

II—109 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 会田 英晴

同 正会員 遠藤 銀朗

1. 研究目的

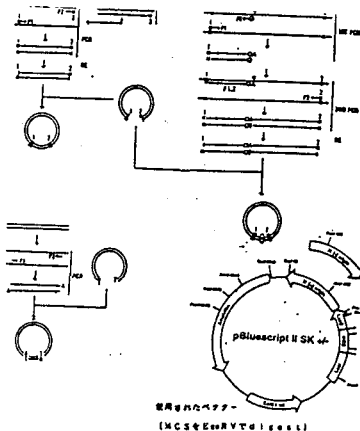
水系の富栄養化の原因物質の1つである窒素の除去に関与している硝化細菌の生態を調査し富栄養化現象やその回復のメカニズムを解明することは、従来の方法では、この細菌が独立栄養細菌で増殖が極めて遅いなどの理由によって困難とされてきた。本研究では、このような硝化細菌の生態を明らかにするために種特異的なDNAプローブの開発を行い、このプローブを使用した*in situ* ハイブリダイゼーション法によって排水処理プロセスや湖沼その他に存在する硝化細菌を培養することなく菌数の計数をし同定する方法を確立することを目的とした。

2. 研究方法

- a) 試料となる硝化細菌を単離するために、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カ月間アンモニアを含む基質で集積培養した。その一部を取り、希釈継代培養を繰り返した。コロイダルシリカゲル平板に塗布し、1カ月後に形成された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り亜硝酸産生の有無を確認した。
- b) 分離した独立栄養のアンモニア酸化細菌と従属栄養の硝化細菌 *Arthrobacter globiformis* IFO3062株の染色体上にある16S-rDNAをPCR法により増幅し、一方独立栄養の *Nitrobacter agilis* IFO14297株と *Nitrosomonas europaea* IFO14298株の16S-rDNAをRT-PCR法により増幅して、それぞれサブクローニングした。これをDidexoxyシーケンス法により部分塩基配列を決定した。
- c) 塩基配列の決定をした *A. globiformis* と既にデータベースに登録されている他の真正細菌と比較し2カ所にこの菌に特異性のある部位を見つけ出し、ともに5'末端にアミノリンクを結合した19merのDNAプローブを作製した。
- d) 作製したDNAプローブの種特異性を *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia carotovora* からの全RNAを調整し3'末端にジゴキシゲニン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) *A. globiformis* と *E. coli* をスライドガラス上に固定しこれに種特異的DNAプローブの5'末端に蛍光色素X-ローダミンイソチシアネートを付加した蛍光色素プローブにより *Arthrobacter* の細胞が検出可能であるか、また大腸菌細胞と識別可能であるかを調べるために*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

3. 実験結果

- a) コロイダルシリカゲル平板を用いて単離した細菌に亜硝酸産生が認められ、活性汚泥からアンモニア酸化細菌が単離された。
- b) 塩基配列の比較により分離した菌と *N. europaea* からの PCR 産物のサブクローンのシーケンスは非常に高い相同性を示し、系統発生的に近縁にあり属・種レベルで等しい可能性が示された。
- c) 5' 末端に蛍光標識した *A. globiformis* 種特異的 DNA のプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、蛍光顕微鏡で 1 細胞ごとの *Arthrobacter* を検出することが可能であった。従って、本方法は、培養困難な硝化細菌等の検出と生態調査に利用できる可能性が高い。



PCRによるクローニング法

上段はプライマーに制限酵素を付加した場合のPCR (正)

と RT-PCRによるクローニング法

下段はT-ベクター法によるクローニング法

実験用DNA、P1、P2はそれぞれ5'、3'プライマー

RT-PCR産物の可視化、Rは制限酵素の位置を示している。

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦



ユニバーサルプライマーを用いた16S-rRNAの

RT-PCR産物

1) DNA/HindIII

2) pX174/HaeIII

3) (-) DNA コントロール 10F-1400R

4) 分離したアンモニア酸化細菌1-3

5) " 2-4 "

6) *Nitrobacter agilis* IPO 14297

7) *Nitrosomonas europaea* IPO 14298

4)、5) 単離細菌抽出物20μlのTEに溶解、1μlのPCR

6)、7) 単離細菌抽出物より選択的抽出の菌体からのRT-PCR

PCR条件: 94℃1', 65℃2', 72℃2'

(1μl cycle 72℃10', 25 cycles

P: Forward primer, R: Reverse primer

T: *Rhodococcus purpureus*

[80.8K / 331 base]

```

1' GCACCTGCCGTC--CAACGXXXXXAAAGTCGGGAT--XNNTCAAGTC
1141' GCACCTTAATGAAGCTCCCGTGCACAAACGGAGGAGGTGGGATGACGTCAAGTC
47' AT--GCCTTACGGCGCTGGGTACANAGCTGCTACAATGCTGGTACAGAGGGTGGC
1201' ATGGCGCTTATGGGTACGGCTTCACAGCTCATACAATGCTGGTTCATAGGGTGGC
193' CCGCGAGGTGAGGAGCTAATCTCACAAACCGATCTAGTCCGGATCGGAGTCTGC
1261' CCGCGA---GGGGAGCTAATCCAGAAAGCCGATCTAGTCCGGATTCGAGTCTGC

163' TCGACTCGCTGAAGTCGAAATCGCTAGTAATCCGAAATGAGAGCTGGCTG--GGTAA
1316' TCGACTGCATGAAGTCGAAATCGCTAGTAATCCGCGATGACGATGCTCCCGTGAATAC
224' TCCGGCGGCTTGTACACACCGGCTGACACCATCGGAGCGGCTTCTGCCAGAGTAC
1378' TCCGGCGCTTGTACACACCGGCTGACACCATCGGAGCGGCTTCTGCCAGAGTAC

```

上: *Rhodococcus purpureus*

F: *Nitrobacter agilis* IPO 14297

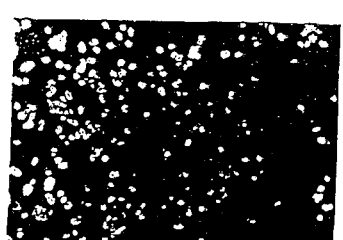
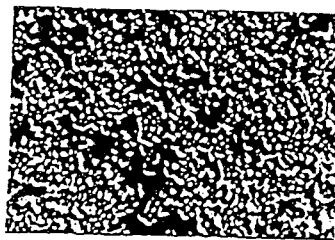
[78.6K / 348 base]

```

1' CCGCGTCTTGTAGTCTGCTACCATTAAGT
1981' TGTGGGTAAAGTCCCGGACGAGCGGCGAGCTTGTGCTTAATTCGCTGCTGCT
21' GCACCTTAAGGAGGAGTCCCGTGCATAGCGCGGAGGAGGAGTGGGATGACGTCAAGT
1141' GCACCTTAATGAAGCTCCCGTGCACAAACCG--GAGGAGGAGGAGGAGTGGGATGACGTCAAGT
81' CAT--CGCTTACGGCGCTGGGTACACAGCTGCTACAATGCGGCTGACAAATGGGAGC
1309' CATGGCGCTTATGGGTACGGCTTCACAGCTCATACAATGCTGCTCATAGGGTTC
148' GCGCGGACCGCTGACAAATCTCAAAACCGCTCTCTAGTGGGATGGGCTGCGAA
1260' CCGCGGAGGAGGAGCTAATCCAGAAAGCGGATCTGATGCTGGGATTCGAGTTCGAA
209' GAGCCCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATGCTGATT
1320' GAGTGCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATGCTGAGT

```

蛍光顕微鏡写真



Fixed *A. globiformis* Alprobe hybridized at 37°C

upper, phase-contrast
under, epifluorescence