

DNAマイクロアレイ及び定量PCRを用いた微生物の迅速測定

大分事業所 高原 達夫・西島 裕人

1 はじめに

微生物の公定試験法である培養法は、一般的に試料を10倍毎、希釈系列を作成し、培養後コロニーの数をカウントすることにより定量する。更に得られたコロニーを種類別に分け、選択分離培養の後、確定試験により菌種の定性を行う方法である。しかし、培養法では、培地の調製等に多大な労力と特定の細菌を判別するまでに1週間前後の期間を要する。また、環境中に生育する細菌のうち、人工的条件下で純粋に培養できるものは1%以下であると推察されている。このため、従来の培養法では活性汚泥など環境中の複合微生物系を網羅的に解析することは困難であった。

近年、分子生物学的手法、蛍光染色法及び遺伝子データベースの充実により、環境中の複合微生物系を網羅的に解析できるDNAマイクロアレイ法及び定量PCR法が注目を集めている^{1, 2, 3)}。本手法は培養を伴わないため、培養困難な環境微生物にも適用可能であり、活性汚泥等の複合微生物系の微生物種を約2日間で網羅的に測定できる利点を有している。

そこで我々はこれらの手法を用い、活性汚泥による排水処理において窒素除去で重要な働きをする硝化細菌に着目し、これらの細菌種を迅速かつ網羅的に同定するシステムを構築した。更に管理データである硝化速度(*1)と比

較を行うことにより、活性汚泥中の硝化細菌のモニタリングツールとしての適用性を評価したので以下に報告する。
(*1):汚泥1kgが1時間にアンモニア態窒素何gを硝酸態窒素に硝化できるかを表す。

2 測定の原理と概要

2.1 DNAマイクロアレイ法

DNAマイクロアレイ法及びPCR法の原理を図1及び図2に示す。

DNAマイクロアレイとは検査対象

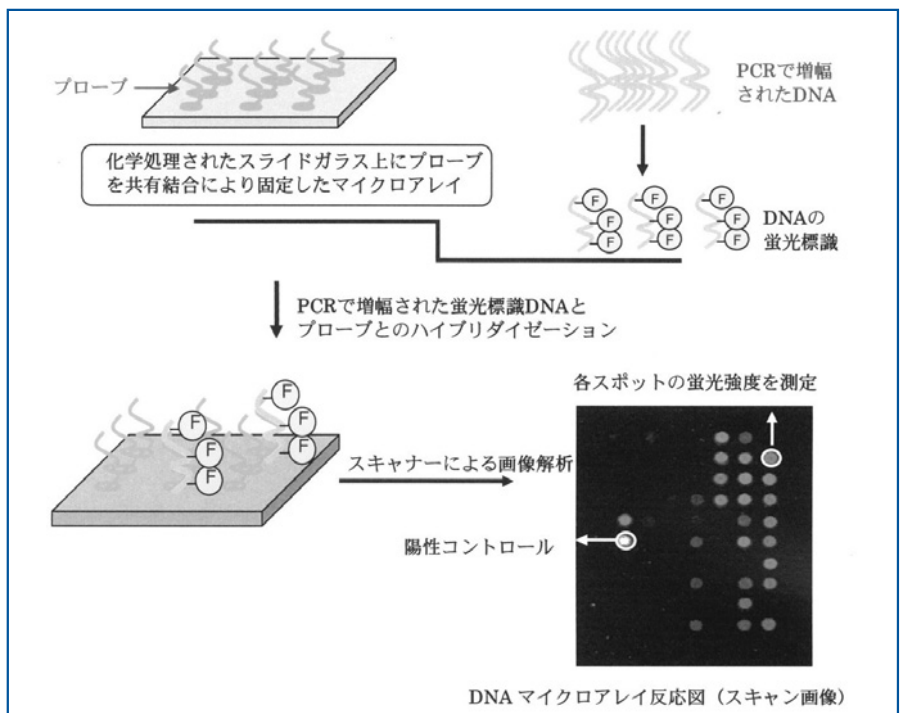


図1 DNAマイクロアレイ法の測定原理

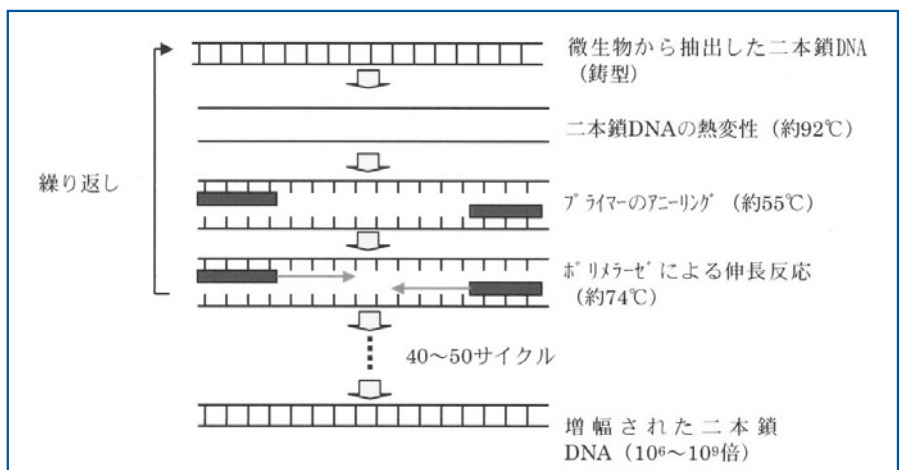


図2 PCR法の原理

菌のDNAにおける特異的領域（50塩基程度）の合成プローブをガラス板上に高密度に固定化したものである。今回使用したDNAマイクロアレイは、岐阜大学大学院医学系研究科の江崎教授らによって開発された926種の微生物検出用DNAマイクロアレイに、*Nitrobacter* 属及び *Nitrosomonas* 属等の硝化細菌のDNAプローブを新たに固定化したものを使用した^{4, 5)} (表1)。

その測定原理は、試料よりDNAを抽出し、あらかじめDNAをPCR法で増幅、蛍光標識を行った後、DNAマイクロアレイに導入する。固定化したプローブと相補的なDNA配列が一致したものが結合し、ガラス板上に固定化される。その後、未結合のDNAを洗浄除去し、用いた蛍光標識団の励起波長を照射するとプローブと結合し蛍光標識されたDNAのみ蛍光を発する。この蛍光パターンを以下の手順で解析することにより、簡易、迅速に特定微生物の検出、同定が可能となり、網羅的に菌の解析を行うことができる。

①蛍光シグナルの陽性基準：陽性スポットの全蛍光シグナルの合計値を算出し、その合計値の0.01%を閾値とする。

②硝化細菌種数：閾値以上の蛍光シグナルで各菌種のデータを抽出し算出する。

③硝化細菌の蛍光シグナルの相対強度 (%) :

$$\frac{\text{各菌種における閾値以上の蛍光シグナル}}{\text{陽性の各微生物の蛍光シグナルの合計値}} \times 100$$

2.2 定量PCR法

定量PCRとは図2のPCR法を応用したもので、検出対象菌の有無を確認するため、対象菌のDNAの特異的領域について増幅するように設計されたプライマーを用いて、遺伝子増幅を行う。対象菌が存在すれば、プライマーで対象菌のDNA増幅が可能となり、存在しなければ増幅されない。また、定量PCRでは、リアルタイムPCR装置を用いることによりDNA増幅過程が蛍光強度の変化でモニタリング可能である。試料より抽出したDNAを10～10,000倍まで4段階に希釈系列を作成し各々増幅を行う。どの希釈系列で増幅が認められるかを測定することに

より、試料中の検出対象菌を簡易、迅速かつ定量的に計測することができる。

【PCR法とは】 Polymerase Chain Reactionの略称で図2のように通常3段階のDNA合成反応を行うことにより、目的領域のDNA断片を特異的かつ大量に増幅させ、この増幅したDNAを蛍光標識により検出することができる。

3 検出対象菌

DNAマイクロアレイ及び定量PCRにおける検出対象の硝化細菌リストを表1に、環境中の窒素循環図を図3に示す。

表1 検出対象の硝化細菌リスト

	Genus (属)	Species (種)	DNAマイクロアレイ	定量PCR
アンモニア酸化細菌	<i>Nitrosomonas</i>	sp.	○	—
		<i>europaea</i>	○	○
		<i>aestuarii</i>	○	○
		<i>communis</i>	○	○
		<i>halophila</i>	○	○
		<i>nitrosa</i>	○	○
		<i>oligotropha</i>	○	○
		<i>ureae</i>	○	○
	<i>Nitrospira</i>	sp.	○	○
		<i>briensis</i>	○	○
<i>Nitrosococcus</i>	sp.	<i>halophilus</i>	○	—
		<i>mobilis</i>	○	○
		<i>oceanus</i>	○	○
<i>Nitrosolobus</i>	sp.	○	—	
亜硝酸酸化細菌	<i>Nitrobacter</i>	sp.	○	—
		<i>winogradskii</i>	○	○
		<i>alkalicus</i>	○	○
		<i>hamburgensis</i>	○	○
	<i>vulgaris</i>	○	○	
<i>Nitrospira</i>	sp.	<i>marina</i>	○	—
		<i>moscoviensis</i>	○	○
合計			25種	20種

○：検出対象， —：検出未対象

sp.：種 (species) の略称。既知の属に分類される未同定種の菌株を示すのに用いられる。

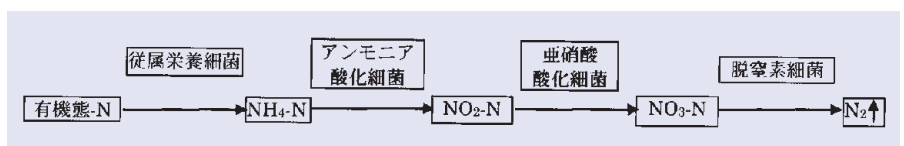


図3 窒素循環模式図

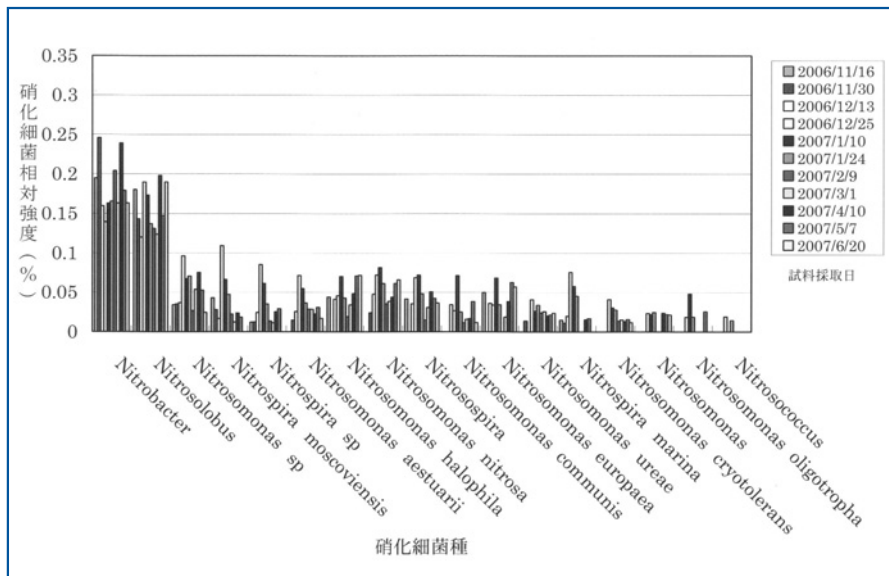


図4 測定結果(検出強度及び頻度の高い順)

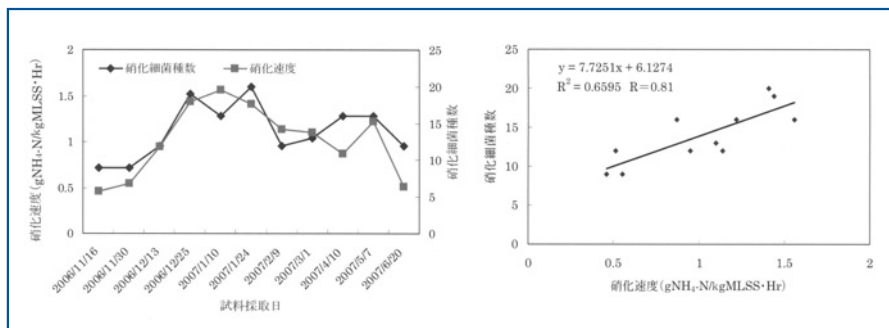


図5 硝化細菌の菌種数と硝化速度との関係

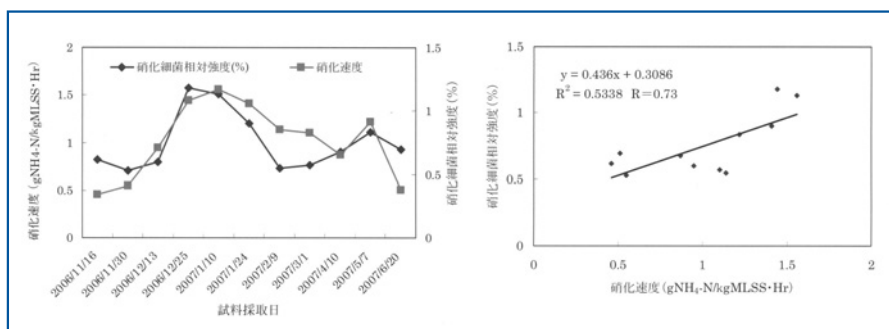


図6 硝化細菌の蛍光シグナルの相対強度と硝化速度との関係

硝化細菌はアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の2種に大別される。これらは、有機態窒素が従属栄養細菌により分解されて生成されるアンモニアを、亜硝酸及び硝酸に酸化する働きを有し、窒素循環の酸化過程として重要な役割を果たしている。

4 検討結果

4.1 DNAマイクロアレイ法

化学工場の排水処理場から、定期的に取り出した活性汚泥試料を測定した結果について、検出頻度及び蛍光強度順でまとめたものを図4に示す。

アンモニア酸化細菌である *Nitrosolobus* 属、亜硝酸酸化細菌であ

る *Nitrobacter* 属が季節や排水の種類の変動に関係なく高い蛍光強度で検出されており、これらが本活性汚泥において優先菌属であることが推察された。

管理データである硝化速度と硝化細菌の検出菌種数との関係を示したものを図5に示す。

硝化速度と硝化細菌の菌種数の増減が同様の傾向を示し、両データ間に良好な相関性が確認できた。本結果は、硝化活性が上がると硝化細菌の菌種が増えることを意味している。

更に硝化速度と蛍光シグナルの相対強度との関係を示したものを図6に示す。

硝化速度と蛍光シグナルの相対強度の増減が同様の傾向を示し、両データ間に良好な相関性が確認できた。本結果は、硝化活性が上がると硝化細菌の菌濃度が上昇することを意味している。

4.2 定量PCR法

DNAマイクロアレイと同一の活性汚泥試料について、測定した結果を表2に示す。なお、定量PCRは各試料において検査対象菌が検出、不検出の判定となり、各測定での検出範囲が狭いため、DNAマイクロアレイとほぼ同じ感度で検出された10,000倍希釈の結果を示す。

アンモニア酸化細菌である *Nitrosomonas nitrosa* 及び *Nitrosococcus oceanus*、亜硝酸酸化細菌である *Nitrobacter alkalicus* がすべての試料で検出されており、これらの細菌種が本活性汚泥において優先菌種であることが推察された。

管理データである硝化速度と本手法で検出された硝化細菌の菌種数との関

表2 測定結果 (10,000希釈)

	Genus	Species	試料採取日						
			2006/11/30	2006/12/13	2006/12/25	2007/1/10	2007/1/24	2007/2/9	2007/8/1
アンモニア酸化細菌	Nitrosomonas	<i>europaea</i>	nega	nega	nega	nega	nega	nega	nega
		<i>aestuarii</i>	posi	nega	posi	posi	posi	posi	posi
		<i>communis</i>	nega	nega	posi	posi	posi	posi	posi
		<i>halophila</i>	nega	nega	nega	nega	nega	nega	nega
		<i>nitrosa</i>	posi	posi	posi	posi	posi	posi	posi
		<i>oligotropha</i>	nega	posi	posi	posi	posi	posi	posi
		<i>ureae</i>	nega	nega	nega	nega	nega	nega	nega
	Nitrosopira	<i>sp.</i>	posi	posi	posi	nega	posi	posi	posi
		<i>briensis</i>	nega	nega	posi	posi	posi	posi	posi
		<i>multiformis</i>	nega	nega	nega	nega	nega	nega	nega
	Nitrosococcus	<i>halophilus</i>	nega	nega	nega	posi	posi	posi	posi
		<i>mobilis</i>	nega	nega	posi	posi	posi	posi	posi
		<i>oceanus</i>	posi	posi	posi	posi	posi	posi	posi
亜硝酸酸化細菌	Nitrobacter	<i>winogradsky</i>	nega	nega	nega	posi	posi	posi	nega
		<i>alkalicus</i>	posi	posi	posi	posi	posi	posi	posi
		<i>hamburgensis</i>	nega	nega	nega	nega	nega	nega	nega
		<i>vulgaris</i>	nega	nega	posi	nega	nega	nega	posi
	Nitrospira	<i>marina</i>	posi	posi	posi	posi	posi	posi	nega
		<i>moscoviensis</i>	nega	posi	posi	nega	nega	nega	nega
		検出菌種数	6	7	12	11	12	12	12

posi : 検出, nega : 不検出, 10,000希釈 検出 : 2×10^7 copy以上/mL

係を図7に示す.

DNAマイクロアレイと同様に, 硝化速度と硝化細菌の菌種数の増減とが同様の傾向を示し, 両データ間に良好な相関性が確認できた.

5 まとめ

硝化速度とDNAマイクロアレイ及び定量PCRの測定データ間に良好な相関性が認められた. このことから, 両手法が活性汚泥中の硝化細菌のモニタリングツールとして有効であることが確認できた.

6 おわりに

今後, 硝化速度等の化学的データと微生物面 (DNAマイクロアレイ法, 定量PCR法) からのデータを合わせて考えることで, 活性汚泥の定期診断, 活動度診断等への活用が考えられる. 更に定期的なデータ蓄積, 詳細な解析により, 将来的には活性汚泥不調の早期発見および排水負荷の変化による馴養状態把握など安定操業への貢献が期待される.

文 献

- 1) 江崎孝行 (2003) トピックス編7 「Realtime PCRと系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法」(バイオインフォマティクスが分かる), pp.105-111, 羊土社, 東京
- 2) 江崎孝行, 大楠清文, 河村好章 (2004) 第9章 「DNAマイクロアレイを用いた環境サンプル中の微生物群集の解析」(難培養微生物研究の最新技術-未利用微生物資源へのアプローチ-), pp.94-100, シーエムシー出版, 東京
- 3) 江崎孝行, 大楠清文 (2005) 「環境中の細菌相の網羅的解析を目指した系統アレイと病原体アレイ」SCAS NEWS 2005-II, pp.3-6
- 4) 中村洋介, 西島裕人 (2007) 第59回日本生物工学会大会講演要旨集, p.50
- 5) 安東信長, 西島裕人, 高原達夫, 岡田洋子 (2008) 第42回日本水環境学会年会講演要旨集, p.417

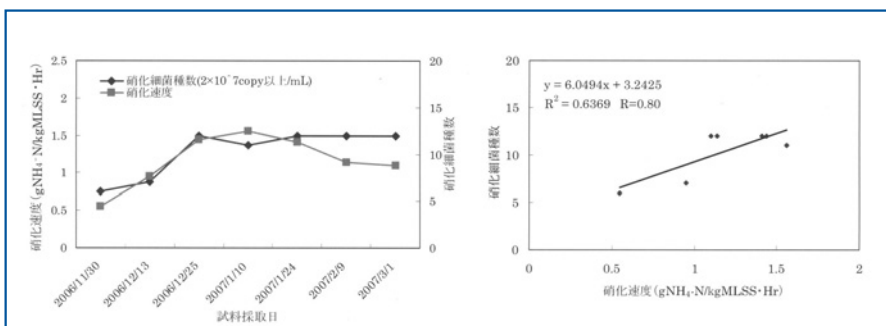


図7 硝化細菌の菌種数と硝化速度との関係



高原 達夫
(たかはら たつお)
大分事業所



西島 裕人
(にしじま ひろと)
大分事業所