

B - 4

分子生物学的手法を用いた脱窒細菌の定量法の開発

長岡工業高等専門学校 ○塚本 雄介 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
三機工業 長野 晃弘

1. はじめに

生物学的排水処理プロセスの高度・安定化を図るために分子生物学的手法を用いてプロセスに関わる微生物群を解析しようとする試みが注目されている。硝化脱窒プロセスにおいては脱窒細菌が系統的に極めて多様であるために分子生物学的な手法の適用が難しい。しかし近年、亜硝酸還元酵素をコードする *nir* 遺伝子の情報を利用した PCR 法が確立され、多種の脱窒細菌が一種の PCR プライマーで検出することが可能となった。本研究では遺伝子の定量的手法である Real Time PCR 法を用いて、*nirS* 遺伝子の定量を行うことで、脱窒細菌の定量法の開発を試みた。また *nirS* 遺伝子をターゲットにした定量系の妥当性を評価するために PCR-DGGE 法を用いて活性汚泥等の脱窒細菌優先菌種の特定を行った。

2. 研究方法

2. 1 DNA 抽出

脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri*-*denitrificans*(IFO13596), *Pseudomonas stutzeri*(IFO3773), *Pseudomonas aeruginosa*(IFO3080)の3種には ProteinaseK を用い、下水処理場から採取した活性汚泥等、実サンプルには bead beater 法を用いて DNA 抽出を行った。

2. 2 脱窒細菌定量のための PCR 法

nirS1F-6R 及び *nirS4F-6R* のプライマーセットを用いた MPN-Nested-PCR 法を PCR 反応液中の DNA 鋳型量(以後鋳型量)を揃えた3種の純菌 DNA に適用し、同様の実験を *nirS4F-6R*, *nirScd3F-4R* の二つのプライマーセットを用いた Real Time PCR 法でも行なった。また Real Time PCR では都市下水処理場活性汚泥(以後活性汚泥)と都市下水処理場脱窒素槽汚泥(以後脱窒素槽汚泥)から抽出した実サンプル DNA でも *nirS*-DNA の測定を行い、さらに *nirS* の定量値と汚泥の脱窒素能との関係を明らかにするために、3.8L 容量のスポンジ担体投入型のラボスケール窒素除去リアクターから採取したスポンジ担体汚泥(以後スポンジ担体汚泥)より回収した DNA を用いた。

2. 3 PCR-DGGE 法を用いた汚泥中脱窒細菌優先菌種の特定

1) 集積培養

上述のリアクターより採取したスポンジ担体汚泥、脱窒素槽汚泥、活性汚泥をサンプルとし脱窒細

菌集積培養を行なった。集積培地は 20mgNO₃-N/L に設定し、植え継ぎは3日おきに行なった。炭素源には都市下水初沈越流水を濃度調整して添加した。

2) PCR-DGGE 法による優先菌種の特定

16SrDNA をターゲットとし、GC クランプ付きの EUB341f 及び UNIV907r のプライマーセットを用いて、各集積培養系汚泥から抽出したサンプルの PCR 増幅を行い、アクリルアミド濃度6%、変性剤濃度勾配30~50%、泳動条件130V、4時間で電気泳動を行った。電気泳動後ゲルから集積培養が進むにつれて蛍光輝度が強くなったバンドを切り出し、PCR による再増幅、精製を行ない、マルチキャピラリーDNA 解析システム CEQ2000(BECKMAN COULTER)を用いて塩基配列を決定した後、系統解析を行なった。

3. 研究結果

3. 1 脱窒細菌定量のための PCR 法

3種の純粋菌株から回収したDNAを鋳型としMPN-Nested-PCR法で1ngあたりの遺伝子数を測定した結果*P.stutzeri*と*P.aeruginosa*の間で3オーダー近くの差が見られた。

表1 Real time PCR法を用いた*nirS*-DNAの測定結果と使用プライマー

Target	<i>nirS</i> 4F-6R (copies/ng)	<i>nirS</i> cd3F-4R (copies/ng)
<i>P.stutzeri</i> - <i>denitrificans</i>	7.77×10^{-5}	3.37×10^{-5}
<i>P.stutzeri</i>	1.71×10^{-5}	1.32×10^{-5}
<i>P.aeruginosa</i>	1.80×10^{-6}	2.64×10^{-5}
脱窒汚泥	5.35×10^{-5}	non-specific
活性汚泥	1.04×10^{-5}	non-specific

この結果は使用したプライマーが混合塩基を含む degenerate primer であること、通常の PCR 反応装置であるサーマルサイクラーの増幅感度が比較的小さいこと、通常の PCR チューブでは primer やターゲット DNA がチューブの壁面に吸着してしまうことが原因として考えられる。MPN-Nested-PCR 法は菌種による定量効率の差が大きく脱窒細菌の定量には適さないと判断した。

定量的 PCR 法である Real time PCR 法に *nirS*-DNA 増幅用の二種のプライマーセットを用いて、純粋菌株から回収した DNA 及び実サンプル DNA の定量効率の比較を行った。評価結果を表1に示す。*P.stutzeri* と *P.aeruginosa* の測定値の差は1オーダーにまで縮まった。通常のサーマルサイクラーを用いたPCRでは*P.stutzeri*DNAを増幅することができなかったことを考えると、Real time PCR 法は増幅感度が極めて高いと考えられる。遺伝子の定量は通常オーダーレベルでの評価が一般的であり、この1オーダーの差は脱窒細菌の多様性を考慮すれば優位な差ではないと考えられる。

次に *nirS*cd3F-4R のプライマーセットを使用した際の測定結果では *P.stutzeri*-*denitrificans* と *P.stutzeri* の測定値の差は約3倍

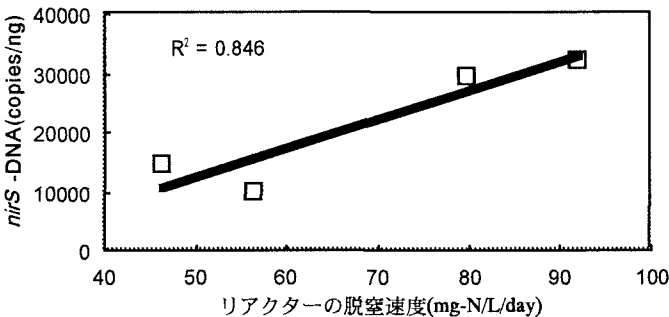


図1 *nirS*-DNA copiesと脱窒能力の関係

にまで縮まった。しかし、脱窒汚泥と活性汚泥から抽出した DNA の PCR 産物に蛍光輝度が強い非特異的増幅が確認された。最適 PCR 反応条件を検討したが、PCR 産物の非特異的増幅は消失できなかった。この結果から Real time PCR 法を用いた際に *nirS*-DNA をターゲットとし、脱窒細菌数を定量する上で *nirS*4F-6R のプライマーセットが有効と判断した。

図 1 は担体投入型のラボスケール窒素除去リアクターの処理性能から評価した脱窒素速度と汚泥サンプルから回収した DNA 1ng 当たりの *nirS* 遺伝子のコピー数の関係を示したものである。1ng 中の *nirS* 遺伝子数は汚泥中の脱窒素細菌が占める割合を示すものである。両者には比較的良好な相関関係が認められ、回収 DNA 中の *nirS* 遺伝子数が汚泥の脱窒能を評価する指標となることが示された。

3. 2 PCR-DGGE 法を用いた汚泥中脱窒細菌優先菌種の特定

図 2 は脱窒集積培養を行った各汚泥の PCR-DGGE 結果である。レーンの上の数字は集積段階を示し、集積段階が進むに連れ、蛍光輝度が強くなっていったバンドは脱窒細菌と考えられる。それぞれのバンドのシーケンスデータは表 2 に示した。Identity は Closest relative のものを示し、Closest species には菌種が特定されているものの中でバンドのシーケンスデータと相同性最上位のものを示した。今回得られた各バンドの相同性最上位の菌は単離されているものが少なく、*nirS* を持っているかどうか確認することはできなかったが、活性汚泥や脱窒槽汚泥のメジャーバンドである C や F のバンドの菌の近縁種 (*Thauera selenatis* , *Thauera sp.T1* , *Thauera aromatica* strain 3CB2 等) は *nirS* を保有しており、*nirS* を用いた定量系が本研究で用いた 3 種の汚泥中の脱窒細菌のポテンシャルを評価する上で有効な手法であると考えられる。

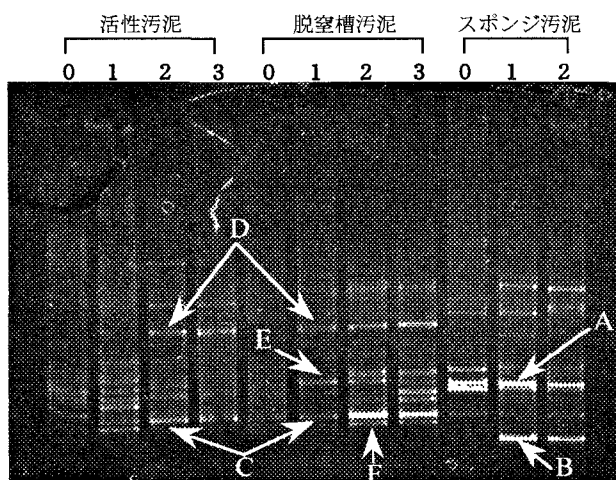


図 2 集積培養汚泥 DGGE 結果

表 2 DGGE Sequence similarities

Band	Closest relative	Closest species	Identity
A	<i>Beta proteobacterium</i> OS-9	<i>Variovorax paradoxus</i>	497/500(99%)
B	<i>Uncultured bacterium</i> clone Blvii28	<i>Bacteroides distasonis</i>	524/564(92%)
C	<i>Thauera sp. S2</i>	<i>Thauera selenatis</i>	521/521(100%)
D	<i>Uncultured bacterium</i> mle 1-2	<i>Bacteroides merdae</i>	556/557(99%)
E	<i>Uncultured bacterium</i> partial IA-11	<i>Clostridium sticklandii</i>	531/532(99%)
F	<i>Uncultured beta proteobacterium</i> SBR1022	<i>Thauera aromatica</i>	359/360(99%)