

B-7 環境因子の変動による活性汚泥内の脱窒素細菌の亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* mRNA 転写特性

長岡工業高等専門学校
豊橋技術科学大学
呉工業高等専門学校
高知工業高等専門学校

○米村 宏 塚本 雄介 荒木 信夫
竹林 賢
山口 隆司
山崎 慎一

1. はじめに

現在、下排水に含まれる窒素化合物の除去には生物学的窒素除去法が広く用いられている。生物学的窒素除去では、好気的な硝化反応と嫌気的な脱窒素を連携させて処理を進行させる必要がある。したがって、硝化細菌や脱窒素細菌は溶存酸素や基質濃度のストレスを短時間で繰り返し受けることになる。本研究は、窒素除去プロセス中の脱窒素細菌に注目し、DO や基質濃度といった環境条件の数時間での変化によって脱窒素細菌が *in-situ* においてどの程度の影響を受けるかを機能遺伝子の mRNA 転写量より評価するものである。機能遺伝子としては脱窒素細菌が有する亜硝酸還元酵素 (Nitrite Reductase、以後 *nir* と略す) をコードする *nirS* 遺伝子を標的とした¹⁾。脱窒素細菌内では硝酸塩イオン (NO_3^-) から亜硝酸塩イオン (NO_2^-)、酸化窒素 (NO)、亜酸化窒素 (N_2O)、窒素ガス (N_2) へと連鎖的に反応が進行するものである¹⁾。*nir* 酵素は、亜硝酸塩イオンから酸化窒素へのステップを触媒し、*nirS* と *nirK* が存在する^{1) 2)}。

2. 研究方法

2. 1 ラボスケールリアクターの運転条件

本研究に用いた脱窒素汚泥サンプルは、窒素除去を目的としたスポンジ担体投入型ラボリアクターから採取した。リアクター容積は 3.2L で、リアクター内には 1cm 角のスポンジ担体を投入し、Table 1 に示す硝酸塩と酢酸ナトリウムを主成分とした低濃度人工排水を流入させ、生成窒素ガスをエアポンプで循環することによりリアクター内を攪拌するようにした。

Table 1 人工合成排水組成	
Composition	g/100L
NaNO_3	24.28
CH_3COONa	20.69
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.67
NaCl	1.01
KCl	0.47
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.47
$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.67
NaHCO_3	93.72
Trace Element	1mL/100L
Yeast Extract	1

2. 2 RNA の抽出、逆転写反応、定量 PCR 法および PCR プライマー

リアクター内スポンジ担体から採取した汚泥は pH5.1 buffer (50mM Sodium Acetate, 10mM EDTA-2Na) にて基質洗浄を行った後、直ちに RNA later (Ambion) へ浸透させ RNA の分解を防止した。RNA 抽出は ISOGEN (Nippon Gene) を用いた Bead-Beater 法にて行った。また RNA の抽出後にサンプルに混入している DNA は測定に影響をおよぼすので DNase 処理を行った。*nirS* mRNA の定量は、まず逆転写酵素 AMV Reverse Transcriptase (TaKaRa) を用いて RNA を鋳型とした DNA の逆転写反応を行い cDNA を合成した。RT では *nir* をコードする機能遺伝子 *nirS* に特異的な *nirS* 6R を用いた。その後、逆転写させた *nirS* cDNA をテンプレートとして、*nirS* 遺伝子数を Smart Cycler を用いた Real Time PCR 法により測定した。Real Time PCR 法の蛍光取得法として SYBR Green I を用いたインターカレーター法を採用した。PCR プライマーは *nirS* 4F-*nirS* 6R を使用した³⁾。Table 2 にそれらの *nirS* 4F-*nirS* 6R の塩基配列を示す。RT-PCR 法と Real Time PCR 法を組み合わせ、逆転写反応した cDNA を定量することにより転写された *nirS* mRNA の発現量を追跡

した。Real Time PCR 法では、融解直線解析および得られた増幅産物のキャピラリー電気泳動装置により、特異性を確認した。*nirS* mRNA

は、サンプルから回収した total RNA 1ng 中の *nirS* mRNA のコピー数とした。

Table2 Primer Sequences		
Target	Primer Name	Primer Sequence
nir	<i>nirS</i> -6R	5'-TTCRTCAAGACSCAYOOGAA-3'
	<i>nirS</i> -4F	5'-CGTTGAACCTTROC GGT-3'

2. 3 NO₃ 及び NO₂ 基質での *nirS* mRNA 転写特性試験

亜硝酸塩及び硝酸塩基質が本実験に供する脱窒細菌の *nirS* 遺伝子を転写誘導するかを確認するために、亜硝酸塩及び硝酸塩を主成分としたそれぞれの基質で *nirS* mRNA 転写特性を評価した。脱窒素ラボスケールリアクターから脱窒素細菌の集積が十分進行しているスポンジ担体を数個採取し、1L 三角フラスコに無基質条件で 12 時間の馴養を行い、その後、亜硝酸塩及び硝酸塩を主成分とした基質を投入して、*nirS* mRNA の発現量を経時的に追跡した。培地の基質濃度はそれぞれ 200mg-N/L で、濃度が一定になるように、適宜 10 倍濃度基質を添加して調整した。サンプルは、基質の供給開始から 0、1、3、5、10、24 時間経過したものを採取した。また、嫌気条件の維持と担体の攪拌のために窒素ガス曝気を行い、20℃の恒温室内で実験を行った。脱窒素反応により pH が上昇した場合、6N HCl を用いて pH の調整を行った。

2. 4 DO 変動による *nirS* mRNA 転写特性試験

溶存酸素 DO 濃度の変動が *nirS* mRNA の転写特性に及ぼす影響を把握するために、DO の制御実験を行った。約 300 個のスポンジ担体を用いて、1 フェーズを 8 時間、合計 3 フェーズ (24 時間) のバッチ実験を行なった。各 Phase 開始時にバッチ的に硝酸塩基質の供給を行い、80mg-N/L、C/N 比 1.5 になるように調整した。Phase1、Phase 3 では窒素ガスで曝気をし、嫌気条件下を保つようにした。Phase 2 では窒素ガスでの曝気を中止し、エアポンプでエアレーションを行い、リアクター内を好気条件下に保持した。各 Phase の 0、1、3、5、8 時間経過時に *nirS* mRNA 測定用のサンプルと培地の硝酸塩および亜硝酸塩濃度を測定した。脱窒素反応により培地の pH が上昇するため、6N HCl を用いて pH の調整を行い pH7.0 ~8.5 の範囲に保つようにした。

3. 実験結果

3. 1 NO₃ 及び NO₂ 基質での *nirS* mRNA 転写特性

Fig.1 は亜硝酸塩及び硝酸塩を基質として、脱窒素汚泥を培養した場合の汚泥中の *nirS* mRNA の変化を示したものである。脱窒素細菌は *nirS* 遺伝子もしくは *nirK* 遺伝子のどちらかを有しているが、本研究で馴養した脱窒素汚泥には少なからず *nirS* 遺伝子を有する脱窒素細菌が存在していると判断した。12 時間の飢餓によって汚泥中の *nirS* mRNA は 10³ copies/ng-total RNA レベルであったものが、基質の供給から 1 時間後にはほぼ 10⁵ copies/ng レベルにまで急上昇した。これは明らかに基質の供給によって *nir* 酵素の発現が誘導され、*nirS* mRNA が転写されたことを示している。その後、*nirS* mRNA は 10⁴-10⁵ copies/ng の転写量を維持した。*nir* 酵素の基質である亜硝酸塩と直接的には *nir* 酵素の基質とはならない硝酸塩を比較すると、亜硝酸塩を基質として添加した方が *nirS* mRNA の転写量が大きかった。しかし、亜硝酸塩に還元された後に *nir* 酵素の基

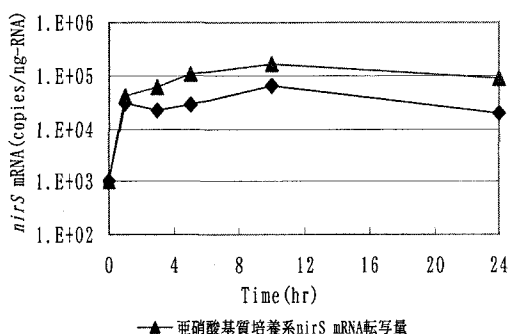


Fig.1 NO₃, NO₂ 基質における *nirS* mRNA 転写量

質となる硝酸塩を基質とした系においても、*nirS* mRNA の転写は即座に誘導されていた。

3. 2 DO 変動による *nirS* mRNA 転写特性

Fig.2 に DO 変動実験における硝酸塩濃度および *nirS* mRNA 転写量の経時変化を示す。この実験では飢餓期間を設けていなかったため *nirS* mRNA は開始当初より 10^5 copies/ng-total RNA の転写量を示していた。嫌気条件が維持され、86mg-N/L の硝酸塩が添加された Phase1 では脱窒素反応は速やかに進行し、硝酸塩は約 4 時間で 8mg-N/L まで減少した。この Phase では *nirS* mRNA は当初のコピー数 10^5 copies/ng レベルを保持した。窒素ガス曝気からエアレーションに変更し、培地内を好気条件に変えた Phase2 では、速度が小さいながら脱窒素反応が進行した。硝酸塩は 8 時間で 85mg-N/L から 22mg-N/L に減少した。これは脱窒素細菌がスポンジ担体の内部にまで増殖しており、培地が好気条件であったにも関わらず担体内部が嫌気条件に維持され、脱窒素反応が発生したものと考えられる。しかし、この Phase2 では *nirS* mRNA は 10^3 copies/ng レベルにまで減少した。したがって、*nir* 酵素の発現は培地の DO (好気条件) によって抑制されるものと判断できる。これは、脱窒素細菌を *nir* 酵素が失活するような期間にわたって好気条件で培養した場合、脱窒素反応が進行するような嫌気条件に戻しても酵素の発現のための誘導期が発生することを示唆している。再度嫌気条件に戻し、硝酸塩基質を供給した Phase3 ではまったく遅滞を生ずることなく脱窒素反応が進行し、*nirS* mRNA も即座に転写されるものであった。Phase3 における脱窒素速度は Phase1 の約 2 倍であったが *nirS* mRNA の転写量はほぼ同じ値を示した。

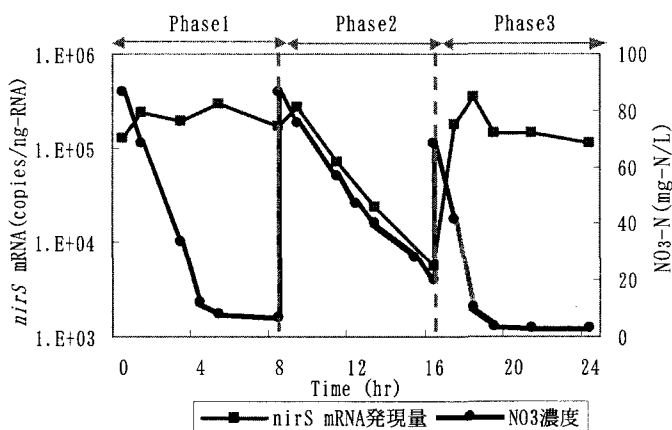


Fig. 2 NO₃-N 経時変化, DO 変動による *nirS* mRNA 転写量

4. 結論

本研究の結論をまとめると以下のようになる。

- 1) Real Time RT-PCR 技術を用いることにより脱窒素汚泥から *nirS* mRNA を定量することができた。
- 2) 脱窒素汚泥に硝酸塩および亜硝酸塩を添加したところ、亜硝酸塩を基質にした方が *nirS* mRNA の転写量が大きかった。だが、硝酸塩を添加した場合も速やかに *nirS* mRNA は転写されるものであった。
- 3) 脱窒素汚泥を好気条件にさらすと *nirS* mRNA の転写量は減少した。
- 4) 脱窒素速度と回収 RNA 量あたりの *nirS* mRNA 転写量には相関関係が認められなかった。

参考文献

- 1) Zumft, W.G., Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, p.533-616 (1997)
- 2) Braker, Get al.; Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Bacteria in Pacific Northwest Marine sediment Communities. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2096-2104 (2000)
- 3) Braker, Get al.; Development of primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3769-3775 (1998)