

研究課題名 環境複合微生物の迅速検出による環境質評価  
所属研究機関名 独立行政法人 産業技術総合研究所  
研究者氏名 関口 勇地

## ・研究計画の概要

### 研究の趣旨・目的

生物学的廃水処理等バイオテクノロジー分野では、その処理の担い手である複合微生物群のモニタリングとそれに基づくプロセス管理上のフィードバックは極めて重要である。土壌・地下水等各種汚染環境での微生物情報を含めた環境質の評価は、環境・公害対策の出発点である。従って、それら人工、自然環境中の多様な微生物の情報(どの種類の微生物が、どれくらい存在し、何をしているのか)は、基礎的データとして極めて重要であり、その測定データは本来リアルタイムで取得できることが望まれる。しかしながら、現在のところ、それらを簡便かつ迅速に達成する技術は開発の途上にある。本研究は、廃水処理及び各種環境中複合微生物群の情報、及び分子遺伝学的手法を利用した微生物の特異的検出・定量手法を進展させ、微生物の持つ各種遺伝子をターゲットとしたオリゴヌクレオチドプローブによるDNA・RNA検出技術、及びDNAマイクロアレイ技術などの手法を利用し、環境複合微生物の全体像を迅速かつ網羅的にモニタリングするためのツールを開発することを目的とする。

### 研究計画の概要

本研究は、廃水処理及び各種環境中複合微生物群の情報、及び分子遺伝学的手法を利用した微生物の特異的検出・定量手法を進展させ、微生物の持つ各種遺伝子をターゲットとしたオリゴヌクレオチドプローブによるDNAマイクロチップ技術などを利用し、環境複合微生物の全体像を迅速かつ網羅的にモニタリングするための新たなツールを開発することを目的としている。その開発のため、以下の4つの項目に関して重点的に研究を行う。すなわち、(1)廃水処理プロセス及び有害物汚染度上環境の微生物群集構造とデータベース化、(2)各環境・状況において特徴的な微生物の同定と特異的検出ツールの開発、(3)各種DNAプローブを利用したDNAチップ等の技術による微生物の迅速・網羅的モニタリング手法の開発、(4)開発された手法による環境質診断・評価である。(1)においては、工業的に大規模かつ広範囲で利用されている最大の複合バイオプロセスである廃水処理プロセス、及び広範囲でその分散が確認されているTCE(トリクロロエチレン)によって汚染されている土壌環境を対象とし、その環境下で生育している複合微生物群を16S rRNA遺伝子により網羅的に解析し、それぞれの環境に存在する微生物群を分子遺伝学的に同定すると共に、その結果をデータベース化する。その結果を基に、各環境において特徴的、あるいは重要な要素となっている微生物群を特定し、開発する迅速な複合微生物モニタリング手法によって検出すべき対象となる微生物群を選定する。(2)においては、(1)の解析によって得られた特徴的微生物群の環境中での機能を解明するため、各環境において重要と推定された個々の微生物群を培養・分離し、それぞれの詳細な生理学的特徴を解析する。同時に、それらの微生物を微生物群類学的にも同定し、新たな機能を有する微生物を発見した場合、その命名・記載及び各国の微生物寄託施設への分譲を行い、広くその成果を公表し環境微生物の知的基盤情報を更に蓄積する。また、それらの微生物群に対しては、個々の微生物群の持つ16S rRNAを標的とした特異的DNAプローブを作製し、そのDNA配列情報をデータベース化する。(3)においては、主に16S rRNA及びその遺伝子を対象とし、複合微生物中の特定微生物の迅速かつ網羅的な新規解析手法を開発する。そのため、DNAマイクロアレイ等想定される最新の技術を利用し、その開発にあたる。また、その手法には、(1)及び(2)によって得られた情報、特に(2)によって得られた特異的DNAプローブの情報を駆使し、(1)で選ばれた環境の環境質診断・評価が可能な技術にすることを目指す。さらに、(4)においては、実際に開発された環境微生物解析技術を利用し、(1)で選ばれた環境の環境質診断・評価が可能かどうかを詳細に検討する予定である。

研究計画の詳細報告

(単位:百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
1. 廃水処理プロセス及び有害物汚染地上環境の微生物群集構造とデータベース化	5.9	3.9	1.5			11.3
(1)嫌気性廃水処理技術の複合微生物群の解析	← 3.4	3.3	1.5		→	8.2
(2)TCE 汚染環境における微生物群の解析	2.5	0.6				3.1
2. 各環境・状況において特徴的な微生物の同定と特異的検出ツールの開発	2.5	3.7	2.5			8.7
(1)嫌気性廃水処理技術の複合微生物群の解析	← 1.5	3.1	2.5		→	7.1
(2)TCE 汚染環境における微生物群の解析	1.0	0.6				1.6
3. 各種 DNA プローブを利用した DNA チップ等の技術による微生物の迅速・網羅的モニタリング手法の開発	11.0	12.2	4.4			27.6
(1)DNA マイクロアレイ技術を利用した網羅的微生物定量技術の開発	← 11.0	2.1	1.5		→	14.6
(2)リボヌクレアーゼを利用した新規微生物定量技術の開発		← 10.1	2.9		→	13.0
4. 開発された手法による環境質診断・評価			1.0			1.0
(1)各種嫌気性廃水・廃棄物処理プロセスのプロセス診断			← 1.0		→	
所要経費(合計) (間接経費を含む)	19.4	19.8	9.4			48.6

## ・研究成果の概要

### 研究成果の概要

平成 14 年度から平成 15 年度にかけ、主に課題(1)、(2)及び(3)に関して集中的な検討を行った。課題(1)に関しては、メタン生成・嫌気性廃水処理汚泥およびテトラクロロエチレン汚染環境をモデル環境複合微生物群とした解析を行った。それらの微生物群集構造を 16S rRNA 遺伝子に基づき解析し、その解析結果を PC 上でデータベース化した。そのデータには現在までに 200 種類を超える遺伝子配列が蓄積されている。その結果、それぞれの環境中で重要な微生物を特定できたと共に、その多くが未だ培養されていない(すなわち機能の未知な)微生物群であることが判明した。課題(2)に関しては、それらの環境下で非常に重要な役割を担っていると考えられる微生物群(嫌気共生微生物、嫌気バルキング原因微生物、メタン生成古細菌、TCE 還元細菌など)を計 10 種類以上分離・培養に成功した。本微生物分離株の生理学的特徴を把握するとともに、いくつかの株に関しては新種として記載・発表を行った。さらに、それらの微生物を特異的に検出可能な 16S rRNA を標的とするオリゴヌクレオチドプローブを各種設計した。それ DNA プローブの特異性の調査を行い、DNA マイクロチップ等への利用が可能であることを確認した。また、課題(3)に関しては、DNA マイクロチップを作成するための若干の基本的な技術的検討を行い、その可能性を調査した。さらに、リボヌクレアーゼ H を利用した rRNA を標的とする微生物の迅速検出・定量のための新規技術を開発し、その有効性を詳細に評価した。

### 波及効果、発展方向、改善点等

本研究では、当面廃水処理プロセスや土壌等の限られた環境に適応した迅速微生物モニタリング技術を開発し、それを利用した環境質診断・評価技術を提供することを目標としている。将来的にはあらゆる環境に対応できるユニバーサルな環境質診断技術を開発することを志向している。このような技術は、水圏・大気・土壌のリアルタイム環境微生物モニタリング技術となるのみならず、人間の腸内複合微生物の評価技術による人体の健康診断など医療分野などにも応用可能な技術となると予想される。また、それはバイオテクノロジー分野や医療現場における迅速な微生物同定技術としても有用であると予想される。さらに本技術は、簡便な汚染環境診断技術として利用ができる可能性もあるなど、応用・波及範囲は高いと考えている。また、本研究で開発する環境質診断技術は、環境微生物に関する基礎科学的情報を基盤とした技術であるため、その基礎的情報を蓄積するという基礎科学の面も含む課題である。環境中やバイオプロセスを構成する複合微生物のほとんど大部分が現在のところ人為的には培養することが出来ない未知微生物群である、その未知生物群への分子情報を利用したさらなるアプローチは、今後のバイオテクノロジーの発展にも不可欠である。本課題では、課題(1)及び(2)において、この基礎科学的側面に頂点を当て、未知微生物群の機能解析を重要な課題としており、その過程で得られる結果は、環境微生物学や環境バイオテクノロジー分野において普遍的かつ重要な基礎科学的知見を提供するものであると考えている。平成 14-15 年度においては、新しいコンセプトを利用した rRNA をベースとする特異的微生物検出・定量技術を開発することが出来た。この手法は類似する手法が存在せず、極めてユニークな技術であり、現在までには考えられない迅速性で複合微生物群中の特定微生物を簡便かつ正確に検出・定量することが出来る。本手法に関しては、医療、医薬、環境微生物、バイオテクノロジー等の分野で普遍的に利用可能な基盤技術となり得るポテンシャルを有している。従って、本手法が微生物を利用する様々な分野において有用な技術として波及していく可能性があると考えている。今後は、日本発の本手法を活用した迅速・網羅的な微生物解析を更に発展させ、本研究課題の目標を達成したい。また、環境微生物分野においては、各種の培養困難であった微生物を実際に培養し、その生理学的特性や機才作業と発表を通じ、基礎微生物学的な知見を広く公表し、その基盤情報の蓄積に貢献できた。また、それらの微生物を特異的に検出可能なオリゴヌクレオチドを各種作製したが、この情報は他の環境微生物分野、環境バイオテクノロジー分野においても、微生物モニタリング手法において有効に使用可能であると考えている。

## . 研究成果発表等の状況

### (1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	1 件	1 件	7 件	9 件
国 際	3 件	0 件	2 件	5 件
合 計	4 件	1 件	9 件	14 件

### (2) 特許等出願件数

合計 0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

### (3) 受賞等

0 件 (うち国内 0 件、国外 0 件)

### (4) 主な原著論文による発表の内訳

\* 発表者氏名, 「発表題目」, 文献名, 巻(号), 頁, (掲載年)の順

国内誌 (国内英文誌を含む)

1. 井町寛之ほか: 「高温嫌気性廃水処理汚泥 から分離したプロピオン酸酸化共生細菌の生理学的特徴とグラニュール汚泥内空間分布」, 水環境学会誌, 25, 539-546, (2002)

国外誌

1. machi, H. et al.: 「*Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic syntrophic propionate-oxidizing bacterium.」, International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, 52, 1729-1735, (2002)

2. iu, Y.-L. et al.: 「*Sporotomaculum syntrophicum* sp. nov., a novel anaerobic, syntrophic benzoate-degrading bacterium isolated from methanogenic sludge treating wastewater from terephthalate manufacturing」, Archives of Microbiology, 179, 242-249, (2003)

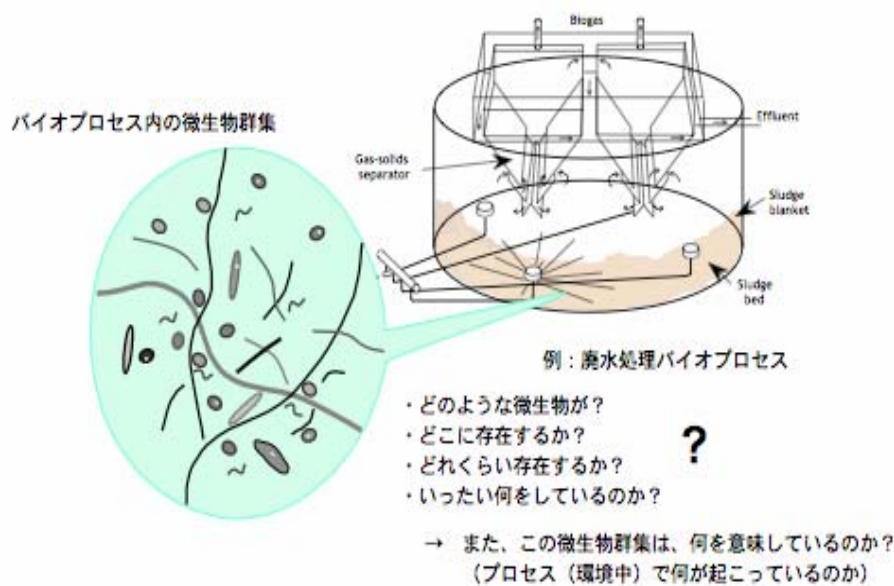
3. Sekiguchi et al. : 「*Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level.」, International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, in press, (2003)

### (5) 主要雑誌への研究成果発表

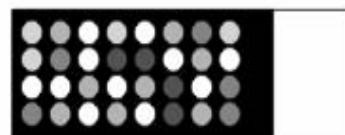
Journal	Impact Factor
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.	2.873
Archives of Microbiology.	1.90

## 環境複合微生物の迅速検出による環境質評価

- 廃水処理等のバイオテクノロジー分野の複合微生物群
  - 汚染環境等（土壌・地下水・河川など）の自然環境中複合微生物
- 微生物情報（どのような微生物が？どこに？どれくらい存在し？何をしているのか？）のリアルタイムモニタリングは、バイオプロセスの維持管理、微生物を利用した汚染環境の浄化（バイオレメディエーション）を診断する上で重要。
- さらにその微生物情報は、それらサンプルの環境質（汚染の状況など）そのものを理解するための指標となりうる。



問題：有効かつ迅速なモニタリング技術の不足：現在まで、プロセスを維持管理する上での微生物情報を容易に得て、それをプロセスにフィードバックする手法が存在しなかった。



DNAプローブのマイクロアレイ化：  
各微生物をスポットのシグナルとして  
検出する。

- DNAテクノロジーを駆使し、微生物群集構造を精度良く評価するためのツールを開発することが本研究の第一の目標。
- さらに、本研究で得られた解析ツールにより、自然環境やバイオプロセス等の状況を診断する、またその将来を予測するための指標として活用する為のデータを蓄積することで、環境質診断に応用することが第二の目標。