

(16) DNAプローブ法による硝化細菌の生態調査方法に関する研究

DEVELOPMENT OF METHOD FOR ECOLOGICAL STUDY ON NITRIFYING
BACTERIA USING DNA PROBE

遠藤 銀朗*, 及川 栄作*, 長谷川 信夫*
Ginro ENDO* Eisaku OIKAWA* Nobuo Hasegawa*

ABSTRACT; Nitrifying bacteria play important roles of nitrogen cycle in the natural ecosystem. In this study, nitrifying bacteria was detected by using methods in Genetic Engineering. Conventional methods for analysis of microbial ecology are not effective to specific microorganisms which grow very slowly and are difficult to be isolated. In this study, detection method for the specific gene using DNA probe was adopted to investigate the population and existing manners of nitrifying bacteria, and fundamental methodology for in situ analysis for the bacteria was applied. *Arthrobacter globiformis* (IFO 3062) was used as a model bacterium to detect the nitrifier in a bacterial mixed culture. This bacteria oxidize ammonium to nitrate, and can utilize organic compounds as carbon sources so that it's growth rate is not slow. In the first phase of this study, the nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA of *A. globiformis* was determined to search species or genus specific sequence regions, and species specific DNA oligomer which can specifically hybridize to the 16SrRNA of *A. globiformis* was chemically synthesized. This DNA oligomer was labeled with a fluorescent reagent by Aminolink method and used as a DNA probe for in situ hybridization. Fixed bacterial cells on a slide glass were treated with the DNA probe and observed under an epifluorescent microscope. The fluorescent signal intensity was evaluated under the microbial ecosystems mixed with *Escherichia coli* and activated sludge.

KEY WORDS; nitrifying bacteria, DNA probe, 16S ribosomal RNA, in situ hybridization, ecological analysis.

1. はじめに

水環境の代表的な汚染形態の一つである富栄養化の進行は、水中の可給態窒素の濃度によって大きく影響される。この可給態窒素の主要な成分としてアンモニア性窒素および硝酸性窒素（および亜硝酸性窒素）を挙げることができる。生物の窒素固定作用によって有機物化された空気中の窒素（ N_2 分子）は生態系の細菌を中心とする分解者の代謝によって無機態のアンモニアに変換されたのち、硝酸（または亜硝酸）を経て分子状窒素に至る循環系をたどる。この窒素循環系において、循環の律速過程はアンモニアの硝酸化と考えられており、この過程を担う硝化細菌の生態を詳細に知ることは、水環境の富栄養化を防止するうえで欠くこ

とができない。

硝化細菌は、一般に増殖速度が遅くかつ生理的特徴を調べるために純粋分離して培養することがきわめて困難な微生物の一つである。したがって、生育している場(in situ)で硝化細菌のポピュレーションを調べることは、これまでの方法では難しく實際上不可能に近い。しかし、近年進展の著しい遺伝子工学的実験手法の一つであるDNAプローブを用いる核酸検出法を採用することによって、環境中の単離できない微生物でも検出し定量しうる可能性がある。

本研究では、原核生物の共通細胞成分でかつ生物の種または属によって固有の部分が存在する16SリボソームRNA(rRNA)を、DNAプローブによって特異的に検出することを利用して硝化細菌の存在をin situで調べるための方法論の基礎を確立した。

2. in situ ハイブリダイゼーションのための特異的DNAプローブの開発

rRNAは細胞内のコピー数が数百から数万と多く、DNAプローブとハイブリダイズすることによって検出のための十分なシグナル強度を得ることが可能と考えられる。特定の微生物細胞のrRNAに特異的にハイブリダイズするDNAプローブを作成するためには、rRNAの塩基配列(全塩基数約1500b)をできるだけ完全な形で決定することが必要とされる。また、これまで報告されデータベース化されている各微生物のrRNAの配列と比較して、生物種または属に特異的な塩基配列部分を見つけだし、それに相補する適切な長さのDNAを、高感度な標識剤によってラベルしたDNAプローブを作成することが必要とされる。硝化細菌について、このためのDNAプローブを作成した過程について示すと、以下の通りである。

2. 1 硝化細菌およびRNA・DNAの回収と塩基配列の決定

アンモニアを硝酸に変換するとともにペプトンを利用して他栄養的にも増殖しうる細菌 *Arthrobacter globiformis*¹⁾ IF0 3062株を(財)発酵研究所より譲渡いただいた。この細菌をペプトン1%, 酵母エキス0.2%, 硫酸マグネシウム0.1%, 塩化アンモニウム0.05%を含む液体培地を用いて一夜培養したのち、凍結融解法を取り入れた溶菌と、フェノール法による除蛋白を行い、さらにエタノール沈殿を行なって全RNAおよびDNAを回収した。

16S rRNAの塩基配列の決定には、逆転写酵素を用いた直接ジデオキシシーケンス法と、16S rRNAをコードする染色体中のrDNAをポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法によって増幅し、pUC119ベクタープラスミド用いてクローニングを行なったのちに、ジデオキシ法によって求めるふたつの方法を試みた。真性細菌の16S rRNAの一般的な構造を図-1に示した²⁾。逆転写酵素によってrRNAの塩基配列を決定するためには、いくつかのプライマーDNAが必要とされる。図-1のrRNAの構造

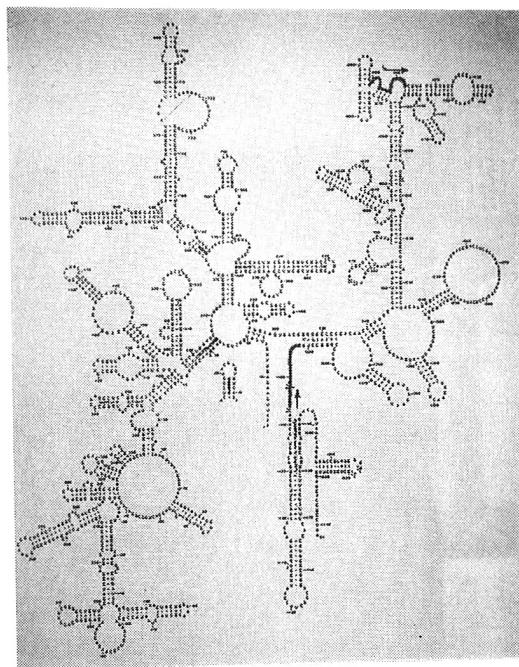


図-1 真性細菌(大腸菌)の16S rRNAの全塩基配列と構造

中に太線で示した部分が今回のRNA塩基配列の決定に用いた二つのユニバーサルプライマーDNA（真性細菌に共通の塩基配列部分に相補的に結合するDNA）の結合部位である。ここでは1400Rと1100Fと呼ばれる二つのプライマーを用いたが、それらの塩基配列を表-1に示した。

表-1 本研究で用いた16SrRNA塩基配列決定用のユニバーサルプライマー

大腸菌における塩基部位		塩基配列	塩基数	適用生物
1100F	1100-1115	5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'	16mer	真性細菌
1400R	1392-1406	5'-ACGGGCGGTGTGT(GA)C-3'	15mer	全生物

逆転写酵素による直接的な塩基配列決定実験の結果得られた *A. globiformis* の16SrRNAの部分塩基配列を図-2に示した。この結果から知られるように、逆転写酵素による直接ジデオキシ法ではRNAの二次構造上ヘリックス部分でDNAの伸長が停止してしまい、塩基配列の読取りが不可能な箇所が多く出現した。このため、上記二つのプライマーを用いて、16SrRNAをコードするrDNAをポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法で増幅してベクタープラスミドpUC119に入れてクローニングしたのちに、抽出し回収したDNAを同じくジデオキシ法によって塩基配列を決定した。この結果を図-3に示したが、大腸菌の相当塩基番号で1009~1406の間の完全な *A. globiformis* の16SrRNAの部分塩基配列を決定できた。図-3中の塩基配列で下段に示したものは、大腸菌の16SrDNAの同一部分の塩基配列で、□で囲んだ部分はヌクレオチド種が一致しない箇所であり、*A. globiformis* に特異的な部分である可能性が高い。

1234
CUACAA
1240 1260
UG?????UAC AAUGGG???? ????GA GGUGGAGC??
1280 1300
AUC??UAAAA GCC?????C? G?UCGGAUUG G???CUGC??
1320 1340
C????CC??? UGAAGUCGGA GUCGCUAGUA AUCGCGCAGA
1360
?UCAUGC
図-2 逆転写酵素によるジデオキシ法によって決定した*A. globiformis* 16SrRNAの塩基配列

2. 2 *A. globiformis* に特異的な16SrRNAを標的とするDNAプローブの作成と in situハイブリダイゼーション

図-3に示した大腸菌と一致しない塩基配列部分のうち塩基番号が1245~1263（大腸菌の16SrRNA上での番号）の19merのオリゴヌクレオチドDNAを化学的に合成し、この5'末端にアミノリンク法³⁾によって蛍光色素であるフルオレセインイソチオシアネートを結合して、蛍光ラベルDNAプローブを作成した。

このDNAプローブを、in situ ハイブリダイゼーションの手法によって微生物細胞内に取り込まれ、細胞内の16SrRNAにRNA-DNAハイブリダイゼーションによって結合させる。結合しなかった余分なDNAプローブなどをリンスすることによって洗浄し、落射蛍光顕微鏡下で蛍光信号を観察した。

3. 蛍光ラベルオリゴDNAプローブを用いた in situハイブリダイゼーションによる硝化細菌 *A. globiformis* の識別検出

上記DNAプローブを用いて、大腸菌 (*E. coli* HB101)を対照として硝化細菌 *A. globiformis*を in situ

```

1100
0  GCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCATGTTGCCAGCACCTACGCTGGGACTCATGGGAGAC
*****
1099 GCAACGAGCGCAACCCCTTATTCATGTTGCCAGCGGTCGGCCGGCACTCAAGGAGAC

1200
61  TGGCCGCGTCAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCCTTATGTC
*****
1159 TGGCCGCGTCAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCCTTATGTC
*****
1250
121  TGGGCTTCACCTATGCTACAATGGCGGTACAAATGGGTGCGAFACTGTGAGGTGGAGCT
*****
1219 AGGGCTACACAGCTGCTACAATGGCGCATACAAGAGAGCGGACCTCGGAGAGCAAGGG
*****
1300
181  AATCCCTAAAAGCCGCTCTCACTTCGGATTGGCTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGG
*****
1279 GACCTCATAAAGTCGCTCTAGTTCGGATTGGCTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGG
*****
1350
241  AATCGCTAGTAATCGTATGATCAGAAATCCGCGGTGAATACGT TCCCGGGCCTTGATAC
*****
1339 AATCGCTAGTAATCGTATGATCAGAAATCCGCGGTGAATACGT TCCCGGGCCTTGATAC
*****
1400
301  ACCGCCCCGT
*****
1398  ACCGCCCCGT

```

図-3 rDNAのPCRクローニング法—ジデオキシ法によって決定した
A.globiformis 16SrRNAの塩基配列

ハイブリダイゼーションによって検出した結果は、対数増殖相にある大腸菌では蛍光顕微鏡観察による蛍光シグナルが見られなかったのに対して、A. globiformis の対数増殖相にある細胞を同様に処理した場合では、図-4に示したように蛍光シグナルが明瞭に観察された。このことは、得られたDNAプローブを用いて少なくとも大腸菌とは識別してA. globiformis の特異的な検出が可能であることを示している。この対数増殖相にあるA. globiformisを下水処理場の活性汚泥と菌体量として約等量混合して再フロック化さ

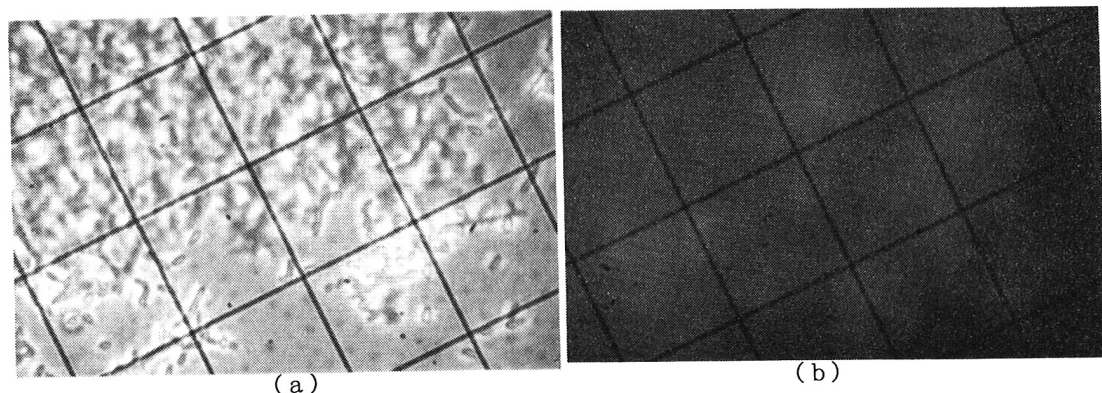


図-4 大腸菌と混合した対数増殖相のA. globiformisのin situハイブリダイゼーション—蛍光顕微鏡観察による蛍光シグナル (a)位相差像 (b)落射蛍光像

せ、同様に前述のA. globiformisのrRNAに特異的なDNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行なった結果を図-5に示した。この結果より、対数増殖相にあるA. globiformisは活性汚泥中에서도検出できることが知られたが、大腸菌の場合とは異なり、バクグランドの蛍光信号（活性汚泥のみをこのDNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーションした場合に観察される蛍光信号）が高いことが知られた。このことは、活性汚泥中の微生物のRNAに非特異的にハイブリダイズしたDNAプローブがあったか、あるいは活性汚泥フロック形成物質と容易に結合しリンスできないDNAプローブがあ

たことを示唆している。

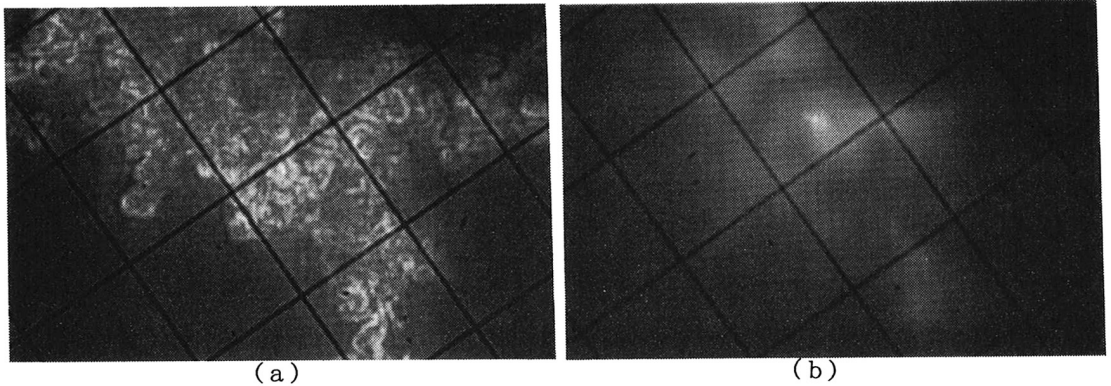


図-5 活性汚泥と混合した対数増殖相の *A. globiformis* の in situ ハイブリダイゼーション-蛍光顕微鏡観察による蛍光シグナル (a)位相差像 (b)落射蛍光像

一方、*A. globiformis* を前述の培地で回分的に 10 日間培養し死滅期に入った菌体を用いて上記 DNA プローブによる in situ ハイブリダイゼーションを行なった場合には、図-6 に示したように、バックグラウンドからの識別は困難で、この方法による目的微生物の検出はできなかった。

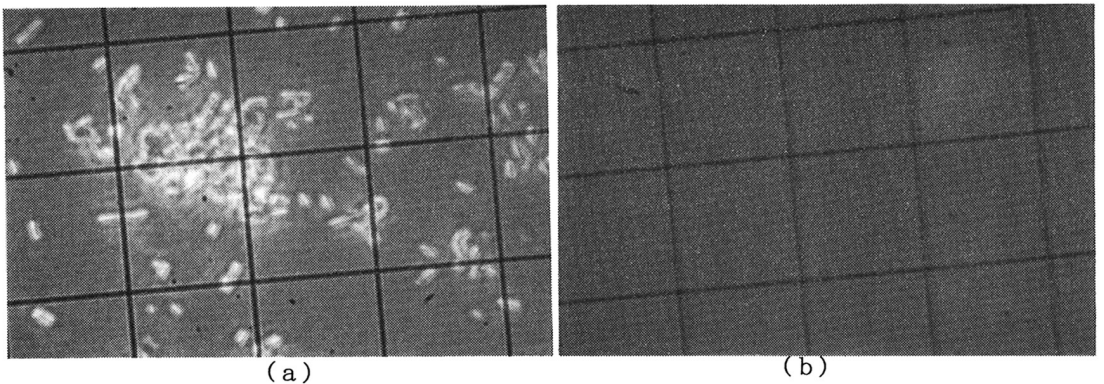


図-6 死滅期にある *A. globiformis* の in situ ハイブリダイゼーション-蛍光顕微鏡観察による蛍光シグナル (a)位相差像 (b)落射蛍光像

4. おわりに

本研究では、培養が困難で生理的特性や能力を解明することが困難であるにも拘らず、環境システムの構成上重要な役割を担っている微生物の、環境生態系での存在状態を把握するために、主として基礎生物学や医学生物学の分野で利用されている DNA プローブによる in situ ハイブリダイゼーション法を適用することを試みた。検出目的微生物として、地球規模の窒素循環でアンモニアを硝酸に変換する硝化細菌を取り上げたが、実験を容易にするためにそれらのうちでも他栄養的にも増殖できる *A. globiformis* IF0 3062 を用いて、前記方法の適用性を調べた。16S rRNA は、通常の細菌細胞中では比較的にコピー数が多くかつ種特異的な塩基配列をみつけることの可能な生体内高分子である。したがって、これにハイブリダイズする特

異的なDNAをプローブとして用いることによって、環境サンプル中の特定の微生物を存在状態を乱すことなく検出定量することが原理的に可能と考えられる。

16S rRNAを標的とするDNAプローブを開発するためには、まず検出目的とする微生物の16S rRNAの塩基配列を決定するかデータベースにある場合にはそれを調べたうえで、微生物種または属レベルで特異的な塩基配列部分を見いだす必要がある。本研究では、一つの硝化細菌についてこれを目的とする蛍光色素でラベルしたDNAプローブを作成し、検出目的細菌細胞での *in situ*ハイブリダイゼーションを行った。大腸菌や活性汚泥と目的硝化細菌を混合して、実際の生態系を模擬した場合での *in situ*検出をおこなって、この種の微生物の環境における生態の解明が可能であるかどうかについて、基礎的な実験を行った。結果から、この方法は原理的には利用可能であることが示されたが、一方ではいくつかの改良されなければならない点も明らかとなった。それらの一つは、rRNAの細胞内含量が少ない飢餓状態にある細菌細胞では、DNAプローブによるハイブリダイゼーションから得られる蛍光信号強度は低く、バックグラウンドからの識別が困難となることである。また、活性汚泥のようなヘテロな細菌叢の微生物集団に適用する場合には、非特異的なハイブリダイズを防止するための方法の開発が必要とされる。このような問題点の解決のためには、より高感度なプローブの作成方法の開発、より確実な *in situ*ハイブリダイゼーション法の開発およびより特異的な塩基配列の検索のための16S rRNAの塩基配列データベースの充実などを次の研究課題として挙げるができる。

これまで、ブラックボックスとして扱われてきた環境システム内における物質循環に係わる微生物の生態を、その内部において理解し、環境の質的評価における根拠のあるパラメータとして組み入れることが重要と考えられる。遺伝子生態学的方法論は、ここに報告した研究に留まることなく環境の解析にとって大いに役立つものと考えられる。

参考文献

- 1) Verstraete W. and Alexander M.; *Journal Bacteriol.*, Vol.110, No.3, 955-961, 1972
- 2) Watson J.D. et al.; "Molecular Biology of the Gene - 4th Ed.", The Benjamin/Cummings Publishing Co., 1987
- 3) Delong E.F. et al.; *Science*, Vol.243, 1360-1363, 1989
- 4) Amann R. et al.; *Nature*, Vol.351, 161-164, 1991