

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-344138

(P2004-344138A)

(43) 公開日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C O 2 F 3/34	C O 2 F 3/34	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/20	C O 2 F 3/34	4 D O 4 O
//(C 1 2 N 1/20	C 1 2 N 1/20	
C 1 2 R 1:01)	C 1 2 N 1/20	
	審査請求 未請求 請求項の数 48 O L (全 53 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-148188 (P2003-148188)	(71) 出願人	000006655
(22) 出願日	平成15年5月26日 (2003. 5. 26)		新日本製鐵株式会社
			東京都千代田区大手町2丁目6番3号
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100092624
			弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也
		(72) 発明者	新田見 匡
			東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大
			学院 新領域創成科学研究科内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】窒素除去用水処理プラントの活性汚泥中の微生物

(57) 【要約】

【課題】窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する新規微生物、及びその亜硝酸還元酵素 N i R K 及び N i R S 遺伝子の新規塩基配列の提供。

【解決手段】窒素除去に関わる微生物を、亜硝酸還元酵素 N i R K、及び N i R S 遺伝子を検出することにより、特定し、また、本遺伝子の一部の塩基配列を明らかにすることにより、上記塩基配列に基づき窒素除去に関わる微生物を特定することができる。これらの特定された微生物を含む活性汚泥を用いて新規窒素除去方法を確立することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 又は 3 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone U13* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 2】

配列番号 2 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M17* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 3】

配列番号 4、6、7、9、10、12、13、14 又は 16 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Mesorhizobium sp. 4FB11* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 4】

配列番号 5 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Alcaligenes sp. STC1* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 5】

配列番号 8 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Alcaligenes xylosoxidans* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 6】

配列番号 11 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M27* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 7】

配列番号 15 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas mendocina* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 8】

配列番号 17 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M58* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻K) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 9】

配列番号 18、33 又は 39 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus denitrificans Pd1222* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 10】

配列番号 19 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica strain AR1* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 11】

配列番号 20、22 又は 24 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 12】

配列番号 21 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *A. eutrophus* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir⁻S) 遺伝子の DNA 断片。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

配列番号 23 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Azoarcus toluovorans* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 14】

配列番号 25 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSAK4* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 15】

配列番号 26 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSAK2* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

10

【請求項 16】

配列番号 27 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone ANIS-76* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 17】

配列番号 28、29、30、36 又は 38 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone HNIS-6* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

20

【請求項 18】

配列番号 31 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus pantotrophus* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 19】

配列番号 32 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera linaloolentis* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 20】

30

配列番号 34 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica strain AR1* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 21】

配列番号 35 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera terpenica strain 58Eu* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

【請求項 22】

配列番号 37 に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas aeruginosa strain Mi11* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子の DNA 断片。

40

【請求項 23】

その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の DNA 断片の塩基配列を含み、かつ、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する微生物。

【請求項 24】

その亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子に請求項 9～22 のいずれか 1 項に記載の DNA 断片の塩基配列を含み、かつ、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する微生物。

【請求項 25】

50

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 1 又は 3 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone U13* 近縁細菌。

【請求項 2 6】

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 2 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M17* 近縁細菌。

【請求項 2 7】

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 4、6、7、9、10、12、13、14 又は 16 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Mesorhizobium sp. 4FB11* 近縁細菌。

10

【請求項 2 8】

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 5 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Alcaligenes sp. STC1* 近縁細菌。

【請求項 2 9】

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 8 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Alcaligenes xylosoxidans* 近縁細菌。

20

【請求項 3 0】

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 11 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M27* 近縁細菌。

【請求項 3 1】

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 15 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas mendocina* 近縁細菌。

【請求項 3 2】

その亜硝酸還元酵素 (N i R K) 遺伝子に配列番号 17 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M58* 近縁細菌。

30

【請求項 3 3】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 18、33 又は 39 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus denitrificans Pd1222* 近縁細菌。

【請求項 3 4】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 19 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica strain AR1* 近縁細菌。

40

【請求項 3 5】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 20、22 又は 24 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium* 近縁細菌。

【請求項 3 6】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 21 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *A. eutrophus* 近縁細菌。

50

【請求項 37】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 23 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Azoarcus toluovorans* 近縁細菌。

【請求項 38】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 25 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSAK4* 近縁細菌。

【請求項 39】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 26 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSAK2* 近縁細菌。

【請求項 40】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 27 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone ANIS-76* 近縁細菌。

【請求項 41】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 28、29、30、36 又は 38 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone HNIS-6* 近縁細菌。

【請求項 42】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 31 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus pantotrophus* 近縁細菌。

【請求項 43】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 32 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera linaloolentis* 近縁細菌。

【請求項 44】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 34 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica strain AR1* 近縁細菌。

【請求項 45】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 35 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera terpenica strain 58Eu* 近縁細菌。

【請求項 46】

その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 37 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas aeruginosa strain M111* 近縁細菌。

【請求項 47】

請求項 23～46 のいずれか 1 項に記載の微生物又は細菌を含む、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理に用いる活性汚泥。

【請求項 48】

請求項 47 に記載の活性汚泥を使用する窒素削減のための水処理方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する微生物、及びその亜硝酸還元酵素N i R K及びN i R Sの遺伝子の塩基配列、並びに上記微生物を含む活性汚泥を使用する、窒素削減のための水処理方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

都市下水や農業、畜産排水などのように、アンモニア態窒素、硝酸態窒素、亜硝酸態窒素といった窒素を含む水の処理には、硝化脱窒法が広く用いられている。しかしながら、例えばコークス炉から発生する排水（安水という）のように、高濃度の窒素を含む水の処理には、硝化脱窒は適用されていない。最近になって、ようやく、安水のような高濃度の窒素を含む排水に対して、硝化脱窒が試みられるようになり始めたのが現状である（特許文献1：特開第2003-53383号公報参照）。

10

また、高濃度の窒素を含有する排水から窒素を除去する際、硝化脱窒に用いる活性汚泥中で、具体的にどのような微生物が窒素除去に関与しているのかは明らかではなく、微生物群集を解析した研究例はない。

【0003】

微生物を利用する窒素除去では、硝化脱窒法が広く用いられる。硝化脱窒法は、微生物の作用で、排水中のアンモニア態窒素を亜硝酸態窒素を経て硝酸態窒素まで酸化した後、硝酸態窒素から亜硝酸態窒素を経て窒素分子にまで還元して、窒素ガスとして大気中に放散させる窒素除去方法である。アンモニア態窒素を硝酸態窒素まで酸化する反応を硝化と呼び、硝酸態窒素から窒素分子へ還元する反応を脱窒と呼ぶ。すなわち硝化と脱窒が組み合わさって硝化脱窒法となっている。一般に、硝化は酸素を供給する好気槽で、脱窒は、酸素を供給しない嫌気槽で進む反応である。

20

【0004】

硝化脱窒を効率的に行わせるために様々な試みがなされてきた。Barnard法は、前段に脱窒を行わせる嫌気槽、後段に硝化を行わせる好気槽を設置し、後段の硝化で生じた硝化液を前段の脱窒反応槽に戻すよう循環させる硝化脱窒法である。脱窒反応では、同時に基質となるCOD成分の消費が必要となる。原水由来のCOD成分を直接、脱窒反応に利用できることから、Barnard法は極めて効率的な硝化脱窒法となっている。もしも硝化反応槽を前段に設置すると、原水由来のCOD成分は好気槽の酸素で容易に酸化分解されてしまう。このため、脱窒反応に必要なCOD成分が不足してしまうことになる。

30

【0005】

硝化脱窒は、単一の微生物が行える反応ではなく、活性汚泥に存在する複合微生物系が担っている。まず硝化であるが、アンモニア態窒素を亜硝酸態窒素にまで酸化するアンモニア酸化細菌や、亜硝酸態窒素を硝酸態窒素にまで酸化する亜硝酸酸化細菌が存在することが知られている。アンモニア酸化細菌としては、ニトロソモナス（Nitrosomonas）などが知られている。亜硝酸酸化細菌としては、ニトロバクター（Nitrobacter）などが知られている。

40

【0006】

脱窒反応については、硝酸態窒素、あるいは亜硝酸態窒素を窒素分子まで還元するさまざまな脱窒細菌の存在が知られている。窒素除去反応である脱窒反応では、生物が保有する様々な酵素の関与が知られている。硝酸態窒素を亜硝酸態窒素に還元する硝酸（塩）還元酵素NaR（Nitrate Reductase）、亜硝酸態窒素を一酸化窒素に還元する亜硝酸（塩）還元酵素NiR（Nitrite Reductase）、一酸化窒素を亜酸化窒素に還元する酸素NOR（Nitric Oxide Reductase）、亜酸化窒素を窒素分子に還元する酸素N₂OR（Nitrous Oxide Reductase）である。これらの酵素による触媒作用を受けて、排水中の硝酸態窒素あるいは亜硝酸態窒素は、最終的に無害な窒素ガスとなって、大気中に放散させることが可能

50

である。

このうち、亜硝酸還元酵素N i Rが司る反応は、脱窒反応の中で反応律速になっている可能性があり、脱窒反応上、極めて重要な反応となっている。

【0007】

一般に、微生物群集の解析にあたって、活性汚泥中の微生物の培養可能性（c u l t u r a b i l i t y）は低い。したがって、培養による微生物解析では窒素除去を司る活性汚泥中の微生物群集構造を把握することができない。

【0008】

特に、窒素除去にかかわっている、亜硝酸還元酵素を有する微生物は未だ特定されていない。

10

【特許文献1】

特開2003-53383号公報

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

以上のような背景から、高濃度の窒素を含有する排水から、窒素を除去する水処理に用いることができる活性汚泥の微生物群集を把握し、窒素除去に関与する有用な微生物を発見し、かかる微生物を利用して、高濃度の窒素を含有する排水から窒素を効率的に除去するための新規水処理方法を提供する必要性がある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

20

微生物群集の解析にあたって、一般に、活性汚泥中の微生物の培養可能性（c u l t u r a b i l i t y）は低い。したがって、培養による微生物解析では窒素除去を司る活性汚泥中の微生物群集構造を把握することが難しい。そこで本発明者は、高濃度の窒素を含有する排水から、活性汚泥を用いる硝化脱窒による窒素除去で、汚泥中に存在し、窒素除去をおこなっている微生物を、窒素除去に関わる機能酵素の遺伝子に着目して、明らかにすることを試みた。すなわち、窒素除去反応に置いて重要な反応である、亜硝酸態窒素を一酸化窒素に変換する反応を司る、亜硝酸還元酵素（N i R）に着目した。亜硝酸還元酵素には、N i R K、 N i R Sと呼ばれる2種類の酵素があることが知られている。本発明者は、窒素除去に関わる微生物を、亜硝酸還元酵素N i R K、 N i R Sの遺伝子を検出することにより、特定した。また、本遺伝子の一部の塩基配列を明らかにすることで、塩基配列に基づいて窒素除去に関わる微生物を特定することを可能にすることに成功した。そしてこれらの微生物を含む活性汚泥を用いた窒素除去方法を確立することに成功し、本発明を完成させた。

30

【0011】

すなわち、

本発明により、以下の〔1〕～〔48〕が提供される：

〔1〕 配列番号1又は3に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在するUncultured bacterium clone U13近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

〔2〕 配列番号2に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在するUncultured bacterium clone M17近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

40

〔3〕 配列番号4、6、7、9、10、12、13、14、又は16に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在するMesorhizobium sp. 4FB11近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

【0012】

〔4〕 配列番号5に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在するAlcaligenes sp. STC1近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

50

〔５〕配列番号８に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Alcaligenes xylosoxidans* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

〔６〕配列番号１１に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M27* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

〔７〕配列番号１５に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas mendocina* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

【００１３】

〔８〕配列番号１７に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M58* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R K）遺伝子のDNA断片。

〔９〕配列番号１８、３３又は３９に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus denitrificans Pd1222* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

〔１０〕配列番号１９に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica strain AR1* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

〔１１〕配列番号２０、２２又は２４に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

【００１４】

〔１２〕配列番号２１に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *A. eutrophus* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

〔１３〕配列番号２３に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Azoarcus toluovorans* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

〔１４〕配列番号２５に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSAK4* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

〔１５〕配列番号２６に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSAK2* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

〔１６〕配列番号２７に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone ANIS-76* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

【００１５】

〔１７〕配列番号２８、２９、３０、３６又は３８に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone HNIS-6* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

〔１８〕配列番号３１に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus pantotrophus* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子のDNA断片。

【００１６】

〔１９〕配列番号３２に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水

10

20

30

40

50

処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera linaloolentis* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子のDNA断片。

〔20〕配列番号34に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica strain AR1* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子のDNA断片。

〔21〕配列番号35に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera terpenica strain 58Eu* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子のDNA断片。

〔22〕配列番号37に示す配列を有する、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas aeruginosa strain M11* 近縁細菌の亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子のDNA断片。

【0017】

〔23〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に上記〔1〕～〔8〕のいずれかに記載のDNA断片の塩基配列を含み、かつ、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する微生物。

【0018】

〔24〕その亜硝酸還元酵素 (Nir S) 遺伝子に上記〔9〕～〔23〕のいずれかに記載のDNA断片の塩基配列を含み、かつ、窒素削減のために用いる活性汚泥法による水処理プラントの活性汚泥中に存在する微生物。

【0019】

〔25〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号1又3に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone U13* 近縁細菌。

〔26〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号2に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M17* 近縁細菌。

〔27〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号4、6、7、9、10、12、13、14又は16に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Mesorhizobium sp. 4FB11* 近縁細菌。

【0020】

〔28〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号5に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Alcaligenes sp. STC1* 近縁細菌。

【0021】

〔29〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号8に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Alcaligenes xylosoxidans* 近縁細菌。

〔30〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号11に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M27* 近縁細菌。

〔31〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号15に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas mendocina* 近縁細菌。

〔32〕その亜硝酸還元酵素 (Nir K) 遺伝子に配列番号17に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone M58* 近縁

10

20

30

40

50

細菌。

【0022】

〔33〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号18、33又は39に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus denitrificans* Pd1222近縁細菌。

〔34〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号19に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica* strain AR1近縁細菌。

10

【0023】

〔35〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号20、22又は24に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium*近縁細菌。

〔36〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号21に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *A. eutrophus*近縁細菌。

〔37〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号23に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Azoarcus toluovorans*近縁細菌。

20

【0024】

〔38〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号25に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSA K4*近縁細菌。

〔39〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号26に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone nirSA K2*近縁細菌。

〔40〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号27に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone ANIS-76*近縁細菌。

30

〔41〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号28、29、30、36又は38に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Uncultured bacterium clone HNIS-6*近縁細菌。

【0025】

〔42〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号31に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Paracoccus pantotrophus*近縁細菌。

40

〔43〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号32に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera linaloolentis*近縁細菌。

〔44〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号34に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Thauera aromatica* strain AR1近縁細菌。

〔45〕その亜硝酸還元酵素（N i R S）遺伝子に配列番号35に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性

50

汚泥中に存在する *Thauera terpenica* strain 58 Eu 近縁細菌。

〔46〕その亜硝酸還元酵素 (N i R S) 遺伝子に配列番号 37 に示す塩基配列を含み、かつ、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理プラントの活性汚泥中に存在する *Pseudomonas aeruginosa* strain Mi 11 近縁細菌。

【0026】

〔47〕上記〔23〕～〔46〕のいずれかに記載の微生物又は細菌を含む、硝化液循環型硝化脱窒活性汚泥法による窒素削減のための水処理に用いる活性汚泥。

【0027】

〔48〕上記〔47〕に記載の活性汚泥を使用する窒素削減のための水処理方法。

【0028】

【発明の実施の形態】

以下、実施例において詳細に説明するが、高濃度のアンモニア態窒素と COD 成分をむ原水から、硝化脱窒による窒素除去をおこなうためのパイロットプラントの運転を行ない、このパイロットプラントから採取した活性汚泥に対して、微生物の解析を行った。

【0029】

図 1 に硝化脱窒による窒素除去パイロットプラントの概要を示す。窒素除去を担う活性汚泥中の脱窒細菌を、亜硝酸還元酵素である N i R K 及び N i R S の遺伝子を検出することにより、その DNA の塩基配列に基づき特定した。亜硝酸還元酵素の遺伝子 n i r K (以下、亜硝酸還元酵素 N i R K の遺伝子については n i r K と表記する) の解析には、クローニングによるクローンライブラリー作成を用いて、活性汚泥に存在する窒素除去に関わる脱窒細菌が保有する、約 550 塩基にわたる n i r K 遺伝子の塩基配列を決定した。また、亜硝酸還元酵素の遺伝子 n i r S (以下、亜硝酸還元酵素 N i R S の遺伝子については n i r S と表記する) の解析は、PCR-DGGE を用いて、活性汚泥に存在する窒素除去に関わる脱窒細菌が保有する、n i r S 遺伝子の塩基配列の部分配列を決定した。

【0030】

以下、実施例に用いた実験原理手順を説明する。

【0031】

活性汚泥試料の採取と保管

プラントから採取した汚泥を、汚泥：エタノール＝9：1 で混ぜてしばらく 4℃ で保存した。DNA 抽出用のサンプリングは以下のように行った。

1. 2 ml チューブに汚泥を 1 ml 取ったものを数個用意し、遠心分離にかけ上澄みを取り除く。
2. ペレットを TH (pH 8.0) バッファーで懸濁し、遠心分離で上澄みを取り除く。
3. -20℃ で保存する。

【0032】

DNA 抽出

Fast DNA SPIN Kit for soil (BIO101) を使用した。Fast DNA SPIN Kit for soil (BIO101) は、500 mg までの土壌や他の環境サンプルから 30 分以内で効率的に DNA を抽出できる Kit である。ホモジナイズする装置が必要ではあるが、抽出作業時間が短い、フェノールやクロロホルムなどの有機溶媒が不要、また比較的抽出しにくいとされてきたグラム陽性細菌なども抽出可能、等の利点がある。

【0033】

Fast DNA SPIN Kit for soil の操作は大きく分けて 2 つのステップからなる。

1) 細胞の破碎・DNA の可溶化・タンパク質の可溶化

サンプルを、ホモジナイズとタンパク質の可溶化が可能なバッファーに溶解させ、それを

10

20

30

40

50

セラミックとシリカからなるビーズと混ぜることにより、細胞を破碎しDNAを可溶化する。この段階で、ほとんどRNAの混入のないDNAを得ることができる。

【0034】

2) DNAの精製と濃縮

可溶化したDNAのみをシリカ製のBinding Matrixに吸着させることで、混在する阻害物質を除去する。その後、Binding Matrixに吸着したDNAを溶出させて、精製DNAを得ることができる。

【0035】

以下、手順を説明する。

【0036】

1. サンプリングして保存しておいたペレットに、サンプルをホモジナイズし、タンパク質を可溶化することのできるSodium Phosphate BufferとMT Bufferを加え、ペレットを懸濁する。

2. ビーズの入ったLysing Matrix E tubeに1を移す。3. 2をFast Prepに設置し、Speed 5.0、30 secで2回処理を行い、細胞を破碎し溶解させる。

【0037】

4. 上澄みを新しいチューブに移し、PPSを加え、手で攪拌する。

5. 遠心分離にかけタンパク質を沈殿させ、上澄みを新しいチューブに移すことでタンパク質を除去する。

6. 5で移した上澄みと等量のBinding Matrixを加え、手で反転浸透した後数分静置してBinding MatrixにDNAを吸着沈殿させる。

【0038】

7. 上澄みを除去した後、残った液でBinding Matrix DNAを懸濁し、それをSpin Filterに移す。

8. 7を遠心分離にかけ、その後、SEWS-Mを加えてFilter上のBinding Matrix-DNAを洗浄濃縮する。

9. Filter上のBinding Matrix DNAにDESを加えて、遠心分離によりDNAを溶出させ、PCRグレードのDNAを回収する。DNAは-20℃で保存可能である。

【0039】

PCR

以下の実施においては、解析対象サンプル中に存在する微生物のうち、窒素除去に関わるものを追跡するため、脱窒反応で重要な亜硝酸還元を司る亜硝酸還元酵素である、NirKとNirSの遺伝子をターゲットとしたPCRを行った。

【0040】

nirK遺伝子とnirS遺伝子をターゲットとしたPCR法について、実験の流れを説明する。

【0041】

1. DNA抽出後、吸光光度計を用いてDNAの濃度を測定する。

2. テンプレートとするDNAを50 ng/μlに調製する。

3. 以下の表1に示すようにPCR mixtureを調製する。

【0042】

【表1】

10

20

30

40

表1 PCR mixtureの組成

0. 2mM dNTP
 1× Buffer
 0. 2mM primer (forward)
 0. 2mM primer (reverse)
 2. 5U/reaction Taq polymerase
 1μl Template DNA (50ng/μl)
 MilliQ水

【0043】

使用する primer は以下の表2より選択する。

【0044】

【表2】

表2 PCR primer

nirK遺伝子クローニング用プライマー配列 (5' - 3')

nirK1F: GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA (配列番号40)

nirK5R: GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG (配列番号41)

nirS遺伝子用プライマー配列 (5' - 3')

Forward:

(CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG) TACCACCC S GAR CCGCGCGT
(配列番号42)

Reverse:

GCCGCCGTCRTGVAGGAA (配列番号43)

※ S: C又はG R: A又はG V: A又はC又はG

【0045】

4. サーマルサイクラー T3 Thermocycler (Biometra) または GeneAmp 9600 (PE Biosystems) で、目的に応じたプログラム条件でPCRを行う。

【0046】

5. アガロースゲル（アガロースを1×TAEに溶かし1質量%から2質量%としたもの）を用いて100Vで15分間電気泳動を行い、その後15分間のエチジウムブロマイド染色を行い、UVトランスイルミネーター（東洋紡）でPCR産物が得られたかどうか確認をする。

【0047】

クローニング

複合微生物系で、ある遺伝子を標的としたPCRを行いそのPCR産物をテンプレートとしてクローニングを行うと、系の中に存在する様々な微生物がある確率で単離した状態で得られ、さらにクローンライブラリーを作成することで、存在微生物の全体像を知ることができる。硝化脱窒型の窒素除去を行う水処理プロセスの活性汚泥中の微生物について、*nirK*遺伝子のprimerで得たPCR産物からクローンライブラリーを作成した。

10

【0048】

クローニングは、大きく分けて次の2段階の反応からなる。

ライゲーション

ライゲーションとは、プラスミドベクターにインサート（特定の遺伝子産物（PCR産物））を組み込む操作である。クローニングに用いられるプラスミドベクターは、インサートを組み込む必要があるため、制限酵素で切断されるクローニングサイトをもつ必要がある。また、最終的にプラスミドを大腸菌に感染させて、大腸菌を増やすことでプラスミドに組み込まれたPCR産物を増やすことをするので、プラスミドベクターは大腸菌に認識される複製開始点を持ち、さらにプラスミドを持つ大腸菌を選択的に増殖させるために薬剤耐性遺伝子を持つ必要がある。プラスミドベクターの調製は自分でも行うことはできるが、上記のように調製済みのベクターが市販されている。

20

【0049】

ライゲーションの際には、PCR産物の末端の修飾方法やベクター／インサート比に注意が必要である。末端の修飾方法にはいくつかあるが、比較的よく行われているのは、PCRでのDNA合成の際に付加されるデオキシアデノシン（dA）を利用したTAクローニングという方法である。また、ベクター／インサート比については、効率よくライゲーションが行われるように通常は1／1から1／10程度にする必要がある。

30

【0050】

トランスフォーメーション（形質転換）

トランスフォーメーションとは、ライゲーションを行ったプラスミドを、DNAの取り込む能力のある大腸菌のコンピテント細胞に感染させる操作である。トランスフォーメーションした細胞を薬剤の含んだプレート上に播くことにより、薬剤耐性を持つ大腸菌、すなわちプラスミドを含む大腸菌が選択的に増殖してコロニーを形成する。一つのコロニーは一種類のみのインサートを含む大腸菌から成るので、複合微生物系において微生物ごとに遺伝子を分けることができる。

【0051】

1) クローニングの方法の検討

インサートの末端修飾には幾つかの方法があり、それに伴いライゲーションの方法もいくつかあるが、本実験では、操作が比較的簡単で、形質転換体が70%程度の確率で得られるといわれるTAクローニング法の変法を採用した。TAクローニング法は、PCRでのDNA合成の際に付加されるデオキシアデノシン（dA）を利用した方法であり、鋳型DNAの配列によってはPCR産物にdAが付加しない平滑状のものが混ざった状態なので、PCRの鋳型DNA等の条件によりクローニング効率が変わることに注意を要する。

40

【0052】

TAクローニング法として市販されているものの中で、具体的にはQIAGEN PCR Cloning System（UAクローニング）のKitを使用した。これは、TAクローニング法の変法で、Tの代わりにUの付いたベクターを用いたものである。Tは

50

非相補的な塩基（G，C，T）とハイブリダイズしやすく、Tが付加されたベクターはベクター同士のアニーリング等の結果をもたらす可能性が有るが、Uは非特異的なベースペアを形成しにくい為、クローニング効率が高いと言われている（Q I A G E N プロダクトガイド）。本実験においても、T A クローニングとU A クローニングの比較を行った。T A クローニングはインサート率（出現コロニー当たりのインサートが入ったコロニーの割合）が半分程度であったが、U A クローニングはインサート率が9割程度と高く、U A クローニングの方がクローニング効率がよいことが明らかとなった。

【0053】

2) 適切なベクター／インサート比の検討

ベクター／インサート比については、通常1／1から1／10程度にする。これは、インサートが少ないとインサート率が低くなり、逆にインサートが多すぎると複数のインサートが一つのベクターに入ってしまうという可能性も出てくるためである。本実験では、Q I A G E N P C R C l o n i n g S y s t e m の K i t で推奨されている1／5と1／10の両方について実験を行った。その結果、1／5と1／10の両方で1／10の方がコロニー数が1、2割程度多かったものの、顕著な差ではなかったため、1／5や1／10程度の比であればどちらでもよいという結論に達した。

10

【0054】

3) インサートの確認方法の検討

インサートの確認には、コロニーを液体培養で増やし、ミニプレップでプラスミドの抽出・精製を行った後にP C R または制限酵素処理を行い、アガロースゲル電気泳動をする方法を使用した。

20

【0055】

以下、手順を説明する。

【0056】

1) P C R 産物（インサート）の精製

1. クローニングしたい目的のP C R 断片を含むP C R 産物を1サンプルにつき数本用意する。
2. それらを集め、M i c r o c o n (M i l l i p o r e) を用いて過剰なプライマーやd N T P を除去して精製を行う。
3. 精製したサンプルのD N A 濃度を測定する。

30

【0057】

2) クローニング操作

クローニングの基本的操作は、Q I A G E N P C R C l o n i n g S y s t e m のプロトコルに準じた。

1. L i g a t i o n m i x t u r e を作成する。（ライゲーション反応液内のベクター／インサート比については、各サンプルにつき1／5と1／10の両方を調製する。）
2. G e n e A m p 9 6 0 0 (P E B i o s y s t e m s) で、16℃で30分間インキュベーションし、ライゲーション反応を行う。
3. トランスフォーメーションの操作をプロトコル通りに行う。
4. トランスフォーメーション液を寒天プレートに播く。
5. でき上がったプレートを37℃で17時間程度（一晚）インキュベートする。

40

【0058】

3) プラスミド抽出

1. コロニーの生えたプレートを1時間程度4℃でコールドインキュベーションする。
2. プラスミドが入っているホワイトコロニーのみを楊枝でピックアップし、液体培地に入った15mlチューブに楊枝ごと入れる。
3. 2を振とうしながら8～10時間培養する。

【0059】

4. Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p K i t (Q I A G E N) を用いて付属のプロトコルに従いプラスミド抽出を行う。（このK i t では、大腸菌からプラスミド

50

を溶出させ、精製、濃縮を行っていることになり、フェノール／クロロホルム抽出やエタノール沈殿等の操作を改めて行う必要はない。）

【0060】

4) M13 PCR

得られたプラスミド抽出液をテンプレートとし、インサートよりも外側に位置している以下の表3に示すM13プライマーを用いてPCRを行う。PCR条件はインサートの長さにより変える必要がある。

【0061】

【表3】

表3 M13プライマー

M13 forward (MB-M4):	GTTTCCCGAGTCACGAC	(配列番号44)
M13 reverse (MBRV):	CAGGAAACAGCTATGAC	(配列番号45)

【0062】

DGGE

DGGEはdenaturing gradient gel electrophoresis (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)の略であり、元来染色体DNAの点変異検出に用いられた技術である。DGGE法は、PCRと組み合わせることで、微量のサンプルから環境中に存在する微生物の遺伝子を培養過程を経ずに検出することができるということで、微生物生態分野において急速に普及した。DGGE法は、培養できない微生物の遺伝子でも検出できるという点ではクローニングと似ているが、バンドとして可視化出来るため、環境中にどれくらいの種類の微生物が存在するのかを容易に判断することができるという利点をもっている。

30

【0063】

DGGEは、DNA変性剤(尿素とホルムアルデヒド)の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中でDNA電気泳動を行うことにより、長さのそろった複数種の2本鎖DNA(例えば、PCR産物)を、塩基配列の違いにより分離できる方法である。

【0064】

GCクランプ(配列:CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCCGTCCCGCCGCCCGCGCCCG)付きのプライマーセットを用いて、PCRで増幅した2本鎖DNAを変性剤の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、DNA変性剤の濃度上昇とともに2本鎖DNA間の水素結合が切断され、二重らせん構造から1本鎖DNAに変性する。しかし、GCクランプ部分は結合力が強いため、DNAは3方向に伸びた形になる。このように変性したDNAは、ゲルを移動する速度が著しく小さくなるため、ある場所に集まり、バンドを形成する。配列の異なる複数の2本鎖(異なる微生物)のDNAはA、T、G、C間の水素結合の数及び配列の違いにより、異なるDNA変性剤濃度で解離するため、異なる位置にバンドが形成され、その結果、微生物を種類ごとに分離することができる。このようにして、サンプルごとにバンドプロファイルが得られ、そのパターンにより群集を評価することができるということになる。

40

【0065】

以下、手順を説明する。

1) ポリアクリルアミドゲルの作成

1. 変性剤について低濃度ゲル溶液、高濃度ゲル溶液、さらに0質量%のゲル溶液を調製

50

する。ポリアクリルアミド濃度は8質量%とする。ゲルの組成を以下の表4に記す。

【0066】

【表4】

表4 ポリアクリルアミドゲルの組成

8%	A c r y l a m i d e / B i s	(37:5:1)
x%	(v/v)	F o r m a m i d e
yM	U r e a	
1×	T A E	

変性剤濃度(%)は、x、yに比例し、変性剤濃度100%は一例として40%(v/v) Formamide、7M Ureaに相当する。

【0067】

2. 1をそれぞれ脱気したものについて、低濃度・高濃度ゲル溶液を14mlずつ用意する。
3. 用意した高濃度ゲルにDyeを加え、低濃度高濃度のそれぞれに架橋剤である0.5質量%APSと0.05質量%TEMEDを加える。
4. 変性剤の濃度勾配をつけられる装置を用いてゲルキャスティングを行う。
5. 12時間放置することで重合を促進させる。

【0068】

2) 電気泳動

DGGEの泳動装置には、D code system (Bio Rad)を使用した。

1. サンプルを用意する。
2. サンプル20μlと6×Dye4μlを混ぜ、調製する。
3. 1×TAE7Lを60℃まで加温したチャンバーにゲルをセットし、サンプルをアプライする。
4. 130Vで5～6時間、電気泳動を行う。

【0069】

3) 画像取得と解析

画像取得とその解析はFluoroImager595 (MolecularDynamics) Scanner ControlとImage Q want、FragmeNTを使用し行った。

【0070】

1. 泳動し終わったゲルを1万倍に希釈したVistra Greenで15分間染色する。
2. 余分な染色液を取り除き、蛍光イメージアナライザーFluoroImager595 (Molecular Dynamics) のScanner Controlを用いて、画像解析ソフトImage Q wantで画像を取り込む。

【0071】

3. 塩基配列決定の為、バンドを切り出す必要のある場合はバンドを切り出す。
4. バンド強度をもとめる等の解析をする場合は、画像解析ソフトFragmeNTを利用して付属のマニュアルに従い解析を行う。

【0072】

シーケンシング

シーケンシングの一例として、SQ-5500 (日立製作所)を用いた場合を例に、シー

ケンシングの方法を説明する。

【0073】

1) オートシーケンサーSQ-5500（日立製作所）によるシーケンシング

1. プロトコルに従いポリアクリルアミドゲルを作成する。
2. Vistra sequencing kit (Amasham Pharmashia) を用い、そのプロトコルに従ってシーケンシング反応のmixtureを調製する。
3. T3 Thermocycler (Biometra) またはGeneAmp9600 (PE Biosystems) を用いて、シーケンシング反応を行う。シーケンシング反応のプログラムは、増幅部位の長さに関わらず、 $<95^{\circ}\text{C} 5\text{min}$ 、 $[95^{\circ}\text{C} : 30\text{sec}, 60^{\circ}\text{C} : 30\text{sec}] \times 25$ 回、 4°C を使用する。

10

【0074】

4. HITACHI SQ-5500で1時間予備泳動したゲルに、3のサンプルをアプライする。
5. 適当な時間、電気泳動を行う。
6. forward鎖とreverse鎖のassemblyを行い、必要に応じて修正し塩基配列を決定する。

【0075】

【実施例】

実施例1：パイロットプラントの運転

20

高濃度のアンモニア態窒素とCOD成分として、フェノールと、チオ硫酸、チオシアンといった硫黄化合物を含む原水を調製し、この原水から硝化脱窒による窒素除去を行うパイロットプラントを運転した。水質データのモニタリングを行い、また定期的に複合微生物解析のため、活性汚泥の採取を行った。図1に、パイロットプラントの概要を、そして以下の表5に運転条件を示す：

【0076】

【表5】

表5 パイロットプラント運転条件

原水流量	60 リットル / 日
循環流量	120 リットル / 日
返送汚泥流量	60 リットル / 日
HRT (計72hr)	脱窒槽 18時間、硝化槽54時間
SRT	約30日
脱窒槽、硝化槽温度制御	30°C
DO	脱窒槽 0.3ppm 未満、 硝化槽 3ppm 以上 (空気曝気による)

【0077】

パイロットプラントは、安水のCOD削減とアンモニア除去を行うため硝化液循環型の硝化脱窒活性汚泥法を採用した。原水の構成成分を以下の表6に示す：

50

【 0 0 7 8 】

【表 6】

表 6 原水の調製
(原水 100 リットルを調製する例)

淡水：海水＝１：１.５ (体積比)	１００ L
塩化アンモニウム	１９２ g
フェノール	６０ g
NaSCN	１４ g
Na ₂ S ₂ O ₃ ・５H ₂ O	６４ g
NaHCO ₃	３６０ g
リン酸水素２ナトリウム（１２水和物）	５ g

【 0 0 7 9 】

原水は前段で、嫌気槽である脱窒槽を、後段で、好気槽である硝化槽を通り、硝化液は脱窒槽へ戻って循環処理される。処理水は、沈殿槽を経て放流される。硝化液の循環率は 200 %、汚泥返送率は 100 % である。汚泥の引き抜きを行い、SRT が約 30 日間となるように運転した。各水質の測定項目を以下の表 7 に示す：

【 0 0 8 0 】

【表 7】

表7 水質の測定項目

原水、脱窒槽からの流出水、処理水について、下記の水質項目の分析を実施した。

PH
SS
T-N
D-T-N
D-NH ₄ -N
D-NO ₂ -N
D-NO ₃ -N
COD
D-COD
D-TOC
D-フェノール
D-SCN
D-S ₂ O ₃
D-SO ₄
Mアルカリ

尚、T-Nは全窒素濃度、D-は、ろ過水であることを示す。

【0081】

微生物群集解析用の活性汚泥は硝化槽の2槽めから採取した。

【0082】

以下にパイロットプラントの運転状況を示す。

まず、窒素除去性能であるが、図2に原水と処理水の全窒素濃度及び窒素除去性能の目安となる原水と処理水の全窒素濃度の差の推移を示す。

【0083】

図2に示すように経時的に良好な窒素除去性能が得られるようになった。

また、窒素除去が少ない2002年8月21日の時点と、窒素除去が良好な2002年11月13日の時点における、脱窒槽でのフェノール、チオ硫酸、チオシアン消費速度を計算した結果を、以下の表8に示す：

【0084】

【表8】

表8 脱窒槽におけるフェノール、チオ硫酸、チオシアン消費速度

	2002年8月21日	2002年11月13日
フェノール消費速度	5.6 mg-フェノール /g-MLSS・日	13.3 mg-フェノール /g-MLSS・日
チオ硫酸消費速度	0.6 mg-S ₂ O ₃ /g-MLSS・日	2.3 mg-S ₂ O ₃ /g-MLSS・日
チオシアン消費速度	1.2 mg-SCN/g-MLSS・日	4.3 mg-SCN/g-MLSS・日

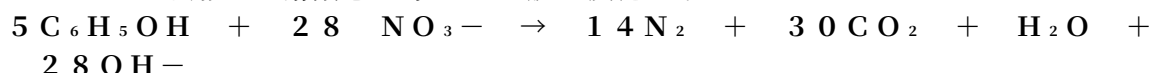
【0085】

脱窒による窒素除去の高まりと対応して、フェノール、チオ硫酸、チオシアンが多く消費されることが明らかとなった。フェノール、チオ硫酸、チオシアンをCOD成分として消費する硝酸態窒素からの脱窒反応、及び、亜硝酸態窒素からの脱窒反応は、それぞれ以下のように表すことができると考えられる。

【0086】

まず、硝酸態窒素からの脱窒反応については、以下のように表せる。

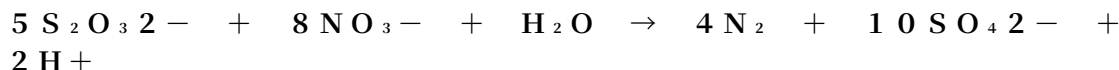
フェノールを用いる硝酸態窒素からの脱窒反応は、：



のように表すことができ、フェノール1gあたり硝酸態窒素を0.83g脱窒できることが計算される。

【0087】

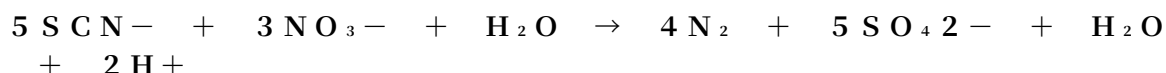
チオ硫酸を用いる硝酸態窒素からの脱窒反応は、



のように表すことができ、チオ硫酸1gあたり硝酸態窒素を0.2g脱窒できることが計算される。

【0088】

チオシアンを用いる硝酸態窒素からの脱窒反応は、

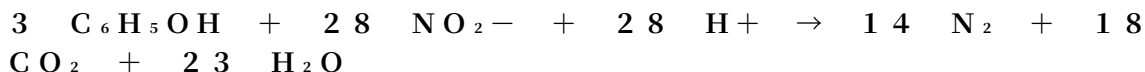


のように表すことができ、チオシアン1gあたり硝酸態窒素を0.14g脱窒できることが計算される。

【0089】

次に、亜硝酸態窒素からの脱窒反応については、以下のように表せる。

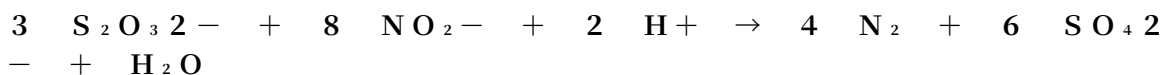
フェノールを用いる亜硝酸態窒素からの脱窒反応は、



のように表すことができ、フェノール1gあたり亜硝酸態窒素を1.4g脱窒できることが計算される。

【0090】

チオ硫酸を用いる亜硝酸態窒素からの脱窒反応は、



のように表すことができ、チオ硫酸1gあたり亜硝酸態窒素を0.33g脱窒できることが計算される。

【0091】

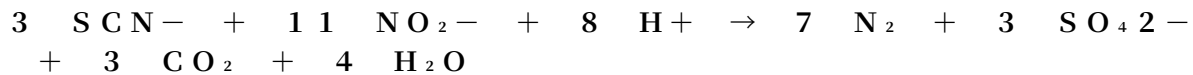
20

30

40

50

チオシアンを用いる亜硝酸態窒素からの脱窒反応は、



のように表すことができ、チオシアン 1 g あたり亜硝酸態窒素を 0.88 g 脱窒できることが計算される。

【0092】

したがって、本パイロットプラントの結果から、硝酸態窒素又は亜硝酸態窒素からの脱窒が、原水由来のフェノール、チオ硫酸、チオシアンを用いて可能であることが実証できた。上記の計算結果から、化学量論的に、亜硝酸態窒素とフェノール又はチオシアンを基質とする脱窒、あるいは硝酸態窒素とフェノールを基質とする脱窒反応が効率的に進んだことが考えられる。

10

【0093】

実施例 2：クローニングによる亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK* の塩基配列決定と、当該遺伝子を有する微生物の特定

クローニングでは、PCR で増幅することができさえすれば、サンプル中に存在する微生物全てが、ある確率でクローンとして得られることになる。そこで、窒素除去性能が良好な時点のパイロットプラントから活性汚泥を採取して、その中に存在する脱窒菌を亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK* を有することを手掛かりに、特定することを試みた。まず、活性汚泥に存在する微生物に対して、亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK* の約 515 bp の領域のクローニングを行い、その塩基配列を決定した。

20

【0094】

方法

クローニングの操作は、先に説明したプロトコルに従って行った。窒素除去性能が良好な時点のパイロットプラントから採取した活性汚泥について、DNA 抽出液から亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK* の約 515 bp の領域を PCR 増幅した (PCR 条件 < 95℃: 10 min, [94℃: 30 sec, 50℃: 30 sec, 72℃: 2 min] × 25 回, 72℃: 10 min, 4℃ >)。PCR products を TA Cloning kit (pT7blue T-Vector (Takara, Tokyo, Japan), DH5α competent high competent cell kit (TOYOBO, Tokyo, Japan)) を使用してクローニングした。寒天プレート上に得られたコロニーのうち、白いコロニーのみ、滅菌した爪楊枝で採取し、予め用意した PCR mixture (100 μl) に懸濁した。PCR mixture の組成、PCR 条件は、春日らの報告 (春日ほか (2001) 水環境学会誌, 24, 856-864) に従ったが、PCR primer にはベクターをターゲットとした M13 primer を用い、同プライマーによりインサートを増幅した。なお得られた PCR products に対しアガロース電気泳動を行い、増幅を確認した。PCR products を Microcon (Millipore Tokyo Japan) により精製し、primer dNTP を除去した。

30

【0095】

次に精製した PCR products (20 ng) を表 3 に記載の M13 primer、ABI Big dye terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) を使って、シーケンシング反応を行った。反応条件は ABI 310 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) のマニュアルに従った。シーケンシング反応で得られた産物中に含まれる dye terminator を Centri-sep spin columns (Applied Biosystems) で除去した後、ABI 310 DNA シーケンサーでシーケンシングを行った。

40

【0096】

決定した塩基配列を用いて、相同性検索プログラム BLAST (<http://spir.al.genes.nig.ac.jp/homology/blast.shtml>)

50

）を用いて既知種の中から相同性の高い塩基配列を検索し、相同性を調べ、微生物の特定を行った。

【0097】

結果・考察

亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirK* の塩基配列として、配列表の配列番号 1～17 に記載の塩基配列を決定した。相同性解析の結果を表 9 に記す。

【0098】

【表 9】

表 9 活性汚泥中の脱窒細菌の *nirK* 遺伝子塩基配列の相同性解析結果

配列番号	相同性が最も高い <i>nirK</i> 遺伝子を有する微生物	相同性
1	Uncultured bacterium clone U13	84%
2	Uncultured bacterium clone M17	82%
3	Uncultured bacterium clone U13	81%
4	Mesorhizobium sp. 4FB11	90%
5	Alcaligenes sp. STC1	84%
6	Mesorhizobium sp. 4FB11	89%
7	Mesorhizobium sp. 4FB11	84%
8	Alcaligenes xylosoxidans	84%
9	Mesorhizobium sp. 4FB11	89%
10	Mesorhizobium sp. 4FB11	86%
11	Uncultured bacterium clone M27	85%
12	Mesorhizobium sp. 4FB11	90%
13	Mesorhizobium sp. 4FB11	83%
14	Mesorhizobium sp. 4FB11	89%
15	Pseudomonas mendocina	82%
16	Mesorhizobium sp. 4FB11	91%
17	Uncultured bacterium clone M58	86%

【0099】

全てデータベース上に 100% 一致のものがなく、新規な *nirK* 遺伝子の塩基配列を有する微生物であることを実証した。

【0100】

実施例 3：PCR-DGGE による亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* の塩基配列決定と、当該遺伝子を有する微生物の特定

PCR-DGGE は、環境サンプル等の培養できない微生物の遺伝子でも検出し、バンドとして可視化でき、さらにはバンドを切り出すことでそのバンドの塩基配列情報を得ることができるため、近年、複合微生物系である環境サンプルの解析などにおいて急速に普及してきた技術である。また、微生物の変化を系時的にバンドの変化として追うことができるという利点を有している。そこで、窒素除去性能が良好な時機のパイロットプラントから活性汚泥を採取して、その中に存在する脱窒菌を亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* を有することを手掛かりに、特定することを試みた。まず、活性汚泥に存在する微生物に対して、亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* の一部塩基配列を決定した。

【0101】

以下、手順を説明する。

窒素除去性能が良好な時機のパイロットプラントから採取した活性汚泥から DNA を抽出

し、以下の表 10 に記載した GC クランプ付きプライマーセットを用いて亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* の一部領域を増幅して解析対象とした。

【0102】

【表 10】

表 10 *nirS* 遺伝子用 PCR primer

nirS 遺伝子用プライマー配列 (5' - 3')

* プライマーセット 4

*nirS*2FGC (CG):

(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCGCCG) TACCACCCCGAGCCGCGCGT
(配列番号 46)

*nirS*3R (GC):

TTCTGACGACGGCGGC (配列番号 47)

* プライマーセット 5

*nirS*2FGC (GA):

(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCGCCG) TACCACCCGGAACCGCGCGT
(配列番号 48)

*nirS*3R (GC) → プライマーセット 4 と同じ

下線部が GC クランプ

【0103】

PCR 条件は、< 95℃: 10min、[94℃: 30sec、53℃: 30sec、72℃: 30sec] × 35 回、72℃: 10min、4℃ > であった。その後、DGGE のプロトコルに従い 40 質量% から 60 質量% の変性剤濃度勾配をつけたゲルを用いて、130V で 6 時間電気泳動を行った。

【0104】

塩基配列解読による DGGE バンドの近縁種決定

得られたバンドについて、それぞれどのような微生物なのかを確認し、パイロットプラント内に存在する微生物の全体像を把握するため、各バンドの近縁種の決定を試みた。

【0105】

方法

DGGE のゲルから主要なバンドを切り出し、滅菌 *milliQ* とともに凍結融解を 3 回繰り返すことで、ゲル片から DNA を回収し、それをテンプレートとして PCR-DGGE を行うという精製の操作を繰り返し、DGGE のゲル上で一本のバンドにした。最増幅の PCR 条件は、< 95℃: 10min、[94℃: 30sec、53℃: 30sec、72℃: 30sec] × 25 回又は 20 回、72℃: 10min、4℃ > である。その後、精製した DNA をテンプレートとして GC クランプ無しのプライマーで亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* の当該領域を再増幅 (PCR 条件: < 95℃: 10min、[94℃: 3

0 sec、53℃：30 sec、72℃：30 sec〕×25回、72℃：10 min、4℃>) し、シーケンシング反応のテンプレートとした。シーケンシング反応は先に説明したプロトコルに従い、またシーケンサーはHITACHI (SQ-5500) を用いた。塩基配列を決定した後、相同性検索プログラムBLAST (<http://spiral.genes.nig.ac.jp/homology/blast.shtml>) を用いて既知種の中から相同性の高い塩基配列を検索し、DGGE各バンドの近縁種を決定した。

【0106】

結果・考察

亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* の一部塩基配列として、配列表の配列番号18から39に記載の塩基配列を決定した。相同性解析の結果を以下の表11に示す：

10

【0107】

【表11】

表11 活性汚泥中の脱窒細菌の *nirS* 遺伝子塩基配列の相同性解析結果

配列番号	相同性が最も高い <i>nirS</i> 遺伝子を有する微生物	相同性
18	<i>Paracoccus denitrificans</i> Pd1222	85%
19	<i>Thauera aromatica</i> strain AR1	88%
20	Uncultured bacterium clone HNIS-16	81%
21	<i>A. eutrophus nirS</i> gene	82%
22	Uncultured bacterium clone HNIS-16	86%
23	<i>Azoarcus toluovorans</i>	93%
24	Uncultured bacterium clone HNIS-6	84%
25	Uncultured bacterium clone nirSAK4	97%
26	Uncultured bacterium clone nirSAK2	87%
27	Uncultured bacterium clone ANIS-76.	81%
28	Uncultured bacterium clone HNIS-6	87%
29	Uncultured bacterium clone HNIS-6	86%
30	Uncultured bacterium clone HNIS-6	88%
31	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	86%
32	<i>Thauera linaloolentis</i>	85%
33	<i>Paracoccus denitrificans</i> Pd1222	83%
34	<i>Thauera aromatica</i> strain AR1	86%
35	<i>Thauera terpenica</i> strain 58Eu	84%
36	Uncultured bacterium clone HNIS-6	87%
37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain Mi11	89%
38	Uncultured bacterium clone HNIS-6	87%
39	<i>Paracoccus denitrificans</i> Pd1222	86%

【0108】

全てデータベース上に100%一致のものがなく、新規な *nirK* 遺伝子の塩基配列を有

50

する微生物であることを実証した。

【0109】

【発明の効果】

本発明は、窒素含有排水から窒素除去する作用を有する微生物を明らかにすると共に、DNAの塩基配列を用いて当該微生物を検出する方法を確立した。これにより、窒素除去方法及びその評価方法を提供することを可能にした。

【配列表】

配列表

配列番号 1

GGCATGGTTCCGTGGCACGTCGTGTCCGGGATGAGCGGCACCATCATGGTGCTGCCGCGCGAGGGGCTGAAG
ACGGCCGACGGCAAGGCGCTGAAGTACGACAAGATCTACTACGTCGGTGAGTACGACCTGTATGTGCCGCGC
GATGAGAACGGCAAGTACAAGGACTACGACACCCCGGGAGAGGCCTATGCCGATACGCTGGAGGTGATGCGC
GGACTGATCCCGACCCACGTCGTGTTC AACGGCAAGGTCGGCGCGCTGACCGGAAGAACGCAATGACCGCC
AAGGTAGGCGAGACCGTCATGCTCGTCCACTCTCAGGCCAACC GGGATACCGGCCGACCTGATCGGCGGA
CACGGCGACTATGTGTGGGAGACGGGCAAGTTCGACAACCCGCCTGAGAAGAACCTGGAGACCTGGTTCATC
CGAGGTGGATCCGCGGGTGCTGCGCTCTACACCTTCAAGCAGCCCGGCATCTATGCCTACGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 2

GGCATGGTTCCGTGGCACGTCACCTCCGGCATGAACGGCGCCATCATGGTGCTGCCGCGCGAGGGGTTGACC
GACGGCAACGGCAAGGATCTTTCCTACGACCGCATCTACTACGTGGGTGAGCAGGACTTCTATGTCCGCGC
GACGAGAACGGCGAGTACAAGAAGTACGAGACCATCAACGACTCCTACTTCGACACGGTCCAGACCATGCGC
ACGCTGGTGCCAGCCACATCGTGTTC AACGGTGCGGTGCGCGCCCTCACGGGAGACAACGCGCTCAAGGCT
GCCGTGCGCGAGACGGTTCTCATCATCCACTCGCAGGCGAACC GTGATACCGGCCGACCTCATCGGTGGC
CATGGCGACTATGTCTGGGCCACGGGCAAGTTCGCAACCCGCCTGATCTCGATCAGGAGACCTGGTTCATT
CCGGGCGGCACCGCCGGCGCCGCGCTCTACACCTTCGAGCAGCCCGGCATCTACGCCTACGTGAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 3

GGAATGGTTCCGTGGCACGTCGTGTCCGGGATGAGCGGCACCATCATGGTGCTGCCGCGCGAAGGACTGAAG
GCGGCCGACGGCAAGCCGCTGAAGTACGACAAGATCTACTACGTCGGTGAGTACGATCTGTATGTGCCGCGC
GATGAGAACGGCAAGTACAAGGACTACGATACGCCGGGAGAAGCCTATGCCGATACGCTTGAGGTGATGCGC
GGCCTGGTGCCGACCCACGTCGTGTTC AACGGCAAGGTCGGTGCGCTGACCGGAAGAACGCGATGACCGCC
AAGGTCGGTGAGACTGTATGCTGGTCCATTCTCAGGCCAACC GGGATACCGGCCACACCTGATCGGCGGA
CACGGCGACTATGTGTGGGAGACTGGCAAGTTCGATAATCGGCCGAGAAGGATTTGGAGACCTGGTTCATC
CGCGGTGGTTCGCGGGGGCGCGCTCTACACCTTCAAGCAGCCCGGCATCTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 4

GGCATGGTTCCCTGGCACGTCGTTTCCGGCATGTCCGGCACGATCATGGTGCTGCCGCGCGACGGCCTGAAG
AACGAGAAGGGCGAGCCGGTCCGCTACGACACCGTGTAACATCGGCGAGAACGAGTTCTACATCCCGCGC
GACGAGGACGGAACTTCATCAAGTTCGACTCGCTCGGCGAGAGCTACGAGAAGACGATGGAGGTCATGCGC
GGCCTGATCCCGACCCACGTGGTCTTCAACGGCGCCGTCCGGCGCGCTGACGGGCGACAACGCGCTGAAGTCG
AAGTTCGGCGAGACGGTGCTGTTTCATCCACGCCAGGCCAACCGCGACTCCAGGCCCCACCTGATCGGCGGC
CATGGCGACTATGTCTGGGAAGAGGGCAAGTTCGCCAATCCTCCGGCCAAGGATCTGGAGACCTGGTTCATC
CGCGGCGGTTCCGGCGGGGGCGGCGCTCTACACCTTCCTGCAGCCGGGTGTGTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 5

GGCATGGTGCC₈TGGCACGTTGGTGTCGGGCATGAGCGGCACGCTGATGGTGCTGCCGCGTGACGGCCTGAAA
GACCCGGAAGGCAAGCCCCCTGACCTACGACAAGGCCTGGACGATCGGCGAGTTGACCTCTACATTCGAAA
GACGAAAACGGCAACTACAAAGACTACGACACTCTGGCCGAAAGCTATGCCGACACGGTCGAGGCCATGCGC
ACGCTCATTCCCACCCACGTGGTGTTCACCGCAAGGTGGGCGCGCTTACCGGCGAAAATGCGCTGACCTCG
AAAGTGGGTGAAACCGTGCTGTTTCGTCCACGGCCAGTGCAACCGCGATACGCGTCCTCACCTGATCGGCGGC
CACGCAGACTGGTTCGCGCCCTGGGCAAGTTCGGAATACGCCGGTCCGCGATATCGAAACCTGGTTCATC
CCGGGTGGCGCGTCGGCGGGGGCGGCATCTACACCTTCAAGCAGCCCGGTGTGTATGCCTACGTGAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 6

GGCATGGTTCCGTGGCACGTCGTTCCGGCATGTCCGGCACGATCATGATGCTGCCGCGCGACGGCCTGAAG
AACGAGAGGGGCGAGCCGGTCCGCTACGACACCGTCTACTACATCGGCGAGAACGAGTTCTACATCCCGCGC
GACGAGAACGGCAACTTCATCAGCTATGAATCGCTTGGTGAAAGCTATGCCGGCACCATGGAGGTCATGCGC
AGCCTGGTTCCCACCCATGTCTCTTCAACGGCCGGGTCCGGGCGCTGACCGGCGAAAATGCGATGGCGGCC
AATGTCCGGCGAGACGGTGCTGTTTCGTCCACTCGCAGGCCAATCGCGACAGCCGGCCCCACCTCATCGGTGGC
CATGGCGACTATGTGTGGGAGGAAGGCAAGTTCGCCAACCCGCCCGCCAAGGACCTGGAGACCTGGTTCATC
CGTGGCGGATCCGGCGGGGGCGGCGCTCTACACCTTCCTGCAGCCGGGCGTCTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 7

GGCATGGTGCCGTGGCACGTCGTTGCGGGCATGAATGGTATGATCATGGTGTTGCCGCGCGACGGGCTGAAG
AACGAGAAGGGCGAACCGGTCCGGTACGATAGCGTCTACTATATCGGCGAGAGCGACTTCTACATCCCGCGC

GACGAGAATGGCGACTTCGTCAACTTCGAGTCGCTGGGCGACAGCTACGCCGACACGCTGGAAGTGATGAAG
GGGCTGATTCCGACCCATGTGGTCTTCAATGGCAGGATCGGCGCGTTGACGGGCGATGCGGCGCTGAAGTCG
AAGGTTGGTGAGACGGTGCTTTTCGTCCATTTCGCAGGCCAACC GCGACAGCCGGCCCCACCTGATCGGCGGC
CATGGCGACTATGTCTGGGAAGAAGGCAAGTTCGCCAATCCGCCGGCCAAGGATCTGGAGACCTGGTTCATC
CGGGGTGGTTCGGCGGGCGTTGCGTCTACACTTTCCTGCAACCGGGAGTGTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 8

GGCATGGTGCCGTGGCACGTGGTGTCTGGGCATGAGCGGCACGCTGATGGTGCTGCCGCGTGACGGCCTGAAA
GACCCGGAAGGCAAGCCCCCTGACCTACGACAAGGCCTGGACGATCGGCGAGTTCGACCTCTACATTCGAAA
GACGAAAACGGCAACTACAAAGACTACGACACTCTGGCCGAAAGCTATGTCGACACGGTCGAGGCCATGCGC
ACGCTCATTCCCACCCACGTGGTGTTC AACGGCAAGGTGGGCGCGCTTACCGGCGAAAATGCGCTGACCTCG
AAAGTGGGTGAAACCGTGCTGATGATCCATTTCGCAGGCCAACC GCGACACCCGCCCGCACCTGATCGGCGGC
CACGGCGACTGGGTCTGGGAAACCGGCAAGTTCGCCAACCCTCCCGAGAAAGACCTGGAAACCTGGTTCATT
CGTGGTGGTTCGGCTGGTGCGGCACCTCTACACCTTCAAGCAGCCCGGTGTGTATGCCTACGTGAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 9

GGAATGGTGCCCTGGCACGTCTGTCTGGGCATGGCCGGCACCATCATGGTGCTGCCGCGCGAGGGCCTGAAG
AACGACAGGGGCGAGCCGGTACGTTACGACAAGGTCTACTATATCGGCGAGAGCGAGTTCTACATCCCGCGC
GACGAGAACGGCAACTTCATCAGCTATGAATCGCTTGGTGAAAGCTATGCCGGCACCATGGAGGTCATGCGC
AGCCTGGTTCACCCCATGTCTCTTCAACGGCCGGGTCTGGGCGCTGACCGGCGAAAATGCGATGGCGGCC
AATGTCGGCGAGACGGTGCTGTTTCGTCCACTCGCAGGCCAATCGCGACAGCCGGCCCCACCTCATCGGTGGC
CATGGCGACTATGTGTGGGAGGAAGGCAAGTTCGCCAACC CGCCGCCAAGGACCTGGAGACCTGGTTCATC
CGTGGCGGATCGGCGGGGGCGGCGCTCTACACCTTCCTGCAGCCGGCGTCTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 10

GGAATGGTTCGTTGGCACGTCTGTGGCGGGCATGAGCGGCACCATCATGATCCTGCCGCGGGACGGCCTGAAG
GACGAGAAGGGCAGGCCGGTCCGCTACGATACCGTCTATTACGTGCGCGAGAACGAGTTCTACATCCCGCGC
GATGCCGACGGAACTTCAAGACGTTGAGAGCCTCGGCGACAGCTATGCCGATACCATTCGACCATGCGC
GGCCTGATCCCGACCCATGTCTCTTCAACGGCCGGGTCTGGCGCATTGACCGGCGACGGAGCGATGAAGGCC

AAGGTCGGCGAGACCGTGCTGTTCTGTCCTCAGGCCAACC GCGACACGCGGCCCCACCTGATCGGCGGA
CACGGCGACTACGTCTGGGAGGAGGGCAAGTTCGCCAACCCACCTGCCAAGGATCTCGAGACCTGGTTCATC
CGTGGCGGATCTGCGGGCGCGGCGCTCTACACCTTCCTGCAGCCGGGCGTCTACGCCTACGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 1 1

GGCATGGTGCCGTGGCACGTGCTGTCGGCATGAGCGGCACCATCATGGTGCTGCCGCGTGAGGGCCTGAAG
AACGCCGAGGGCAAGGCGCTGAAGTACGACCGGATCTATTACGTGCGCGAGTATGACCTTTACGTGCCGCGT
GACGAGAACGGCAAGTACAAGGACTACGAGACGGTCGGTGAATCTTACGCCGACACGCTCGAGGTGATGCGC
AAGCTGACCCCGACCCATGTTGTCTTCAACGGCAAGGTCGGCGCCCTGACCGGCAAGAATGCGATGACCGCC
AAGGTCGGTGAGACCGTGATGATCGTGCATTCTCAGGCTAACCGGGACACCCGGCCGCACCTGATCGGCGGA
CACGGCGACTATGTCTGGGAAACCGGCAAGTTCGCCAACCCGCCGAGAAGAACCTTGAGACCTGGTTCATC
CGGGGCGGATCTGCGGGCGCTGCGCTCTACACCTTCAAGCAGCCCGGCATCTACGCCTACGTGAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 1 2

GGCATGGTTCCGTGGCACGTGCTCTCCGGCATGTCCGGCACGATCATGGTGCTGCCGCGGACGGCCTGAAG
AACGAGAAGGGCGAGCCGGTCCGCTACGACACCGTCTACTACATCGGCGAGAACGAGTTCTACATCCGCGC
GACGAGGACGGAACTTCATCAAGTTCGCCTCGCTGGGCGAGAGCTACGAGGAGACGATGAAGGTCATGCGC
GGCCTCGTGCCCAACCATGTGCTGTTCAACGGCCGGGTGCGCGCTGACGGGCGACAACGCGATGAAGTCG
AAGGTCGGCGAGACGGTGCTGTTCTGTCATTTCGACAGGCCAACC GCGACAGCCGGCCCCACCTGATCGGCGGC
CATGGCGACTACGTCTGGGAAGAGGGCAAGTTCGCCAACCCGCCGGCCAAGGATCTCGAGACCTGGTTCATC
CGCGGCGGCTCGGCCGGTGCAGCGCTCTACACCTTCCTCCAGCCGGGCGTGTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 1 3

GGCATGGTGCCGTGGCATGTGGTTTCGGGCATGGCGGGAAC TTGATGGTGCTGCCGCGGAGGGCCTGAAGG
ACGAAAAGGGCAATCCGCTGCGCTATGACCGGATCTACTACGTGCGCGAGAACGAGTTCTACATTCCGCGCG
ATGCGGACGGGAACTTCATCAACTTCGATTTCGCTGGGTGAGAGCTTTCCCGACACGCTCGAAGTGATGCGGG
GCCTGGTTCGACCCATGTGCTGTTCAACGGCAGGGCAGGAGCGCTGACAGGCGAGAACGCGATGAAGGCGA
AGGTCGGCGAGACGGTGCTGATCGTCCACAGCCAGGCCAATCGCGACACGCGCCCGCATCTGATCGGCGGCC
ATGGCGATTATGTGTGGGAGGAAGGCAAGTTCGCCAACCCGCCTGCCAAGGACCTGGAGACCTGGTTCATCC

GGGGCGGTTCCGGCCGAGCGGCGCTCTATACTTTCTGCAGCCCGGCGTCTACGCCTATGTGAACCACAACC
TGATCGAGGC

配列番号 1 4

GGCATGGTGCCCTGGCACGTCGTCTCCGGCATGGCCGGCGCGATCATGGTGCTGCCGCGGACGGGCTGAAG
AACGACAAGGGCGAGCCGGTCAGATACGACACCGCCTACTTCATCGGCGAGAACGAGTTCTACATCCCGCGC
GACGAGAACGGCAACTTCATCAGCTATGAATCGCTTGGTGAAGCTATGCCGGCACCATGGAGGTCATGCGC
AGCCTGGTTCCCACCCATGTCGTCTTCAACGGCCGGGTGCGGGCGCTGACCGGCGAAAATGCGATGGCGGCC
AATGTCGGCGAGACGGTGCTGTTTCGTCCACTCGCAGGCCAATCGCGACAGCCGGCCCCACCTGATCGGTGGC
CATGGCGACTATGTGTGGGAGGAAGGCAAGTTCGCCAACCCGCCCGCCAAGGACCTGGAGACCTGGTTCATC
CGTGGCGGATCGGCAGGGGCGGCGCTCTACACCTTCCTGCAGCCGGGCGTCTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 1 5

GGCATGGTGCCGTGGCACGTTGTCACCGGCATGAACGGCACACTTCTGGTTCTGCCGCGGACGGCCTGAAA
GACGCCTACGGCAACACCCTGAAGTACGACCGCATCTACACGATCGGAGAGCAGGATCTGTACATTCGGAAG
GATGAAGAAGGCAAGTACAAGAAGTACAACAGCCTGATTGAAAGCTACGCCGATACCACCGAAGCCATGCGC
GGCCTGATTCCAACGCATGTGGTGTTC AACGGCAAGGTGCGCGCGCTGACCGGCGAAGGCGCCTTGAAGGCC
AACGTGGGCGAAACCGTGCTGTTTCGTCCACGGCCAGTGCAACCGCGATACCGGTCTCACCTGATCGGCGGC
CACGCAGACTGGTTCTGGCCCCCTGGGCAAGTTCGGAATACGCCGGTCCGCGATATCGAAACCTGGTTCATC
CCGGGTGGCGCGTCGGCGGGCGGCCATCTACACCTTCAAGCAGCCCGGTGTGTATGCCTACGTGAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 1 6

GGCATGGTTCCTGGCACGTCGTCTCGGGCATGAGCGGCACGATCATGGTGCTGCCGCGGACGGCCTGAAG
AACGACAAGGGCGAGCTCGTCAAGTACGACACCGTCTACTACATCGGCGAGAACGAGTTCTACATCCCGCGC
GACGAGAACGGCGACTTCGTCAAGTTCGCCTCGCTCGGCGAGAGCTACGAGGAGACGATGAACGTCATGCGC
GGCCTCGTTCCGACCCATGTGGTCTTCAACGGCCGGGTGCGCGCGCTGACGGGCGAGAACGCCATGAAGTCG
AAGGTGCGCGAGACGGTGCTGTTTCGTTTATTCGCAGGCCAACCGCGACTCCAGGCCCCACCTGATCGGCGGC
CATGGCGACTATGTCTGGGAAGAGGGCAAGTTCGCCAACCCGCCCGCCAAGGACCTCGAGACCTGGTTCATC
CGCGGCGGTTCCGCGGGAGCGGCGCTGTACACCTTCCTCCAGCCGGGCGTGTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 1 7

GGCATGGTTCCGTGGCACGTCGTGTCCGGCATGAGCGGCACCATCATGGTGCTGCCGCGCAAGGACTGAAG
GCGGCCGACGGCAAGCCGCTGAAGTACGACAAGATCTACTGCGTCGGTGAGTACGATCTGTATGTGCCGCGC
GATGAGAACGGCAAGTACAAGGACTACGATACGCCGGGAGAAGCCTATGCCGATACGCTTGAGGTGATGCGC
GGCCTGGTGCCGACCCACGTCGTGTTC AACGGCAAGGTCGGTGCGCTGACCGGCAAGAACGCGATGACCGCC
AAGGTCGGTGAGACTGTCATGCTGGTCCATTCTCAGGCCAACCGGGATACCGGCCACACCTGATCGGCGGA
CACGGCGACTATGTGTGGGAGACTGGCAAGTTCGATAATCGGCCGGAGAAGGATTTGGAGACCTGGTTCATC
CGCGGTGGTTCCGCGGGGGCCGCGCTCTACACCTTCAAGCAGCCGGGCATCTACGCCTATGTCAACCACAAC
CTGATCGAGGC

配列番号 1 8

TACCACCCCGAGCCGCGCGTTCGCTCCATCGTGGCCTCCCACTACCGGCCCGAATTCATCGTCAACGTGAAG
GAAACCGGCCATATCCTTCTGGTCGACTACTCCGACATCAAGAACCTGAAGACCAC

配列番号 1 9

TACCACCCCGAGCCGCGCGTTGCCTCGATCGTCTCGTCGCACGACAAGCCCGAGTGGGTGATCAACGTCAAG
GAAACCGGCATGATCAAGCTGGTTGACTACTCGGACATCGCCAACCTGAAGGAAATCACCATCAACTCGGCG
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 0

TACCACCCCGAGCCGCGCGTTGCCGCGATCGTCTCATCGCACTACAAGCCGAGTTCCTGGTAAACGCCAAG
GAAACCGGTGTTGTGCACATGGTCGATTACACCGACCTCGACAACCTCAAGGTAACGATGATCAAGACGCCG
CGCTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 1

TACCACCCCGAGCCGCGCGTGGCCGCTATCGTGGCCAGCCACCAGAAGCCCGAGTTCCTGATCAACGCCAAG
GAAACCGGCAAGATCTGGATGGTGGACTACACCGACCTGGAGAACCTGAAGACCACGCAGATCAACTCGGCC
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 2

TACCACCCCGAGCCGCGCGTNGCCTCGATCGTGTGTCGCACAACAACCCCGAGTTCATCGTCAACGTCAAG
GAGACGGGCAAGATCCTGTTCTGTCGACTACACCGACCTGAAGAACCTGAAGACGATCGAGATCGAAGCCGAG
nGGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 3

TACCACCCCGAGCCGCGCGTCGCGTCGATCGTCGCCCTCCATGGTCAAGCCCGAATGGGTGGTGAACGTGAAG
GAGACGGGCCAGATCATGCTCGTCGACTACACCGACATCAAGAACCTCAAGACCACGACGATCGAGTCCGCG
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 4

TACCACCCCGAGCCGCGCGTCGCGGCGATCGTGGCAAACCACAGCAAGCCCGAGTCATGGTCAACGTGAAGG
AGACCGGCAAGATCCTGCTGGTCGACTACACCGACATCCGCAACCTGCGCACGACGGAGATCGAGGCAGCGC
GATTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 5

TACCACCCCGAGCCGCGCGTCGCGTCGATCGTCGCCGTGCACGACAAGCCGCAGTTCATCGTGAACGTGAAG
GAGACGGGCAAGATCATGCTCGTCGACTACACCGACCTGGAGAACCTGCGCACGATCGAGATCGGCGCGTCG
CGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 6

TACCACCCSGAGCCGCGCGTGGCCGCCATCGTGTCCAGCCACGAGAAGCCGGAGTTCCTGGTCAACGCCAAG
GAAACCGGCAAGATCTGGATGGTTGACTACACCGACCTGGACAACCTCAAGATGACGAAGATCAAGACGTCC
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 7

TACCACCCTGAGCCGCGCGTGGCCGCCATCGTGTCCAGCCACGAGAAGCCGGAATTCCTGGTCAACGCCAAG
GAAACCGGCAAGATCTGGATGGTGGACTACACCGACCTGGACAACCTCAAGATGACGAAGATCAAGACGTCC
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 8

TACCACCCCGAGCCGCGCGTCGCCCTCCATCGTCTCCTCGCACATCAAGCCGGAGTTCGTGGTCAACGTGAAG
GAGACCGGCAAGGTGCTGCTGGTCGACTACAGCGACCTCAAGAACCTGAAGACCACCGAGATCGAGGCCGAA
CGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 2 9

TACCACCCCGAGCCGCGCGTCGCCCTCGATCGTGTGTCGTCACAACAACCCCGAGTTCATCGTCAACGTGAAG
GAGACGGGCAAGATCCTGTTGTCGACTACACCGACCTGAAGAACCTGAAGACGGTCGAGGTCGAGGCCGAG
CGTTCCTGCACGACGGAGGC

配列番号 3 0

TACCACCCCGAGCCGCGCGTCGCCCTCGATCGTGTGTCGTCACAACAACCCCGAGTTCATCGTCAACGTCAAG

GAGACGGGCAAGATCCTGTTCTGTCGACTACACAGACCTGAAGAACCTGAAGACGGTCGAGGTGGAAGCCGAA
CGCTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 1

TACCACCCCGAGCCGCGCGTGGCCTCGATCGTGGCATCGCATTTCAAGCCGGAATTCCTGCTGTGGTCAAG
GAAACCGGCAAGGTGCTGTTCTGTTGACTATACCGACCTCGACCACCTGAAGACGACCGAGGTGCGGCGGAT
CGCTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 2

TACCACCCGGAACCGCGCGTGGCCGCTATCGTGGCCAGCCACCAGAAGCCCGAGTTCCTGATCAACGCCAAG
GAAACCGGCAAGATCTGGATGGTGGACTACACCGACCTGGAGAACCTGAAGACCACGCAGATCAACTCGGCC
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 3

TACCACCCGGAACCGCGCGTGGCGGCCATCGTCTCCAGCCATGAGAAGCCCGAGTTCCTGGTCAACGCCAAG
GAAACCGGCAAGATCTGGATGGTCGACTACACCGATCTCGAGAACCTCAAGACCACGCAGATCGACACCGCC
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 4

TACCACCCGGAACCGCGCGTTGCCTCGATCGTCTCGTCGCACGACAAGCCCGAGTGGGTGATCAACGTCAAG
GAAACCGGCATGATCAAGCTGGTTGACTACTCGGACATCGCCAACCTGAAGGAATCACCATCAACTCGGGCG
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 5

TACCACCCGGAACCGCGCGTGGCGGCCATCGTCTCCAGCCATGAGAAGCCCGAGTTCCTGGTCAACGCCAAG
GAAACCGGCAAGATCTGGATGGTCGACTACACCGACCTGGAGAACCTGAAGACGACGCAGATCGACACCGCC
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 6

TACCACCCGGAACCGCGCGTCGCGGCGATCGTGGCAAACCACAGCAAGCCCGAGTTCATCGTCAACGTGAAG
GAGACCGGCAAGATCTTGCTGGTCGACTACACCGACATCCGCAACCTGCGCAGCAGGAGATCGACAGCGCG
AAGTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 7

TACCACCCGGAACCGCGCGTCGCCGCCATCGTGTCTGTCACACGAGCACCCGGAGTTCATCGTCAACGTCAAG
GAGACCGGCCAGATCCTGCTGGTGGACTACAGCAACGTGAACGCGCTGAAGACCACCACCATCGGGGCCGCA

CGCTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 8

TACCACCCGGAACCGCGCGTCGCGGCGATCGTGGCAAACACAGCAAGCCCGAGTTCATCGTCAACGTGAAG
GAGACCGGCAAGATCCTGCTGGTCGACTACACCGACATCCGCAACCTGCGCACGACGGACATCGAAGGCGCG
CGATTCTGCACGACGGCGGC

配列番号 3 9

TACCACCCGGAACCGCGCGTTGCGGCGATCGTGGCCTCGCATAACCGTCCCGAGTTCATCGTCAACGTCAAG
GCAACCGGCAAGATCATGCTGGTCGACTACACCGAACTGAAGAACCTCAAGACGAGTGACATCGACGCCGAG
CGCTTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 4 0

GG(A/C)ATGGT(G/T)CC(C/G)TGGCA

配列番号 4 1

GCCTCGATCAG(A/G)TT(A/G)TGG

配列番号 4 2

(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG)TACCACCCSGARCCGCGCGT

配列番号 4 3

GCCGCGGTCRTGVAGGAA

配列番号 4 4

GTTTTCCCAGTCACGAC

配列番号 4 5

CAGGAAACAGCTATGAC

配列番号 4 6

(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG)TACCACCCGAGCCGCGCGT

配列番号 4 7

TTCCTGCACGACGGCGGC

配列番号 4 8

(CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG)TACCACCCGGAACCGCGCGT

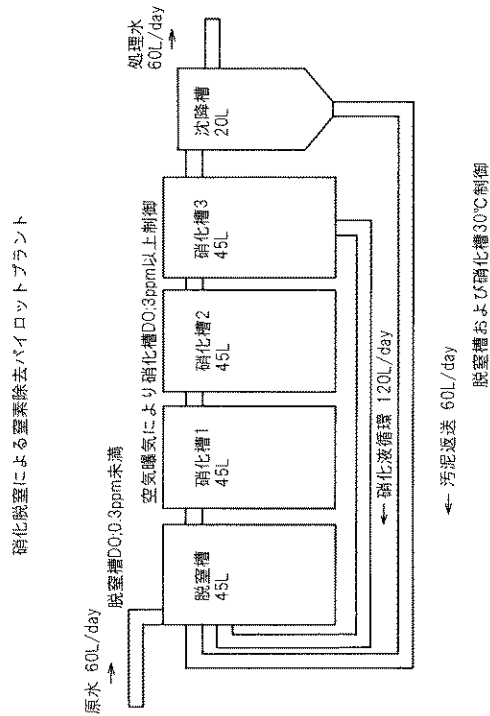
【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、硝化脱窒による窒素除去パイロットプラントの概略図である。

【図 2】図 2 に原水と処理水の全窒素濃度及び窒素除去の性能の目安となる原水と処理水の全窒素濃度の差の推移を示す。

【図 1】

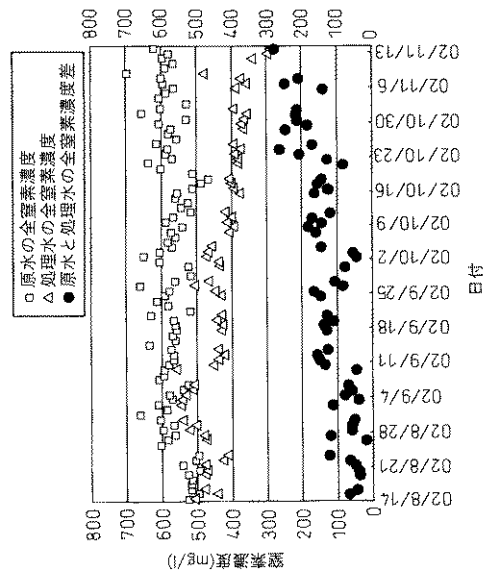
図 1



【図 2】

図 2

バイロットプラントによる窒素除去性能の推移



【手続補正書】

【提出日】平成15年5月30日(2003.5.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0109

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0109】

【発明の効果】

本発明は、窒素含有排水から窒素除去する作用を有する微生物を明らかにすると共に、DNAの塩基配列を用いて当該微生物を検出する方法を確立した。これにより、窒素除去方法及びその評価方法を提供することを可能にした。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nippon Steel Co., Ltd.

<120> Microorganisms present in the activated sludges in water treating plants used for eliminating nitrogen-containing compounds

<130> 1033876

<140> 2003-148188

<141> 2003-05-26

<160> 48

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 515

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone U13

<400> 1

```

ggcatggttc cgtggcacgt cgtgtccggg atgagcggca ccatcatggt gctgccgcgc      60
gaggggciga agacggccga cggcaaggcg ctgaagtacg acaagatcta ctacgtcggc      120
gagtacgacc tgtatgtgcc gcgcgatgag aacggcaagt acaaggacta cgacaccccg      180
ggagaggcct atgccgatac gctggaggctg atgcgcggac tgatcccgac ccacgtcgtg      240
ttcaacggca aggtcggcgc gctgaccggc aagaacgcaa tgaccgcaa ggtaggcgag      300
accgtcatgc tcgtccactc tcaggccaac cgggataccc ggccgcacct gatcggcgga      360
cacggcgact atgtgtggga gacgggcaag ttcgacaacc cgcctgagaa gaacctggag      420
acciggttca tccgaggtag atccgcgggt gctgcgtctt acaccttcaa gcagcccggc      480
atctatgcct acgtcaacca caacctgac gaggc                                     515

```

<210> 2

<211> 515

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone M17

<400> 2

```

ggcatggttc cgtggcacgt cacttccggc atgaacggcg ccatcatggt gctgccgcgc      60

```

gaggggttga cgcacggcaa cggcaaggat ctttctacg accgcatcta ctacgtgggt 120
 gagcaggact tctatgtccc gcgcgacgag aacggcgagt acaagaagta cgagaccatc 180
 aacgactcct acttcgacac ggtccagacc atgcgcacgc tggtgcccag ccacatcgtg 240
 ttcaacggtg cggtcggcgc cctcacggga gacaacgcgc tcaaggctgc cgtcggcgag 300
 acggtttca tcatccactc gcaggcgaac cgtgataccc gcccgcacct catcgggtggc 360
 catggcgact atgtctgggc cacgggcaag ttccgcaacc cgcctgatct cgatcaggag 420
 acctggttca ttccgggcgg caccgccggc gccgcgctct acaccttca gcagcccggc 480
 atctacgcct acgtgaacca caacctgatc gaggc 515

<210> 3

<211> 515

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone U13

<400> 3

ggaatggttc cgtggcacgt cgtgtccggg atgagcggca ccatcatggt gctgccgcgc 60
 gaaggactga aggcggccga cggcaagccg ctgaagtacg acaagatcta ctacgtcgggt 120
 gactacgac tgtatgtgcc gcgcgatgag aacggcaagt acaaggacta cgatacgccg 180
 ggagaagcct atgccgatac gcttgagggt atgcgcggcc tggtgccgac ccacgtcgtg 240
 ttcaacggca aggtcgggtc gctgaccggc aagaacgcga tgaccgcaa ggtcgggtgag 300
 actgtcatgc tggttcattc tcaggccaac cgggataccc ggccacacct gatcggcgga 360
 cacggcgact atgtgtggga gactggcaag ttcgataatc ggccggagaa ggatttggag 420
 acctggttca tccgcgggtg ttccgcgggg gccgcgctct acaccttcaa gcagccgggc 480
 atctacgcct atgtcaacca caacctgatc gaggc 515

<210> 4

<211> 515

<212> DNA

<213> Mesorhizobium sp. 4FB11

<400> 4

ggcatggttc cctggcacgt cgtttccggc atgtccggca cgatcatggt gctgccgcgc 60
 gacggcciga agaacgagaa gggcgagccg gtccgttacg acaccgtgta ctacatcggc 120

gagaacgagt tctacatccc gcgcgacgag gacggaaact tcatcaagtt cgactcgctc 180
 ggcgagagct acgagaagac gatggaggtc atgcgcggcc tgatcccgac ccacgtggtc 240
 ttcaacggcg ccgtcggcgc gctgacgggc gacaacgcgc tgaagtcgaa ggtcggcgag 300
 acggctgctgt tcatccacgc ccaggccaac cgcgactcca ggccccacct gatcggcggc 360
 catggcgact atgtctggga agagggaag ttccccaatc ctccggccaa ggatctggag 420
 acctggttca tccgcggcgg ttccggcggg gcggcgctct acaccttctt gcagccgggt 480
 gtgtacgcct atgtcaacca caacctgac gaggc 515

<210> 5

<211> 515

<212> DNA

<213> *Alcaligenes* sp. STC1

<400> 5

ggcatgggtc cstggcacgt ggtgtcgggc atgagcggca cgctgatggt gctgccgcgt 60
 gacggcciga aagacccgga aggcaagccc ctgacctacg acaaggcctg gacgatcggc 120
 gagttcgacc tctacattcc gaaagacgaa aacggcaact acaaagacta cgacactctg 180
 gccgaaaagt atgccgacac ggtcgaaggc atgcgcacgc tcatccac ccacgtggtg 240
 ttcaacggca aggtgggcgc gcttaccggc gaaaatgcgc tgacctcgaa agtgggtgaa 300
 accgtgctgt tcgtccacgg ccagtgaac cgcgatacgc gtcttcacct gatcggcggc 360
 cacgcagact ggttctggcc cctgggcaag ttctcgaata cgccgggtccg cgatatcgaa 420
 acctggttca tcccgggtgg cgcgtcggcg gcggccatct acaccttcaa gcagcccgtt 480
 gtgtatgcct acgtgaacca caacctgac gaggc 515

<210> 6

<211> 515

<212> DNA

<213> *Mesorhizobium* sp. 4FB11

<400> 6

ggcatgggtc cgtggcacgt cgtctccggc atgtccggca cgatcatgat gctgccgcgc 60
 gacggcciga agaacgagag gggcgagccg gtccgtacg acaccgtcta ctacatcggc 120
 gagaacgagt tctacatccc gcgcgacgag aacggcaact tcatcagcta tgaatcgctt 180

```

ggtagaaagct atgccggcac catggaggtc atgcgcagcc tggttccac ccatgtcgtc 240
ttcaacggcc gggtcggggc gctgaccggc gaaaatgcga tggcggccaa tgtcggcgag 300
acggtgctgt tcgtccactc gcaggccaat cgcgacagcc ggccccacct catcgggtggc 360
catggcgact atgtgtggga ggaaggcaag ttcgccaacc cgcccgccaa ggacctggag 420
acctggttca tccgtggcgg atcggcgggg gcggcgctct acaccttctt gcagccgggc 480
gtctacgctt atgtcaacca caacctgatc gaggc 515

```

<210> 7

<211> 515

<212> DNA

<213> Mesorhizobium sp. 4FB11

<400> 7

```

ggcatggigc cgtggcacgt cgttgcgggc atgaatggta tgatcatggt gttgccgcgc 60
gacgggctga agaacgagaa gggcgaaccg gtccggtacg atagcgtcta ctatcggc 120
gagagcgact tctacatccc gcgcgacgag aatggcgact tcgtcaactt cgagtcgctg 180
ggcgacagct acgccgacac gctggaagtg atgaaggggc tgattccgac ccatgtggtc 240
ttcaatggca ggatcggcgc gttgacgggc gatcggcgc tgaagtcgaa ggttggtag 300
acggtgcttt tcgtccattc gcaggccaac cgcgacagcc ggccccacct gatcggcggc 360
catggcgact atgtctggga agaaggcaag ttcgccaatc cgccggccaa ggatctggag 420
acctggttca tccggggtagg ttcggcgggc gttgcgttct acactttctt gcaaccggga 480
gtgtacgctt atgtcaacca caacctgatc gaggc 515

```

<210> 8

<211> 515

<212> DNA

<213> Alcaligenes xylosoxidans

<400> 8

```

ggcatggigc cgtggcacgt ggtgtcgggc atgagcggca cgctgatggt gctgccgcgt 60
gacggcciga aagacccgga aggcaagccc ctgacctacg acaaggcctg gacgatcggc 120
gagttcgacc tctacattcc gaaagacgaa aacggcaact acaaagacta cgacactctg 180
gccgaaagct atgtcgacac ggtcgaggcc atgcgcacgc tcattccac ccacgtggtg 240

```

ttcaacggca aggtgggcgc gcttaccggc gaaaatgcgc tgacctcgaa agtgggtgaa 300
 accgtgciga tgaiccatc gcaggccaac cgcgacaccc gcccgacct gatcggcggc 360
 cacggcgact gggctcggga aaccggcaag ttcgccaacc ctcccgagaa agacctggaa 420
 acctggttca ttcgtggtag ttcggctggc gcggcactct acaccttcaa gcagcccggc 480
 gtgtatgcct acgtgaacca caacctgac gaggc 515

<210> 9

<211> 515

<212> DNA

<213> Mesorhizobium sp. 4FB11

<400> 9

ggaatggtag cctggcacgt cgtgtcgggc atggccggca ccatcatggt gctgccgcgc 60
 gaggcciga agaacgacag gggcgagccg gtacgttacg acaaggctca ctatcggc 120
 gagagcgagt tctacatccc gcgcgacgag aacggcaact tcatcagcta tgaatcgctt 180
 ggtagaaagt atgccggcac catggaggtc atgcgcagcc tggttccac ccatgtcgtc 240
 ttcaacggcc gggtcggggc gctgaccggc gaaaatgcga tggcggccaa tgtcggcgag 300
 accgtgcigt tcgtccactc gcaggccaat cgcgacagcc ggccccacct catcggtagc 360
 catggcgact atgtgtggga ggaaggcaag ttcgccaacc cgcgcgcaa ggacctggag 420
 acctggttca tccgtggcgg atcggcgggg gcggcgctct acaccttct gcagccgggc 480
 gtctacgcct atgtcaacca caacctgac gaggc 515

<210> 10

<211> 515

<212> DNA

<213> Mesorhizobium sp. 4FB11

<400> 10

ggaatggtag cgtggcacgt cgtggcgggc atgagcggca ccatcatgat cctgccgcgc 60
 gacggcciga aggacgagaa gggcaggccg gtccgttacg ataccgtcta ttacgtcggc 120
 gagaacgagt tctacatccc gcgcgatgcc gacggaaact tcaagacgtt cgagagcctc 180
 ggcgacagct atgccgatac cattgcgacc atgcgcggcc tgatcccgac ccatgtcgtc 240
 ttcaacggcc gggtcggcgc attgaccggc gacggagcga tgaaggccaa ggtcggcgag 300

accgtgctgt tcgtccactc tcaggccaac cgcgacacgc ggccccacct gatcggcgga 360
cacggcgact acgtctggga ggagggaag ttgccaacc cacttgcaa ggaatcagag 420
acctggttca tccgtggcgg atctgcgggc gcggcgctct acaccttct gcagccgggc 480
gtctacgct acgtcaacca caacctgatc gaggc 515

<210> 11

<211> 515

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone M27

<400> 11

ggcatggigc cgtggcacgt cgtgtccggc atgagcggca ccatcatggt gctgccgcgt 60
gagggcciga agaacgccga gggcaaggcg ctgaagtacg accggatcta ttacgtcggc 120
gagtaigacc ttacgtgcc gcgtgacgag aacggcaagt acaaggacta cgagacggtc 180
ggtaaatctt acgccgacac gctcgaggtg atgcgcaagc tgaccccgac ccatgttgic 240
ttcaacggca aggtcggcgc cctgaccggc aagaatgcga tgaccgcaa ggtcggtag 300
accgtgatga tcgtgcattc tcaggctaac cgggacaccc ggccgcacct gatcggcgga 360
cacggcgact atgtctggga aaccggcaag ttgccaacc cgccggagaa gaaccttag 420
acctggttca tccggggcgg atctgcgggc gctgcgctct acaccttcaa gcagccgggc 480
atctacgct acgtgaacca caacctgatc gaggc 515

<210> 12

<211> 515

<212> DNA

<213> Mesorhizobium sp. 4FB11

<400> 12

ggcatggitc cgtggcacgt cgtctccggc atgtccggca cgatcatggt gctgccgcgc 60
gacggcciga agaacgagaa gggcgagccg gtccgtacg acaccgtcta ctacatcggc 120
gagaacgagt tctacatccc gcgcgacgag gacggaaact tcatcaagtt cgcctcgtg 180
ggcgagagct acgaggagac gatgaaggtc atgcgcggcc tcgtgccac ccatgtcgtg 240
ttcaacggcc gggtcggcgc gctgacgggc gacaacgcga tgaagtcgaa ggtcggcgag 300
acggigctgt tcgtccattc gcaggccaac cgcgacagcc ggccccacct gatcggcggc 360

catggcgact acgtctggga agagggcaag ttcgccaacc cgccggccaa ggatctcgag 420
 acciggtica tccgcgccgg ctccggccgt gcagcgctct acaccttctt ccagccgggc 480
 gtgtacgcct atgtcaacca caacctgac gaggc 515

<210> 13

<211> 514

<212> DNA

<213> Mesorhizobium sp. 4FB11

<400> 13

ggcatgggtgc cgtggcatgt ggtttcgggc atggcgggaa ctgatgggtg ctgccgcgcg 60
 agggccctgaa ggacgaaaag ggcaatccgc tgcgctatga ccggatctac tacgtcggcg 120
 agaacgagtt ctacattccg cgcgatgcgg acgggaactt catcaacttc gattcgcctgg 180
 gtgagagctt tcccgacacg ctccaagtga tgcggggcct gggtccgacc catgtcgtgt 240
 tcaacggcag ggcaggagcg ctgacaggcg agaacgcgat gaaggcgaag gtcggcgaga 300
 cggigctgat cgtccacagc caggccaatc gcgacacgcg cccgcattcg atcggcggcc 360
 atggcgatta tgtgtgggag gaaggcaagt tcgccaacc gcctggcaag gacctggaga 420
 cctggttcat ccggggcggg tcggccggag cggcgctcta tactttctg cagcccggcg 480
 tctacgccta tgtgaaccac aacctgacg aggc 514

<210> 14

<211> 515

<212> DNA

<213> Mesorhizobium sp. 4FB11

<400> 14

ggcatgggtgc cctggcacgt cgtctccggc atggccggcg cgatcatggt gctgccgcgc 60
 gacgggciga agaacgacaa gggcgagccg gtcagatacg acaccgcta ctteatcggc 120
 gagaacgagt tctacatccc gcgcgacgag aacggcaact tcatcagcta tgaatcgctt 180
 ggtgaaaagct atgccggcac catggaggtc atgcgcagcc tggttcccac ccatgtcgtc 240
 ttcaacggcc gggtcggggc gctgaccggc gaaaatgcga tggcggccaa tgtcggcgag 300
 acggigctgt tcgtccactc gcaggccaat cgcgacagcc ggccccacct gatcgggtggc 360
 catggcgact atgtgtggga ggaaggcaag ttcgccaacc cgccggccaa ggacctggag 420

acctgggttca tccgtggcgg atcggcaggg gcggcgctct acaccttctt gcagccgggc 480
gtctacgcct atgtcaacca caacctgatc gaggc 515

<210> 15

<211> 515

<212> DNA

<213> *Pseudomonas mendocina*

<400> 15

ggcatgggtc cgtggcacgt tgtaccggc atgaacggca cacttctggt tctgccgcgc 60
gacggccctga aagacgccta cggcaacacc ctgaagtacg accgcatcta cacgatcgga 120
gagcaggatc tgtacattcc gaaggatgaa gaaggcaagt acaagaagta caacagcctg 180
attgaaagct acgccgatac caccgaagcc atgcgcggcc tgattccaac gcatgtgggtg 240
ttcaacggca aggtcggcgc gctgaccggc gaaggcgctt tgaaggccaa cgtgggcgaa 300
accgtgctgt tcgtccacgg ccagtgcac cgcgatacgc gtccctacct gatcggcggc 360
cacgcagact gggtctggcc cctgggcaag ttctcgaata cgccgggtccg cgatatcgaa 420
acctgggttca tcccggttgg cgcgtcggcg gcggccatct acaccttcaa gcagcccgtt 480
gtgtatgcct acgtgaacca caacctgatc gaggc 515

<210> 16

<211> 515

<212> DNA

<213> *Mesorhizobium* sp. 4FB11

<400> 16

ggcatgggtc cctggcacgt cgtctcgggc atgagcggca cgatcatggt gctgccgcgc 60
gacggccctga agaacgacaa gggcgagctc gtcaagtacg acaccgtcta ctacatcggc 120
gagaacgagt tctacatccc gcgcgacgag aacggcgact tcgtcaagtt cgcttcgctc 180
ggcgagagct acgaggagac gatgaacgtc atgcgcggcc tcgttccgac ccatgtgggtc 240
ttcaacggcc gggtcggcgc gctgacgggc gagaacgcca tgaagtcgaa ggtcggcgag 300
acgggtgctgt tcgttcattc gcaggccaac cgcgactcca ggccccacct gatcggcggc 360
catggcgact atgtctggga agagggaag ttccccaacc cgcccgccaa ggacctcgag 420
acctgggttca tccgcggcgg ttccggcggga gcggcgctgt acaccttctt ccagccgggc 480

gtgtacgcct atgtcaacca caacctgac gaggc 515

<210> 17

<211> 515

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone M58

<400> 17

ggcatgggtc cgtggcacgt cgtgtccggc atgagcggca ccatcatggt gctgccgcgc 60

gaaggaciga aggcggccga cggcaagccg ctgaagtacg acaagatcta ctgcgtcggc 120

gagtacgac tgtatgtgcc gcgcgatgag aacggcaagt acaaggacta cgatacgccg 180

ggagaagcct atgccgatac gcttgaggcg atgcgcggcc tggtgccgac ccacgtcgtg 240

ttcaacggca aggtcggcgc gctgaccggc aagaacgcga tgaccgcaa ggtcggcgtg 300

actgtcaigc tggccattc tcaggccaac cgggataccc ggccacacct gatcggcggc 360

cacggcgact atgtgtggga gactggcaag ttcgataatc ggccggagaa ggatttggag 420

acctgggtca tccgcggcgg ttcgcggggg gccgcgtct acaccttcaa gcagccgggc 480

atctacgcct atgtcaacca caacctgac gaggc 515

<210> 18

<211> 128

<212> DNA

<213> Paracoccus denitrificans Pd1222

<400> 18

taccaccccg agccgcgcgt cgcctccatc gtggcctccc actaccggcc cgaattcacc 60

gtcaacgiga aggaaaccgg ccataatcct ctggcgcact actccgacat caagaacctg 120

aagaccac 128

<210> 19

<211> 165

<212> DNA

<213> Thauera aromatica strain AR1

<400> 19

taccaccccg agccgcgcgt tgcctcgatc gtctcgtcgc acgacaagcc cgagtgggtg 60

atcaacgtca aggaaaccgg catgatcaag ctgggtgact actcggacat cgccaacctg 120
aaggaaaatca ccatcaactc ggcgaagttc ctgcacgacg gcggc 165

<210> 20

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone HNIS-16

<400> 20

taccaccccg agccgcgcgt tgcgcgac gtctcatcgc actacaagcc ggagttcctg 60
gtaaacgcca aggaaaccgg tgttgatcac atggtcgatt acaccgacct cgacaacctc 120
aaggtaacga tgatcaagac gccgcgcttc ctgcacgacg gcggc 165

<210> 21

<211> 165

<212> DNA

<213> A.eutrophus nirS gene

<400> 21

taccaccccg agccgcgcgt ggccgctatc gtggccagcc accagaagcc cgagttcctg 60
atcaacgcca aggaaaccgg caagatctgg atgggtggact acaccgacct ggagaacctg 120
aagaccacgc agatcaactc ggccaagttc ctgcacgacg gcggc 165

<210> 22

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone HNIS-16

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> "n"="a" or "c" or "g" or "t"

<220>

<221> misc_feature

<222> (145)..(145)

<223> "n"="a" or "c" or "g" or "t"

<400> 22

taccacccccg agccgcgcgt ngcctcgatc gtgtcgtcgc acaacaaccc cgagttcatc	60
gtcaacgtca aggagacggg caagatcctg ttcgtcgact acaccgacct gaagaacctg	120
aagacgatcg agatcgaagc cgagnggttc ctgcacgacg gcggc	165

<210> 23

<211> 165

<212> DNA

<213> *Azoarcus toluovorans*

<400> 23

taccacccccg agccgcgcgt cgcgtcgatc gtcgcctcca tggtaagcc cgaatgggtg	60
gtgaacgtga aggagacggg ccagatcatg ctcgtcgact acaccgacat caagaacctc	120
aagaccacga cgaatcgatc cgcgaagttc ctgcacgacg gcggc	165

<210> 24

<211> 164

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone HN1S-6

<400> 24

taccacccccg agccgcgcgt cgcggcgatc gtggcaaacc acagcaagcc cgagtcattg	60
tcaacgtgaa ggagaccggc aagatcctgc tggtcgacta caccgacatc cgcaacctgc	120
gcacgacgga gatcgaggca gcgcgattcc tgcacgacgg cggc	164

<210> 25

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone nirSAK4

<400> 25

taccacccccg agccgcgcgt cgcgtcgatc gtcgccgtgc acgacaagcc gcagttcatc	60
gtgaacgtga aggagacggg caagatcatg ctcgtcgact acaccgacct ggagaacctg	120
cgcacgatcg agatcggcgc gtcgcgcttc ctgcacgacg gcggc	165

<210> 26

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone nirSAK2

<400> 26

```
taccacccsg agccgcgcgt ggccgccatc gtgtccagcc acgagaagcc ggagttcctg      60
gtcaacgcca aggaaaccgg caagatctgg atgggtgact acaccgacct ggacaacctc      120
aagatgacga agatcaagac gtccaagttc ctgcacgacg gcggc                      165
```

<210> 27

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone ANIS-76

<400> 27

```
taccaccctg agccgcgcgt ggccgccatc gtgtccagcc acgagaagcc ggaattcctg      60
gtcaacgcca aggaaaccgg caagatctgg atgggtgact acaccgacct ggacaacctc      120
aagatgacga agatcaagac gtccaagttc ctgcacgacg gcggc                      165
```

<210> 28

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone HNIS-6

<400> 28

```
taccaccccg agccgcgcgt cgcctccatc gtctctctgc acatcaagcc ggagttcgtg      60
gtcaacgtga aggagaccgg caaggtgctg ctgggtgact acagcgacct caagaacctg      120
aagaccaccg agatcgaggc cgaacgttcc ctgcacgacg gcggc                      165
```

<210> 29

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone HNIS-6

<400> 29

taccacccccg agccgcgcgt cgcctcgatc gtgtcgtcgc acaacaaccc cgagttcatc 60
 gtcaacgiga aggagacggg caagatcctg ttcgtcgact acaccgacct gaagaacctg 120
 aagacggtcg aggtcgaggc cgagcgcttc ctgcacgacg gaggc 165

<210> 30

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone HNIS-6

<400> 30

taccacccccg agccgcgcgt cgcctcgatc gtgtcgtcgc acaacaaccc cgagttcatc 60
 gtcaacgiga aggagacggg caagatcctg ttcgtcgact acacgacct gaagaacctg 120
 aagacggtcg aggtggaagc cgaacgcttc ctgcacgacg gcggc 165

<210> 31

<211> 165

<212> DNA

<213> *Paracoccus pantotrophus*

<400> 31

taccacccccg agccgcgcgt ggcctcgatc gtggcatcgc atttcaagcc ggaattcctg 60
 ctgtcggica aggaaaccgg caagtgctg ttcgtggact ataccgacct cgaccacctg 120
 aagacgaccg aggtcgcggc cgatcgcttc ctgcacgacg gcggc 165

<210> 32

<211> 165

<212> DNA

<213> *Thauera linaloolentis*

<400> 32

taccacccgg aaccgcgcgt ggccgctatc gtggccagcc accagaagcc cgagttcctg 60
 atcaacgcca aggaaaccgg caagatctgg atggtggact acaccgacct ggagaacctg 120
 aagaccacgc agatcaactc ggccaagtgc ctgcacgacg gcggc 165

<210> 33

<211> 165

<212> DNA

<213> *Paracoccus denitricans* Pd1222

<400> 33

taccacccgg aaccgcgcgt ggcggccatc gtctccagcc atgagaagcc cgagttcctg	60
gtcaacgcc aaggaaaccgg caagatctgg atggtcgact acaccgatct cgagaacctc	120
aagaccacgc agatcgacac cgccaagttc ctgcacgacg gcggc	165

<210> 34

<211> 165

<212> DNA

<213> *Thauera aromatica* strain AR1

<400> 34

taccacccgg aaccgcgcgt tgcctcgatc gtctcgtcgc acgacaagcc cgagtgggtg	60
atcaacgtca aaggaaaccgg catgatcaag ctgggtgact actcggacat cgccaacctg	120
aaggaatcac catcaactcg ggcgaagttc ctgcacgacg gcggc	165

<210> 35

<211> 165

<212> DNA

<213> *Thauera terpenica* strain 58Eu

<400> 35

taccacccgg aaccgcgcgt ggcggccatc gtctccagcc atgagaagcc cgagttcctg	60
gtcaacgcc aaggaaaccgg caagatctgg atggtcgact acaccgacct ggagaacctg	120
aagacgacgc agatcgacac cgccaagttc ctgcacgacg gcggc	165

<210> 36

<211> 165

<212> DNA

<213> Uncultured bacterium clone HNIS-6

<400> 36

taccacccgg aaccgcgcgt cgcggcgatc gtggcaaacc acagcaagcc cgagttcatc	60
gtcaacgtga aggagaccgg caagatcttg ctggtcgact acaccgacat ccgcaacctg	120

cgcacgacgg agatcgacag cgcgaagttc ctgcacgacg gcggc 165
 (210) 37
 (211) 165
 (212) DNA
 (213) *Pseudomonas aeruginosa* strain Mill
 (400) 37
 taccacccgg aaccgcgcgt cgccgccatc gtgtcgtcac acgagcaccg ggagttcatc 60
 gtcaacgtca aggagaccgg ccagatcctg ctggcggact acagcaacgt gaacgcgctg 120
 aagaccacca ccatcggggc cgcacgcctc ctgcacgacg gcggc 165
 (210) 38
 (211) 165
 (212) DNA
 (213) Uncultured bacterium clone HN1S-6
 (400) 38
 taccacccgg aaccgcgcgt cgccggcgatc gtggcaaacc acagcaagcc cgagttcatc 60
 gtcaacgtga aggagaccgg caagatcctg ctggcggact acaccgacat ccgcaacctg 120
 cgcacgacgg acatcgaagg cgcgcgattc ctgcacgacg gcggc 165
 (210) 39
 (211) 165
 (212) DNA
 (213) *Paracoccus denitrificans* Pd1222
 (400) 39
 taccacccgg aaccgcgcgt tgcggcgatc gtggcctcgc ataaccgtcc cgagttcatc 60
 gtcaacgtca aggcaaccgg caagatcatg ctggcggact acaccgaact gaagaacctc 120
 aagaccgagt acatcgacgc cgagcgcttc ctgcacgacg gcggc 165
 (210) 40
 (211) 17
 (212) DNA
 (213) PCR primer nirK1F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> "n" = "a" or "c" or "g" or "t"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> "s" = "c" or "g"
 <400> 40
 ggnaagggttc cstggca 17
 <210> 41
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> PCR primer nirK5R
 <400> 41
 gcctcgatca grttttgg 18
 <210> 42
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> PCR primer nirS Forward
 <400> 42
 cgccccccgc gccccgcgcc cgtccccgcc cccccgccg taccaccsg arccgcgcgt 60
 <210> 43
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> PCR primer nirS Reverse
 <400> 43
 gccgccgtcr tgvaggaa 18
 <210> 44

(211) 17
 (212) DNA
 (213) PCR primer M13 forward MB-M4
 (400) 44
 gttttcccag tcacgac 17
 (210) 45
 (211) 17
 (212) DNA
 (213) PCR primer M13 reverse MBRV
 (400) 45
 caggaaacag ctatgac 17
 (210) 46
 (211) 60
 (212) DNA
 (213) PCR primer nirS2FGC(CG)
 (400) 46
 cgccccgccg gccccgcgcc cgtcccgccg cccccgccg taccaccccg agccgcgcgt 60
 (210) 47
 (211) 18
 (212) DNA
 (213) PCR primer nirS3R(GC)
 (400) 47
 ttccctgcacg acggcggc 18
 (210) 48
 (211) 60
 (212) DNA
 (213) PCR primer nirS2FGC(GA)
 (400) 48
 cgccccgccg gccccgcgcc cgtcccgccg cccccgccg taccacccgg aaccgcgcgt 60

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
	C 1 2 N 1/20	Z A B A
	C 1 2 N 1/20	
	C 1 2 R 1:01	

(72)発明者 味埜 俊
東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院 新領域創成科学研究科内

(72)発明者 伊藤 公夫
千葉県富津市新富20-1 新日本製鐵株式会社技術開発本部内

(72)発明者 三木 理
千葉県富津市新富20-1 新日本製鐵株式会社技術開発本部内

Fターム(参考) 4B024 AA17 BA08 CA02 CA04 DA06 EA04 GA11 HA12
4B065 AA01Y AA12X AA26X AA41X AB01 AC14 BA02 CA28 CA54 CA56
4D040 BB05 BB57 DD03 DD11 DD14