

嫌気共生プロピオン酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の 各ヒドロゲナーゼ発現

長岡技術科学大学 学生会員 ○中村明靖

正会員 井町寛之、大橋晶良、原田秀樹

1.はじめに

高速廃水処理技術である高温 UASB プロセスは廃水処理過程においてプロピオン酸の蓄積が生じ、良好な廃水処理が望めなくなるといった問題がしばしば発生する。1985年に Wiegant らが報告してからすでに18年が経過しているにもかかわらずこの問題の良好な回避方法は未だ不明である。この問題解決の糸口は、高温嫌気条件下でプロピオン酸の分解に寄与している未だ報告がなされていない微生物群にあると考えられる。このような切り口より高温嫌気条件下においてプロピオン酸の分解に寄与している微生物が Imachi らにより分離され新属新種として生理学的特徴が報告された。報告された微生物は単独でのプロピオン酸の分解が行えなかった。このことは、プロピオン酸分解反応の標準自由エネルギー変化(ΔG°)からも分かるように、強い吸エルゴン反応であるためである(Table 1-(1))。プロピオン酸の分解に伴い水素

Table 1 Standard Gibbs free-energy changes (ΔG°) at 55°C.

(1) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-(\text{aq}) + 3\text{H}_2\text{O}(\text{liq}) \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^-(\text{aq}) + \text{HCO}_3^-(\text{aq}) + \text{H}^+(\text{aq}) + 3\text{H}_2(\text{g})$	$\Delta G^\circ = +62.2 \text{ kJ/reaction}$
(2) $\text{HCO}_3^-(\text{aq}) + 4\text{H}_2(\text{g}) + \text{H}^+(\text{g}) \rightarrow \text{CH}_4(\text{g}) + 3\text{H}_2\text{O}(\text{liq})$	$\Delta G^\circ = -122.5 \text{ kJ/reaction}$
(3) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-(\text{aq}) + 3/4\text{H}_2\text{O}(\text{liq}) \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^-(\text{aq}) + 1/4\text{HCO}_3^-(\text{aq}) + 1/4\text{H}^+(\text{aq}) + 3/4\text{CH}_4(\text{g})$	$\Delta G^\circ = -60.2 \text{ kJ/reaction}$

が生成され、分解寄与微生物が水素分圧の上昇により生育が困難になるためプロピオン酸の分解が進行しないのである。つまり、水素を除去すればプロピオン酸の分解が進むのである(Table 1-(3))。よって、プロピオン酸分解細菌は、プロピオン酸の分解により生成された水素を利用する水素資化性の微生物と強固な共生系を構築しなければプロピオン酸の分解が行えない共生細菌である。このプロピオン酸分解時における共生関係は、水素が重要なファクターとなっており、水素伝達共生関係が成り立っているといえる。この水素伝達を担っているものがヒドロゲナーゼと呼ばれる酵素である。酵素は、DNA→mRNA→酵素の順番で生成され、酵素生成量は mRNA 発現量に比例していると言われている。そこで、この酵素を菌体内で合成するための設計図として発現している mRNA 遺伝子を調べることで嫌気性廃水処理汚泥内での水素伝達共生関係微生物の生態把握ができると考えられる。そこで、本研究はプロピオン酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の高温嫌気共生条件下においてヒドロゲナーゼをコードしている mRNA の遺伝子配列の決定及び遺伝子定量を試みた。

2.実験方法

2.1 プロピオン酸酸化細菌(*Pelotomaculum thermopropionicum* strain SI)のヒドロゲナーゼ遺伝子配列

高温プロピオン酸酸化細菌である *P.thermopropionicum* strain SI(DSM 13744)のヒドロゲナーゼ遺伝子配列は報告されていない。現在報告されている数々のヒドロゲナーゼ-アミノ酸配列を用い保存性の高い領域よりプライマーを作成し、SI株より抽出したゲノム DNA に対し PCR、クローニングを介し塩基配列の同定を試みた。DNA 抽出は SDS+ビーズビーターを用いた。

2.2 水素資化性メタン生成古細菌(*Methanothermobacter thermautotrophicus* strain ΔH)のヒドロゲナーゼ遺伝子配列

M.thermautotrophicus strain ΔH(DSM 1053)は全塩基配列が決定されている。本研究でターゲットとするヒドロゲナーゼは mv-ヒドロゲナーゼ(mvhDGAB)とした。

2.3 ヒドロゲナーゼ-mRNA 発現の調査

キーワード：共生細菌、水素伝達共生関係、ヒドロゲナーゼ、mRNA、RT-PCR、Real-Time PCR

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 環境システム工学

Tel.0258-47-1611 (ext.6646) Fax.0258-47-9630 E-mail: akinobu@stn.nagaokaut.ac.jp

mRNA 発現の調査には RT-PCR (Reverse Transcription-PCR)を用いた。純粋菌株より RNA を抽出し、下流特異点配列プライマーを用い各遺伝子の逆転写を行った。逆転写後 cDNA に対しヒドロゲナーゼに特異的なプライマーを用い PCR 反応を行った。RNA 抽出には ISOGEN(Nippongene)+ポリトロンホモジナイザーを用いた。

2.4 Real-Time PCR による遺伝子定量

遺伝子定量には Light Cycler (Roche)を使用し、各ヒドロゲナーゼ-mRNA 遺伝子の定量化を試みた。なお、インターカレーションダイとして SYBR Green I を用いた。

3.実験結果

SI 株のヒドロゲナーゼ遺伝子の同定に際して、現在報告されている数々のヒドロゲナーゼ-アミノ酸配列を用い保存性の高い領域より上流部に 2 種、下流部に 1 種の計 3 種のプライマーを作成した(Table 2)。プライマーは DNA 配列上では完全一致する部位が少なく混合塩基を多数有すものとなってしまった。

そのためイノシン(I)を用いることで混合塩基数を減らした。SI 株より抽出したゲノム DNA に対し上流部 2 種のプライマー1F,4R を用い PCR 反応を行った。反応生成物をアガロースゲルによりサイズ分画し、ゲルから DNA を回収・精製して得た増幅産物の塩基配列をクローニングを介して決定した。決定した塩基配列中に特異的なプライマーを作成し、下流部に作成したプライマー9R-1 を用いて同様の作業を行い塩基配列を決定した。この操作により得た遺伝子配列を BLASTX による

アミノ酸との相同性検索を行い機能の同定を行った。*Desulfovibrio* 属のヒドロゲナーゼが相同性 49%と最も高く、その他相同性のあるものすべてがヒドロゲナーゼであった。アミノ酸との相同性は一般に 30%以上あれば相同性があるといわれている事より、今回得た遺伝子はヒドロゲナーゼの機能を有していると考えられた。次に、得られた遺伝子が実際に発現しているかを RT-PCR によりチェックした。ポジティブコントロールとして 16S rRNA を用いた RT-PCR も同時に行った。その結果、今回同定した SI 株のヒドロゲナーゼ-mRNA 遺伝子の発現が確認された(Fig.1)。発現が確認できたため、mRNA 発現量の定量を行った。供試サンプルとして、ピルビン酸で培養した SI 株純菌、水素で培養したΔH 株純菌および、SI 株とΔH 株のプロピオン酸による共生培養系を用いた。抽出した Total RNA に対し下流特異

Table 2 PCR primers used in this study

primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Sequence position*
primer 1F	ACICGIATYGARGG	73-90
primer 4R	CAYTAYYTISARGCICT	613-630
primer 9R-1	AYCCITGYITSGCIT	1720-1737

*: *Escherichia coli* hydrogenase-1 large subunit

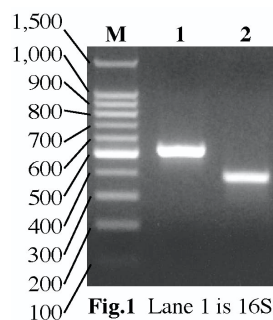


Fig.1 Lane 1 is 16S rRNA and lane 2 is hydrogenase of strain SI.

点配列プライマーを用い逆転写反応を行い、反応生成物である cDNA の定量を行った。同時に 16S rDNA 遺伝子をターゲットとした DNA の定量も行った。定量結果を Table 3 に示す。

Table 3 Results of quantitative analysis by R-PCR.

sample name	Target cell	16S rDNA (copies/ng)	16S rRNA (copies/ng)	hydrogenase-mRNA (copies/ng)
pure culture	strain SI	8.0×10^6	2.8×10^6	7.5×10^1
	strain ΔH	2.8×10^6	3.9×10^4	2.1×10^0
co-culture	strain SI	6.4×10^4	1.5×10^4	2.5×10^1
	strain ΔH	4.0×10^6	5.9×10^4	4.4×10^2

4.まとめ

本研究により同定されていない機能遺伝子を同定した。Real-Time RT-PCR を用いてヒドロゲナーゼ-mRNA の定量が行えた。ヒドロゲナーゼ-mRNA 遺伝子発現量は 16S rRNA 遺伝子発現量に対し 2~5 オーダーの発現量の違いが確認された。常時発現していると言われている 16S rRNA 遺伝子との発現量の違いが大きい事より、ヒドロゲナーゼ遺伝子は常時発現をしていない事が考えられる。今後は、水素伝達共生系微生物の生態解析を進めるべく、様々な培養条件下におけるヒドロゲナーゼ遺伝子発現を調査する。

謝辞 本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発」の事業として実施した。