

コンポスト製造過程で出現する脱窒細菌が保有する N₂O 還元酵素の多様性に関する研究

東北学院大学	工学部	環境建設工学科	学生会員	東海林 晃
	同上		非会員	大坪 和香子
	同上		正会員	宮内 啓介
	同上		フェロー会員	遠藤 銀朗

1. 序論

コンポスト化技術は、生ごみや家畜糞尿を窒素バイオマス資源（有機肥料）として再利用することにより、化学肥料による土壌の劣化の拡大を防ぎ、循環型および環境保全型社会の形成に貢献する技術として注目されている。しかし、窒素成分を多く含む畜産廃棄物などを材料としたコンポスト化過程では、温室効果ガスである亜酸化窒素（N₂O）が発生することが問題視されている。今後、環境を保全しつつ農作物を持続的に生産するためには、N₂O の発生抑制機能を付与した環境保全型コンポスト製造技術の開発が必要になる。本研究は、この基盤形成として、コンポスト製造過程で起こるN₂O発生に関与する微生物の動態を明らかにすることを目的とし、脱窒細菌の保有するN₂O 還元酵素遺伝子（*nosZ*）に着目し、解析を行った。本講演では、コンポスト化中期におけるコンポスト表面部および内部の*nosZ*の存在量および多様性について発表する。

2. 実験方法

2.1 定量的リアルタイムPCR 法を用いた堆肥化中期における*nosZ*保有脱窒細菌の定量解析

コンポスト化開始後9 週目のサンプルからDNAを抽出し、このDNA を鋳型として脱窒細菌*nosZ*遺伝子を定量的リアルタイムPCR 法にて増幅し、堆肥山表面と内部の*nosZ*保有脱窒細菌の存在量を比較する。

2.2 *nosZ*のクローン解析および系統解析による堆肥化中期の堆肥山における脱窒細菌の多様性解析

2.1で使用したコンポストDNAおよびプライマーセットを用い、*nosZ*遺伝子断片をPCRにより増幅した。増幅したDNA断片をそれぞれクローニングした。各クローンライブラリーからランダムに選択した24クローンについて、塩基配列の解読（シーケンス）を行い、得られ

た塩基配列情報をデータベースと照合し、それぞれの*nosZ*塩基配列に最も相同性の高い*nosZ*既知配列を特定した。この測定結果から、DNA1 μg あたりのN₂O 還元酵素遺伝子（*nosZ*）のコピー数を算出し、各試料中に存在したN₂O還元酵素を保有する脱窒細菌の存在量を推定した。

3. 実験結果

3.1 定量的リアルタイムPCR 法を用いた堆肥化中期における*nosZ*保有脱窒細菌の定量解析

図1~3に3種類のプライマーを使用し堆肥山表面（T2）と堆肥山内部試料（T3）DNA1μgあたりの*nosZ*保有細菌のコピー数の比較を示す。

堆肥山表面と内部を比較し、堆肥山内部（T3）よりも堆肥山表面（T2）の方が堆肥 DNA1μg あたりの*nosZ*保有細菌のコピー数が多いことから、堆肥化中期における堆肥山では、脱窒細菌は全体的に存在するが、N₂O 還元能を有する脱窒細菌の存在量は、堆肥山表面の方が内部よりも多いことが推測された。

使用したプライマーの違いを比較し、定量結果にプライマーが与える影響も調べた。堆肥 DNA1μg あたりの *nosZ*保有細菌のコピー数が *nosZ*1F を使用した場合と *nosZ*-UNIV-Fw を使用した場合とではどちらも堆肥山表面試料（T2）は平均 1.20×10^8 コピー、堆肥山内部試料（T3）は平均 6.55×10^7 コピーという結果であったのに対して、*nosZ*-F-1181 を forward プライマーとして用いた場合では堆肥山表面試料（T2）は 1.76×10^7 コピー、堆肥山内部試料（T3）は 1.04×10^7 コピーとなっており、コピー数が 1/10 程度少なくな見積もられてしまうことが分かった。また、定量 PCR 産物の電気泳動結果では、どの forward プライマーを用いた場合でも、不特異的な増幅バンドが見られることもなかった。このため、今後の *nosZ* 遺伝子解析

の実験では、*nosZ*1F または *nosZ*-UNIV-Fw を使用するのがよいと考えられた。

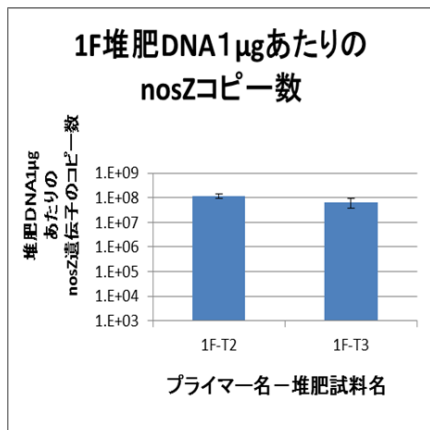


図1. T2およびT3堆肥試料中に含まれる *nosZ* 遺伝子のコピー数 (Fw プライマー: *nosZ*1F)

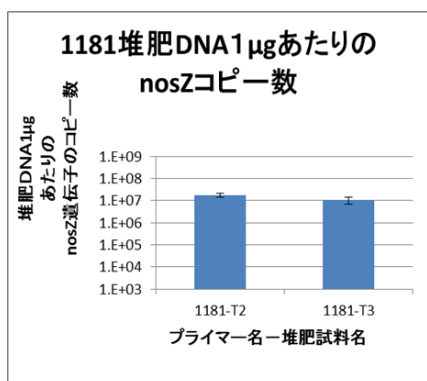


図2. T2またはT3堆肥試料中に含まれる *nosZ* 遺伝子のコピー数 (Fw プライマー: *nosZ*-F-1181)

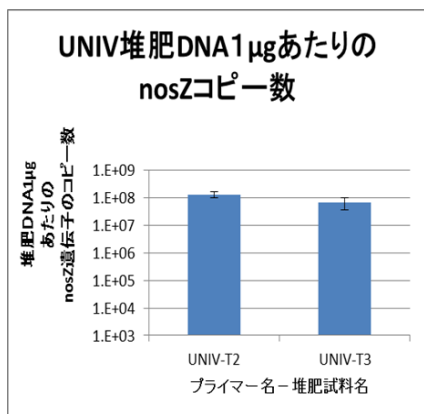


図3. T2またはT3堆肥試料中に含まれる *nosZ* 遺伝子のコピー数 (Fw プライマー: *nosZ*-UNIV-Fw)

3.2 *nosZ* のクローン解析および系統解析による堆肥化中期の堆肥山における脱窒細菌の多様性解析

3種類のプライマーを用いて定量PCR増幅した産物のクローニングおよびシーケンスを行ったが、全ての条件（堆肥3種、プライマー3種）において24～28個の *nosZ* 遺伝子配列を得ることができた。全ての堆肥試料においてベータプロテオバクテリア綱-(Betaproteobacteria) の *Achromobacter* 属細菌が一番多い割合を占めているが、プライマーとして *nosZ*1F を用いた定量PCRで増幅された *nosZ* は比較的多く検出された *Paracoccus* (Alphaproteobacteria) や、*nosZ*-UNIV-Fw を用いた定量PCRで増幅された *nosZ* で比較的多く検出された *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) が、*nosZ*-F-1181 を用いた定量PCRで増幅された *nosZ* にはほとんど見られなかったことから、用いるプライマーの種類の選択が、クローニング結果に大きく影響することが明らかになった。

4. まとめ

本研究では、堆肥化施設で採取した生ゴミを原料とした堆肥試料を用い、定量的リアルタイムPCRの解析結果から、 N_2O 還元酵素タンパク質をコードする *nosZ* 遺伝子の存在量（コピー数）が堆肥表面部の方が堆肥内部より大きいということが明らかになり、堆肥表面部は堆肥内部よりも N_2O 還元能を有する保有細菌の数が多いということが示唆された。また、様々な種類の *nosZ* 保有脱窒細菌が多く出現すること、およびその多様性を明らかにすることができた。今後の研究では、これらの *nosZ* 保有脱窒細菌が実際に脱窒および N_2O 発生に関与しているかを明らかにすることが必要である。