

チック PHA の直接生産を検討した。

- 1) 浄化槽汚泥は *A. latus* の培地として不適當ではないことを確認した。
- 2) TOC 測定の結果、超音波処理により浄化槽汚泥中の水溶性有機物の濃度は飛躍的に高くなることがわかった。超音波処理した浄化槽汚泥から、未処理汚泥の場合よりも多いポリ（ヒドロキシアリカン酸）を生合成することができた。
- 3) ¹H-NMR による構造解析から、汚泥炭素源から *A. latus* により合成されるポリ（ヒドロキシアリカン酸）はポリ（3-ヒドロキシ酪酸）とポリ（3-ヒドロキシ酪酸-co-3-ヒドロキシ吉草酸）共重合体であることがわかった。
- 4) これらのポリ（ヒドロキシアリカン酸）は汚泥に含まれるオリゴ糖と脂肪酸に由来すると考えられた。

第6章 浄化槽汚泥ファージに関する研究

6.1 はじめに

浄化槽汚泥の中には腸内細菌を始め様々なヒト由来細菌が存在し、それらに感染する多種多様なファージが共存している。これらファージは浄化槽汚泥を形成する微生物生態系において、各菌体のポピュレーションのコントロールや、遺伝子の伝播などを通じ、汚泥を形成する微生物叢のダイナミックな変動に深く関わっているものと考えられている。しかし、これらファージが汚泥の微生物学的特性の変動にどのように関与しているかの知見はほとんど得られていない。また汚泥から新規ファージをスクリーニングすることは比較的容易にでき、それらの遺伝子構造を解析することにより、今までにない活性を持った新規酵素の探索が期待できる。

以上のような観点から本研究では、ファージを指標とした合併処理浄化槽内細菌群の季節変動を解析する目的で、約1年に渡り大腸菌特異的ファージ濃度の経月変化を調査した。また、特定の細菌群のポピュレーションをファージの添加によりコントロールすることの可能性を探索する目的で、*E. coli* 0157:H37 とその特異的ファージをモデル系に選定し、両者のポピュレーションがファージ非感受性細菌の存在によりどのように変化するかを解析した。さらに、汚泥からスクリーニングした *Bacillus amyloliquefaciens* 特異的ファージが持つ溶菌酵素2種をコードする遺伝子領域を大腸菌発現ベクターへクローニングし、それらの発現が大腸菌に与える影響、及び精製酵素がもつ抗菌活性について解析した。

6.2 実験方法

6.2.1 浄化槽汚泥内ファージ濃度の測定

使用した汚泥は、国民宿舎に設けられた長時間ばっ気方式（処理対象人員 2000 人）の汚泥濃縮槽汚泥（以下、「濃縮槽汚泥」、比較的有機物分解の進んでいる汚泥）、及び駅前の公衆トイレに設けられた沈殿分離槽が前置された接触ばっ気方式（処理対象人員 100 人）の沈殿分離槽底部汚泥（以下、「沈分汚泥」、生し尿に近い）の2種である。調査期間は平成11年4月～平成12年1月までの9ヶ月間で、その後も継続している。各汚泥の上清（12,000 rpm, 10 min, 4°C遠心分離後）と固形懸濁物中のファージ濃度をそれぞれ測定した。上清中のファージ濃度は遠心分離により得られた上清を 0.45 μm のフィルターにより浮遊細菌を除き、ブランクアッセイ法により行った。固形懸濁物中に存在するファージ量は、遠心分離により得られた沈殿物に溶出液（1%NaCl, 0.1%ホウ酸緩衝液 pH10）を遠心分離前の検体汚泥相当量加え、充分攪拌後室温に 90 分放置し、その上清（12,000 rpm, 10 min, 4°C遠心分離後）から 0.45 μm のフィルターにより浮遊細菌を除き、ブランクアッセイ法により測定した。

6. 2. 2 ファージと宿主の相互作用の解析

E. coli 0157:H37(農林水産省家畜衛生試験場、中澤宗生氏より分譲)に感染するファージを浄化槽汚泥よりスクリーニングし、複合培養系においてヒト由来細菌のポピュレーションをファージを用いて制御することを前提に、ファージ非感受性大腸菌 JA300(Leu^r)共存下での両大腸菌及びファージ濃度の変化を平板希釈法及びブランクアッセイ法により求めた。

6. 2. 3 バチルスファージの溶菌酵素遺伝子のクローニング

昨年度の実験により *Bacillus* 属に分類される菌体 7 種を用いて、ファージのスクリーニングを行い、*B. amyloliquefaciens* に感染するファージから溶菌タンパク質 lys1521 をコードする遺伝子をクローニングできた。lys1521 は相同性解析により *B. subtilis* 特異的ファージである PZA がコードする gene-5A の発現産物と高い相同性が認められたことから、他の領域においても相同性の高い領域を含むことが考えられた。そこで、PZA ファージの溶菌酵素をコードする遺伝子配列を基にプライマーを設計し、ホリンとエンドライシンをコードする領域を PCR で増幅後、pET21d ベクターにクローニングし、大腸菌 JM109(DE3)内で発現した。また、大腸菌内で産生されたエンドライシンをニッケルキレートカラムにより精製し、グラム陽性細菌 5 種、グラム陰性細菌 3 種に対する抗菌作用を解析した。

6. 3 実験結果及び考察

6. 3. 1 浄化槽汚泥内ファージ濃度の経月変化

衛生指標細菌として *Escherichia coli* 2 種、*Pseudomonas* 2 種、*Bacillus* 2 種、*Micrococcus* 2 種及び *Staphylococcus* 2 種を用い、各菌種に感染するファージをブランクアッセイ法により検出した。*Escherichia coli*、*Pseudomonas* に感染するファージは調査期間を通し、両汚泥中に検出された。しかし、それ以外の衛生指標細菌に感染するファージを検出することはできなかった。図 6-1 に大腸菌 JM109 に感染するファージタイトルの経月変化を示す。大腸菌はヒト及び多数の動物回腸下部と結腸全体に生息し、ヒト糞便中での菌数は 10^{10} CFU/g と考えられている。したがって、今回検出された大腸菌ファージはこれらヒト由来大腸菌が浄化槽汚泥中に多数存在することを示すものである。*Pseudomonas* は偏性好気性グラム陰性桿菌であり、土壌、淡水、海水、など広く自然界に存在し、動植物の病気の原因となる。濃縮槽汚泥と沈分汚泥ではファージの存在形態がだいぶ異なっていた。濃縮槽汚泥に存在するファージのほとんどは固形懸濁物の中に検出され、沈分汚泥中のファージは浮遊状態で存在していた。各汚泥を顕微鏡で観察すると、濃縮槽汚泥には多くのフロックが存在していた。おそらくこれらフロックに吸着された形でファージが存在しているものと考えられた。一方、沈分汚泥には濃縮槽汚泥で見られたよ

うなフロックは存在せず、主に浮遊状態の細菌から構成されていた。また、沈分汚泥のファージは遠心上清から検出されたことから、ファージは浮遊状態で存在していることが示唆された。

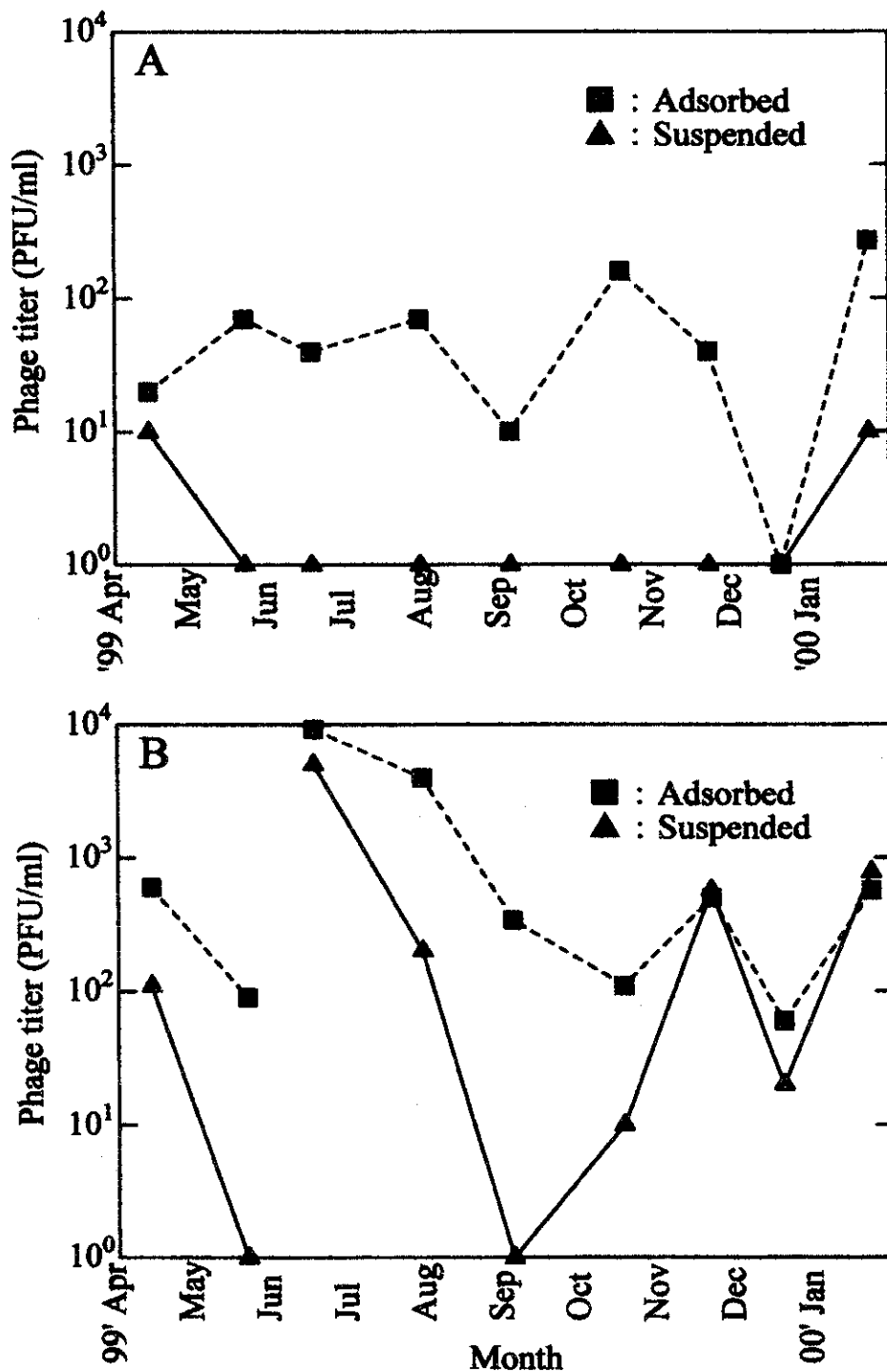


図6-1 大腸菌ファージ濃度の経月変化

A : 濃縮槽汚泥、B : 沈分汚泥

6. 3. 2 ファージと宿主菌の相互作用の解析

ファージと宿主の相互作用は特異的レセプターとリガンドの結合により厳密に規制されている。したがって、ファージによりその宿主となる細菌のポピュレーションを特異的に制御できる可能性がある。そこで本研究では *E. coli* 0157:H37 に感染する溶菌性ファージを用い、ファージと宿主の相互作用、及びファージ非感受性細菌が共存することの影響について解析した。

様々な MOI (Multiplicity of Infection) で *E. coli* 0157:H37 とファージを混合し、栄養培地で培養を行うと、宿主菌の溶菌が認められる。図 6-2 は時間 0 分において、MOI = 10^{-1} でファージを感染させた際の培養液の濁度、及びファージ濃度変化を示したものである。感染 2.5 時間後に宿主の溶菌が認められ、濁度が減少した。しかし、さらに培養を継続すると 24 時間以内にファージ耐性菌が出現し、再び濁度が上昇した。一方、ファージ非感受性の *E. coli* JA300 が共存する系で MOI=1 でファージを感染させると、ファージ濃度の上昇は無く、宿主の増殖が観察された(図 6-3)。これは優占種として存在する *E. coli* JA300 によって、本来の宿主である *E. coli* 0157:H37 とファージの衝突頻度が減少したためと考えられる。以上のことから、ファージによりその宿主菌のポピュレーションをコントロールする際には、共存する異種細菌及び懸濁物等の相互作用を考慮し、最適条件の設定を行うことが必要である。

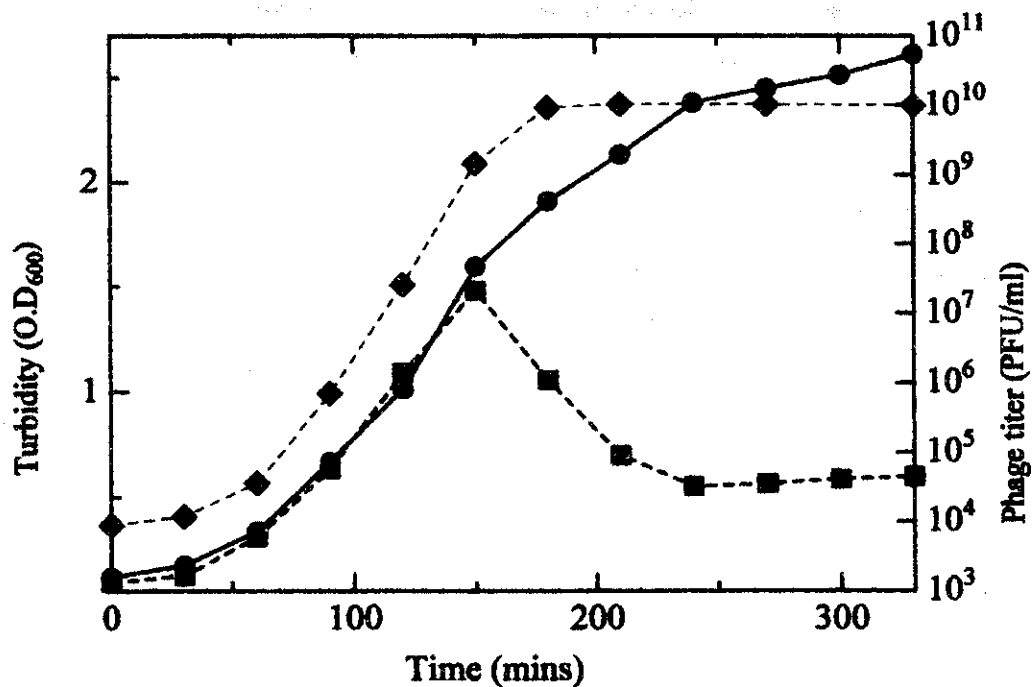


図 6-2 ファージによる大腸菌の溶菌過程

E. coli 0157:H37 の増殖、● : ファージ感染がない場合 ■ : ファージ感染がある場合
◆ : *E. coli* 0157:H37 ファージの増殖

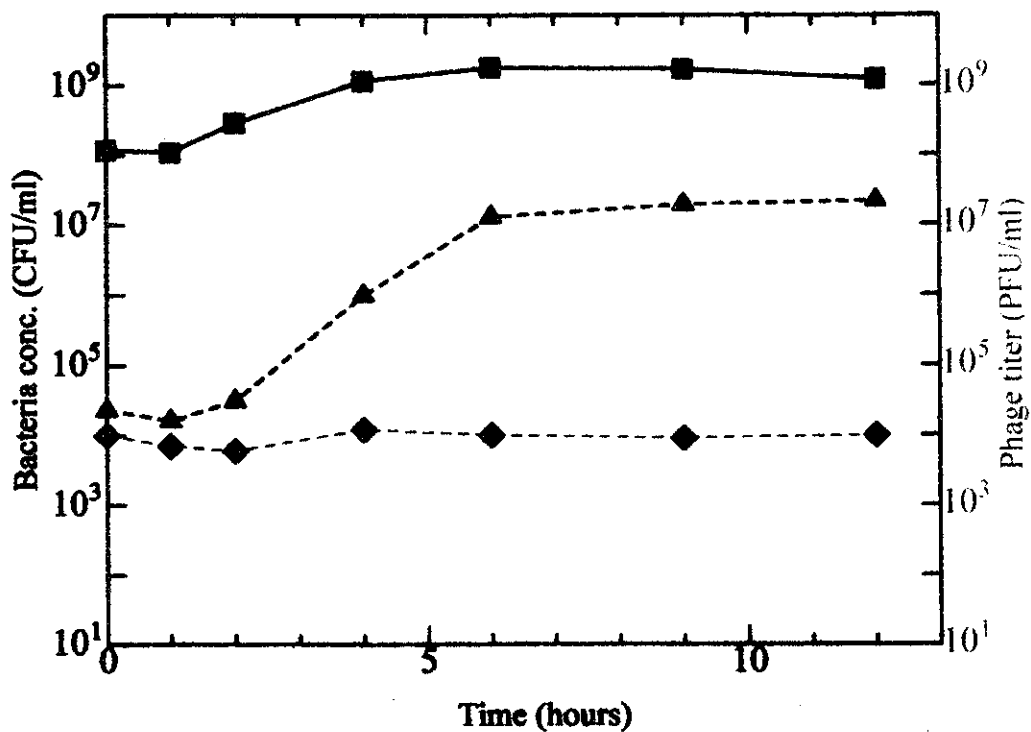


図6-3 複合培養系におけるファージと宿主の相互作用

■ : *E. coli* A300 の増殖、▲ : *E. coli* 0157:H37 の増殖、
◆ : *E. coli* 0157:H37 ファージの増殖

6. 3. 3 バチルスファージの溶菌酵素の解析

グラム陽性菌である *Bacillus* の細胞壁は、生育期によっても異なるが、15~80nm の比較的厚い 1 層構造体として電子顕微鏡下で観察される。したがって *Bacillus* に感染するファージはより活性の高い溶菌酵素を持っていることが期待される。昨年度、汚泥からスクリーニングした *B. amyloliquefaciens* 特異的ファージからホリン及びエンドライシンをコードする遺伝子領域をクローニングし、その塩基配列を特定した(図6-4)。ホリン及びエンドライシンをコードする領域は 1 塩基を隔てて隣接しており、両遺伝子は同時に転写されるものと考えられる。

Holin

1 atgggagatatgacaatgatagcgtggatgcaacactttttgaaacggacgagacaaag 60
M T M I A W M Q H F L E T D E T K

61 ctaattactggctaaccattccttatggtttgtatggttgtgatacagtactggcgctc 120
L I Y W L T F L M V C M V V D T V L G V

121 ctatttcaaagcttaaccggaacattaaatcttgcattcaaaatcaaacaggggta 180
L F A K L N P N I K F S S F K I K T G V

181 ttaattaaagttagtgaatgattctagcgttggctgttccgcttccgtgttcccttc 240
L I K V S E M I L A L L A V P F A V P F

241 cctgagggtctacctctattatacaggtttatacggcttctgtgtatcggaatatat 300
P A G L P L L Y T V Y T A L C V S E I Y

301 tctattttcggcatctgagattagttgatgataagagtactttcttgaataacttgaa 360
S I F G H L R L V D D K S D F L E I L E

Endolysin

361 aaacttcttaaacgtacatccggtaaaaataaggaggacaaataacatgcaaatccaca 420
N F F K R T S G K N K E D K * M Q I S Q

421 agcaggcatcaacttaattaagagttttgaaggttacaactgaaagcctataagctgt 480
A G I N L I K S F E G L Q L K A Y K A V

481 tccaactgaaaagcattacacaattggttatgggcattacggttctgatgttccactag 540
P T E K H Y T I G Y G H Y G S D V S P R

541 acaagttatcactgctaaacaggctgaagacatgctacgtgatgatgacaggctttgt 600
Q V I T A K Q A E D M L R D D V Q A F V

601 ggacgggtgtaataaagcattgaaagtgctgtcactcagaatcagtttgatgcactagt 660
D G V N K A L K V S V T Q N Q F D A L V

661 ctcatctgcttataacgcttgggttagggctttcaggcttcttctctactggaatattt 720
S F A Y N V G L G A F R S S S L L E Y L

721 gaacgaaggtagaacggctctagcggcgctgaattccctagatggaataagtcaggagg 780
N E G R T A L A A A E F P R W N K S G G

781 aaaggtgatcaaggattggttaaccgtagagcacaagagcaagccttgtttaaagtgg 840
K V Y Q G L V N R R A Q E Q A L F N S G

841 aacacctaataaatgtttcacgtggaacatcgtcttctaagggtgacacctaagtaacaaggt 900
T P K N V S R G T S S S K V T P K Y K V

901 taaaagtggtgacaacctcactaaaatcgctaaaagcataataactacggttgctactct 960
K S G D N L T K I A K K H N T T V A T L

961 gttgaaactcaatccaagtattaaagaccctaacatgattagagttggacaaacaattaa 1020
L K L N P S I K D P N M I R V G Q T I N

1021 tgttacgggtagcggcggcaaacacataaggtgaagagtggtgacacacttagcaaat 1080
V T G S G G K T H K V K S G D T L S K I

1081 tgcggttgataacaaaacactgtaagtaggcttatgagctcaacctgaaattactaa 1140
A V D N K T T V S R L M S L N P E I T N

1141 tccgaatcatataaaagtaggtcaacaattagactaagctga 1183
P N H I K V G Q T I R L S *

図6-4 *B. amyloliquefaciens* ファージがコードするホリンとエンドライシン

B. amyloliquefaciens が有する 2 つの溶菌酵素の溶菌作用を解析した。ホリン、エンドライシン及び両者（ホリン-エンドライシン）をコードする遺伝子領域を pUC118 ベクターに組み入れ、IPTG の添加によりそれぞれの溶菌酵素を大腸菌内で発現した。ホリンの産生を誘導すると、IPTG 添加後約 3 時間で大腸菌の増殖が停止した。しかし顕微鏡観察

JM109(DE3)で生産した His-Tag 融合エンドライシンを Ni-キレートカラム His-Trap™ で精製し、その抗菌効果を調べるため、細菌の培養液に精製エンドライシンを加えた時の生菌数の変化を調べた(図6-6A)。

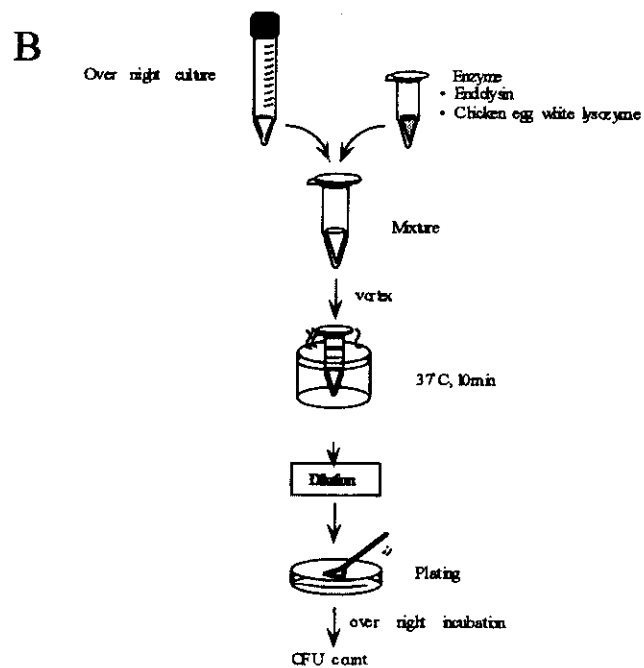
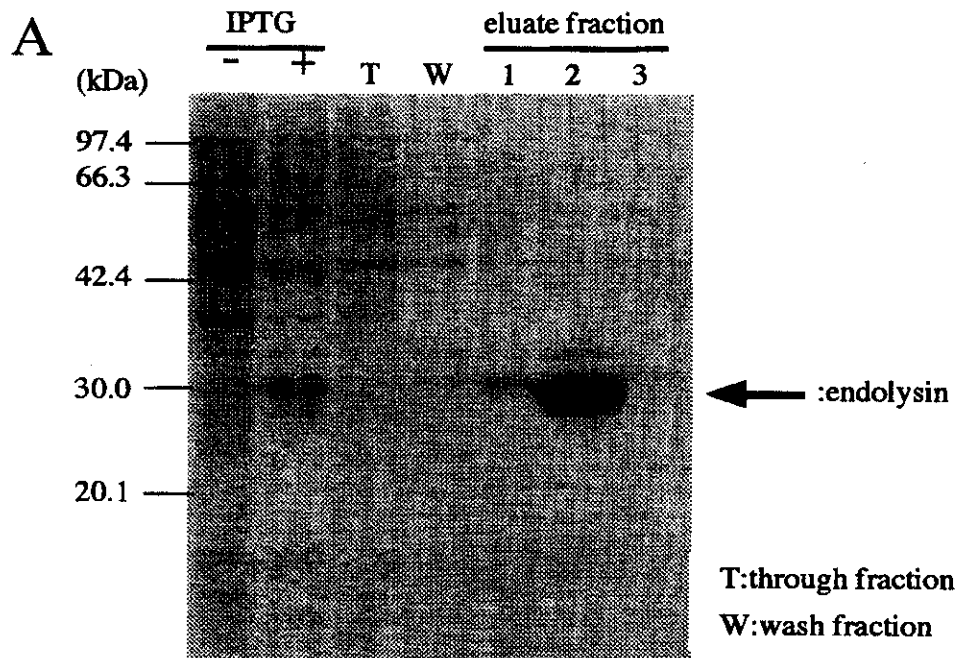


図6-6 エンドライシンの精製 (A) と抗菌活性測定法 (B)

表6-1はグラム陽性細菌5種(*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus*)に対する殺菌効果を

解析した結果である。使用したエンドライシンの本来の宿主である *Bacillus amyloliquefaciens* に対しては約 97%の殺菌率を示した。また *Micrococcus luteus* に対しては 99%以上の殺菌率を示した。しかし *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus roseus* に対しては殺菌作用を示さなかった。

表 6-1 エンドライシンのグラム陽性細菌に対する抗菌活性

Sample	VIABILITY (%)				
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. cereus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. roseus</i>	<i>S. aureus</i>
No addition	100	100	100	100	100
Endolysin	7.2	160	< 0.015	39	150
CEWL *	6.1	310	< 0.015	4.7	10

CEWL: Chicken Egg White Lysozyme

グラム陰性の細菌 3 種(*Escherichia coli* JM109, JA300, *Pseudomonas aeruginosa*)を用いた際の結果を表 6-2 に示す。JM109 に対してはエンドライシン単独の添加でも約 99%の殺菌作用を示し、その効果は EDTA を加えることにより助長された。また *P. aeruginosa* に対してはエンドライシン単独では 42%の殺菌効果しか示さなかったが、EDTA の添加により生菌数は約 10 万分の一に減少した。実験で示された殺菌効果は卵白リゾチーム(CEWL)と比較しても大変高いと言える。

表 6-2 エンドライシンのグラム陰性細菌に対する抗菌活性

Sample	VIABILITY (%)		
	<i>E. coli</i> -JM109	<i>E. coli</i> -JA300	<i>P. aeruginosa</i>
No addition	100	100	100
EDTA	76	20	25
Endolysin	1.1	33	42
Endolysin + EDTA	0.13	2.4	0.00096
CEWL *	72	95	70
CEWL + EDTA	64	31	0.4

CEWL: Chicken Egg White Lysozyme

6.4 おわりに

浄化槽汚泥を処理する際、衛生上に配慮することが重要である。特にヒト由来細菌を多く含むことから、処理過程においてこれら細菌の消長を把握する必要がある。ヒト由来細菌を特定するには様々な方法があるが、特定細菌に感染するファージ濃度を指標とする方法は比較的簡便であり、ファージ感染の特異性から、宿主細菌濃度を正確に反映しているものと考えられる。本研究により、ヒト由来細菌の代表である大腸菌特異的ファージの2種の浄化槽汚泥における約1年にわたる濃度変化が明らかとなった。沈分汚泥（未処理の尿尿を主成分とする汚泥）においては、大腸菌感染ファージの濃度は $10^2 \sim 10^4$ (PFU/mL)であり、浮遊状態及び懸濁物に吸着した状態で検出された。一方、長時間ばっ気処理を行った濃縮槽汚泥においては、大腸菌感染ファージの濃度は $10^1 \sim 10^2$ (PFU/mL)であり、浮遊状態のファージ濃度は低く、ほとんどが懸濁物に吸着した状態で検出された。ばっ気処理により大腸菌特異的ファージ濃度が1/1000~1/10に減少したことから、ヒト由来細菌濃度も同処理により減少していると考えられる。しかし、懸濁物に吸着しているファージが比較的高濃度で濃縮槽汚泥に検出されたことから、これら懸濁物に吸着することによりファージの安定性が増すことが示唆された。

特定細菌をファージによりコントロールすることができれば、病原細菌を汚泥から駆除することが可能となる。本研究では大腸菌 0157:H37 を例に汚泥からファージをスクリーニングし、大腸菌とファージの相互作用を解析した。ファージと大腸菌の2成分系ではファージの添加により大腸菌が溶菌し、ファージによる病原菌の制御ができることが示された。しかし、ファージ非感受性大腸菌が高濃度で共存するとファージが本来の宿主に感染する過程が阻害された。今後、複合培養系におけるファージと宿主の相互作用を定量的に解析することにより、実際の処理環境において、ファージを効果的に使用するための条件を検討する計画である。

グラム陽性細菌であるバチルスに感染するファージを汚泥からスクリーニングし、ファージが持つ宿主溶菌酵素の遺伝子2種をクローニングすることができた。溶菌酵素の一つであるエンドライシンは単独で *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus* に対する殺菌作用を示した。抗生物質耐性菌の出現が社会問題となっているが、ファージが持つ溶菌酵素は細胞壁を持つ細菌にのみ作用し、人に対する副作用が少ないと考えられる。従来、抗生物質はカビなどから探索されてきたが、汚泥に存在するファージから新たな抗菌剤が探索できる可能性が本研究によって示された。