

II-475

硝化細菌の16S-rRNAの塩基配列の決定と*in situ* ハイブリダイゼーションによる硝化細菌細胞の検出

東北学院大学大学院 学生員 ○ 及川 栄作

同 工学部 正会員 遠藤 銀朗

同 工学部 正会員 石橋 良信

1. 研究目的

水系の富栄養化の原因物質の1つである窒素の除去に関与している硝化細菌の生態を調査し富栄養化現象やその回復のメカニズムを解明することは、従来の方法では、この細菌が独立栄養細菌で増殖が極めて遅いなどの理由によって困難とされてきた。本研究では、このような硝化細菌の生態を明らかにするために種特異的なDNAプローブの開発を行い、このプローブを使用した*in situ* ハイブリダイゼーション法によって排水処理プロセスや湖沼その他に存在する硝化細菌を培養することなく菌数の計数をし同定する方法を確立し、この微生物の能力を技術的に活用することを目的とした。

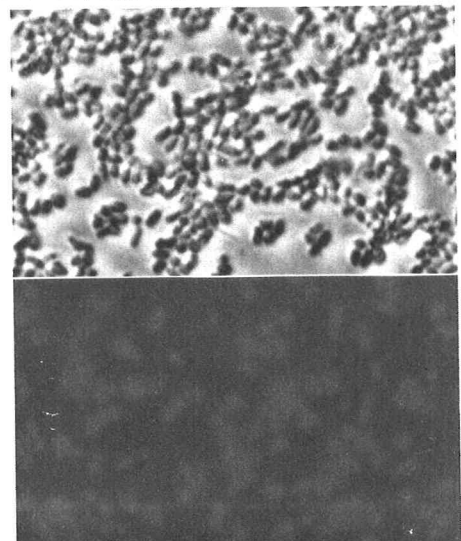
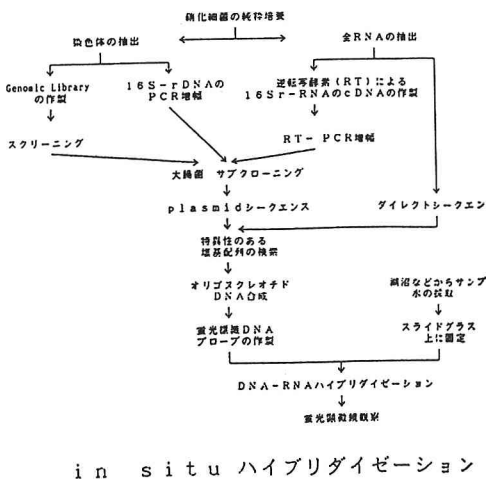
2. 研究方法

a) 試料とする硝化細菌を分離するために下水処理場より活性汚泥を採取しこれをモデル浄化槽に移し4カ月アンモニアを含む基質で集積培養した。そこから1ml取り出し9ml入りの無機液体培地に入れL型試験管で25℃で2~3週間培養した。その内の1mlを取り新しい無機培地に植え継ぎさらに1~2回希釈継代培養を繰り返し従属栄養細菌を除いていった。培地に従属栄養細菌が残存しているかはNutrient broth (Difco) に一部を取り培養して確認した。濁りがありpHの低下が認められた培養液をコロイダルシリカ(スノーテックス、日産化学工業)で固化した平板培地に塗抹した。平板は、乾燥しないようにパラフィルムを巻き数箇所穴をあけて25℃で約1カ月インキュベートした。目で確認できる単一のコロニーを液体培養し培養液の一部をイオンクロマトグラフによって亜硝酸産生の有無を確認した。 b) 分離した独立栄養の硝化細菌と従属栄養の硝化細菌 *Arthrobacter globiformis* IF03062株の染色体にコードされている16S-rDNAを全生物にユニバーサルなプライマー、真正細菌にユニバーサルなプライマーなどを用いて遺伝子増幅法PCR反応に供して増幅した。一方、独立栄養の亜硝酸酸化細菌 *Nitrobacter agilis* IF014297株とアンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* IF014298株を大阪発酵研究所より送付されて来た状態から熱して溶菌させた後に5Mチオチアン酸グアニジン溶液によく混合してフェノール:クロロホルム抽出、エタノール沈澱して全RNAを調整した。全量を逆転写酵素を用いてcDNAを作製しその1/10量2μlをユニバーサルプライマーを使用してPCR反応25サイクル増幅(RT-PCR)した。PCR産物をplasmid T-vectorを用いてligationさせ大腸菌に形質転換しX-galを使用したカラーセクション法により形質転換体からwhite colonyを選択した。アルカリ法によりplasmidを調整しインサートの確認後塩化セシウム密度勾配超遠心して精製した。α-³⁵S dCTPで標識してDideoxyシーケン法により塩基配列の決定をした。 c) 得られた *A. globiformis* の16S-rRNAの部分塩基配列とすでにデータベースに登録されている

他の真生細菌と比較しこの菌に特異生のある部位を2カ所見つけ出しプローブA1, A2と名づけた。ともに5'末端にアミノリンクを結合した19merのオリゴヌクレオチドをDNA合成機(abi)を用いて合成した。d) 作製したDNAプローブA1の種特異性を *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia carotovora* からの全RNAをチオシアン酸グアニジン法により調整し3'末端にジボキシゲニン-11-dUTP標識したプローブを用いてスロットブロットハイブリダイゼーションにより確認した。e) 重炭酸ナトリウム緩衝液存在下で赤色の蛍光色素X-ローダミンイソチオシアネートを暗所、室温、一晚反応し色素を付加し蛍光プローブを作製した。ゲルろ過カラムを通して付加されなかった色素を除き20%ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し付加しなかったオリゴヌクレオチドを除いて精製した。f) A1プローブを用いて個々の *A. globiformis* 細胞を検出することが可能であるかを調べるために、あらかじめ対数増殖期の細胞をスライドガラス上にホルムアルデヒドで固定し *in situ* ハイブリダイゼーションを行ない蛍光顕微鏡で観察した。

3. 実験結果

- 塩基配列の比較により分離した菌と *N. europaea* からの16S-rRNAの塩基配列は、高い相同性を示し、分離した菌がアンモニア酸化細菌であり系統発生的に属・種レベルで等しい可能性が示された。
- スロットブロットハイブリダイゼーションによって種特異性が明らかとなった5'末端に蛍光標識したDNAプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、蛍光顕微鏡観察下で1細胞ごとの *Arthrobacter* を検出可能であった。
- 16S-rRNAをターゲットとしたPCR、RT-PCR、サブクロニング法と *in situ* ハイブリダイゼーション法を組み合わせた特定のバクテリア細胞検出法は、培養困難な硝化細菌などの検出と生態調査に利用できる可能性が高い。
- 本研究で得られた成果は、遺伝子工学的的方法による環境浄化微生物の生態解析の基礎として役立てることができると考えられる。



蛍光顕微鏡観察