

(23) 定量PCR法による*Microcylunatus phosphovor* の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用

福島 寿和^{1*}・小貫 元治²・佐藤 弘泰¹・味埜 俊¹

¹東京大学大学院 新領域創成科学研究科 環境学研究系 (〒277-8561 千葉県柏市柏の葉5-1-5)

²東京大学 サステナビリティ学連携研究機構 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

* E-mail: fukushima@mw.k.u-tokyo.ac.jp

*Microcylunatus phosphovor*の存在量を簡便且つ迅速に定量するために、Quenching Primer PCR法 (Qprimer-PCR) を用いて*M. phosphovor*の16S rRNA遺伝子の定量手法を確立した。PCR条件を最適化した後、活性汚泥試料から抽出したDNAに対して*M. phosphovor*の16S rRNA遺伝子のみを正確にPCR増幅できていることを解離曲線解析および塩基配列解読によって確認した。異なる炭素源を与えて嫌気-好気法にて運転した5系列の実験室規模リアクター中の*M. phosphovor*の挙動を定量した結果、炭素源によって異なる挙動を示していることが確認された。また、実下水処理場においては処理方式に関わらず存在していることが確認された。

Key Words : *Microcylunatus phosphovor*, Quenching Primer PCR, 16S rRNA遺伝子, 活性汚泥, 嫌気-好気法

1. はじめに

*Microcylunatus phosphovor*は活性汚泥から単離された細菌で、好気条件下でポリリン酸を蓄積し、嫌気条件下でこのポリリン酸を用いてグルコース等の炭素源を摂取することが報告されている^{1,2)}。酢酸の利用性は無いものの、生物学的リン除去プロセス (EBPR process; Enhanced Biological Phosphorus Removal process) において主要な役割を担うポリリン酸蓄積細菌³⁾ (PAOs; Polyphosphate Accumulating Organisms) と類似した代謝能を持っており、本プロセスのモデル細菌として扱われている。

生物学的リン除去プロセスにおけるPAOsの挙動を把握するために、FISH法を用いて全細菌に対する割合とした定量評価がおこなわれている⁴⁾。しかしながら、*M. phosphovor*はグラム陽性細菌であるため、FISH法をおこなうためにリゾチーム処理を要する。すなわち、グラム陰性細菌の細胞が破壊され、汚泥中の*M. phosphovor*の正確な定量をおこなうことが困難となる。このため、生物学的リン除去プロセス中における*M. phosphovor*の挙動に関する知見は、これまであまり得られていない。

近年、標的細菌の活性汚泥中の挙動を迅速かつ簡便に把握する手法として、定量PCR法による定量方法が用い

られている⁵⁾。定量に用いるDNAを汚泥から抽出する際に、ガラスビーズ等を用いて細胞壁を破碎することによって、グラム陽性細菌においても高いDNA収率を得ることができる。このため、定量PCRを用いることにより、グラム陽性、陰性に関わらず正確な定量が可能となる。

そこで本研究では、定量PCR法のひとつであるQuenching Primer PCR法 (Qprimer-PCR)⁶⁾を用いて*M. phosphovor*の16S rRNA遺伝子の定量手法を確立した。PCR産物の解離曲線解析および塩基配列の解読により、*M. phosphovor*の16S rRNA遺伝子のみを正確に増幅していることを確認した。また検量線を作成し、定量可能範囲を決定した。

続いて、確立した定量PCR法を用いて活性汚泥内の*M. phosphovor*の挙動を定量的に評価した。5系列の実験室規模リアクターを、異なる炭素源を用いて嫌気-好気法にて運転し、各系内における*M. phosphovor*の挙動を定量することで、炭素源における挙動の違いを検討した。また、異なる処理方式の実下水処理場汚泥内における*M. phosphovor*の挙動を定量することで、処理方式における違いを比較した。

2. 材料および方法

(1) 検量線DNAの調製

凍結保存しておいた *Microbunatus phosphovoros* JCM9379 (Accession No. : D26170) からDNAをIsoil for Beads Beading (NIPPON GENE) により抽出した。抽出方法は同社のプロトコルにしたがった。得られたDNAから16S rRNA遺伝子の全長を27^{bp} (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') および1492^{bp} (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') プライマーを用いてPCR増幅した。PCR産物のDNA濃度を分光光度計 (NanoDrop ND-1000) で定量し、16S rRNA遺伝子のコピー数 (copy/μL) を算出した。そのPCR産物を滅菌蒸留水で適宜希釈して検量線DNAとして用いた。

(2) 活性汚泥試料

a) 実験室規模リアクターの運転およびモニタリング

リアクターの運転条件は、炭素源を除いて既報⁹⁾にしたがった。容量10Lの連続回分式リアクターを実験室内に設置して、排水30分、水道水流入20分、基質流入10分、嫌気工程90分、好気工程150分、沈殿60分を1サイクルとして運転した。水道水流入と基質流入の30分間に窒素パージをおこなって溶存酸素を除去した。pHはpHコントローラーによって7.0~7.2に調整した。各サイクルの排水工程において6Lの上澄みを排水することによってHRTを10時間に調整した。同様に各サイクルの好気工程の最後の30分で約300mlの汚泥混合液を引き抜くことによってSRTを約8日に調整した。なお、リアクター運転に用いた汚泥は、採取日は異なるが、都内の同一処理場の返送汚泥を用いた。

基質は表-1に示すように炭素源のみが異なる組成にて運転した。R5は酵母エキス (炭素換算で50%)、ペプトン (40%) および酢酸 (10%)、R6はグルタミン酸 (94%) および酵母エキス (6%) を炭素源とした。R7は酢酸、R8はアスパラギン酸、R9はグルコースを唯一の炭素源として運転した。

活性汚泥試料は採取後、直ちに液体窒素内に凍結保存した。また、試料を採取した時におけるリン除去状態を把握するため、リン含有率 (% MLVSS) を Standard Methods⁹⁾にしたがい測定した。

b) 実下水処理場汚泥

標準法、嫌気-好気法および嫌気-無酸素-好気法にて運転している実下水処理場の汚泥試料を、それぞれ7, 3および2試料を採取し、直ちに液体窒素内に凍結保存した。

c) DNA抽出

凍結保存しておいた活性汚泥試料からDNAをFAST DNA kit for Soil (BIO 101) により抽出した。抽出方法は同社のプロトコルにしたがった。抽出したDNAは分光光度計で濃度を測定し、5ng/μLになるように滅菌蒸留水で希釈し、定量PCRに供した。

(3) PCR条件

Quenching Primer PCR法による定量PCR法の条件検討をおこなった。BODIPYラベルしたMP81f (5'-BODIPY-CTTGCTCTTTTGATCAGTGGCG-3', 配列部位: 81-102) をフォワードプライマーとし、MP482r (5'-TCCTCTCTCTGCTCCTACCG-3', 配列部位: 482-501) をリバープライマーとした。MP81fプライマーの配列は Kawaharasakiら¹⁰⁾によって設計されたFISH用プローブを参考とし、MP482rプライマーの配列はARBソフトウェア¹¹⁾

表-1 実験室規模リアクターの基質組成

mg/L	R5	R6	R7	R8	R9
ペプトン	34.6				
酵母エキス	46.2	5.0			
グルタミン酸ナトリウム 一水和物		124.7			
酢酸			0.5		
酢酸ナトリウム 三水和物	22.7		160.0		
L(+)-アスパラギン酸ナトリウム 一水和物				120.0	
D(+)-グルコース					100.0
塩化カルシウム 二水和物	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
塩化マグネシウム 二水和物	45.4	45.4	45.4	45.4	45.4
塩化カリウム	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
塩化アンモニウム	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8
硫酸アンモニウム	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8
リン酸水素二カリウム	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
リン酸二水素カリウム	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
アリルチオ尿素	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

を用いて設計した。PCR反応液 (20 μ L) の組成は、1.0U KOD ϕ -plus, 1 $\times$ PCRバッファー, 0.2mM (each) dNTP, 1mM MgSO₄, 25 μ g/ μ L BSA, 0.1 μ M (each) プライマーとし、各濃度の検量線DNAもしくは50ng DNAを添加した。PCR反応はLightCycler (Roche) を用いて、94°C5分の熱変性の後、94°C15秒, 62°C30秒, 68°C30秒のサイクルを40回おこない、最後に68°C5分で伸長をおこなった。

(4) 解離曲線解析および塩基配列解読

滅菌蒸留水をDNAの代わりに添加した陰性対照および活性汚泥試料から抽出したDNAに対して解離曲線解析をおこなった。PCR反応に続いて、95°C30秒, 40°C120秒の反応の後、0.1°C/秒の割合で95°Cまで升温し、連続的に蛍光を検出した。この結果から、LightCycler Software version 3.5 (Roche) を用いて解離曲線を作成した。

また、PCR産物のプライマー部位を除く領域 (塩基長は357bp) における塩基配列を解読し、*M. phosphovoros* の16S rRNA遺伝子のみを正確にPCR増幅できていることを確認した。なお、シーケンシング反応にはABI Big dye terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) およびMP482rプライマーを用いた。シーケンサーはオートシーケンサーABI3100 (Applied Biosystems) を使用し、それぞれ同社のプロトコルにしたがった。

(5) *Microtholatus phosphovoros* の16S rRNA遺伝子の定量

検量線作成には10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ copies/reactionの検量線DNAを用いた。検量線DNAおよび活性汚泥試料の測定結果はMacro for LightCycler Ver 2.2 for win (J-Bio 21) を用いて解析した。

DNA抽出を含む全ての実験行程における定量値のばらつきを把握するため、同一汚泥を6試料用いて、*M. phosphovoros* の16S rRNA遺伝子を定量し、定量値の変動係数を求めた。変動係数は、6試料の定量結果における標準偏差を平均値で除することで求めた。なお、その後の測定では検量線DNAおよび活性汚泥試料は全て1連にて測定した。

3. 実験結果

(1) 定量PCR法の確立

a) 解離曲線解析および塩基配列解読

活性汚泥試料から抽出したDNAおよび陰性対照に対しておこなった解離曲線解析の結果を図-1に示す。活性汚泥試料では、*M. phosphovoros* の16S rRNA遺伝子の増幅部位を示すピークのみが83°C付近に検出された。塩基配列解読の結果、PCR産物のプライマー配列を除いた領域で*M. phosphovoros* の16S rRNA遺伝子と配列が100%一致し

ていた。なお、検量線DNAに対しても同様の結果が得られた。これらの結果から、検討に用いた活性汚泥試料に対して正しくPCR増幅されていることが確認された。

一方で、陰性対照においてもPCR増幅が認められたが、解離曲線のピークは73°C付近であり、*M. phosphovoros* の16S rRNA遺伝子ではなく、異なった温度での解離であった。このPCR産物の濃度が低いため、ゲル電気泳動による検出は不可能であったが、解離温度が低いことから産物の塩基長は短く、プライマーダイマー等が生成していた可能性が考えられた。これらの結果を踏まえて、定量の際には、陰性対照のCt値よりも3.3サイクル以上高いCt値、すなわち10倍以上高い濃度を定量下限値とし、さらに解離曲線解析によって、活性汚泥試料におけるPCR増幅が正しくおこなわれていることを確認することとした。

b) 検量線の作成および活性汚泥試料における変動係数

図-2に10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ copies/reactionの検量線DNAを用いて作成した検量線を示す。この結果、R²値が0.9996と良好な結果が得られた。他の試験においても常に0.999以上の値を示していた。

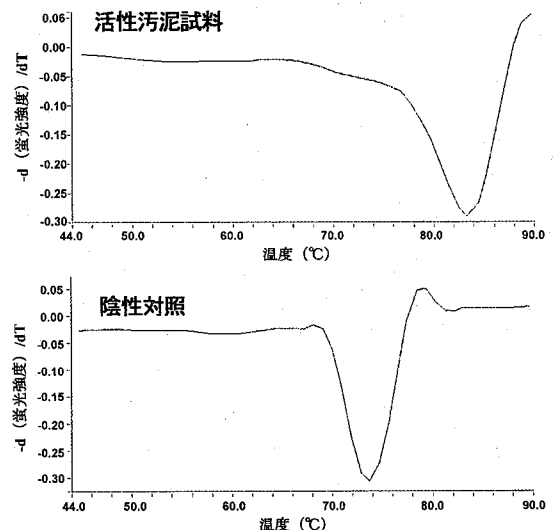


図-1 解離曲線解析結果

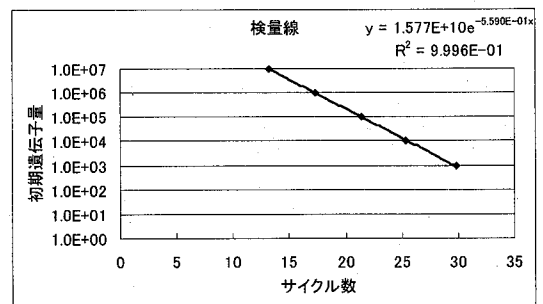


図-2 検量線

なお、陰性対照においても増幅が認められ、Ct値は36サイクル付近であった。一方、検量線DNAの最低濃度である 10^3 copies/reactionのCt値は約30サイクル付近であった。両者のCt値は3.3サイクル以上、すなわちDNA量に換算して10倍以上の差があり、前述のように異なる解離曲線を示していたことから、 10^3 copies/reactionを定量下限値とした。

また、実験行程における定量値のばらつきを把握するため、同一汚泥試料を6試料用いて算出した定量値の変動係数は12%であった。

(2) 活性汚泥試料への適用

a) 実験室規模リアクターにおける定量

表-2に各リアクターにおけるリン含有率および*M. phosphovoros*の16S rRNA遺伝子の定量結果を示す。なお、検出されたDNAは全て*M. phosphovoros*の16S rRNA遺伝子であることを解離曲線解析にて確認した。R5（酵母エキス、ペプトンおよび酢酸）、R6（グルタミン酸および酵母エキス）およびR9（グルコース）において*M. phosphovoros*の16S rRNA遺伝子が検出された。

R5では高いリン除去を示した61日目においてDNA量が最高値を示し、リン除去の状態と同様の変動を示していた。R6においてもリン除去が良好な67日目において高いDNA量を示し、123日目ではリン含有率の低下に伴いDNA量も減少した。その後162日目では、リン除去が低下しているにもかかわらずDNA量は増加し、最も高い

値となった。但し、162日目以降リン除去が回復し、187日目では7%程度までリン含有率が増加していたことから、リン除去能の復活に先立ち*M. phosphovoros*が増加していた可能性が考えられた。R9においては、DNA量が少ないものの、リン除去の状態と同様の変動を示していた。

一方でR7（酢酸）およびR8（アスパラギン酸）においては*M. phosphovoros*のDNA量は定量下限値以下であった。

以上の結果から、*M. phosphovoros*は炭素源の種類によって、その挙動が異なることが明らかになった。酵母エキス、ペプトン、グルタミン酸およびグルコースにおいてはリン含有率の上昇に伴いその存在数が増加していたが、酢酸、アスパラギン酸においては存在が確認されなかった。

b) 実下水処理場汚泥における定量

表-3に実下水処理場の処理方式および*M. phosphovoros*の16S rRNA遺伝子の定量結果を示す。全ての実下水処理場汚泥において、 10^4 copies/50ngDNA程度が確認され、検出されたDNAは全て*M. phosphovoros*の16S rRNA遺伝子であった。

各処理方式におけるDNA量の平均値は標準法で 1.6×10^4 copies/50ngDNA、嫌気-好気法で 1.8×10^4 copies/50ngDNA、嫌気-無酸素-好気法で 1.6×10^4 copies/50ngDNAと差は認められなかった。

表-2 実験室規模リアクターにおけるリン含有率と*M. phosphovoros*の定量結果
(N.D.は定量下限以下)

リアクター番号	炭素源	運転日数	リン含有率 (%/MLVSS)	<i>M. phosphovoros</i> の 16S rRNA遺伝子 (Copies/50ng DNA)
R5	酵母エキス ペプトン 酢酸	1	4.6	N.D.
		40	5.3	3.8×10^4
		61	8.4	8.1×10^4
		90	5.1	4.2×10^4
R6	グルタミン酸 酵母エキス	1	3.2	N.D.
		67	10.0	1.0×10^5
		123	7.6	2.5×10^4
		162	4.7	1.3×10^5
R7	酢酸	8	5.5	N.D.
		37	14.9	N.D.
		54	2.0	N.D.
R8	アスパラギン酸	8	3.5	N.D.
		22	6.7	N.D.
		43	0.9	N.D.
R9	グルコース	8	3.4	1.4×10^3
		22	4.2	3.7×10^3
		43	0.5	2.0×10^3

表-3 実下水処理場の処理方式と
*M. phosphovoros*の定量結果

処理方式	番号	<i>M. phosphovoros</i> の 16S rRNA遺伝子 (Copies/50ng DNA)
標準法	1	9.4×10^3
	2	1.2×10^4
	3	2.8×10^4
	4	2.1×10^4
	5	1.7×10^4
	6	1.3×10^4
	7	1.2×10^4
嫌気-好気法	8	2.1×10^4
	9	1.6×10^4
	10	1.8×10^4
嫌気-無酸素 -好気法	11	1.5×10^4
	12	1.6×10^4

4. 考察

Quenching Primer PCR法 (Qprimer-PCR) を用いて *Microtholunatus phosphovoros* の16S rRNA遺伝子の定量手法を検討した結果、活性汚泥試料に対して正確にPCR増幅をおこなっており、定量可能であることが確認された。既存の定量手法であるFISH法では正確な定量が困難であった *M. phosphovoros* を迅速且つ簡便に定量することが可能となった。

異なる炭素源を用いて運転した実験室規模リアクター汚泥における定量結果では、炭素源の種類によって存在量の明確な違いが認められた。Nakamuraら²⁾は各炭素源における嫌気状態での基質摂取能を検討し、酵母エキス、ペプトン、グルタミン酸およびグルコースは摂取していたが、乳酸および酢酸は摂取困難であったと報告している。本研究においても酵母エキス、ペプトン、グルタミン酸およびグルコースにおいては高いDNA量を示していたことから、これらの炭素源を嫌気条件下にて摂取していたと考えられる。また、リン含有率と類似した変動をDNA量が生じていたため、これらの炭素源を与えた系におけるリン除去への寄与が推察された。今後、リン染色法であるDAPI染色法とFISH法を組み合わせることによって、リン除去への寄与を確認する必要がある。一方で、酢酸およびアスパラギン酸を与えた系においては定量下限値以下であり、嫌気条件下ではこれらの炭素源を摂取困難であることが示唆された。

実下水処理場汚泥の定量結果では、処理方式による違いは認められなかった。 *M. phosphovoros* は好気条件下においても様々な炭素源を摂取可能であることから¹⁾、処

理方式に関わらず生存は可能であると考えられた。

本研究により、活性汚泥内における *M. phosphovoros* の存在量を迅速且つ簡便に測定することが可能となった。今後は、本法により *M. phosphovoros* の活性汚泥内での挙動およびリン除去への寄与がより詳細に明らかになることが望まれる。

謝辞：本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究（A）16201016）および21世紀COEプログラム（K07）の補助を受けておこなわれた。

参考文献

- 1) Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawaharasaki M., Masuda K. and Kamagata Y.: *Microtholunatus phosphovoros* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 45, No. 1, pp. 17-22, 1995
- 2) Nakamura K., Ishikawa S. and Kawaharasaki M.: Phosphate uptake and release activity in immobilized poly-phosphate accumulating bacterium *Microtholunatus phosphovoros* strain NM-1, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 80, No. 4, pp. 377-382, 1995
- 3) Seviour R.J., Mino T. and Onuki M.: The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 27, pp. 99-127, 2003
- 4) Wong M.T., Mino T., Seviour R.J., Onuki M. and Liu W.T.: In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan, *Water Research*, Vol. 39, No.13, pp.2901-2914, 2005
- 5) Vervaeren H., De Wilde K., Matthys J., Boon N., Raskin L. and Verstraete W.: Quantification of an Eikelboom type 021N bulking event with fluorescence in situ hybridization and real-time PCR, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 65, pp. 695-704, 2005
- 6) Kurata S., Kanagawa T., Yamada K., Torimura M., Yokomaku T., Kamagata Y., Kurane R.: Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 6, e34, 2001
- 7) Lane D.J.: 16S/23S rRNA sequencing, pp.115-147. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Academic Press, Chichester, England, 1991
- 8) 岡本真由子, 福島寿和, 小貫元治, 味埜俊: 単一基質で運転した生物学的リン除去プロセスにおける PCR-DGGE 法を用いた微生物群集解析と FISH 法を用いた生物学的リン除去を担う微生物の同定, *環境工学研究論文集*, Vol. 41, pp. 301-310, 2004
- 9) APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, 1998
- 10) Kawaharasaki M., Kanagawa T., Tanaka H. and Nakamura K.:

Development and Application of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide
Probe for Detection of The Phosphate-Accumulating Bacterium
Microtholunatus phosphovorus in an Enhanced Biological Phosphorus
Removal Process, *Water Science and Technology*, Vol. 37, No. 4-5, pp.
481-484, 1998

11) Ludwig W., Strunk O., Westram R. and 29 other authors: ARB: a
software environment for sequence data, *Nucleic Acids Research*, Vol. 32,
No. 4, pp. 1363-1371, 2004

(2006.5.26 受付)

Development of Quantitative PCR method for *Microtholunatus phosphovorus* and Its Application to Activated Sludge Sample

Toshikazu FUKUSHIMA¹, Motoharu ONUKI², Hiroyasu SATOH¹ and Takashi MINO¹

¹Institute of Environmental Studies, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

²Integrated Research System for Sustainability Science, The University of Tokyo

Quantitative PCR method for 16S rRNA gene of *Microtholunatus phosphovorus* was developed utilizing Quenching Primer PCR (QPrimer-PCR). PCR mixture and condition were optimized. Melting curve analysis and sequencing results revealed that only the target *M. phosphovorus* DNA were PCR amplified, without amplification of the nontarget sequences. We quantified *M. phosphovorus* in five laboratory-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) activated sludge processes fed with different carbon sources. The abundance of *M. phosphovorus* varied according to type of carbon source. In addition, *M. phosphovorus* existed in full-scale wastewater treatment plants regardless of type of treatment methods.