

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20360238
 研究課題名（和文） 下廃水処理プロセス中バクテリオファージの
 水処理性能との関連の解明と応用
 研究課題名（英文） Impact of bacteriophages on wastewater treatment processes and their
 application
 研究代表者
 佐藤 弘泰 (SATO HIROYASU)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授
 研究者番号：90251347

研究成果の概要（和文）：

下廃水処理プロセス中のバクテリオファージについて、解析手法を開発し、水処理性能との関連を調べた。溶菌後宿主から放出される DNA を検出する事で、溶菌された宿主を知ることができる可能性を示した。日々汚泥中の細菌の数%が溶菌されているとの知見が得られた。ファージ DNA はそのままでは制限酵素により切断されない事から、宿主とファージの関係の複雑さが伺われた。一方、処理性能との関連についてはなお検討を積み重ねる必要が残った。

研究成果の概要（英文）：

The influence of bacteriophages on wastewater treatment was investigated, together with the development of methods to analyze bacteriophages. Host DNA was detected in the lysate of phages, and the finding lead to the possibility to identify the lysed host by analyzing DNA in supernatant of wastewater treatment processes. It was estimated that around 1 to several % of bacteria are daily lysed by phages, and it may be possible to use phages to reduce waste sludge. Phage DNA was resistant to digestion by restriction enzymes, suggesting the complex relationship between phages and host. Yet, further compilation of case studies is still needed to know the impact of phages on wastewater treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：生物学的廃水処理、活性汚泥、バクテリオファージ、宿主、溶菌

1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法は非常に広く用いられている下水処理技術であるが、処理プロセス内で起きている現象の詳細については未知な部分が非常に多く残されている。

近年申請者らはバクテリオファージが活性汚泥中に存在し、かつ、時折宿主細菌の一斉溶菌を起こしているようであることを発見した。バクテリオファージが自然界に存在することは古くから知られていた。また、海洋細菌についての研究者らは、バクテリオファージによる細菌の溶菌が海洋中での炭素循環において大きな役割を担っていることを報告している。一方、活性汚泥中については人体の健康と関連のあるウイルスや病原ウイルスの指標としてのバクテリオファージ(特に大腸菌ファージ)については研究が多くなされてきたが、活性汚泥中の常在細菌を宿主とするバクテリオファージとその処理への影響についてはほとんど顧みられてこなかった。申請者らは、活性汚泥から分離した細菌の多くに関連するバクテリオファージが存在すること、また、リン除去に関連する細菌の一つである *Microlunatus phosphovorius* にも溶菌性バクテリオファージが存在することを明らかにした。

一方、これまでバクテリオファージを調べる効果的な手法が存在していなかった。PFGE法(パルスフィールドゲル電気泳動法)は試料中に存在するバクテリオファージのDNAをサイズによって分別することはできるが、それ以上の解析を行うことはほとんど不可能であった。一方、これまではメタゲノム法により環境試料中の特定の時点において存在するDNAを網羅的に調べて、ウイルスのDNA塩基配列を再構築するような方法があったが、莫大な労力がかかるだけでなく、時々刻々と変化するバクテリオファージのウイルスを調べるためには効果的とはいえない方法であった。それが、Phi29 DNA polymeraseのように非特異的かつ高効率に目的DNAを増幅するDNA polymeraseが使われるようになって来ており、状況が一変する可能性がある。Phi29 DNA polymeraseを用いれば、PFGE法により分離したバクテリオファージDNAを増幅することができる。さらに、それを用いれば、さまざまなバクテリオファージのDNA塩基配列を比較し、活性汚泥中に存在するバクテリオファージの分類や、個別の挙動の正確な追跡が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では当初以下の三つの目的を掲げた。1) 活性汚泥中に存在するバクテリオ

ファージの分類の手がかりとなる情報を取得すること、2) 廃水処理プロセスの性能との関連や微生物群集構造との関連を精査し、バクテリオファージが下 wastewater 処理に及ぼす影響を明らかにすること、3) 以上の結果を総括し、バクテリオファージを下 wastewater 処理プロセスの運転管理のために応用する可能性がないか検討する事、である。一方、活性汚泥中のバクテリオファージの生態について未だに情報が乏しいので、ファージの生態に関連する情報を取得する事もこころがけた。

3. 研究の方法

(1) 活性汚泥中に存在するバクテリオファージの分類の手がかりとなる情報の取得

既存の手法として、PFGE法によるDNAサイズによるプロファイリング手法が存在する。一方、DNAファージのかなりの部分が40kb~50kb程度の分子サイズだということがわかっており、分子量サイズが似通っているため、PFGE法ではファージの種構成の変動を知ることができない。そこで、RFLP法(制限酵素切断断片多型法)を適用することについて検討した。まず、実験室活性汚泥反応槽の放流水を孔径0.2μmのメンブレンフィルターでろ過し、超遠心によってファージを濃縮し、Proteinase Kを用いて外套タンパクを消化し、ファージDNAを回収した。それに対して制限酵素 *SaI* または *EcoRI* を適用し、消化を試みた。また、回収したDNAの一部をPhi 29 DNA Polymerase (REPLI-g Mini Kit, QIAGEN)を用いて増幅した後に消化を試みた。

また、近年高速シーケンシング法が開発され、環境試料をメタゲノム法によって解読する事が行われるようになってきている。そうした手法をバクテリオファージに対して適用する事で、より詳しい情報を得ることができる。本研究では、高速シーケンシング法での解析に供するための試料の濃縮・回収法について検討した。実下水処理場放流水をメンブレンフィルターでろ過し、ろ液を超遠心法又は限外ろ過膜を用いて処理し、ファージを濃縮し、キット(QIAamp MinElute Virus Spin Kit, QIAGEN)を用いてDNAを精製・回収した。

(2) バクテリオファージが下 wastewater 処理に及ぼす影響の解明

活性汚泥プロセスを実験室内において運転し、有機物除去性能やリン除去性能とバクテリオファージの挙動の関連について検討した。流入水としては酢酸およびペプトン主体の人工下水を用い、また、有効容量10Lの回分式反応槽を用いた。汚泥滞留時間は10日とした。処理水に含まれるバクテリオファージの挙動を、ファージ性DNAの総量の測

定および PFGE 法でプロファイルを取る事で観測した。ファージ性 DNA の総量は、処理水を孔径 $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、Proteinase K を用いて外套タンパクを消化し、抽出された DNA の量を DNA 結合性蛍光染料である PicoGreen を用いて測定した。なお、この方法では液中のファージ以外の DNA 成分も同時に定量されてしまうが、その量は無視できる程度である事を別途の検討により確認した。PFGE 法での解析もほぼ同様に行ったが、Proteinase K を用いて DNA を回収する前に、試料を限外ろ過膜 (SPIN-X UF, Corning 社) により濃縮した。また、PFGE 法は BioRad 社の ChefDR II システムを用いて実施した。

(3) 生態の解明

バクテリオファージの生態の解明に関して、活性汚泥中でのファージの生成過程を捉えるための検討、および、溶菌された宿主の同定につなげるための検討を行った。

活性汚泥中でのファージの生成過程を捉えるために、嫌気好気式回分式活性汚泥プロセスを実験室内で運転し、1 サイクル内での上清中のファージの挙動をファージ性 DNA の総量を測定した。上清は汚泥混合液を遠心分離することにより得た後孔径 $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過して得た。DNA の総量の測定は、(2) と同様の方法で実施した。

宿主の同定につながる情報を得るための検討については、宿主の DNA の一部が上清に残存する可能性があると考え、ファージ溶菌液中に宿主の 16SrRNA 遺伝子を検出する事を試みた。宿主として *Salmonella enterica* ST1129 株を、また、ファージは東北大学川渡フィールド研究センターにて分離されたものを用いた。トリプトソーヤブイヨン培地にて一晩前培養した宿主 10^8cfu/mL にファージ 10^8pfu/mL を添加し、その後の上清中の宿主 DNA の量を、宿主の保有する *invA* 遺伝子を標的とする定量 PCR 法により追跡した。培養上清液中のファージ粒子の数はブランク法により求めた。

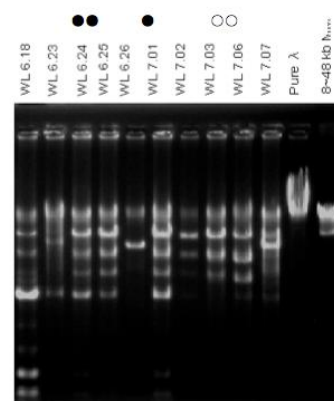
4. 研究成果

(1) 活性汚泥中に存在するバクテリオファージの分類の手がかりとなる情報の取得

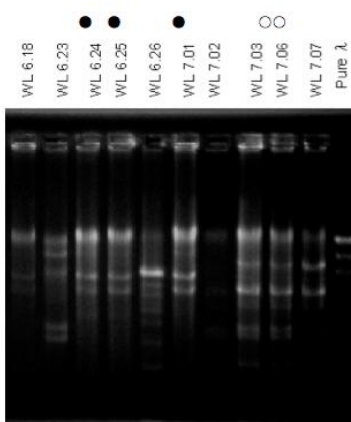
a) RFLP 法の適用

活性汚泥から得られたファージを *SalI* または *EcoRI* 制限酵素を用いて消化を試みたところ、ほとんど消化されなかった。しかし、Phi 29 DNA polymerase を用いて

増幅して得られた DNA 試料は、制限酵素によって切断された。その結果を図 1 に示す。



(a) *SalI* 制限酵素処理後



(b) *HindIII* 制限酵素処理後

図 1 RFLP 法によるファージ DNA のプロファイリング

上記結果は 6 月 18 日から 7 月 7 日までの間、一つのリアクターの処理水中のファージを調べたものである。日によってバンドパターンが異なる事、また、同じようなバンドパターンが複数の日に見られ、パターンは出現するファージの種類に応じているものと考えられる。

なお、制限酵素はももとは宿主細菌が外来の遺伝子を自らの遺伝子と区別し分解除去するために用いられる。すなわち、宿主自身は自己の DNA を修飾し、制限酵素による分解を受けぬようにしているのに対し、ファージのような外来遺伝子は修飾されておらず、制限酵素に分解されてしまうとされている。しかるに活性汚泥処理水から得られたファージ DNA は制限酵素に寄って分解されなかったため、恐らく宿主の細胞にひとたび入り込むことができれば、制限酵素による分解を受けにくいかもしれない。

よく研究されているファージは大腸菌のような増殖速度の速い微生物に寄生するファージであり、そうしたファージは自らの

DNA を修飾する時間的余裕が短いであろう。一方、活性汚泥細菌に寄生するファージは、宿主の増殖がゆっくりとしているためファージも長い時間宿主細胞内にとどまっていなければならない。そのため、宿主の DNA 修飾酵素が十分に作用して、ファージ DNA も修飾されているのかもしれない。

増殖速度がゆっくりとした環境細菌に関しては宿主とファージの関係についてほとんど知られていない。ここで得られた成果はその一端である。

b) メタゲノム法による解析のためのファージ DNA 回収法の検討

超遠心法により 500mL の試料から回収したファージ DNA の量およびそこから DNA 抽出・精製キットにより回収された DNA の量は表 1 の通りであった。0.5 μ g の DNA を回収する事を目標としたが、十分達成できた。

表 1 ファージ DNA の回収率と回収量

	sample			
	A	B	C	D
500 ml の試料中の全 DNA 量 (μ g)	72.18	82.20	28.64	50.02
超遠心後に回収されたファージ DNA 量 (μ g)	5.76	6.89	7.13	6.57
キットによる精製後に回収された DNA 量 (μ g)	3.56	3.46	4.31	1.72
精製段階での回収率 (%)	45	41	17	13

表 1 ファージ DNA の回収率と回収量

(2) バクテリオファージが下廃水処理に及ぼす影響の解明

実験室活性汚泥プロセスの運転経過を図 2 に示す。図には MLSS, MLVSS と上清中のリン酸濃度のみを示している。約 1 ヶ月運転したが、20 日目過ぎから糸状性細菌によるバルキングが始まり汚泥濃度が減少し、25 日目以降リン除去が悪化した。

バクテリオファージを PFGE 法によりモニタリング結果を図 3 に示す。図 3 から、50kb 付近のバンドは運転開始から終了までほぼ一貫して存在していたことがわかる。一方、15 日目には 120kb 程度、23 日目には 200kb 以上の DNA サイズのバクテリオファージが、それぞれ 1 日だけ出現した。なお、PFGE の結果では一見 10~15 日目のファージの存在量が多く、その前後では少なく見える。しかし、試料の調整方法の影響を受けているので、定量的な比較は PFGE 法ではやや難しい。

ファージ性 DNA の総量を測定した結果を図 4 に示す。15 日目~17 日目では 25 μ g/L 程度の濃度であったが、それ以外の期間は 10 μ g/L 程度で推移していた。

図 2 に示した処理状況の推移の中で、図 3、図 4 に見られるようにファージは増減

したり、あるいは突発的な溶菌を起こしていたものと考えられる。しかし、これらの関連は、未だ明確ではない。

なお、処理水中のファージ濃度から、いくつかの仮定 (DNA サイズおよび一つの宿主の溶菌でのファージ粒子の放出量) を導入する事で、溶菌された宿主細菌の量を推定することができる。反応槽内で溶菌される宿主の数は、 $3\sim 6 \times 10^{11}$ 個/日程度と算出された。一方、反応槽内の細菌数はおよそ 10^{13} 個のオーダーなので、活性汚泥中の全細菌のうち一日あたり数パーセントがバクテリオファージにより溶菌している事となる。生成されたファージ粒子のすべてが処理水に出てくる訳ではなく、少なからぬ割合が汚泥フロク内にとどまっているであろう事を想像すると、また、さらに、今回調査したのは DNA ファージだけであり、RNA ファージも存在するであろう事を考えると、実際にはもっと大きな影響を持っていると考えられる。なお、汚泥滞留時間 10 日で運転していたので、一日あたり宿主の 10% が系外に除去される。それと比べると、細菌の死亡要因の少なくとも 1 割以上はファージによる溶菌ということができる。

(3) 生態の解明

a) 回分サイクル内でのファージの挙動

回分式実験室活性汚泥プロセスを嫌気好気条件にて運転し、1 サイクル内でのファージの増殖挙動について検討した。結果の一例を図 5 に示す。ファージ性 DNA 濃度は嫌気工程においてはほぼ一定であったが、好気工程において増加した。

嫌気工程では宿主細菌はエネルギーを得ることができず、従って生合成活動は不活発であると考えられる。その予想と一致する結果となった。しかし、嫌気工程においてもやや増加するケースが見られた。また、好気工程でのファージ DNA 濃度の増加は好気工程に入って直後に活発な事が多かったが、徐々に増加するケースも見られた。

また、一旦ファージ DNA 濃度が急激に上昇し、その後もとのレベルに戻るようなケースも散見された。測定上のミスである可能性もあるが、非常に不安定なファージが存在する可能性も現時点では否定できない。さらに慎重な検討を要する。

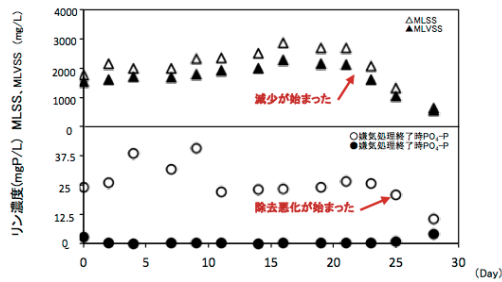


図2 実験室活性汚泥プロセスの運転経過

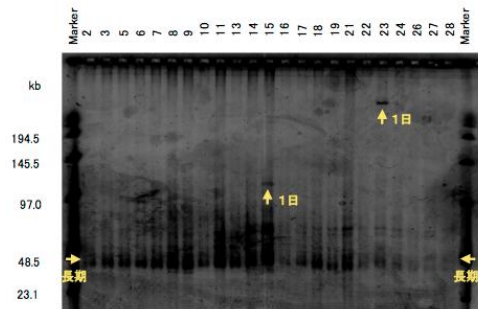


図3 PFGE 法によるモニタリングの結果

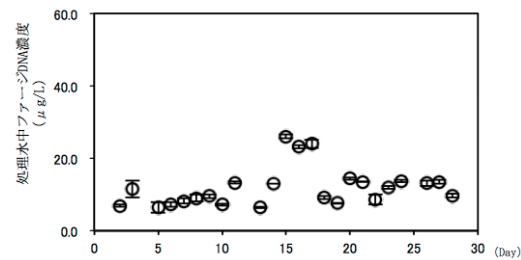


図4 処理水ファージ性 DNA 濃度の推移

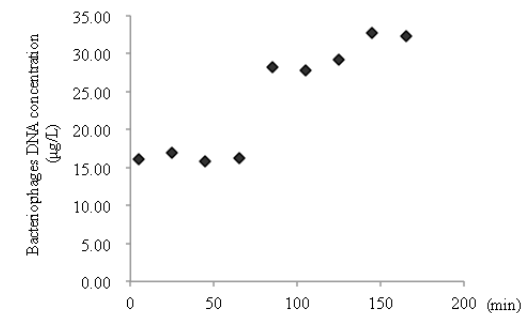


図5 1 サイクル内でのファージ性 DNA の挙動の例

b) 宿主の情報を得るための試み

Salmonella 菌株にファージを添加し、その後、上清中に漏れでた宿主の DNA の量を、*invA* 遺伝子を標的とする定量 PCR 法で追跡した。その結果を図6に示す。また、培養初期4時間について、上清中のファージ粒子の数と上清中宿主 DNA のコピー数の関係を図7に示す。

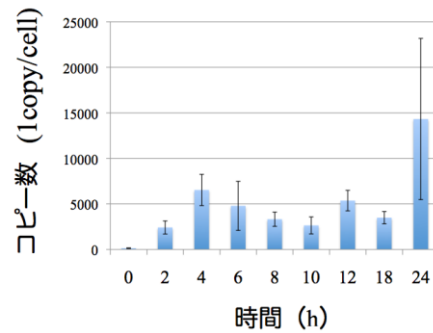


図6 上清中 *invA* 遺伝子のコピー数

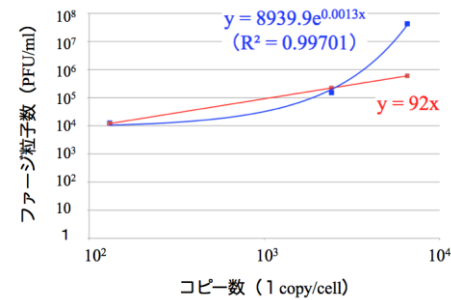


図7 検出された *invA* 遺伝子のコピー数とファージ粒子数の関係 (曲線: 実測された結果、直線: ファージのバーストサイズが 92 であることに基づく計算値)

初期4時間においては、宿主の溶菌が進むにつれ、上清に検出された *invA* 遺伝子の量が増加し、一部の宿主由来 DNA が上清に漏出する事を確認することができた。特に、最初の二時間については理論的な関係によく一致していた。しかし、その後上清中の *invA* 遺伝子のコピー数は減少した。恐らくファージが宿主に由来する DNA 分解酵素も上清中に放出され、そのため、DNA の分解が進んだものと見られる。

上清中に宿主 DNA が検出されたという事から、上清中の宿主由来 DNA を調べる事で溶菌された宿主に関する情報を得ることができると可能性がある。

(4) 総括

以上のように、バクテリオファージをモニタリングする手法として、PFGE 法、ファージ性 DNA の定量法に加え、DNA 増幅を介しての RFLP 法によるプロファイリング手法を導入した。また、ファージの増殖が、主に好気性条件下で起きている事を確認した。さらに、上清中に宿主の DNA が漏出するので、それを手がかりとして宿主に関する情報を得ることができると可能性があることがわかった。

また、活性汚泥中の細菌の死因の数割がファージによる溶菌によるのではないかと

試算を得た。また、(2)に述べたように、活性汚泥プロセスの運転に伴ってファージも増減し、明確にバーストが起きたとわかる形跡も見ることができた。このことは、ファージを用いて例えば余剰汚泥の減量を促進できる可能性につながる。また、ファージをモニターする事で、微生物群集構造の変化の原因に迫ることができる可能性は非常に高いと言える。

その一方、本研究の範囲では、ファージが活性汚泥プロセスの性能に影響を与えたという証拠は得ることができなかった。また、ファージを用いて病原微生物を制御するアイデアとして、ファージセラピーが提案され、海外ではそれを実践している医学者も存在する。同じような発想を下排水処理系に持ち込む事も可能であろうが、そのためには、ファージと宿主の関係について、なお基礎的な情報を収集する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. 小川寛司、佐藤弘泰、多田千佳、中井裕 (2011) 水処理過程におけるバクテリオファージの動態の評価. 第45回日本水環境学会年会講演集.P111. (査読無し)
2. 楊賀、佐藤弘泰、味埜俊 (2011) 活性汚泥処理水中バクテリオファージの定性・定量モニタリング. 第45回日本水環境学会年会講演集、P674. (査読無し)
3. 佐藤弘泰 (2009) リン資源の効率的回収に向けて -頼れる生物学的リン除去活性汚泥法を目指して-. 再生と利用. No.124, 11-18. (査読無し)

[学会発表] (計 6 件)

1. 楊賀、佐藤弘泰、味埜俊 (2010)PFGE法による活性汚泥処理水中バクテリオファージコロファイリングのための試料濃縮法の検討.第26回日本微生物生態学会大会、P115. (2010.11.24-26, つくば)
2. 佐藤弘泰、楊賀、陳靈佳、味埜俊 (2010)DNA増幅・RFLP法による活性汚泥上清水中バクテリオファージプロファイリング. 大阪大学蛋白質研究所セミナー バクテリオファージ研究の可能性と課題. (2010.9.9-9.10, 大阪)
3. 佐藤弘泰(2010)下水処理微生物生態系とバクテリオファージ. 大阪大学蛋白質研究所セミナー バクテリオファージ研究の可能性と課題. (2010.9.9-9.10, 大阪)

4. 小川寛司、多田千佳、佐藤弘泰、中井裕 (2010)畜産環境におけるバクテリオファージの動態の評価法. 第9回畜産環境学会. 2010.7.30, 東京(全国家電会館).

5. Lin Chia TAN, 佐藤弘泰、味埜俊(2010) 活性汚泥法処理水中バクテリオファージのRFLP法によるプロファイリング. 第44回日本水環境学会講演集. P79. (2010.3.15-17 福岡市)

6. Otawa, K., Nakai, Y., Mino, T., Satoh, H. (2009) Monitoring of total viral dsDNA concentration in the supernatant of laboratory-scale activated sludge reactors with the fluorescent dye PicoGreen. ASPD5, IWA Specialized Conference, May24-27, Aalborg, Denmark.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 弘泰 (SATO HIROYASU)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：90251347

(2) 研究分担者

味埜 俊 (MINO TAKASHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60166098

中井 裕 (NAKAI HIROSHI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80155655

小田和 賢一 (OTAWA KENICHI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：00451550

(H20のみ)

多田 千佳 (TADA CHIKA)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30413892

(H21-H22)

(3) 連携研究者

なし