

好気性脱窒活性を推測するための Nap-mRNA の定量

長岡工業高等専門学校	非会員	○末武沙樹
長岡工業高等専門学校	正会員	川上周司
長岡工業高等専門学校	非会員	上村光輝
香川工業高等専門学校	正会員	荒木信夫
金沢大学	非会員	早川杏珠

1. 背景と目的

アンモニア態窒素の生物学的窒素除去には硝化と脱窒の2工程で行われている。前者は好気性条件下で、後者は嫌気性条件下で制御され、一般的には二つの反応槽を必要としていた。しかし、中国の研究グループを中心に硝化と好気性脱窒を同時に行う好気性脱窒細菌が発見され、その利用が期待されている。この好気性脱窒細菌を用いた窒素除去を用いれば1つの反応槽で硝化脱窒を行うことが可能であると期待される。また、好気性脱窒細菌の多くは、好気条件では好気性脱窒を行うが嫌気条件下でも通常の脱窒反応を行うことが知られている。したがって、既存のA20法や好気槽内の微小な嫌気領域など、嫌気と好気環境が複雑に移行する環境では嫌気的な脱窒と好気的な脱窒が頻繁に入れ替わっていることが予想される。これまで嫌気性の脱窒のみが脱窒に関与してきたと考えると、好気性脱窒の寄与を無視しており脱窒活性を過小評価してきた可能性が考えられる。我々は両反応の切り替わりを追跡し、脱窒反応における好気性脱窒の寄与率を推定する技術の開発を目的に研究を進めている。

好気性脱窒反応は未だ未開な部分も多数存在するが、ペリプラズムの外側に位置するペリプラズム硝酸還元酵素 (Nap 酵素) の関与が重要であることが示されている。この酵素は酸素耐性があり、好気条件下でも脱窒反応を進行させることが可能になると考えられている。本研究ではこの Nap 酵素の Nap-mRNA の有無を追跡することで好気性脱窒の寄与率を推測できないかと考えた。そこで、この Nap-mRNA を定量 PCR で検出、定量する技術を構築し、脱窒反応における好気性脱窒の寄与率を推定する技術の開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 プライマーの選定

NapA 遺伝子を増幅させる PCR プライマーに NapA-F, NapA-R¹⁾, NapA 3zF, NapA 3zR²⁾, 及び V16, V17 3) を採用した。また、RNA 抽出の是非を調べるために rRNA を増幅させるプライマーに EUB338, 907r を用いた。

2.2 振盪培養実験

滅菌済みのコニカルフラスコに Denitrification Medium (DM) 培地を 190mL と、好気性脱窒菌である *Acinetobacter* を 10⁵ cell 程度になるよう加えた。回転数 200rpm, 温度 30°C で振盪させることで好気的な環境を維持し、1時間毎に 1.5mL のサンプルを採取し、直ちに5倍量の RNeasy lysis buffer を入れた。なお、DM 培地は 1L あたりの組成を Sodium succinate 4.7g, Na₂HPO₄ · 7H₂O 2.04g, KH₂PO₄ 1.5g, NH₄Cl 0.3g, KNO₃ 0.6g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1g, Trace Element Solution 2.0mL とした。

2.3 RNA の抽出と逆転写

採取したサンプルを氷冷した PBS で2回洗浄し、遺伝子抽出キット(MORA-EXTRACT: エー エムアール社)を用いて RNA を抽出した。さらに DNase 処理を行い DNA を除去した後、PrimeScript RT-PCR Kit (タカラバイオ社)を用いて逆転写を行い complementary DNA (cDNA) を合成した。逆転写プライマーには Random 6 mers を用いた。

2.4 PCR

cDNA を 2.1 に示したプライマーを用いて PCR により増幅させた. PCR の反応条件は, いずれも 94°C で 10 分反応後, 94°C で 30 秒, 50°C で 30 秒, 72°C で 1 分を 35 サイクル実施し, 最後に 72°C で 10 分とした. 電気泳動には 2% の Agarose gel を調製し, PCR 産物を充填した. 電気泳動の後, バンドを観察した. また, 振盪培養実験前の *Acinetobacter* の純粋菌株から抽出した DNA を用いて同様に行った.

2.5 水質分析

培養実験において好気性脱窒反応が起きているかを確認するために培養の前後でアンモニア態窒素, 硝酸態窒素, COD を吸光光度計 DR3900 (HACH, USA) を用いて測定した.

3. 結果と考察

3.1 RNA 抽出実験方法の確立について

リボソーム遺伝子はほぼすべての生物が保有するものであり, 生命活動の一環で常に rRNA を発現させている. そこで RNA がサンプルから十分に抽出できているかを確認するために抽出した RNA を Random 6 mer で逆転写した cDNA サンプルを対象に EUB338 及び 907r プライマーを用いた PCR を行った. 結果, 得られたバンドの位置から rRNA の発現が確認できた為, 本実験の行程で十分な RNA の抽出に成功したと判断した (データ非表示).

3.2 好気性脱窒反応の確認

水質分析の結果を図 1 に示す. NH_3 は培養の開始前と後で消失し, NO_3^- は微減した. 仮に脱窒反応が起こっていないと仮定した場合, NO_3^- は増加するはずである. 従って微減ではあるが, NO_3^- が消失したことから脱窒反応が起きていたと判断した. また振盪培養により十分な酸素が供給されていたと考え, この反応は好気性脱窒であると判断した.

3.3 好気性脱窒反応下における Nap-mRNA の検出

RNA の抽出が確認できた cDNA に対して Nap-mRNA の検出を試みた. NapA-F と NapA-R, NapA3zF と NapA 3zR, V16 と V17 のプライマーセットを用いて PCR を行ったが, いずれのプライマーを用いた場合も NapA-mRNA の増幅は確認できなかった. 一方で, 実験前の *Acinetobacter* の純粋菌株から抽出した DNA を用いて同様の PCR を行ったところ全てのプライマーペアにおいて増幅を確認しており (図 2), 実験で用いた *Acinetobacter* が NapA 遺伝子を保有することを確認した. これらの結果から, 本実験で用いた *Acinetobacter* が Nap を発現していないか, 発現していても微量であり本研究で構築した方法ではその発現を捉えることができなかった可能性が考えられた.

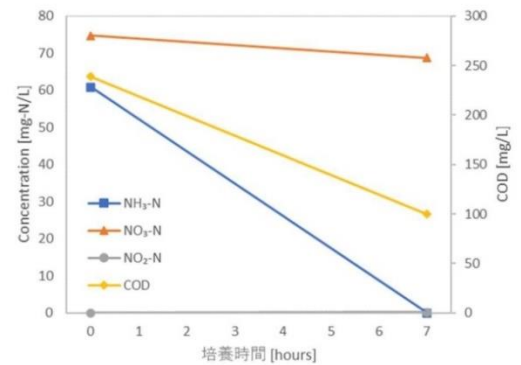


図 1 培養前後の水質分析の結果

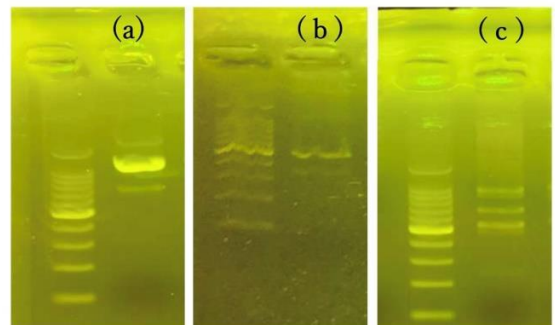


図 2 *Acinetobacter* の Nap 遺伝子の検出: 用いたプライマーは (a) napA-F, NapA-R, (b) NapA-3zF, NapA-3zR, (c) V16, V17

参考文献

1) Kong, Q.X., et al., *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 260 (2), pp. 150-155, 2006. 2) Throbäck, I.N. et al., *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 49, pp. 401-417, 2004. 3) Flanagan et al., *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 177(2), pp. 263-270, 1999.