

Real-Time PCR を用いた嫌気プロピオン酸酸化細菌のヒドロゲナーゼ発現の定量

水圏土壌環境制御研究室 中村明靖

指導教官 大橋晶良, 井町寛之, 原田秀樹

1 はじめに

今日のように、新たな環境規制が数多くあり、経済価値も変化せざるを得なくなったことから、広大な土地を必要とせず、投入するエネルギーが圧倒的に少なくさらに、廃水処理によりメタンガスという形でエネルギー回収が可能な嫌気性処理法が注目を集めている。この嫌気性処理技術で最も普及し、嫌気性廃水処理装置の約70%をも占めているといわれている UASB プロセスは35°C 付近もしくは無加温で運転されている。そして近年、新たに 55°C 付近で稼働し従来の UASB プロセスに比べ非常に高い処理性能を有している高温 UASB プロセスの開発が行われている^{1~4)}。しかしながら、高温 UASB プロセスは環境変動などによる外的ストレスに対して弱く管理維持が困難であることから、実用化には至っていない。このなかで、最も広く知られている問題としてプロピオン酸の蓄積がある。プロセスの処理能力が低下した際の多くの場合、プロピオン酸が蓄積し良好な処理が望めなくなると報告されてから 19 年が経過しようとしているにもかかわらずこの問題の良好な回避方法は未だ不明である⁵⁾。この問題の解決の糸口は、高温嫌気条件下にてプロピオン酸の分解を担っている微生物にあると考え、2000 年に世界で初めて高温嫌気条件下でプロピオン酸を酸化分解する微生物の分離がされた⁶⁾。

この高温嫌気プロピオン酸酸化細菌(*Pelotomaculum thermopropionicum* strain SI)はプロピオン酸酸化時に水素を放出し水素分圧を上昇させるため、熱力学的に水素を利用する水素資化性細菌と共生した低水素分圧環境下にしか生存できない。この微生物間では種間水素伝達共生(Interspecies hydrogen transfer)が成り立っているといえる⁷⁾。しかし現在まで、詳細な共生関係の構築状況の報告が無い。

高温嫌気プロピオン酸酸化細菌は共生細菌であり、種間水素伝達を行っていることから、水素が共生関係の鍵となっている。そこで、水素放出・取り込みを司っているヒドロゲナーゼ遺伝子の定量解析を行うことで詳細な共生関係の構築状況を把握することができ、高温嫌気性廃水処理の運転指針を提案できると予測した。

そこで、本研究では SI 株のヒドロゲナーゼ遺伝子の同定、RNA 抽出・逆転写反応の最適化を行い、遺伝子定量法を確立する。

2 SI 株のヒドロゲナーゼ遺伝子

今までに報告されているヒドロゲナーゼ-アミノ酸配列を収集し共通部位より DNA primer をデザインした。デザインした DNA primer を用い PCR 反応、クローニングを介すことで SI 株のヒドロゲナーゼ遺伝子断片を得た。その後、DNA primer の外側の塩基配列の決定も行った。決定には

LA PCR™ in vitro Cloning Kit (TaKaRa)を使用した。得た遺伝子断片は 1,761bp あった。この遺伝子断片を BLASTP search, Pfam による機能の推定、Sequence Motif Search による遺伝子に含まれている motif の推定および、GeneMark, GENETYX for MacOS.X による RBS(Ribosome Binding Sites)と開始・終止コドンの推定 (ORF 予測) を行った。

結果、[NiFe]-hydrogenase large subunit の全長(1,449 bp)と、[NiFe]-hydrogenase small subunit の一部分を獲得した。

3 Real-Time PCR を用いたヒドロゲナーゼ遺伝子の定量化

3-1 Real-Time PCR 反応条件の検討

遺伝子定量には Real-Time PCR (LightCycler; Roche)を用いた。PCR 増幅には TaKaRa Ex Taq R-PCR version kit (TaKaRa)と Table 1 に示す DNA primer を用いた。PCR の条件の至適化には、反応組成液中の Mg^{2+} 濃度およびアニーリング温度の調整を各 DNA primer セットについて行った。

Table 1 RT-PCR primers used in this study.

Target	primer	primer sequence (5'-3')	Sequence position	note	Reference
Hydrogenase of strain SI	hyd2F ver.SI	GGGGCCTTGAGATCATCTTA	116-135*		This study
	hyd3R ver.SI	GCGGTTTTTCGGCGCTAAAAT	484-503*		This study
	RT-primer ver.SI	GGAAATAACCTCCTTTATCG	588-607*	for RT	This study
mv-hydrogenase of strain ΔH	mvh-f	ATGGCTGAAGATGAC	1-15**		8)
	mvh3R	TTAAGATGATGGTTAACAG	356-374**		This study
	mvh-r	CCTTATGCTTCAGCT	414-428**	for RT	8)

*:strain SI hydrogenase-1 large subunit
**:strain ΔH mv-hydrogenase

Target	primer	primer sequence (5'-3')	Sequence position	note	Reference
16S rRNA of strain SI	DEM116f	GTAACGCGTGGATAACCT	116-133*		9)
	TGP690	CTCAAGTCCCCTCAGTTTCAA	690-709*		7)
	UNI1490R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1491-1509*	for RT**	10)
	UNI907R	CCCCGTC AATTCCTTTGAGTTT	907-928*	for RT**	11)
16S rRNA of strain ΔH	Ar109f	TGCACAATGACTCGKCA	109-125		12)
	Ar912r	CTCCCCGCCAATTCCTTTA	912-931		13)
	UNI1490R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1491-1509*	for RT	10)

*:E.coli 16S rRNA

**coculture RT by using UNI1490R and, pure culture by using UNI907R.

3-2 遺伝子定量化の検討

供試サンプルとして、プロピオン酸を主基質とした水素資化性メタン生成古細菌である *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH との共生培養系およびピルビン酸を主基質とした SI 株の純粋培養系および、水素を主基質とした *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH を用いた。ヒドロゲナーゼ遺伝子発現量を RT 反応と Real-Time PCR を用い測定した(Table 2)。その結果、Real-Time PCR を用い本研究にて決定したヒドロゲナーゼ遺伝子の定量化に成功した。16S rRNA はポジティブコントロールとして定量を行いました、ΔH のヒドロゲナーゼ遺伝子は mv-hydrogenase をターゲットとした。

Table 2 Results of quantitative analysis by R-PCR.

sample name	Target cell	16S rRNA (copies/total RNA)	hydrogenase-mRNA (copies/total RNA)
pure culture	strain SI	2.4×10^9	6.5×10^4
	strain ΔH	3.5×10^8	1.9×10^4
co-culture	strain SI	7.9×10^6	1.3×10^4
	strain ΔH	3.1×10^7	2.3×10^5

3-3 SI 株純菌の遺伝子定量

遺伝子定量が可能となったことで、SI 株の遺伝子発現のモニタリングを行った。主基質としてピルビン酸を 20mM, イーストエキストラクト 0.01%を最終濃度として添加したものを用いた。初期菌体投入量として 10^5 cell の SI 株を植種し、55 °C 静置培養した。培養開始より 12 時間毎に基質

減少量、発生ガス・生成物質、菌体量および遺伝子発現量を測定した。結果を Fig. 1 に示す。遺伝子発現量のグラフ(Fig. 1, (a))は、微生物あたりの保持 RNA コピー数で表記してある。

定量を行った結果、まず、基質減少(Fig. 1 (b))にともない微生物の増加が見られ(Fig. 1 (c))、16S rRNA およびヒドロゲナーゼ遺伝子発現量共に増加した(Fig. 1 (a))。その後、水素分圧の上昇により基質減少がストップし微生物の増殖は見られなかったが 16S rRNA 遺伝子の微生物あたりの保持量は 100 copies/cell 程度で安定した。一方、ヒドロゲナーゼ遺伝子の保持量は減少した。この結果より、微生物活性の評価を行うには 16S rRNA 解析より、ヒドロゲナーゼ遺伝子解析を行うことが望ましいと示唆された。

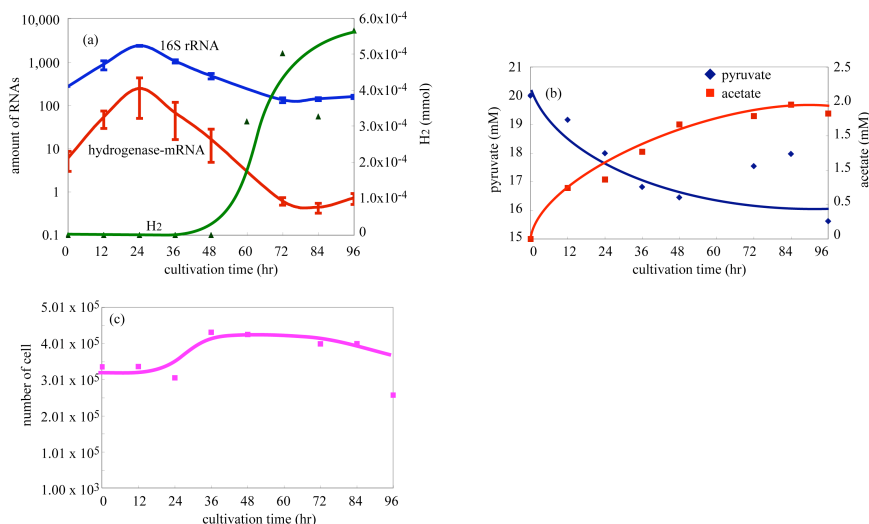


Fig. 1 (a): Quantification of gene expression and H₂ production by strain SI in pure culture; (b) pyruvate utilization in strain SI pure culture. (c): number of cell.

4 RNA 抽出手法と逆転写反応条件の検討

4-1 RNA 抽出手法の検討

RNA は微生物の活性により保持量が変化するため、絶対的な抽出効率を求めることはできない。そこで、微生物から安定して RNA が抽出できる手法を選択した。比較した手法は ISOGEN, RNeasy Mini Kit, acid phenol をそれぞれビーズビーター法と組み合わせた 3 種である。

結果、acid phenol を用いた抽出手法が最も安定して RNA を抽出することができた(Fig. 2)。他の 2 手法は微生物数の増加に伴い抽出される RNA 量が飽和してしまった。さらに、RNeasy Mini Kit は RNA 抽出量が少なかった。これは、tRNA 等の低分子 RNA の抽出には向いていないためである。しかし、mRNA 等長鎖の核酸は安定して抽出できると報告されている¹⁴⁾。

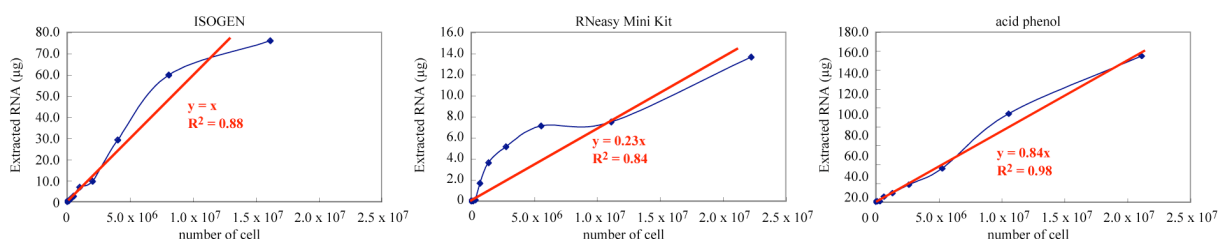


Fig. 2 Results of extracted RNA

以上結果より SI 株の遺伝子定量を行う際には acid phenol を用いた RNA 抽出を採用することが最も適していると考えられる。

4-2 逆転写反応条件の検討

SI 株の 16S rRNA とヒドロゲナーゼ遺伝子を合成した後、濃度を 10^6 copies に設定し逆転写反応温度を 60~30 °C 間で 4 °C 間隔に設定し反応を行った(Fig. 3)。逆転写反応生成物をそのまま Real-Time PCR に供した場合と(Fig. 3 (A))、逆転写反応生成物を希釈したものを供した場合(Fig. 3 (B))では逆転写効率が違う結果となった。これは、逆転写反応生成物を希釈する際に生じる希釈誤差ではないかと考えられる。しかし、反応温度の違いによる逆転写効率の変化に規則性がない結果となった。これは、逆転写反応に用いている DNA primer とその後の遺伝子定量に用いる DNA primer のポジションが関係しているのではないかと考えた。

RNA は 2 次および 3 次構造を形成する。逆転写反応は高次構造を形成している場合その箇所ですトップしてしまう。逆転写反応での中間地点で RNA が高次構造を形成していると逆転写反応がストップしてしまうためスムーズに逆転写反応が進まず、ばらつきが生じたのではないかと考え、逆転写伸張を極力短くする DNA primer を再デザインし同様の実験を行った(Fig. 4)。結果を Fig. 5 に示す。

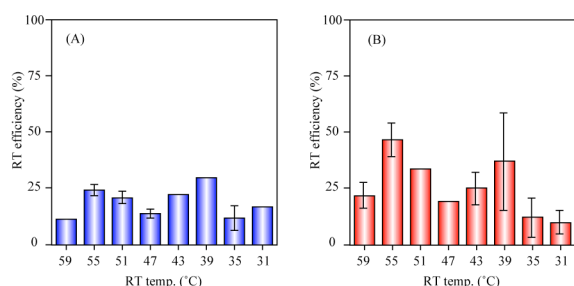


Fig. 3 RT efficiency by UN1907R primer. (A): result of quantification of non dilution RT products by Real-Time PCR. (B): result of quantification of 10 times dilution RT product by Real-Time PCR.

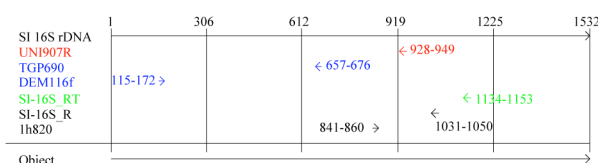


Fig. 4 Primer position

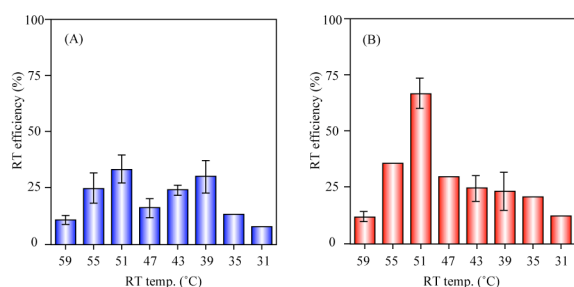


Fig. 5 RT efficiency by SI-16S_RT primer. (A): result of quantification of non dilution RT products by Real-Time PCR. (B): result of quantification of 10 times dilution RT product by Real-Time PCR.

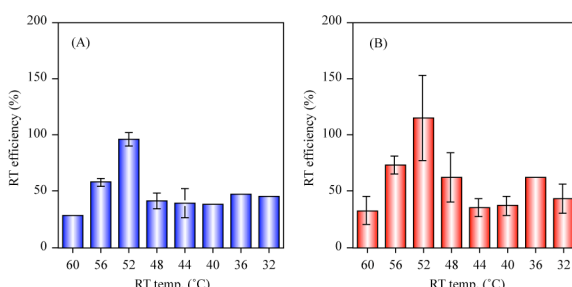


Fig. 6 RT efficiency by RT-primer ver. SI primer. (A): result of quantification of non dilution RT products by Real-Time PCR. (B): result of quantification of 10 times dilution RT product by Real-Time PCR.

この結果では、反応温度による逆転写高率に規則性が現れた、逆転写効率の上昇も確認された。このことより、逆転写反応生成物液中に遺伝子定量の PCR 反応を阻害する働きがあるため、希釈することでその阻害物質が軽減されるのではないかと予想された。また、逆転写反応とその後の遺伝子定量に用いる DNA primer の選択は重要であると考えられる。至適逆転写反応温度は 51 °C であった。

ヒドロゲナーゼ遺伝子についても同様の手順を踏んだ。逆転写反応生成物を希釈した場合(Fig. 6 (B))、16S rRNA の時と同様に逆転写効率が向上した。しかし、逆転写効率が 100%を超える結果となった。これらのことより、逆転写反応生成物の希釈は行うことが望ましいが、希釈による誤差も含まれてしまうと予測された。至適逆転写反応温度は 52 °C であった。

5 まとめ、今後の展開

ヒドロゲナーゼ遺伝子の決定および定量法が確立し、ヒドロゲナーゼ遺伝子定量が有用であることを知見として得た。ヒドロゲナーゼ遺伝子発現の解析は共生関係を解明するにあたり有用なツールになると考えられる。しかし現在のところ、遺伝子発現量の解析が完了しているのは SI 株の純粋培養系のみであり、プロピオン酸蓄積に関わる基質での調査を行っていない。

今後、様々な基質下におけるヒドロゲナーゼ遺伝子発現量を解析することが必要である。そして、本研究の最終目標であった高温嫌気性廃水処理の運転指針を提案することを目標とし研究を進めていく。

参考文献

- 1) 原田秀樹, 大橋晶良 1998. 高温条件下での嫌気グラニュール形成- “夢の超高速” 嫌気性廃水処理プロセスの実用化. 水環境学会誌 21,635-639.
- 2) 珠坪一晃 1997. 高温 UASB 反応器におけるグラニュール形成機構と保持汚泥微生物叢の生態学的構造に関する研究. 長岡技術科学大学.
- 3) 多川正, 原田秀樹, 高橋弘希, 大橋晶良, 関口勇地 1999. 新規の多段型 UASB 反応器による脂質・タンパク質含有廃水の高温嫌気性処理パイロットプラント実験. 環境工学論文集 36,431-441.
- 4) クーシヴィライ パイラヤ, 多川正, 関口勇地, 大橋晶良, 原田秀樹 2002. 多段型 UASB リアクターによる焼酎蒸留粕廃液の超高速メタン発酵処理-スタートアップ期間及び再スタートアップ期間のプロセス挙動-. 環境工学論文集 39,77-85.
- 5) Wiegant W. M., J. A. Claassen, and G. Lettinga, 1985. Thermophilic anaerobic digestion of high strength wastewaters. *Biotechnol. Bioeng.* 27:1374-1381.
- 6) Imachi H., Sekiguchi Y., Kamagata Y., Ohashi A., and Harada, H., 2000. Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3608-3615.
- 7) Wolin M. J., and T. L. Miller, 1982. Interspecies hydrogen transfer: 15 years later, p. 561-565, In ASM News.

- 8) **Luo H.-W., H. Zhang, T. Suzuki, S. Hattori, and Y. Kamagata**, 2002. Differential expression of methanogenesis genes of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum*) in pure culture and in cocultures with fatty acid-oxidizing syntrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1173-1179.
- 9) **Stubner S., K. Meuser**, 2000. Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:73-80.
- 10) **Weisburg W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane**, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
- 11) **Amann R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, and D. A. Stahl**, 1991. Molecular and microscopic identification of Sulfate-Reducing Bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:614-623.
- 12) **Großkopf R., P. H. Janssen, and W. Liesack**, 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:960-969.
- 13) **Lueders T., and M. Friedrich**, 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2732-2742.
- 14) **Xiang X., D. Qiu, R. D. Hegele, W. C. Tan**, 2001. Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum. *J. Virol. Methods.* **94**:129-135.