

# 好気性脱窒反応時の遺伝子解析

長岡高専 非会員 吉岡水輝,長岡高専 非会員 末武沙樹,正会員 川上周司

## 1. 背景

近年, 化石燃料の燃焼や化学肥料の過剰施用, 家畜排せつ物処理などの人間活動により, アンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) や硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) などの窒素化合物が環境中に多量に放出されている。これらの化合物は, 河川や湖沼における富栄養化, 水質汚濁, 藻類の異常増殖などを引き起こし, 深刻な環境問題となっている。このような窒素汚染に対処するため, 従来は好気条件下での硝化反応と無酸素条件下での脱窒反応を組み合わせた生物学的処理法が広く利用されてきた。しかし, この方式は反応槽の分割設計や酸素濃度の精密制御, 外部炭素源の添加などが必要であり, 運転管理が煩雑でエネルギーコストが高いという課題を抱えている。

一方, 近年では酸素存在下でも硝酸や亜硝酸を電子受容体として窒素除去が進行する好気性脱窒 (aerobic denitrification) が報告されており, 注目を集めている<sup>1)</sup>。この反応は, 好気条件下において硝化と脱窒が同時に進行する現象として知られ, 同時硝化-脱窒 (heterotrophic nitrification-aerobic denitrification; HN/AD) とも呼ばれる。特に *Pseudomonas* 属をはじめとする一部の微生物において, この能力が確認されており, 従来の二段階プロセスを簡略化できる新たな窒素除去技術としての応用が期待されている。しかしながら, 好気性脱窒に関する微生物の種類や反応機構, 遺伝子発現制御に関しては未解明な点が多い。とくに, 酸素存在下での脱窒活性を担う酵素群 (napA, nirK/nirS, norB, nosZ など) の発現動態や, それらの制御機構に関しては十分な知見が得られていない。近年の報告では、好気性脱窒菌 *Pseudomonas stutzeri* において RNA-Seq を用いた解析が行われたものの, 既知の脱窒関連遺伝子の発現変化が明瞭に確認されず, 未知の遺伝子群が関与している可能性が示唆されている。

そこで本研究では, 好気性脱窒能を有する微生物を対象に, RNA-Seq 解析を用いて好気および低酸素条件下における遺伝子発現動態を網羅的に解析する。これにより, 好気条件下における脱窒反応を支える酵素遺伝子や電子伝達系, ストレス応答関連遺伝子の挙動を明らかにし, 好気性脱窒の分子機構を解明することを目的とする。本研究の成果は, 好気性脱窒を利用した新規窒素除去技術の開発およびプロセス最適化に向けた基盤的知見を提供するものである。

## 2. 実験方法

### 2.1 好気性脱窒菌の分離及び培養

本研究では, まず好気性脱窒能を有する微生物の分離および培養を行った。環境試料を採取し, BTB 溶液を添加した DM 寒天培地を用いて好気条件下で培養した。培地上でのコロニー形成時に pH 変化に伴う色調変化を指標とし, 硝酸イオンを電子受容体として利用できる菌株を選抜した。得られた候補株については, 再培養および純粋分離を行い, 以後の解析に供した。

### 2.2 好気性条件下における反応挙動の変化

次に, 分離した好気性脱窒菌を用いて反応条件下での挙動を評価した。培養は恒温インキュベーター内で実施し, 溶存酸素 (DO) 濃度を 3~5 mg/L の範囲に制御して好気条件を維持した。一定時間ごとに培養液を採取し, 硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ), 亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ), アンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ), 溶存酸素 (DO), pH などの水質項目を測定し, 窒素除去特性を評価した。

### 2.3 遺伝子発現解析による機構の解明

さらに、好気条件下で培養した菌体から mRNA を抽出し、網羅的な遺伝子発現解析を実施した。まず、全 RNA が抽出できることを RNeasy PowerSoil Total RNA Kit を用いて確認した。抽出した RNA は rRNA 遺伝子を標的とした PCR および Nap 遺伝子を標的とした PCR を行い、電気泳動の結果を持って抽出の有無を確認した。抽出を確認できた RNA はライブラリ調製を経て RNA-seq (RNA sequencing) 解析に供し、得られたリード配列を基準ゲノムにマッピングして解析を行った。これにより、好気条件下において発現変動を示す遺伝子群を特定し、好気性脱窒に関与する酵素遺伝子および電子伝達系関連遺伝子の発現動態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 好気性脱窒細菌の分離培養

DM 寒天培地を用いて好気性脱窒細菌の分離を試みたところ *Acinetobacter* 属に近縁な細菌種の分離に成功した。この株を対象に DO3~5 mg/L で制御した好気性脱窒試験に供したところ、好気条件下でのアンモニウムイオンの減少を確認できた。したがってこの株を好気性脱窒細菌だと判断し、以後の実験に用いた。

#### 3.2 RNA の抽出方法の検討

分離した *Acinetobacter* 属の細菌を用いて好気性脱窒試験を行い、その際に回収した菌体から RNA-seq に供するだけの十分な量の RNA が抽出可能か検討した。まず、RNA 抽出と逆転写を行った際に NanoDrop2000 で濃度を定量したところ RNA で 164 ng/μL, cDNA で 2670.4 ng/ μL の値を検出した。次にこの cDNA に対し rRNA 遺伝子を標的とした EUB338 及び 907r を用いた PCR を行い電気泳動を行ったところ、目的の長さのバンドを得た（図 1）。従って RNA の抽出は可能であると判断した。

次に Nap-mRNA の検出を試みた。先ほどの cDNA に対し NapA-F, NapA-R, NapA-3zF, NapA-3zR, V16, V17 のプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、NapA-F, NapA-R のプライマーセット<sup>2)</sup>で目的の增幅長のバンドが得られた（データ非表示）。したがって分離した *Acinetobacter* 属の細菌は好気性脱窒細菌が用いる Nap 遺伝子を発現していることが示唆された。



図 1 RNA の抽出の確認用いたプライマーは EUB338, 907r ペア。12,11: *Acinetobacter* から抽出した RNA, 10: Negative control.

#### 3.3 今後の展望

現在までに分離した *Acinetobacter* 属に対し好気性脱窒試験を行い、RNA の抽出までを確認した。今後は RNA-seq 解析を行い、好気性脱窒細菌がどのような遺伝子を発現しているのか網羅的に解析していきたいと考えている。

### 4. 参考文献

- 1) Yang, Jixian, Liang Feng, Shanshan Pi, Di Cui, Fang Ma, He-ping Zhao, Ang Li, A critical review of aerobic denitrification: Insights into the intracellular electron transfer, *Science of The Total Environment*, Volume 731, 2020.
- 2) Kong J, Gollub RL, Rosman IS, Webb JM, Vangel MG, Kirsch I, Kaptchuk TJ. Brain activity associated with expectancy-enhanced placebo analgesia as measured by functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci*. 11;26(2):381-8, 2006.