

(39) **Real-Time PCR 法と Competitive PCR 法を用いた *Nitrosomonas* 属の
16S rDNA 遺伝子及び *amoA* 遺伝子の定量**

**Quantification of 16S ribosome and *amoA* genes in the genome of
Nitrosomonas by Real-Time PCR and Competitive PCR.**

中村明靖*、荒木信夫**、山口隆司***、山崎慎一****、大橋晶良*、原田秀樹*
Akinobu NAKAMURA, Nobuo ARAKI, Takashi YAMAGUCHI, Shinichi YAMAZAKI,
Akiyoshi OHASHI, Hideki HARADA

ABSTRACT; Real-Time PCR and Competitive PCR were applied to quantify 16S ribosomal and ammonia monooxygenase (*amoA*) genes in the genome of ammonia-oxidizing bacteria. Two sets of PCR primer targeting the 16S ribosomal gene and one set targeting *amoA* gene were selected to implement both PCR-based quantification methods. A linear response was observed over more than 3 orders of magnitude at real time PCR using a dilution series of *Nitrosomonas europaea* DNA, ranging from 10^5 to 10^2 copy number of 16S ribosomal gene and from 10% to 0.01% to total DNA, respectively. The DNAs extracted from nitrifying activated sludge sample contained 3.0×10^4 and 1.3×10^5 copies/ng in 16S ribosomal gene and 1.8×10^5 copies/ng in *amoA* gene, that corresponded to 16, 43 and 55% to the gene numbers at a *N.europaea* DNA equivalent. The number of *amoA* gene in the DNA extracted from the activated sludge increased with increase in the ammonia-oxidizing activities determined by batch experiments, while the abundance of 16S ribosomal gene showed almost constant.

KEYWORDS; Real-Time PCR, Competitive PCR, *Nitrosomonas europaea*, *amoA* gene.

1. はじめに

アンモニア酸化細菌は自然界における窒素循環を担うキー微生物である。自然環境中や下排水に含まれるアンモニア態窒素はまずアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の働きによって硝酸に酸化され、次に酸素制限下で脱窒素細菌によって窒素ガスに転換される。アンモニア酸化細菌の多くは独立栄養細菌であり、増殖速度が極めて小さく、pH や水温等の影響を受けやすいことが報告されている¹⁾。下排水処理プロセスの窒素除去効率、特にアンモニア酸化能の向上には、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌を安定してリアクターに保持することが必要である。硝化細菌の検出や菌数計測には MPN 法に代わって抗原抗体法や DNA プローブの FISH 法も適用され始めた^{2,3,4,5)}。しかし、これら手法を活性汚泥に適用した場合、硝化細菌がクラスターを形成してダイレクトカウントができない、細胞が活性汚泥由来のポリマーに覆われているために抗体や DNA プローブの細胞への浸透が阻害される^{2,5)}、活性汚泥中に蛍光観察を妨害するクリスタル等の夾雑物が混在する⁶⁾、といった欠点が指摘されている。

*長岡技術科学大学 環境システム工学系(Dept. of Environ. Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

**長岡工業高等専門学校 環境都市工学科(Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology)

***呉工業高等専門学校 環境都市工学科(Dept. of Civil Engineering, Kure National College of Technology)

****高知工業高等専門学校 建設システム工学科(Dept. of Civil Engineering, Kochi National College of Technology)

Nitrosomonas 属のような独立栄養アンモニア酸化細菌によるアンモニアの亜硝酸への酸化は2つのステップに区別できる。まずアンモニア(NH₃)は Ammonia Monooxygenase (AMO)によって Hydroxylamine(NH₂OH)に酸化され、さらに Hydroxylamine Oxidoreductase (HAO)によって亜硝酸(NO₂)に酸化される⁷⁾。分子生物学的な解析手法の進展により、*Nitrosomonas europaea* のゲノム上でこの2つの酵素をコードする遺伝子の解析が多く報告されている^{8,9)}。AMO をコードする遺伝子は *amoA*, *amoB*, *amoC* でオペロンを構成しており、ゲノム中に複数のコピーが存在すると報告されている¹⁰⁾。また、アンモニア酸化細菌の *amoA* 遺伝子の塩基配列は多くの細菌で調査されており、*amoA* 遺伝子の多様性から評価した系統解析も行われている。

近年、PCR 技術の普及にともなって、MPN-PCR¹¹⁾、Competitive PCR^{12,13)} や Real-Time PCR¹⁴⁾ といった PCR 反応に基礎をおいた遺伝子の定量技術が開発され、土壌や水系底質に生息する硝化細菌にも適用されている。遺伝子定量技術では、細胞を破碎して DNA を回収し遺伝子数を定量するため、上述した抗原抗体法や FISH 法を適用する際の夾雑物質の問題が発生しない。また、FISH 法では 16S rRNA を標的として検出を行っているため、活性の小さい細胞は微弱な蛍光強度しか得られない。これに対し遺伝子定量技術はゲノム DNA 中の遺伝子を標的としているため、検出効率が細胞の活性の影響を受けず、さらに *amoA* のような機能遺伝子を標的とした場合は 16S rDNA 遺伝子よりも直接的にアンモニア酸化能ポテンシャルを評価できるものと考えられる。本研究の目的は、まず *Nitrosomonas* の純粋菌株をもちいて 16S rDNA 遺伝子と *amoA* 遺伝子を標的とした定量 PCR 法の測定効率を検証した後、遺伝子の定量を活性汚泥サンプルに適用し、汚泥のアンモニア酸化能のポテンシャル評価を試みるものである。

2.実験方法

2.1 リアクター及び人工排水

アンモニア酸化細菌由来の遺伝子の定量には、純粋菌株として *Nitrosomonas europaea* (IFO14298)、活性汚泥サンプルとして硝化脱窒同時除去を目的としたラボスケール担体投入型リアクター(容積3.2L)から採取した生物膜汚泥を用いた。このリアクターは生物膜付着担体として2種のメディアを投入しており、20℃の恒温室内で人工排水を処理している。Table 1 に人工排水の組成を示す。リアクターの運転はアンモニア負荷、曝気量と C/N 比を変化させながら6ヶ月以上連続運転を行っている。遺伝子定量のためのサンプル採取時には10~20個の担体を用いてバッチ試験を行い、付着生物膜量あたりのアンモニア酸化比活性(mg-N/mg-VSS/d)を測定した。

Table 1 Compositions of synthetic wastewater fed to lab-scale reactor.

Composition	(g/100L)
NH ₄ Cl	15.28
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	2.31
NaCl	1.01
KCl	0.47
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.47
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.67
NaHCO ₃	93.72
Fe-EDTA	0.03
CH ₃ COONa	5.47~10.94

2.2 DNA の抽出と精製

DNA の抽出はビーズビーダー法を用いた。サンプルを 2.2mL スクリューキャップチューブに採取し、リン酸バッファー(3xPBS:3xphosphate-buffered saline; 411mM NaCl, 24.33mM Na₂HPO₄, 8.04mM KCl, 4.41mM KH₂PO₄, pH8.0)で洗浄を行った。その後0.2mm 径ビーズ(1g)、300μL phosphate buffer(100mM Na₂HPO₄, pH8.0)、300μL lysis buffer(100mM NaCl, 500mM Tris-HCl [pH 8.0], 5% SDS)にクロロホルム溶液を加えてビーディング(Mini-BeadBeater, Biospec Products, Inc.) (4,200 rpm, 1min)を行った²⁴⁾。60℃(10min)で保温し、遠心分離(1,500g、4℃、10min)後、上澄み液を 1.5mL チューブに回収した。回収したサンプルについて数回の PCI 溶液(平衡化済みフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)、CIA 溶液(クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1)による精製を行い、3M 酢酸アンモニウムとイソプロピルアルコールを添加して核酸を沈殿回収し、RNase 処理(最終濃度:50μg/mL)を行い精製後 TE buffer に溶解した。

2.3 PCR プライマーと FISH 用プローブ

本研究でアンモニア酸化細菌に特異的な 16S rDNA 遺伝子および *amoA* 遺伝子の定量に用いた PCR プライマーを Table 2,3 に示す。各プライマーセットの増幅塩基長は β AMOf-Nmn657;535bp, CTO189f-RT1r 116bp (Real-Time PCR 時は CTO189fA/B と CTO189fC を 2:1 で混ぜたもの-RT1r;116bp), *amoA*-1F-*amoA*-2R;491bp である。FISH 用プローブとしては Nmn657 の 5'末端に TRITC 標識を付加したものをを用いた。

Table 2 PCR primers used in this study for quantification of 16S ribosome gene of β -subclass ammonia-oxidizing bacteria (AOB).

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Sequence position	Target	Ref.
β AMOf	TGGGGRATAACGCAYCGAAAG	142-162	β AOB	15)
CTO189f*	GGAGRAAAGYAGGGGATCG	189-207	β AOB	16)
CTO189fA/B**	GGAGRAAAGCAGGGGATCG	189-207	β AOB	16)
CTO189fC**	GGAGGAAAGTAGGGGATCG	189-207	β AOB	16)
Nmn657	TGGAATTCCTCCCTCTCTG	657-676	<i>Nitrosomonas europaea</i> <i>N.eutroph,N.marina</i>	5)
RT1r	CGTCCTCTCAGACCARCTACTG	283-304	β AOB	14)

* Primer CTO189f was used for competitive PCR

**Primers CTO189fA/B and CTO189fC were used for real time PCR at a weight ratio of 2:1.

Table 3 PCR Primers used in this study for quantification of *amoA* gene of AOB.

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Sequence position	Target	Ref.
<i>amoA</i> -1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	332-349	β AOB	9)
<i>amoA</i> -2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	802-822	β AOB	9)

2.4 Competitive PCR 法

Competitive PCR 法で用いる Competitor は Competitive DNA Construction Kit (TaKaRa Biomedicals)を用いて作成し、プライマーセットごとに以下のような長さに設定した β AMOf-Nmn657 ; 427bp、CTO189f-RT1r ; 191bp、*amoA*-1F-2R ; 339bp。Competitive PCR 反応 (0.5mM 10xPCR buffer、0.16mM dNTP Mix、0.5 μ L primer(10pmol) x2、0.025units *Taq* polymerase、1 μ L template DNA、33.75 μ L H₂O、5 μ L competitor、total 50 μ L) は、95 $^{\circ}$ C(10min)の変性後、95 $^{\circ}$ C(40sec)の変性、X $^{\circ}$ C 40 秒のアニーリング、72 $^{\circ}$ C(90sec)の伸張ステップを 35 サイクル行い、その後アニーリング温度で 1min、72 $^{\circ}$ Cで 5min の条件で実施した。増幅産物はアガロース電気泳動で分画し、バンド強度を画像解析 (EDAS290 (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System)で得た。また、増幅産物の塩基長の解析にはキャピラリー電気泳動装置(Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies Inc.)を用いた。

2.5 Real-Time PCR 法

Real-Time PCR(Smart Cycler System, Cepheid, TaKaRa Biomedicals)は、検出方法としてインターカレーター (SYBR Green I) 法を用いた。インターカレーター法の場合、ターゲットに対する特異性はなく、二本鎖DNAであればすべて検出する。そのため、プライマーダイマーのような非特異的産物の増加を確認するため、PCR ステージの後の融解曲線を検証し、ターゲットの増幅による蛍光のみを取得することにした。Real-Time PCR の最適条件はマグネシウム濃度、アニーリング温度、蛍光取得時の温度の3つをプライマーごとに再決定した。また、Kowalchukら¹⁶⁾にならないCTO189fプライマーは用いずに、CTO189fA/BとCTO189fCを2:1で混合したものをを用いた(Table 2)。

PCR反応液組成はキットに従った(TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version, TaKaRa Biomedicals)。PCR反応は、95℃(120sec)の変性後、95℃(10~15sec)の変性、X℃(10~15sec)のアニーリング、72℃(10~15sec)の伸張、85~88℃(6sec)の蛍光取得ステップのサイクルを40回、その後に融解曲線反応を行った。検量線作成用の試料としては*N.europaea*から回収したゲノムDNAをそれぞれのPCRプライマーで増幅したPCR産物を用いた。

2.6 In situ hybridization法

担体投入型人工排水リアクターの生物膜サンプルに対して、Table 2に示したNm657プライマーをDNAプローブとしてその5'末端にTRITC標識を付加したものを用いた。FISHはAmannの方法¹⁷⁾に準拠して行った。サンプルは4%-パラホルムアルデヒド溶液にて固定した後にFISH法に供した。FISHはHybridization Buffer 16μL (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.2, 0.01% Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)、ホルムアミド15%)をスポットし、さらに2μL(100ngのプローブを含む)のプローブ溶液を加えて46℃で2時間ハイブリダイズした。試料は落射蛍光顕微鏡(Olympus BX60-FLA)を用いて観察した。

3. 実験結果及び考察

3.1 Competitive PCR による遺伝子の検出効率

まず、*N.europaea* から回収した DNA をポジティブコントロール、*Pseudomonas stutzeri* (IFO13596) から回収した DNA をネガティブコントロールとし各プライマーセットの最適 PCR 条件を検討した。本実験で用いた 3 種のプライマーセットによる増幅産物の塩基長をキャピラリー電気泳動で測定した結果、いずれも所定の塩基長の産物が得られることを確認した。その後、定量用コンペティターと競合増幅することも確認した。

Fig.1 は検出効率を確認するために *N.europaea* の *amoA* 遺伝子を Competitive PCR で定量した電気泳動写真と解析結果である。また、Table 4 は、各プライマーセットを用いて計測した *N.europaea* の DNA 1ng あたりの各遺伝子のコピー数値を示した。*N.europaea* のゲノムサイズ 3.0Mbp¹⁸⁾ と 4 種類のヌクレオチドの平均分子量 326 から *N.europaea* のゲノム 1ng には 2.95×10^5 copies 存在すると計算できる。この値に対する各プライマーによる Competitive PCR による定量値は、16S rDNA 遺伝子では 33, 55%, *amoA* 遺伝子では 280%であった。*N.europaea* のゲノムには 16S rDNA 遺伝子が 1 コピー存在するとされており¹⁹⁾、Competitive PCR による 16S rDNA 遺伝子の検出効率は低い値といえる。一方、*amoA* 遺伝子では 280%と大きな値を示した。Mendum ら²²⁾ は土壌中のアンモニア酸化細菌数を Competitive PCR で計測したところ、16S rDNA と *amoA* 遺伝子数はほぼ同等であったと報告している。*amoA* 遺伝子が大きく計測された原因は明らか

でないが、ゲノム上の *amoA* 遺伝子数も影響していると考えられる。AMO オペロンは *N.europaea* のゲノム上に Multiple Copy で存在し^{10,20)}、β-Subclass のアンモニア酸化細菌では3~4コピーが検出されることも報告されている²¹⁾。

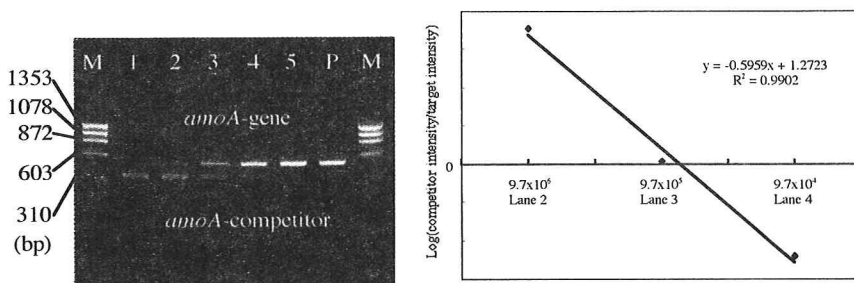


Fig.1 The result of Competitive PCR for quantification of *amoA* gene of *N.europaea*.

M=marker, P=positive control. Each tube contained same amount of DNA as a template and a dilution series of competitor as an internal standard ($9.7 \times 10^7 \sim 9.7 \times 10^3$ copies/tube).

Table 4 Quantification values of 16S ribosome and *amoA* genes of *N.europaea* by competitive PCR with several PCR primer sets.

Target	16S rDNA		<i>amoA</i> -gene
Primer	CTO189f-RT1r	BAMOf-Nmn657	<i>amoA</i> -1F,2R
copies/ng	9.8x10 ⁴	1.6x10 ⁵	8.5x10 ⁵

3.2 Real-Time PCR による遺伝子の検出効率

Real-Time PCR 反応の最適条件は、サーマルサイクラーを用いた通常の PCR 反応時と異なるため、*N.europaea* から回収した DNA を用いて、最適 PCR 条件を **Table 5** のように決定した。また、Real-Time PCR を用いた遺伝子定量の検量線の作成には *N.europaea* ゲノムを各プライマーで増幅させた PCR 産物を用いた。検量線用の PCR 産物は精製を行い、紫外線吸光度により反応生成物の重量を測定した後に、産物の塩基数からコピー数として算出した。

Table 5 Optimum PCR conditions for the primer sets used for real time PCR.

Primer	Mg ²⁺ concentration	Annealing (°C)	Detection of Fluorescence (°C)
BAMOf-Nmn657	4mM	59	88
CTO189f-RT1r	4mM	61	85
<i>amoA</i> -1F <i>amoA</i> -2R	4mM	59	85

Table 6 に、各プライマーセットで *N.europaea* から回収した DNA 1ng 中の各遺伝子の定量結果を示す。16S rDNA 遺伝子の定量結果では Competitive PCR と比較して検出効率は大きくなり、CTO189f-RT1r では 64%、BAMOf-Nmn657 のセットでは 100% に達した。*amoA* 遺伝子の検出効率は 120% であり、Competitive PCR 法での検出効率と比べると約半分の値となった。Competitive PCR と Real-Time PCR で求めた *N.europaea* の定量結果は約 2 倍の定量値の違いが現れた。しかしながら、遺伝子定量はオーダーレベルでの測定が一般的であり、遺伝子数における 2 倍の差は誤差範囲内であると考えられる。

また、全アンモニア酸化細菌をターゲットにした CTO189f-RT1r プライマーセットの方が *Nitrosomonas* 属細菌をターゲットにした BAMOf-Nmn657 プライマーセットよりも小さな定量値となった。これは、PCR 反応では増幅する遺伝子部位によって増幅効率が変わることが知られており、また、CTO189f-RT1r プライマーセットは混合塩基を 3 個含んでいることが増幅効率を減少させた一因であると予想される。

Table 6 Quantification values of 16S ribosome and *amoA* genes in *N.europaea* by real time PCR.

Target	16S rDNA		<i>amoA</i> -gene
Primer	CTO189f*-RT1r	BAMOf-Nmn657	<i>amoA</i> -1F,2R
copies/ng	1.9x10 ⁵	3.1x10 ⁵	3.3x10 ⁵

* A mixture of CTO189fA/B and CTO189fC at the weight ratio of 2:1.

3.3 Real-Time PCR 法の検出限界測定と定量限界

Real-Time PCR 法による遺伝子の検出限界と定量限界を検討するために、*N.europaea* から回収した DNA を 10⁵~10⁶copies/tube となるように純水で段階希釈し、BAMOf-Nmn657 プライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。その結果を **Fig.2** に示す。グラフから直線性が得られたのは 10⁵~10²copies/tube の 3 オーダーであり、低濃度域の 10²copies/tube 以下では検出は可能であるが定量は困難であった。Heid ら²³⁾ は Real-Time PCR では 5 オーダーの直線性が得ることができると報告している。さらに硝化細菌由来の遺伝子が検出されない汚泥（主に炭水化物を主成分として小汚泥滞留時間で培養した活性汚泥）から DNA を回収し、

Neuropaea から回収した DNA に混合した試料を用いて共存 DNA の妨害の影響を検証した。その結果を Fig.3 に示す。*Neuropaea* DNA の混合割合が重量換算で 10~0.01% までは直線性が得られた。DNA 含有率が 0.001% になると Threshold Cycle が多くなり、直線に乗らなくなった。10~0.01% の相関係数 R^2 は 0.9986 である。このことより、Real-Time PCR を用いた *Neuropaea* DNA の 16S rDNA は 10^2 copies/tube 、重量存在率として存在率 0.01% までの定量が可能であると判断した。

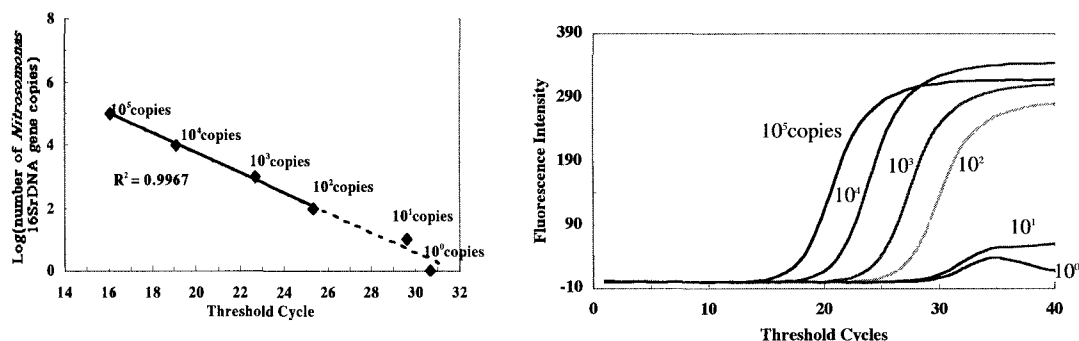


Fig.2 Generation of standard curve with threshold cycle for serially diluted *Neuropaea* DNA.

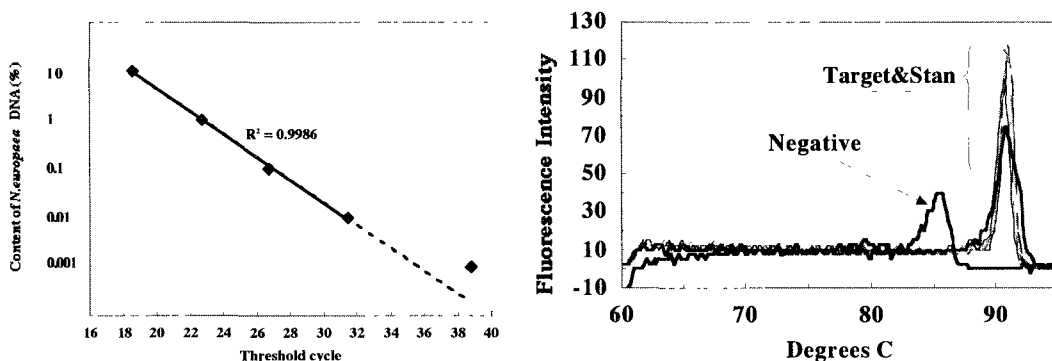


Fig.3 Relationship between the content of *Neuropaea* DNA as a template and a number of threshold cycle of real time PCR.

Fig.4 Melting curves of real-time PCR products with the primer set of BAMOf-Nmn657, amplified from activated sludge DNA.

3.4 活性汚泥への適用結果

Neuropaea から回収した DNA を用いた検出効率および定量性評価の結果を踏まえ、BAMOf-Nmn657 プライマーセットを用いた Real-Time PCR 法による遺伝子定量を窒素除去ラボリアクターから採取した活性汚泥に適用した。Fig.4 に BAMOf-Nmn657 プライマーセットを用いて活性汚泥 DNA をテンプレートにした Real-Time PCR 増幅産物の融解曲線グラフを示す。ネガティブコントロールの蒸留水だけの tube のみに非特異的な増幅が発生しているが、その他の増幅産物には非特異的な増幅は含まれておらず、所定のターゲット部位と同じ塩基長の産物だけが増幅されていることを確認した。ネガティブコントロールに現れた非特異的な増幅はプライマーダイマーの形成によるものである。Table 7 に各プライマーセットによる遺伝子の定量値を示す。回収した DNA 1ng 中の 16S rDNA 遺伝子数は、CTO189f-RT1r プライマーセットでは 3.0×10^4 copies/ng、BAMOf-Nmn657 プライマーセットでは 1.3×10^5 copies/ng、*amoA* 遺伝子では 1.8×10^5 copies/ng であり、Table 6 の *Neuropaea* DNA の定量値との比は、それぞれのプライマーで 16、42、55% であった。

活性汚泥から回収した DNA 中の *Nitrosomonas* 由来遺伝子数と *N.europaea* DNA の遺伝子定量値に対する比を検証するために、*Nitrosomonas* 属の多くの種を検出する Nmn657 プローブ (βAMOf-Nmn657 プライマーセットとしても使用)を用いて活性汚泥サンプルに FISH を試みをした。Fig.5 にその観察写真を示す。

Nitrosomonas 属の細菌は写真のようにクラスターを形成して存在していたが、任意の 10 視野で DAPI 検出細胞との比を求めたところ 5.2%±4.4%であった。この FISH の結果は、活性汚泥 DNA に対する *Nitrosomonas* 由来遺伝子の比 16~55%に較べて小さい。この原因は、FISH 検出細胞の直接菌数計測を行う際に細胞が重なり合っていたために計測値が小さくなったこと、リアクターが C/N=0.4 とアンモニア酸化細菌にとって高い活性を保持できる状況にあり 1 細胞に 1 ゲノム以上存在していたと考えられることである。*N.europaea* のような 1 ゲノムに 1 個の 16S rDNA 遺伝子しか有していない菌種では、1cell=1genome と仮定すると 16S rDNA(copies/mL)を細胞数(cells/mL)に換算できる。しかし、本研究では遺伝子の定量値を回収 DNA 1ng 当たりのコピー数とした。これは核酸抽出操作でサンプルの性状や抽出方法によって回収率が大きく変化する²⁴⁾影響を排除するためである。これは本研究のような遺伝子定量値と直接菌数計測による細胞数とが比較対象にならないことを示唆している。

Table 7 Quantification values of 16S ribosome and *amoA* genes of DNA extracted from activated sample by real time PCR.

Target	16Sr DNA		<i>amoA</i> -gene
	CTO189f*-RT1r	βAMOf-Nmn657	<i>amoA</i> -1F,2R
copies/ng	3.0x10 ⁴	1.3x10 ⁵	1.8x10 ⁵

*A mixture of CTO189fA/B and CTO189fC at the weight ratio of 2:1.

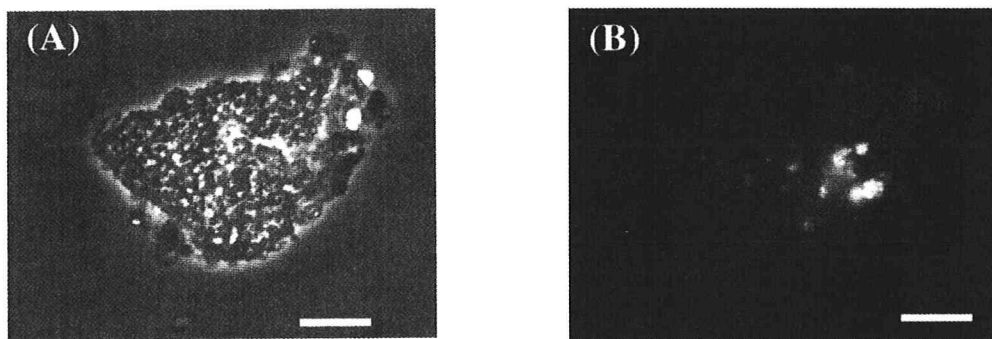


Fig.5 Whole cell hybridization with fluorescent oligonucleotide probe (Nmn657 probe) specific for the genus of *Nitrosomonas*. Identical microscopic fields were viewed by phase constant (A) and by G-excitation (B) as the same optical field. Scale bars represent 10μm.

3.6 遺伝子定量と比活性の比較

汚泥中の *Nitrosomonas* 由来遺伝子の定量値と活性汚泥のアンモニア酸化比活性の関係を評価するために、βAMOf-Nmn657, *amoA* 1F-2R の両プライマーセットを用いて、脱窒除去ラボリアクターから採取した汚泥サンプルに対して *Nitrosomonas* の 16S rDNA 遺伝子と *amoA* 遺伝子の定量を行った。Fig.6 に汚泥の 16S rDNA 遺伝子と *amoA* 遺伝子の定量値とアンモニア酸化比活性の関係を示す。*amoA* 遺伝子 10⁴copies/ng 以下の点を除いては汚泥の比活性が大きくなると遺伝子数も多くなる。一方、16S rDNA 遺伝子では 1 点を除いて、比活性が 0.4~0.9mg-N/mg-VSS/d と変化しても遺伝子数は概ね 6.0x10⁴copies/ng とほぼ一定であり、遺伝子数と比活性には優位な傾向は確認できない。これは、汚泥内に存在する *Nitrosomoans* 属のすべてが活発にアンモニア酸化に寄与していないことを示唆している。もしそうであるなら、汚泥内の *Nitrosomoans* 細胞数とアンモニア酸化比活性には比例関係が認められない場合もあると考えなければならない。このデータは実験期間中に汚泥内の *amoA* 遺伝子と 16S rDNA 遺伝子の比が変化したと考えることができるが、この

原因については不明である。今後、データ数を多くして検証する必要がある。

このアンモニア酸化細菌の細胞数と比活性の関係を明らかにするには *amoA* 遺伝子の転写量の測定値、例えば *amoA*-mRNA²⁵⁾と合わせて解析する必要があるだろう。

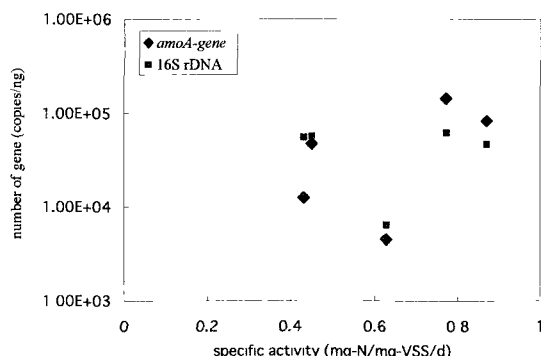


Fig.6 Relationship between specific ammonia- oxidizing activities and the number of 16S ribosome and *amoA* genes in DNA extracted from the activated sludge.

まとめ

本研究で得られた結論をまとめると以下のとおりである。

- 1) *N.europaea* から回収した DNA をテンプレートにして Competitive PCR により 16S rDNA 遺伝子と *amoA* 遺伝子を定量した結果、*N.europaea* のゲノムサイズから算定した遺伝子数に対して、16S rDNA 遺伝子で 33～55%、*amoA* 遺伝子で 280%の検出効率であった。また、Real-Time PCR では、16S rDNA 遺伝子で 64～100%、*amoA* 遺伝子で 120%であった。
- 2) DAPI 染色細胞に対する FISH 検出細胞の直接菌数計測で 5.2%と評価された活性汚泥から回収した DNA の *Nitrosomonas* 16S rDNA 遺伝子と *amoA* 遺伝子数は、*N.europaea* から回収した DNA の遺伝子計測値の 16～42%(16S rDNA 遺伝子)、55%(*amoA* 遺伝子)であった。
- 3) Real-Time PCR 法を用いた *Nitrosomonas* 16S rDNA 遺伝子の定量は下限値が 10^2 copies/tube、重量存在率として 0.01%までが可能であった。
- 4) 汚泥のアンモニア酸化比活性が増大すると回収 DNA あたりの *amoA* 遺伝子数も上昇した。一方、*Nitrosomoas* の 16S rDNA 遺伝子と比活性には関係が認められなかった。

謝辞: 本研究は NEDO(新エネルギー産業技術総合開発機構)の産業技術研究事業費助成金の助成を受けた(課題番号 01B63001d、研究代表者: 山口隆司)ことを付記し、関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) Eighmy, T.T., and P.L.Bishop. 1989. Distribution and role of bacterial nitrifying populations in nitrogen removal in aquatic treatment systems. *Water Res.* **23**:947-955.
- 2) Swerinski,H., S.Gaiser, and D.Bardtke. 1985. Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: interference of the test in biofilm reactors. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **21**:125-128.
- 3) Wagner,M., G.Rath, R.Amann, H.-P.Koops and K.-H.Schleifer. 1995. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *System.Appl.Microbiol.* **18**:251-264.
- 4) Schramm,A., L.H.Larsen, N.P.Revsbech, N.B.Ramsing, R.Amann and K.-H.Schleifer. 1996. Struture and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**:4641-4647.
- 5) Araki,N., A.Ohashi, I.Machdar and H.Harada. 1999. Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site. *Water Science and Technology.* **7**:23-31.

- 6) 荒木信夫、樋口義丈、丸山和馬、矢澤賢一郎、高井智丈. 1999. 下水高度処理における硝化生物膜の比活性と細菌叢の FISH 解析、土木学会第 54 回年次学術講演会（広島）講演概要集、第 7 部. pp.340-341.
- 7) Wood, P.M. 1986. Nitrification as a bacterial energy source. In J.I. Prosser (ed.), *Nitrification*. Oxford, Society for General Microbiology: IRL Press. 39-62.
- 8) Sayavedra-Soto, L.A., N.G. Hommes, D.J. Arp, J. Alzerreca, J.M. Norton, and M.G. Klotz. 1998. Transcription of *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiology Letters*. **167**:81-88.
- 9) Rottehaeuwe, J.H., K.P. Witzel and W. Liesack. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4704-4712.
- 10) Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.P. Koops and M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5368-5382.
- 11) Phillips, C.J., Dave Harris, Sherry L. Dollhopf, Katherine L. Gross, James I. Prosser, and Eldor A. Paul. 2000. Effects of Agronomic Treatments on Structure and Function of Ammonia-Oxidizing Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5410-5418.
- 12) Phillips, S.D., E.A. Paul, and J.I. Prosser. 2000. Quantitative analysis of ammonia oxidizing bacteria using competitive PCR. *FEMS Microbial Ecology*. **32**:167-175.
- 13) Stephen, J.R., Yun-Juan Chang, Sarah J. Macnaughton, George A. Kowalchuk, Kam T. Leung, Cissy A. Flemming, and David C. White. 1999. Effect of Toxic Metals on Indigenous Soil -Subgroup *Proteobacterium* Ammonia Oxidizer Community Structure and Protection against Toxicity by Inoculated Metal-Resistant Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:95-101.
- 14) Hermansson, A. and P.-E. Lindgren. 2001. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:972-976.
- 15) McCaig, A.E., T. M. E. and J. I. Prosser. 1994. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**:363-368.
- 16) Kowalchuk, G.A., J.R. Stephen, W. De Boer, J.I. Prosser, T.M. Emley and J.W. Woldendorp. 1997. Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of β Subdivision of the Class *Proteobacteria* in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA Fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1489-1497.
- 17) Amann, R.L. 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.3.6: 1-15. Kluwer Academic Publishers in the Netherlands.
- 18) National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Accession: NC_002714
- 19) Aakra, A. J.B. Utaker and L.F. Nes. 1999. RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: a phylogenetic approach. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**:123-130.
- 20) Mctavish, H., J.A. Fuchs and A.B. Hooper. 1993. Sequence of the *thr* gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriology*. **175**:2436-2444.
- 21) Norton, J.M., J.M. Low and G. Martin. 1996. The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrosomonas* sp. NpAV. *FEMS Microbiology Letters*. **139**:181-188.
- 22) Mendum, T.A., R.E. Sockett and P.R. Hirsch. 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the β -subdivision of the class *proteobacteria* in arable soils to nitrogen fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4155-4162.
- 23) Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**:986-994.
- 24) Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4715-4724.
- 25) 井口晃徳、塚本雄介、中村明靖、荒木信夫、山口隆司、大橋晶良、原田秀樹. 2002. RT-PCR 法で評価した硝化汚泥中の *amoA* 遺伝子の発現量と比活性との関係、第 36 回日本水環境学会年会（岡山）講演集、p.297.