996)
- 17) Giovannoni, S. J., T. B. Britchi, C. L. Moyer, and K. G. Field. *Nature.* 344:60-63 (1990)
- 18) Fuhrman, J. A., K. McCallum, and A. A. Davis. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1294-1302 (1993)
- 19) Muyzer, G., E. C. de Waal, E. C. and A. G. Uitterlinden. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700 (1993)
- 20) Ferris, M. J., G. Muyzer, G. and D. M. Ward. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:340-346 (1996)

- 21) Ferris, M. J., S. C. Nold, N. P. Revsbech, and D. M. Ward. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1367-1374 (1997)
- 22) Murray, A. E., C. M. Preston, R. Massana, L. T. Taylor, A. Blakis, K. Wu, and E. F. DeLong. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2585-2595 (1998)
- 23) Rosado, A. S., C. F. Duarte, L. Seldin and J. D. Van Elsas. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2770-2779 (1998)
- 24) Brinkhoff, T., C. M. Santegoeds, K. Sahm, J. Kuever, and G. Muyzer. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4650-4657 (1998)
- 25) Bruns, M. A., J. R. Stephen, G. A. Kowalchuk, J. I. Prosser, and E. A. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2994-3000. (1999)
- 26) Sievert, S. M., T. Brinkhoff, G. Muyzer, W. Ziebis, and J. Kuever. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3834-3842. (1999)
- 27) Eichner, C. A., R. W. Erb, K. N. Timmis, and I. W. Döbler. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 102-109 (1999)
- 28) Murray, A. E., J. T. Hollibaugh, and C. Orrego. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2676-2680 (1996)
- 29) Santegoeds, C. M., T. G. Ferdelman, G. Muyzer and D. Beer. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3731-3739 (1998)
- 30) Van Hannen, E. J., G. Zwart, M. P. van Agterveld, H. J. Gons, J. Ebert, and H. J. Laanbroek. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:795-801 (1999)
- 31) Holmes, A. J., N. J. P. Owens, and J. C. Murrell. *Microbiology.*141: 1947-1955 (1995)
- 32) Jeffrey, W. H., S. Nazaret, and T. Barkay. *Microb. Ecol.* 32: 293-303 (1996)
- 33) Miguez C. B., D. Bourque, J. A. Sealy, C. W. Greer, and D. Groleau. *Microb. Ecol.* 33:21-31 (1997)
- 34) Shigematsu, T., S. Hanada, M. Eguchi, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5198-5206 (1999)
- 35) McDONALD, I. R., E. M. Kenna, and J. C. Murrell. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:116-121 (1995)
- 36) 杉田 治男, 店網 秀男, 小橋 二夫, 出口 吉昭. *Jap. J. Limnol.* 43: 27-34 (1982)
- 37) 前田 秋一. *Jap. J. Limnol.* 41: 163-172 (1980)
- 38) Bruce, L. *Can. J. Microbiol.* 21: 392-394 (1975)

- 39) Konda, T. *Jpn. J. Limno.* 46: 247-255 (1985)
- 40) Gillan, D. C., A. G. Speksnijder, G. Zwart, and C. De Ridder. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3464-3472 (1998)
- 41) Muyzer, G., and E. C. de Waal. NATO ASI Series G35: 207-214 (1994)
- 42) Farrelly, V., F. A. Rainey, and E. Stackebrandt. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2798-2801 (1995)
- 43) Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625-630 (1996)
- 44) Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3724-3730 (1998)
- 45) Muyzer, G. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141 (1999)
- 46) 見坂 武彦, 山口 進康, 那須 正夫. 防菌防黴. 27: 223-229 (1999)
- 47) Reasoner D. J., and E. E. Geldreich. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7 (1985)
- 48) Steward, A., K. Prandy, and R. Blackburn. *Nature.* 245:415-417 (1973)
- 49) Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. Chang, and D. C. White. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3566-3574 (1999)
- 50) Sayler, G. S., T. W. Sherrill, R. E. Perkins, L. M. Mallory, M. O. Shiaris, and D. Petersen. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1118-1129 (1982)
- 51) Atlas, R. M., A. Horowitz, M. I. Krichevsky, and A. K. Bej. *Microbial Ecology.* 22:249-256 (1991)
- 52) Mills, A. L., and L. M. Mallory. *Microbial Ecology.* 14:219-232 (1987)
- 53) 新エネルギー・産業技術総合開発機構. 土壤汚染等修復技術開発報告書 (1999)
- 54) Tourova, T. P., M. V. Omel'chenko, K. V. Fegeding and L. V. Vasiljeva. *Mikrobiologiya.* 68:568-570 (1999)
- 55) Hiraishi, A. and M. Kaneko. *Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol.* 9:55-65 (1994)
- 56) Hanada, S., T. Shigematsu, K. Shibuya, M. Eguchi, T. Hasegawa, F. Suda, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 539-544 (1998)
- 57) Bowman, J. P., L. I. Sly, P. D. Nichols, and A. C. Hayward. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 735-753.
- 58) Dalton, H., D. D. S. Smith, and S. J. Pilkington, (1990) *FEMS Microbiol. Rev.* 87:201-207. (1990)
- 59) Lipscomb, J. D. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:371-399. (1994)
- 60) Murrell, J. C. *Biodegradation.* 5: 145-159 (1994)

- 61) Stainthorpe, A. C., G. P. C. Salmond, H. Dalton, H. and J. C. Murrell, *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 211-216 (1990)
- 62) McDonald, I. R., H. Uchiyama, S. Kambe, O. Yagi, and J. C. Murrell. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1898-1904 (1997)
- 63) Dunfield, P. F., W. Liesack, T. Hanckel, R. Knowles, and R. Conrad. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1009-1014 (1999)
- 64) Hanson, R. S., and Hanson, T. E. Hanson. *Microbiol. Rev.* 60:439-471. (1996)
- 65) Stainthorpe, A. C., Y. Lees, G. P. C. Salmond, H. Dalton, and J. C. Murrell. *Gene.* 91:27-34 (1990)

