

B-3

担体充填型窒素除去リアクターにおける機能遺伝子の mRNA 発現量解析

長岡工業高等専門学校 ○竹林 賢、荒木信夫

呉工業高等専門学校 山口隆司

高知工業高等専門学校 山崎慎一

1. はじめに

現在、従来の排水処理プロセスと比較して維持管理が容易、狭小な施設設置面積であることから、間欠曝気式窒素除去プロセスの開発が進められている。このようなプロセスの間欠曝気運転のシーケンスはリアクターの処理性能から適宜設定されているため、処理プロセスごとに運転条件が異なっている。本研究は分子生物学的手法を用いて硝化脱窒反応に関わる菌体の生理特性を明らかにし、間欠曝気シーケンスの妥当性を検証することを目的としている。そこで通常発現から分解までの体内保持時間が短い mRNA に着目し、mRNA の発現量の定量解析を試みた。また、このような機能遺伝子の mRNA は、様々な環境因子条件により発現誘導及び制御を受けるとされている。本研究では硝化細菌群の Ammonia Monooxygenase をコードする機能遺伝子から発現される amoA mRNA と、脱窒細菌群の Nitrite Reductase をコードする機能遺伝子の nirS mRNA をターゲットとした。まず、amoA mRNA と nirS mRNA の定量法の検証を行い、溶存酸素濃度の制御による mRNA の発現量の解析を試みる。

2. 実験方法

2.1 実験装置と運転条件

本研究に用いた微生物汚泥サンプルは、硝化脱窒同時除去を目的とした担体投入型リアクターから採取した。リアクター内にはスポンジ担体と中空円筒状担体を添加し、Table.1 に示すアンモニアを主成分とした低濃度人工合成排水を流入した。また、リアクターの運転は 20℃ の恒温室内で行った。RUN1 の運転は、アンモニア酸化細菌の集積を目的として基質の連続流入・連続曝気条件を採用した。RUN 2 の運転は、脱窒細菌の優先を目的として、曝気の ON・OFF、曝気停止時における基質流入条件を設定し、押し出し型シーケンシングリアクターとして運転を行った。また、流入基質の C/N 比を 1.2 と設定した。

Table.1 人工合成排水組成表

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	5.47~16.55

2.2 抽出 RNA の逆転写反応、定量 PCR 法および PCR プライマー

リアクター汚泥からの RNA の抽出は、Bead-Beader 法により行った。amoA mRNA の定量は、逆転写酵素を用いて RNA を鋳型とした DNA の合成反応（逆転写反応）を行う RT (Reverse Transcription) -PCR 法と PCR 法に既知量の DNA competitor を投入することにより定量を可能とした Competitive PCR 法を組み合わせた。amoA mRNA (cDNA) の定量に用いた competitor は 339bp に設定した。一方、nirS mRNA の定量は、RT (Reverse Transcription) -PCR 法と Real Time-PCR 法を組み合わせで行った。PCR 反応時の増幅曲線はインターカレーター法 (SYBR Green I) により検出した。

RT 反応と mRNA の定量に使用したプライマーを Table.2 に示す。機能遺伝子の mRNA の定量は、アンモニア酸化酵素をコードする amoA 1F-amoA 2R のプライマーセットと亜硝酸還元酵素をコードする nirS 4F-nirS 6R

のプライマーセットを使用した。両機能遺伝子をターゲットとしたプライマーの有効性は、増幅産物の塩基長をキャピラリー電気泳動装置により解析を行うことで確認した。

Table.2 プライマーシーケンス

Reaction	Target	Primer Name	Primer Sequence
RT Reaction	All RNA	Random Primer	5'-NNNNNNNNNN-3'
PCR Reaction	amoA gene	amoA-1F	5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'
		amoA-2R	5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'
	nirS gene	nirS-4F	5'-TTCRTCAAGACSCAYCCGAA-3'
		nirS-6R	5'-CGTTGAACCTTRCCGGT-3'

Y=(C/T), R=(A/G), S=(C/G), K=(G/T)

2. 3 DO 制御による amoA mRNA の発現量

まず amoA mRNA 定量法の有効性を検証する目的で、Run1 汚泥を 0mM、0.1mM、1mM、10mM、50mM のアンモニア濃度で 4 日間馴養し、amoA mRNA の測定を行った。次に Run1 のスポンジ担体をサンプリングし、DO 制御条件下での回分実験を行った。本実験は、DO=5mg/L で運転を行っていたリアクタースポンジ担体を瞬時に DO=0mg/L の状態に移行し、8 時間馴養した (CASE1)。その後、曝気を再開し DO=5.0mg/L 以上に設定した系 (CASE2) と CASE1 から引き続き無酸素条件を継続した系 (CASE3) を構築した。各 CASE では、経時的に汚泥サンプルを回収し、amoA mRNA の定量に供した。DO 制御実験開始時の Run1 汚泥から回収した DNA1ng 当たりの amoA 遺伝子数は 1.8×10^5 copies であった。実験期間には DO 濃度以外の環境因子条件 (アンモニア濃度、pH、水温) は統一して実験を行った。

2. 4 NO₃ 濃度差による nirS mRNA の発現量

nirS mRNA 定量法の有効性を検証する目的で、Run2 汚泥を 100、50、0mg-N/L の硝酸性窒素濃度で 3 日間馴養し、回収した RNA をテンプレートとして nirS mRNA の定量を行った。また、実験開始時の Run2 汚泥から回収した DNA1ng 当たりの nirS 遺伝子数は 3.2×10^5 copies であった。実験期間中は、低 DO を保ち、pH、水温等の環境因子は変化させないように設定した。

3. 実験結果

3. 1 リアクター運転結果

Table.3 にリアクターの運転結果を示す。本リアクターの運転期間は約 300 日であり、運転操作条件を Run1 と Run2 に大別した。常曝気・連続基質流入条件下 (Run1) においてはアンモニア酸化率 96% を達成し、汚泥内へのアンモニア酸化細菌の集積が顕著であった。一方、Run2 においてはアンモニア酸化細菌に加え脱窒細菌も十分生育が可能となる運転条件を採用した。すなわち、リアクターのシーケンス運転は好気条件下において基質の流入を停止し、嫌気条件下のみ基質の流入を行う設定とした。アンモニア酸化率は 93% に達し、硝酸塩還元率も 60% に達した。しかし、無曝気条件での基質流入としたため、

Run2 の HRT の平均が 11.9 時間となり、Run1 の平均 HRT 5.4 時間と比較して約 2 倍の値となった。

DO 制御における amoA mRNA 発現評価実験時のアンモニア負荷は 176.4mg-N/L/day で、アンモニア酸化率は

Table.3 リアクター連続運転結果

運転条件	RUN1	RUN2
	連続曝気 連続基質流入	間欠曝気 曝気停止時の基質流入
HRT	5.13~5.68	10.80~13.09
NH ₄ 負荷 (mg-N/L/day)	172.8~178.2	72.2~87.9
NH ₄ 酸化率 (%)	69.11~96.3	84.2~93.9
NO ₃ 負荷 (mg-N/L/day)	79.0~166.3	67.8~77.1
NO ₃ 還元率 (%)	29.8~49.8	49.3~60.9
窒素除去能 (mg-N/L/day)	56.5~61.3	35.8~41.2

83%であった。また、硝酸塩濃度差における nirS mRNA 発現評価を行った時のアンモニア負荷は 86.4 mg-N/L/day、硝酸塩負荷は 72.7mg-N/L/day、硝酸塩還元率は 51.7%であった。

3. 2 DO 制御による amoA mRNA の発現量

Fig.1 はそれぞれ 0mM、0.1mM、1mM、10mM、50mM のアンモニア濃度の基質で 4 日間 (96 時間) 馴養した Run1 汚泥から回収した total RNA 1ng 中の amoA mRNA の定量結果を示す。アンモニア濃度 50mM において、 1.3×10^6 copies/ng、10mM は 5.6×10^5 copies/ng、1mM は 3.9×10^5 copies/ng、0.1mM は 1.5×10^5 copies/ng、0mM は 6.9×10^4 copies/ng となり、アンモニア濃度が濃くなるに従い、amoA mRNA の発現が誘導されるという結果が得られた。

Fig.2 は DO 濃度制御下における amoA mRNA の発現量を示した結果である。AmoA mRNA の発現量は無酸素条件下を 35 時間継続 (CASE1 8h&CASE2 27h) しても当初の 10^5 copies/ng レベルを維持した。また、8 時間の無酸素条件 (CASE1) の後、DO を回復しても amoA mRNA の発現量は有意な差は認められなかった。これは、35 時間程度の無酸素条件でも amoA mRNA の転写は制御を受けず、アンモニア酸化反応が停止した状態でも mRNA の発現が継続していることを示している。しかし、今回の実験だけではアンモニア酸化反応を促す Ammonia Monooxygenase の生成の有無は確認できないため、酵素は存在するが電子受容体の欠乏状態であるのか、翻訳段階で酵素生成が抑制されているのかについての判断は行えない。

3. 3 NO₃ 濃度差による nirS mRNA 発現量

amoA mRNA と同様に硝酸性窒素濃度の濃度変化が nirS mRNA の発現に変化を及ぼすかを検証した。硝酸性窒素濃度 100mg-N/L、50mg-N/L、0mg-N/L の基質に 3 日間馴養した結果、nirS mRNA はそれぞれ 1.1×10^2 copies/ng、 2.1×10^2 copies/ng、0 copies/ng であった。nirS mRNA は amoA mRNA と比較して検出効率が小さく、100mg-N/L、50mg-N/L の基質に馴養したサンプルについても 10^2 copies/ng レベルの発現しか見られなかった。サンプルからは十分な RNA が回収されている。また、本実験で用いたプラマーセットを用いて同じ汚泥から回収したゲノム DNA を増幅した結果、nirS 遺伝子の増幅は良好に行われていた。nirS mRNA の定量が上手く行かなかった原因としては、汚泥内の脱窒素細菌の nirS mRNA の発現量が微少であったためと推測しているが、今後 nirS mRNA の定量法の改良も踏まえて検討する予定である。

4. まとめ

硝化ラ bior アクターで馴養した汚泥サンプルに対し DO 濃度制御実験を行った結果、35 時間の無酸素条件においても汚泥から回収した amoA mRNA は DO が存在する条件と変化しなかった。したがって、amoA mRNA は DO による誘導・制御を受けないことが明らかとなった。

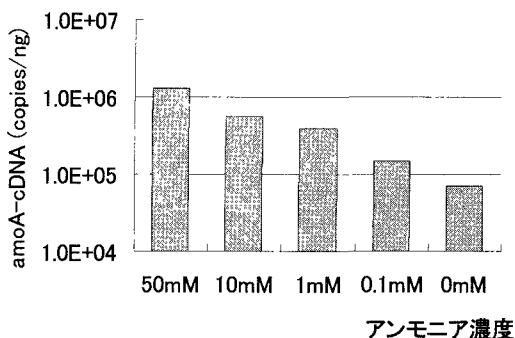
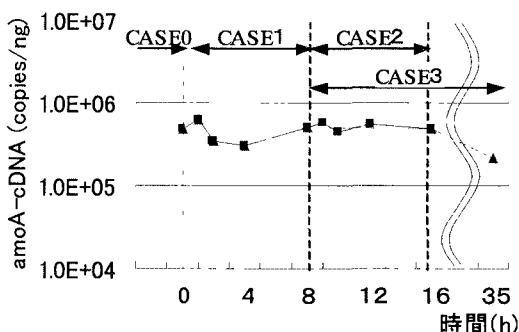


Fig.1 各NH₃濃度で発現したamoA mRNA量



CASE0 : DO濃度 5.0mg/L (リアクター内)
CASE1 : DO濃度 0 mg/L
CASE2 : DO濃度 5.0mg/L
CASE3 : DO濃度 0 mg/L (CASE1からの継続)

Fig.2 DO濃度制御下のamoA mRNA発現量