

(17) クローニング法による実下水処理場活性汚泥に 存在するポリヒドロキシアルカン酸合成遺伝子 (*phaC*)の解析

道中 敦子^{1*}・小貫 元治²・佐藤 弘泰¹・味埜 俊¹

¹東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究室 (〒277-8563 柏市柏の葉 5-1-5)

²東京大学サステイナビリティ学連携研究機構 (〒113-8654 東京都文京区本郷7-3-1)

* E-mail: mitinaka@env.t.u-tokyo.ac.jp

3つの実下水処理場から採集した活性汚泥中のPHA合成機能遺伝子(*phaC*)について、C1226f-CP_rプライマーセットを用いたクローニング法により解析を行った。得られたクローンは既知のPHA合成酵素と43-100%相同性を示し、活性汚泥で一般的に観察される*Alcaligenes* sp.や*Pseudomonas putida*などの*phaC*が検出された。A処理場(嫌気無酸素好気法)とM処理場(嫌気好気法)試料いずれも約8割を*Rhodospirillum rubrum* PHA合成酵素に約50%類似するクローンのみから成るグループ(Y2)が占有していたが、N処理場(標準法)試料では1割程度だった。このようにクローンライブラリーを作成することによって、各処理場の*phaC*分布に特徴があることがわかった。

Key Words : polyhydroxyalkanoate, activated sludge, functional gene, *phaC*

1. はじめに

活性汚泥では有機物をポリヒドロキシアルカン酸(PHA)のような形態で一時的に貯蔵することが知られている。このような代謝は、基質の摂取を巡る微生物間の競争において何らかの役割を果たしていると考えられる。生物学的リン除去プロセスにおいて、リン除去に関連するポリリン酸蓄積細菌(PAOs)やグリコーゲン蓄積細菌(GAOs)などがPHAを有機貯蔵物質の1つとして菌体内に蓄積することが報告されており^{1,2)}、これらは廃水処理に直接関わってくるPHA蓄積細菌の一例である。PHAは、生物学的リン除去プロセスのような嫌気と好気の繰り返される条件下だけでなく、基質の負荷変動がある時にも貯蔵されることが報告されている^{4,5)}。有機物の貯蔵は、活性汚泥数学モデルActivated sludge model(ASM) No.2では嫌氣的有機物摂取に関与する場合のみ扱われているが、ASM No.3では好気条件での貯蔵も組み込まれている⁶⁾。

さらにもう一方で、PHAは生分解性プラスチックの原料となることが報告されており、物性試験や工業化への試みがなされてきた^{7,8)}。また、活性汚泥プロセスを用い

た生分解性プラスチック生産システムに関する研究もなされてきた^{10,13)}。

このように活性汚泥ではPHAが深く関わっていることがわかる。しかしながら、生物学的リン除去に関連する一部のPHA蓄積細菌については知見が集積されつつあるが、それを除くと活性汚泥中に存在するPHA蓄積細菌についての情報は少なく、特に分子生物学的なレベルでの情報はほとんどない。従って、本研究では、活性汚泥中に存在するPHA合成酵素について分子生物学的なレベルでの基礎的な知見を得ることを目的とした。PHA合成酵素について分子生物学的なレベルの知見が蓄積されれば、そこから、活性汚泥における炭素源をめぐる微生物間の関係性、生成されるPHAとPHA合成酵素の関係などについて把握することができ、新たな知見が得られることが期待される。

多くのPHA蓄積細菌についての研究から、PHA合成にはいくつかの酵素が関わっていることが明らかになっている¹⁴⁾。そのうちの、PHA合成の最終段階に位置する3-ヒドロキアルカノイルCoAのポリマー化を触媒するPHA合成酵素はPHA合成のキー酵素であり、本稿ではこれを

コードする遺伝子について解析した。この酵素は*phaC*遺伝子によりコードされており、複数の純粋菌株がもつ*phaC*を捕らえる縮合PCRプライマーがSheuらによって報告されている¹⁹⁾。

本研究では3つの異なる実下水処理場活性汚泥中に存在する*phaC*の多様性をクローニング法を用いて調べることで、どのようなPHA合成酵素が存在しているか、処理場ごとに差があるかどうか、活性汚泥中に存在する*phaC*に関する情報を得ることを試みた。

2. 実験方法

(1) 試料

a) 活性汚泥試料

首都圏に立地する3つの都市下水処理場から試料を採取した。A処理場は嫌気無酸素好気活性汚泥法、M処理場は嫌気好気活性汚泥法、N処理場は標準活性汚泥法(好気法)で運転されている。試料は好気工程末端から採集し、採集したのは10月である。本稿では、これらの試料を処理場の名称にちなみそれぞれ試料A、試料M、試料Nとよぶ。

b) PHA蓄積細菌純粋菌株試料

純粋菌株はすべてIAM Culture Collectionから取得しIAMのプロトコールに従い培養を行った。用いた純粋菌株は以下の11種類であり、いずれもPHA蓄積能を有することが知られている; *Wautersia eutropha* (前*Alcaligenes eutrophus* または *Ralstonia eutropha*¹⁰⁾) H16 IAM 12368, *Alcaligenes sp.* IAM 12565, *Azotobacter chroococcum* IAM 12666, *Methylobacterium extorquens* IAM 12631, *Paracoccus denitrificans* IAM 12479, *Pseudomonas alcaligenes* IAM 12411, *Pseudomonas aureofaciens* IAM 1001, *Pseudomonas oleovorans* IAM 1508, *Pseudomonas putida* IAM 1236, *Sphaerotilus natans* IAM 12068, *Rhizobium meliloti* IAM 12611。

(2) 核酸(DNA)の抽出

採取した試料からFastDNA SPIN Kit for soil(Obiogene, CA)を用いて、付属のプロトコールに従いDNAを抽出した。

(3) PCR反応

抽出したDNAは濃度を50ng/μlに調整し、PCR反応の鋳型に供した。Sheuらの開発したPCRプライマー¹⁹⁾はフォワードに5個、リバーズに6個の混合塩基配列を含む。そこで、ここでは将来的に系内の*phaC*構造を簡易に把握する方法としてDGGEを適用することを想定し、非縮合プライマーを検討することとした。そこで、Sheuらのプライマーと同じ部位をターゲットとし、*Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas oleovorans*, および *Wautersia eutropha*のPHA合成酵素(*phaC*)を標的とする非縮合プライマー、C774f-CAIr, C1226f-CPr, C1580f-CWr, C1938f-CPr, C3940f-CPr, C4931f-CPrの6通りのプライマーセットについて検討を行った。それぞれのプライマーの塩基配列を表-1に示す。どのプライマーセットもSheuらが設計したCF1 (5'-ATCAACAARTWCTACRTCYS-3')、CR4 (5'-AggTAgTTgTYgACSMRTAg-3')に含まれる配列である。検討にあたっては、前述の11種の純粋菌株を用いてその増幅産物の有無について確認を行った。PCR反応にはAmpli Taq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, CA)を用い、PCR反応液は基本的に同社の推奨する組成に従い、最終濃度がdNTP 0.2mM、ポリメラーゼ 0.05U/μL、各プライマー 0.2μMとなるように調整した。しかし、Sheuらのプライマーを用いる場合には、Sheuら¹⁹⁾に従い、プライマー濃度を2.5μMとし、0.03% DMSOと1M Betaineを添加した。PCR反応の温度条件についてはShueらの方法¹⁹⁾に従い(94℃:10min, 51℃:2min, 72℃:2min)1サイクルに引き続いて、(94℃:20sec, 57℃:45sec, 72℃:1min)を35サイクル、最後に72℃:10minを行った。

(4) クローンの取得、DNA塩基配列決定

クローニングとシーケンス反応はC1226f-CPrプライマ

表-1 本稿で用いたプライマーの配列をそのターゲット領域

プライマー	プライマー配列 (5'→3')	菌種	Accession No. (GenBank)	<i>phaC</i> のターゲット領域
C774f	ATCAACAAGTTCTACATCCTCGACCT	<i>Alcaligenes sp.</i>	U78047	nt 774-799
C1226f	ATCAACAAGTTCTACgTATTCgACCT	<i>P.oleovorans</i>	M58445	nt 1226-1251
C1580f	ATCAACAAGTACTACATCCTggACCT	<i>W.eutropha</i>	J05003	nt 1580-1605
C1938f	ATCAACAAGTTCTACgTCTTCgACCT	<i>Paeruginosa</i>	X66592	nt 1938-1963
C3940f	ATCAACAAGTTCTACATCTTCgACCT	<i>P.oleovorans</i>	M58445	nt 3940-3965
C4931f	ATCAACAAGTACTACATCTTCgACCT	<i>Paeruginosa</i>	X66592	nt 4931-4955
CAIr	AggTAgTTgCCCCACCgTAgTTCCA	<i>Alcaligenes sp.</i>	U78047	nt 1230-1255
CPr	AggTAgTTgTgACCCAgTAgTTCCA	<i>P.oleovorans</i>	M58445	nt 1679-1704
CWr	AggTAgTTgTCgACCACgTAgTTCCA	<i>W.eutropha</i>	J05003	nt 1226-1251

ーセットで得られたPCR産物に対してのみ行った。QIAGEN PCR Cloning plus Kit (Qiagen, Germany)を用いて、付属のプロトコールに従いPCR増幅産物のクローニングを行った。得られた白色コロニーからSP6とT7プライマーによりコロニーPCRを行い、目的領域のDNA断片を切り出した。クローン化したPCR産物はC1226fまたはCPrプライマー、ABI BigDye terminator kits version 3.1 (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い、ABI3100 (Applied Biosystems)により、付属のプロトコールに従いDNA塩基配列を決定した。

決定されたクローンのDNA塩基配列はCLUSTAL W¹⁷⁾によって系統解析を行い、それをもとにTREE VIEW¹⁸⁾により系統樹を作成した。また、得られたクローンから得た配列は、既存のDNAあるいはタンパク質のデータベースとBLAST¹⁹⁾をそれぞれ用いて、クローンのDNA塩基配列あるいはアミノ酸配列と既知のものとの相同性解析を行った。

3. 結果及び考察

(1) 目的とするPHA合成機能遺伝子

a) プライマーセットの選択

Sheuらは設計したプライマーを19種のPHA合成細菌について適用し、6科にまたがる15種のPHA合成遺伝子を検出することができたと報告した¹⁹⁾。このプライマーセットが検出できるPHA合成遺伝子は*Ralstonia eutropha*等の持つ比較的短鎖のヒドロキシ脂肪酸ポリマー合成酵素 (Type I) および*Pseudomonas oleovorans*等のもつ中一長鎖のヒドロキシ脂肪酸ポリマー合成酵素 (Type II) の双方にまたがるものである。Type IまたはType IIのPHA合成酵素をもつ11種の細菌 (Sheuらがプライマー設計に用いた細菌のうち入手可能であったもの) に対して予備実験としてPCRを行った結果、C1580-CWrではどの細菌からもPCR産物が得られなかった。C774f-CAIr、C1938f-CPr、C3940f-CPr、C4931f-CPrは*P. alcaligenes*、*P. oleovorans*、*P. putida*の3つの細菌から期待される長さ(約500bp)のPCR産物が得られた。C1226f-CPrは*M. extorquens*以外の細菌すべてから期待される長さのPCR産物が得られた。CF1-CR4では、*A. chroococcum*、*M. extorquens*、*P. denitrificans*、*S. natans*以外の細菌からPCR産物が確認された。

C1226f-CPr、C1938f-CPr、C3940f-CPr、C4931f-CPrは*Pseudomonas*属から設計したプライマーであり、PCRの結果、*Pseudomonas*属からPCR産物が確認されたことは予想されるものだった。また、CF1-CR4についてはSheuらの結果でも*A. chroococcum*は増幅されておらず、今回産物が確認されなかったことは予想される結果だった。しかしながら、以下の点について予想されない結果が得られた。

- C1580-CWrは*W. eutropha*が持つ配列だが、*W. eutropha*からPCR産物は確認されなかった。
- C774f-CAIrは*Alcaligenes* sp. が持つ配列だが、*Alcaligenes* sp. からPCR産物は確認されず、*Pseudomonas*属である3つの菌株からPCR産物が確認された。
- C1226fとCPrのプライマーセットは縮合プライマーであるCF1-CR4に含まれるうちの1つの配列である。従ってCF1-CR4では増幅出来なかった*A. chroococcum*、*M. extorquens*、*P. denitrificans*、*S. natans*は増幅しないと予想されたが、結果では予想に反してこれらの細菌はC1226f-CPrで増幅された。

*phnC*のPCR増幅について、以上のような不明点はあるものの、ここでは、検討に用いたプライマーセットの中で最も広範囲にわたるPHA蓄積細菌を検出することが出来たC1226f-CPrを用いて、その増幅されたPCR産物について解析を進めることとした。

b) C1226f-CPrによって得られたクローン

C1226f-CPrを用いて活性汚泥試料A、M、Nから目的領域を増幅し、PCR産物を得た。アガロースゲル電気泳動のバンドの濃さから、定性的にはあるが、3つの試料から得たPCR産物はほぼ同量だった。得られたPCR産物は期待される長さ(約500bp)だった。得られたPCR産物をクローニングした結果、A、M、N、それぞれ79個、75個、53個、計207個の塩基配列の解読に成功したクローンを得た。

得られたクローンのDNA配列をアミノ酸配列に翻訳し、増幅された産物が*phnC*かどうか確認した。得られた各クローンの塩基配列をアミノ酸配列に翻訳すると158-165個のアミノ酸配列に翻訳された。塩基配列は異なるがアミノ酸配列が一致するクローンが確認された。

今回得られたすべてのクローンについて、アミノ酸配列のホモロジー検索を行った結果、最も近い既知のタンパク質はどのクローンもPHA合成酵素だった。その相同性の範囲は43%から100%だった。このように相同性が5割に満たない低い値のものも見られたが、SteinbüchelとHeinが36種の細菌についてそのPHA合成酵素の配列の相同性を調べたところ143から87.5%だった²⁰⁾ことから、その多様性は十分考えられる範囲だった。その中でも90%以上の高い相同性で既知のPHA合成酵素のアミノ酸配列と一致するクローンが確認された。例えば、*Alcaligenes* sp. (proteinID: AAB36944.1) のPHA合成酵素に94%、*Aeromonas hydrophila*のPHA合成酵素に98%、*P. oleovorans* (AAA25932.1) のPHA合成酵素に98%、*Pseudomonas* sp. HJ-2 (AAQ72540.1) のPHA合成酵素に100%、*P. putida* (AAP37048.1) のPHA合成酵素に100%と、非常に高い相同性で一致するクローンが確認された。いずれの細菌も活性汚泥では一般的に検出されるものである。よ

って、C1226f-CPrプライマーセットは上記の既知の*phaC*を捉えることが出来ることが確認され、*Alcaligenes* sp.が持つTypeIのPHA合成酵素と*Pseudomonas* sp.が持つTypeIIのPHA合成酵素、共に検出することが出来ることが確認さ

れた。

次にクローンのアミノ酸配列からモチーフ構造の検索を行った。Rehm は 59 種類の細菌についてその PHA 合成酵素を比較し、PHA 合成酵素は活性中心となる 319 番

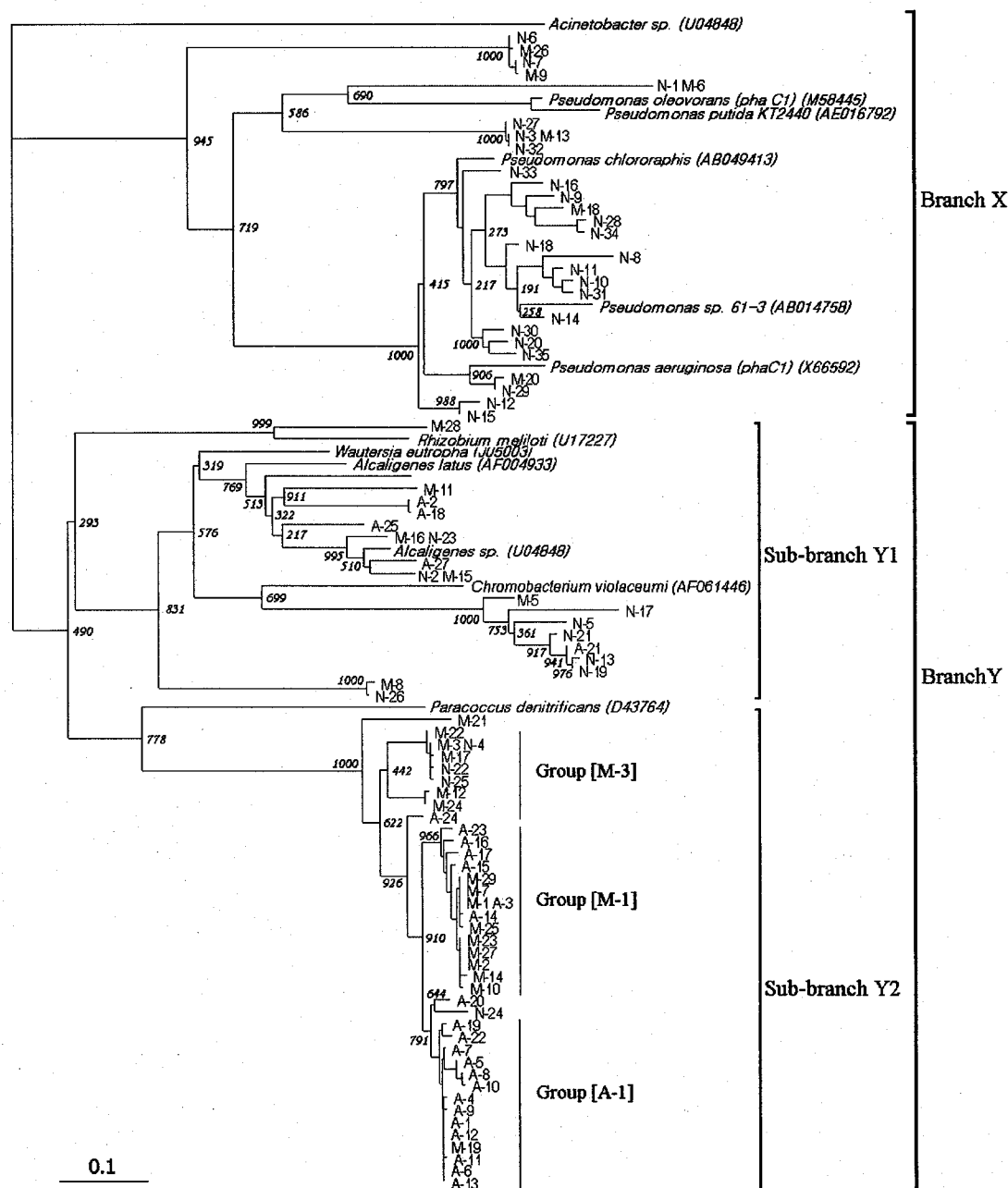


図-1 3つの実下水処理場から得られたターゲット遺伝子(*phaC*)配列から作成した無根系統樹

目の Cys-319 と 322 番目の Gly-322 を含む "G-x-C (または S)-x-G" (G: グリシン, C: システイン, S: セリン, x: 任意のアミノ酸残基) というモチーフ構造を持つことを報告している²⁰⁾。今回得られたすべてのクローン 207 個をアミノ酸配列に翻訳すると 84 種類のアミノ酸配列が得られ、そのうちの 80 種類についてはすべてモチーフ構造が予想される位置に確認された。残りの 4 種類については、モチーフ内の 1 つめの「G」が「A(アラニン)」に置換されていた。しかしながら、活性中心となる「C」がすべての配列において保存されていることから、得られた配列はターゲット領域であるといえる。

以上のことから本稿で用いた C1226f-CP_r によって目的のターゲット領域が増幅されていることが確認され、このプライマーセットは TypeI または TypeII の PHA 合成酵素を持つ細菌のうち少なくとも本稿で確認した 10 種類について検出することが出来るプライマーであることが確認された。

(2) 系統解析

個々のクローンから得た配列に対し、CLUSTAL W(DDBJ)を用いて相同性を解析した。アラインメントをかけた結果、スコアが100%となる2つの配列は同配列とみなした。得られたクローンの配列と、12種類PHA蓄積細菌から得た*phaC*のDNA配列を用いて系統解析を行った。図-1に作成した系統樹を示す。図中の各細菌名の後ろに続く括弧内に、登録されているそれぞれの*phaC*塩基配列に対するDDBJ Accession No.を記載した。枝分かれ部位の数字はブートストラップ値を示し、図左下のスケールバーは塩基配列が10%異なる距離を示す。系統樹に示される距離から、大きく2つのBranch XとYに分けられ、それぞれ28、56種類の異なる配列を持つクローンから構成されていた。Branch YはさらにSub-branch Y1とY2のサブクラスターに分けられた。Branch Xは主に*Pseudomonas*属が含まれていた。Sub-branch Y1は*Alcaligenes* sp.や*Wautersia eoutropha*のように既知のTypeIIに属する*phaC*から構成されていた。一方、Sub-branch Y2は主にクローンから構成されていた。また、Sub-branch Y2はそれぞれ相同性が高いクローン(相同性97%以上)どおし集約すると、Group[A-1](相同性; >97%)、Group[M-1](相同性; >97%)、Group[M-3](相同性; >99%)の3つのグループに分けられた。

BLASTXを用いて各クローンのアミノ酸配列を既知のタンパク質とホモロジー解析をした結果より、Branch Xを構成するクローンのアミノ酸配列はTypeIIのPHA合成酵素が最も近いアミノ酸配列として上位に上がってくる。一方、Branch Yを構成するクローンの場合、TypeIのPHA合成酵素が上位に上がってくる。このことから、

Branch Xに属するクローンは中一長鎖のヒドロキシ脂肪酸ポリマー合成酵素、Branch Yに属するクローンは比較的短鎖のヒドロキシ脂肪酸ポリマー合成酵素に類似すると推測された。

(3) クローンライブラリーの構成

3つの実下水処理場A、M、N、から得たクローンライブラリーの構成を図-2に示す。出現頻度が1のクローン(各クローンライブラリー内に1つしか存在しないもの。ただし、系統樹上でグループ化したGroup[A-1]、[M-1]、[M-3]に属するものは含まない。)は「その他」としてまとめた。

AとM、MとN、それぞれに共通するクローンは確認されたが、3つの処理場試料すべてに共通するクローンは確認されなかった。AはGroup[A-1]が、MはGroup[M-1]が半数以上を占め、優占していた。一方、Nについては、最も出現頻度の高かったクローン(N-1)でさえ約1割程度であり、AやMのような明確に優占するクローンは見られなかった。また、Nは他の試料より得られた配列の種類も多く、比較的多様なクローンライブラリーを示した。

図-2に示されるように、嫌気無酸素好気法で処理を行っているA処理場、嫌気好気法で処理を行っているM処理場から採取した試料、どちらも、Sub-branch Y2が約8割占めている。それに対し、標準活性汚泥法(好気法)で処理を行っているN処理場から採取した試料には約1割程度しか存在していない。AやMのように好気工程の前段階に嫌気工程を加えると生物学的リン除去を行うPAOsが優占することが知られている。また、PAOsは活性汚泥中に存在するPHA蓄積細菌の1つであることははじめににも記載したとおりであり、PAOsの代謝ではリンとPHAが深く関わっている。A処理場、M処理場、N処理場の好気工程終わりから採取した汚泥を用いて、汚泥リン含有量率(全リン量(mg)/MLSS(g))を測定したところ、A、Mは約18mg/gであるのに対し、Nは10mg/gと低かった。このことから、NはPAOsが少なく、その分だけPHA能力が低い汚泥であることが予想される。この結果から、PAOsが集積される条件下では、Sub-branch Y2に見られる*phaC*が優占する可能性があるのではないかと推測された。

Sub-branch Y2に分類されるクローンのアミノ酸配列よりBLASTによるホモロジー検索を行ったところ、*Rhodospirillum rubrum*が持つPHA合成酵素(protein ID: AAD53179.1)に最も類似していた。しかしながらその相同性は43-49%にとどまった。Sub-branch Y2はクローンのみから構成されるクラスターであり、これまでに報告されていない*phaC*である可能性が示された。

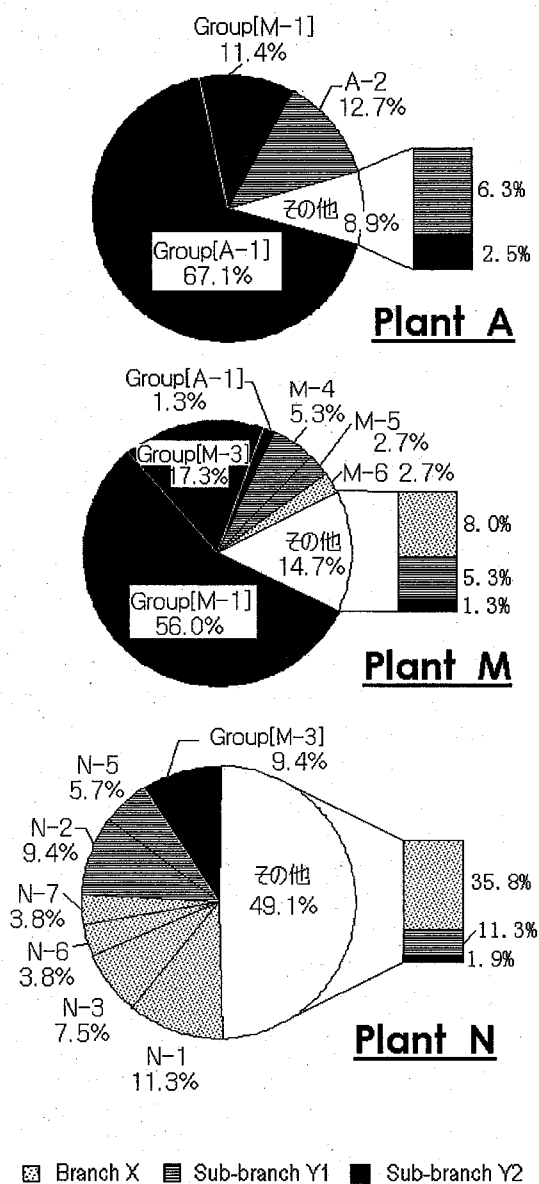


図2 実下水処理場活性汚泥から得た
phageクローンライブラリー

4. 結論

今回検討したC1226f-CP γ プライマーセットでPCRを行ったところ、実下水処理場から得た活性汚泥サンプルについても期待される長さの目的PCR産物が検出することが出来た。また、得られたPCR産物をクローニングによ

り解析したところ、PHA合成酵素のモチーフ構造が保存されていること、既知のphageが検出されたことから、目的とする領域を増幅していることが確認された。

3つの実下水処理場試料から得たクローンは、そのアミノ酸配列から、既知のPHA合成酵素に43-100%の相同性を持つことがわかった。また、3つの試料を通して共通するクローンはなかった。嫌気無酸素法、嫌気好気法で処理をしているAやMではSub-branch Y2のクローンが約8割と多く存在していたが、標準活性汚泥法であるNでは約1割程度しか存在していなかった。このようにそれぞれの処理場ごとで特徴的なクローンライブラリーが得られた。今回用いたプライマーは活性汚泥に存在するphage全体の一部であると考えられるが、一部を捉えているとしても、各処理場間で差異が示されたことは非常に興味深い結果であり、また、様々なphageが存在することを示すことが出来た。

以上のことからそれぞれの系を構成するphage遺伝子群集の構造をクローニング法により捉えることができ、系によってその特徴が異なっていることが明らかとなった。しかしながら、今回の結果は3つの処理場のみの比較であるため、今後いろいろな系に適用し、phage遺伝子のデータベースを充実されることにより、処理場ごとによる傾向を見ることが出来ると期待される。その結果、どのような条件でどのようなphageが出現するのか把握すること出来るようになるだろう。

謝辞:

本研究を行うにあたり、試料を提供していただきました各下水道処理場の方々に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Wentzel M.C., Lotter L.H., Ekama G.A., Leeuwenthaland R.E., and Maais G.R.: Evaluation of biochemical models for biological excess phosphorus removal, *Water Science Technology*, Vol. 23, No.4-6, pp. 567-576, 1991.
- 2) Mino T., van Loosdrecht M.C.M. and Haijnen J.J.: Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process, *Water Research*, Vol. 32, No. 11, pp. 3193-3207, 1998.
- 3) Mino T., Satoh H. and Matsuo T.: Metabolisms of Different Bacterial Population in Enhanced Biological Phosphate Removal Processes. *Water Science Technology*, Vol. 29, No. 7, pp. 67-70, 1994.
- 4) van Loosdrecht M.C.M., Pot M.A. and Heijnen J.J.: Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses, *Water Science and Technology*, Vol 35 No 1 pp 41-47, 1997
- 5) Dionisi D., Majone M., Papa V., and Beccari, M.: Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding, *Biotechnology and Bioengineering*, 85, pp. 569-579, 2004
- 6) Gujer W., Henze M., Mino T. and van Loosdrecht M.C.M.: Activated sludge

- model No.3, *Water Science Technology*, Vol. 39, No.1, pp. 183-193, 1999.
- 7) Doi Y. 1990. *Microbial Polyesters*. New York: Wiley-VCH. 156 p.
 - 8) Wallen L.L., and Rohwedder W.K.: Poly-β-hydroxyalkanoate from Activated Sludge, *Environmental Science & Technology*, Vol. 8, pp. 576-579, 1974.
 - 9) Satoh H., Mino T., and Matsuo T.: Uptake of Organic Substrates and Accumulation of Polyhydroxyalkanoates Linked with Glycolysis of Intracellular Carbohydrates under Anaerobic Conditions in the Biological Excess Phosphate Removal Process, *Water Science Technology*, Vol. 26, No. 5-6, pp. 933-942, 1992.
 - 10) Satoh H., Mino T., and Matsuo T.: PHA production by activated sludge, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 25, pp. 105-109, 1999.
 - 11) Satoh H., and Mino T.: Production of PHAs from activated sludge. In: Doi Y, Steinbüchel A, editors. *Biopolymers* Vol. 3a. New York: Wiley VCH. pp. 337-352, 2001.
 - 12) Serafim L.S., Lemos P.C., Oliveira R., and Reis M.A.: Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions, *Biotechnology & Bioengineering*, Vol. 87, pp. 145-160, 2004.
 - 13) Dionisi D., Majone M., Papa V., and Beccari M.: Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding, *Biotechnology & Bioengineering*, Vol. 85, pp. 569-579, 2004.
 - 14) Rehm B.H.A. and Steinbüchel A.: Biochemical and genetic analysis of PHA syntases and other proteins required for PHA synthesis, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 25, pp. 3-19, 1999.
 - 15) Sheu D.S., Wang Y.L., and Lee C.Y.: Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR, *Microbiology*, Vol. 146, pp. 2019-2025, 2000.
 - 16) Vandamme P. and Coenye T.: Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, Vol. 54, No.6, pp. 2285-2289, 2004.
 - 17) Thompson J.D., Higgins D.G., and Gibson T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994.
 - 18) Page R.D. M.: TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers, *Computer Applications in the Biosciences*, Vol. 12, No.4, pp. 357-358, 1996.
 - 19) Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, pp. 3389-3402, 1997.
 - 20) Steinbüchel A. and Hein S.: Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Vol. 71, pp. 81-123, 2001.
 - 21) Rehm B.H.A.: Polyester synthases: natural catalysts for plastics, *Biochemical Journal*, Vol. 376, pp. 15-33, 2003.

(2006. 5. 26受付)

Analysis of polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) in activated sludge from full-scale waste water treatment plants by cloning method

Atsuko MICHINAKA¹, Motoharu ONUKI², Hiroyasu SATOH² and Takashi MINO³

¹Course of Socio-Cultural and Socio-Physical Environmental Studies, Graduate School of Frontier Science, The University of Tokyo

²Integrated Research System for Sustainability Science (IR3S), The University of Tokyo

The phylogenetic diversity of PHA synthase genes (*phaC*) in activated sludge from three different full-scale wastewater treatment plants was investigated. The PHA synthase genes in activated sludge from three municipal wastewater treatment plants were analyzed by PCR with a C1226f-CP_r primer set followed by cloning and DNA sequencing. The clone library from Plant A had a simpler profile, and one of the clones occupied about 50% of the total clones. On the other hand, the clone library from plant N showed higher diversity. When the DNA sequences were translated into amino acid sequences, the similarities of the clones to known PHA synthase were found to be higher than 43%, indicating that the obtained sequences are most probably PHA synthases. The overlaps of the clones from each plant were small, and on the constructed phylogenetic tree, clones from each wastewater treatment plant had a tendency to form their own clusters. Some of the clones were found to have similarities to the known *phaC* genes to the extent of more than 90%. Some of the clones formed distinct clusters with similarities to the known *phaC* genes at around 43-49%, indicating the existence of *phaC* genes not reported from pure cultures.