

## B-55 MALDI/TOFMS 法による微生物群集 構造変化の迅速検出の可能性

○佐藤弘泰・味埜俊

東京大学大学院新領域創成科学研究科 (〒277-8563 千葉県柏市柏の葉 5-1-5)

\* E-mail: hiroyasu@k.u-tokyo.ac.jp

### 1 はじめに

分子生物学的手法が発展してきたことにより、活性汚泥中の微生物群集構造を解析する技術は長足の進歩を遂げた。しかし、試料からの DNA 抽出に始まり PCR 反応、精製、T-RFLP 法や DGGE 法による分離、といった一連の分析には相当な時間と労力を要する。

一方、佐藤らは活性汚泥抽出液中の成分が群集構造に大きな影響を及ぼしうる事<sup>1)</sup>を報告している。そうした成分を特定していくためには、群集構造の変化をさらに迅速に検出することのできる技術が必要である。

一方、マトリックス支援イオン化・飛行時間型質量分析法 (MALDI/TOFMS 法) は、微生物からの粗抽出液や、コロニーそのものを試料として分析にかけることができる。同手法を用いて、リボソーマルタンパク質の質量スペクトルを調べ、迅速に細菌種を同定する技術が開発されている。

そこで、MALDI/TOFMS 法を活性汚泥微生物群集構造の変化を検出するために適用できないかと考えた。リボソーマルタンパク質を標的とする手法<sup>2)</sup>を含めいく通りかの方法を試みたが、検出されるピークの数が少なく、また、操作がやや煩雑であった。試みた中では、エタノール抽出液を 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) をマトリックスとして  $m/z$  600~1000 の領域を解析する事で、良好な結果を得ることができた。その結果をここに報告する。

### 2 方法

用いた活性汚泥は、2010 年 1 月 15 日に実下水処理場から汚泥を採取し、同日、人工下水を基質として運転を開始した SBR 式の実験室活性汚泥である。リアクター容量は 10L であり、汚泥滞留時間は 9 日~10 日、運転サイクルは 4 時間で、基質の流入と嫌気反応が計 1 時間、好気反応 2 時間、沈殿・放流工程 1 時間であった。また、水理学的滞留時間は 8 時間である。流入人工下水の組成は酢酸ナトリウム 181mg/L、ペプトン 80mg/L、酵母エキス 16mg/L、塩化カリウム 17.6mg/L、塩化カルシウム 8.0mg/L、硫酸アンモニウム 34.6mg/L、硫酸マグネシウム 43mg/L、リン酸水素二カリウム 28.8mg/L であり、有機態炭素濃度は 101mgC/L、リンは 6.6mgP/L である。この活性汚泥リアクターから 1~3 日ごとに好

気条件の終わりで活性汚泥混合液を採取し、分析まで、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、同じ日に、嫌気末、好気末の溶存有機態炭素、リン酸態リン、および好気末での MLSS、MLVSS を測定した。

試料を室温にて解凍し、0.5mL を採取して遠心分離し、上清を除去した。そしてエタノール 0.5mL を加えてよく混合し、遠心分離してエタノール抽出液を回収した。DHB マトリックスは、DHB (MALDI-MS 用、Fluka) を超純水・アセトニトリル・トリフルオロ酢酸 (体積混合比 50:50:1) に 10mg/mL の濃度で溶解したものをを用いた。エタノール抽出液 10  $\mu\text{L}$  と DHB マトリックス 10  $\mu\text{L}$  を混合し、その 0.5  $\mu\text{L}$  を MALDI プレートに滴下し、乾燥させ、ABSciex 4800 MALDI/TOFMS により分析した。各試料について 2 つずつスポットした。分析は、リフレクトロンモードによりポジティブモードで行い、また、 $m/z$  575~1,000 の間で各スポットにつき 2,000 回の積算によりスペクトルを採取した。

得られたデータは MarkerView V1.2 (ABSciex) を用いての多変量解析に供した。その際、ピーク強度をその試料について得られたピーク強度の総和に対する相対値に変換し、さらに、対数変換してから主成分分析を行った。

また、分子生物学的な手法による群集構造解析と比較するために、各試料について 530f(5'-FAM)907r プライマーセット<sup>3)</sup>と *AhlI* 制限酵素を用いて PCR/T-RFLP<sup>4)</sup> 解析および RT (逆転写)-PCR/T-RFLP 解析を行った。いずれの場合も超音波破砕希釈法<sup>5)</sup>によって鋳型試料を作成した。また、PCR 反応では ExTaq HotStart Version (Takara) を、また、RT-PCR 反応では PrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Takara) を用いた。

### 3 実験結果と考察

#### 3.1 リアクターの運転状況

リアクターの運転状況を図 1 に示す。運転開始後 40 日ごろまでは徐々に汚泥濃度が増加していった。その後、沈降性が悪化し、徐々に汚泥濃度は減少に転じた。上清中のリン酸の分析は、40 日目ごろまでは分析されていない日があるが、分析機器の故障のためである。MLVSS/MLSS の値から判断して、リン除去は必ずしも良好でなかった可能性も考えられるが、嫌気でのリンの吐

き出しは60日目ごろまでは十分に起きていた。50日目以降、MLSSは急速に低下し、それともなって嫌気でのリン酸の吐き出し・好気での取込みは不活発になった。嫌気末端のDOCも増加したが、流入水のDOCは100mgC/L程度であり、それに比べるとよく摂取されていた。

### 3.2 MALDI/TOFMS 法による分析

運転期間67日から、28回試料を採取した。それらを分析するために要した時間は3時間ほどであった。

運転開始後4日目と48日目の試料から得られた質量スペクトルの全体を図2に示す。ピークが非常に多く、肉眼ではそれぞれの特徴を把握しにくい。例えば、4日目のスペクトルにあるm/z 628.6のピークと48日目のスペクトルにあるm/z 629.8は目視では同じピークと捉えやすいが、しかし、質量数が1.2ダルトン異なっており、明らかに異なるピークである。肉眼で比較するよりも、質量数に基づくピークの同定の確度が高いので、スペクトルデータを直接統計解析にかけた方が楽である。

質量スペクトルをMarkerViewを用いて主成分分析にかけた結果を図3に示す。プロットは運転に伴って徐々に第四象限から第一象限、第二象限、第三象限と移動していった。すなわち、運転の経過に伴って、第1主成分のスコアは次第に減少した。また、第2主成分のスコアは運転開始から半ばまで増加し、40日目以降減少した。特に、汚泥のMLSS濃度が顕著に減少しはじめた55日目以降、第2主成分のスコアが急速に落ちたことがわかるが、その前触れは50日目ごろから出ていたようにも見える。

また、各日について、2スポットずつ作成し分析した。二つのスポットが近接している日もあったが、なかにはやや離れている日もあった。MALDI/TOFMSのスペクトルはやや再現性に乏しいところがあり、複数のスポットを見るようにした方がよい。また、スポット数を増やしても分析にかかる時間はほとんど変わらない。

なお、今回検出されたピークがどのような成分を含むのかは、現時点では不明である。試料の調製過程から考えて、脂質系のものである事は確かである。主成分への寄与が大きいこれらピークについてMS/MS分析を試みたが、未だ同定にはいたっていない。

群集構造の変化を確認するために、PCR/T-RFLP法およびRT-PCR/T-RFLP法を行った。いずれも、分析完了まで2日程度かかる上に、フラグメントサイズは1bp程度ずれることがあるため、群集構造の変化を数値的に解析するためには手作業での補正が必要であった。また、今回対象としたとしたのはrRNAのV4~V5領域であるが、一般に制限酵素による切断部位が限られており、良好なプロファイルを得にくい。AhaIはその中では比較的多様なフラグメントを与えるが、切断されない細菌も多い。

すなわち、当初からT-RFLPによる解析は分解能が低いことが予想されていた。

PCR/T-RFLP法、RT-PCR/T-RFLP法のいずれにおいても、50日目以降343bpのピークが顕著に増加した。この点においてはMALDI/TOFMS法と一致した結果であった。しかし、培養開始期の群集構造の変化はいずれのT-RFLP法の結果でも明らかではなかった。しかし、実処理場汚泥を植種して人工下水で運転を行ったのであるから、運転開始期に群集構造は変化していたはずである。MALDI/TOFMS法の方が今回の実験では群集構造の変化をより鋭敏に反映していたものと考えられる。

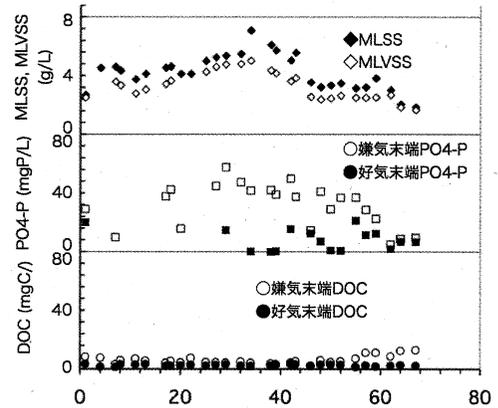


図1 実験室活性汚泥リアクターの運転経過

### 4. 今後の展開

活性汚泥中の群集構造の変化を迅速に捉える技術を開発した。細菌群集構造に影響を与える成分を探索するための基盤技術の一つとして大きな期待を寄せている。また、さらにその先には、細菌群集構造の制御に結びつけたい。

**謝辞:**本研究は科学研究費補助金基盤研究(A)(22246069)による補助を受けた。また、活性汚泥リアクターの運転管理・モニタリングをしてくれた学生諸君に謝意を表す。

### 参考文献:

- 1) 佐藤弘泰、小川旦、味埜俊(2009) 環境工学研究論文集. 46, 503-510.
- 2) Sauer, S., Reinhardt, R., Lehrach, H., Gut, I.G. (2006) Nature Protocols, 1, 1761-1771.
- 3) Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: John Wiley & Sons, 115-175
- 4) Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. and Fomey, L. J. (1997) Appl Environ Microbiol 63:4516-4522.
- 5) 佐藤弘泰、小貫元治、味埜俊 (2008) 環境工学研究論文集. 45, 225-232.

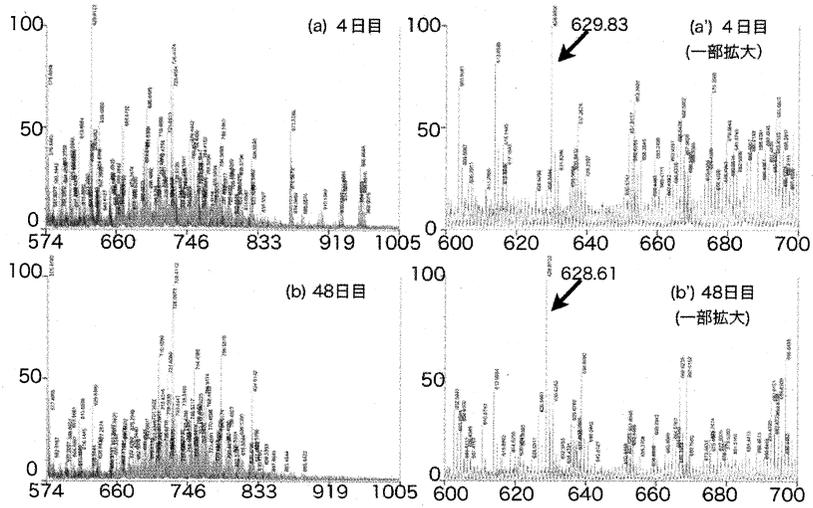


図2 4日目および48日目の試料のMALDI/TOFMS スペクトル

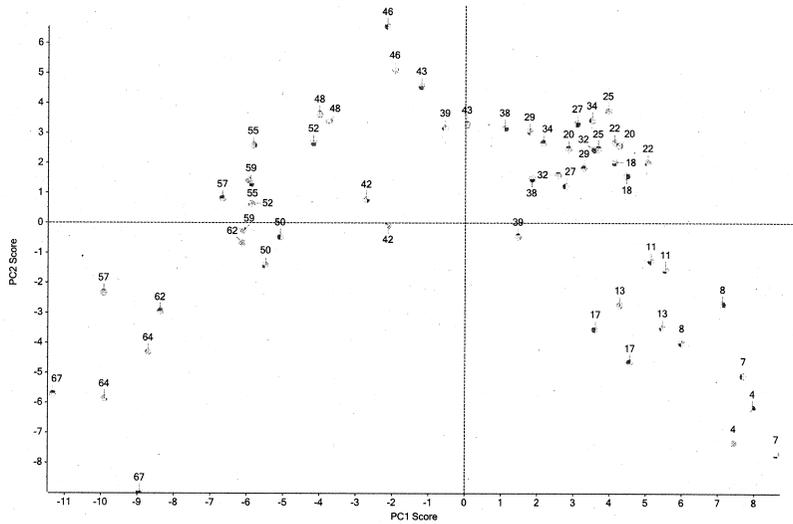


図3 主成分分析によるスペクトルの変化過程の可視化

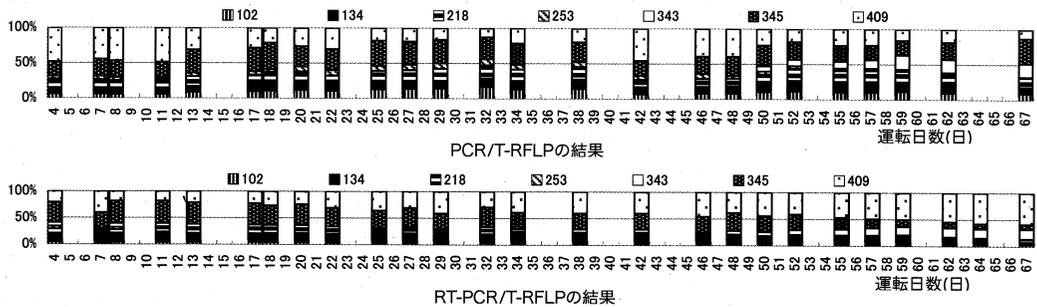


図4 PCR/T-RFLP 法および RT-PCR/T-RFLP 法による細菌群集構造の解析結果