

II-145

活性汚泥中の芳香族化合物分解菌検出への
DNA-DNAコロニーハイブリダイゼーション法の適応
(第1報) -pheBプローブの特異性に関する検討-

大阪大学工学部 (学生員) 森 一博 (正員) 藤田正憲
(正員) 池 道彦 (学生員) 岡田 博

1. はじめに

近年、強力な分解菌や遺伝子組換えによって作成された育種細菌を廃水処理へ活用し、難分解性物質の除去効率を向上させる試みが検討されている。この際各種分解菌の生態挙動を正確に把握することが重要である。従来、分解菌の検出は表現型を利用した方法(選択培地による検出)によってなされてきたが、分解遺伝子の多くは菌体間を移動するプラスミド上にコードされていることが知られるようになり、遺伝子型そのものを検出する必要が高まってきた。本報告では、比較的容易に遺伝子型を検出できるDNA-DNAコロニーハイブリダイゼーション法を活性汚泥中の分解菌検出に適用するための基礎的検討を行った。ここでは、カテコール分解遺伝子の標識により作成されたpheBプローブの特異性について検討した。

2. 実験材料及び方法

ODNAプローブ: 活性汚泥より分離されたフェノール分解菌*Pseudomonas putida* BH株の染色体由来のカテコール2,3オキシゲナーゼ(C2,3O)構造遺伝子(pheB)を含む5.7kb DNA断片を、ランダムプライム法によりジゴキシゲニンが付加したdUTPで非放射性標識したpheBプローブを用いた。ここで、プローブの作成、検出にはDNAラベリング&ディテクションキット(バーリンガー・マンハイム山之内社製)を用いた。

○使用菌株及びプラスミド: 本実験の供試菌株(プラスミド)を表1に示した。表中、xylE及びnahHはBH株以外の細菌に由来するC2,3O遺伝子である。

表1 供試菌株

No.	菌株(プラスミド)	表現型及び遺伝子型
1.	<i>Pseudomonas putida</i> BH	Phe ⁺ , Ben ⁺ , pheB
2.	<i>Pseudomonas putida</i> PpG1064	Phe ⁺ , Ben ⁺ , trp
3.	<i>Pseudomonas cepacia</i> AC1228	Ben ⁺
4.	<i>Pseudomonas fluorescences</i> AC2000	Ben ⁺
5.	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> SS86	Phe ⁺ , Ben ⁺ , BHC ⁺
6.	<i>Escherichia coli</i> C600	leu, thr, thi
7.	<i>Escherichia coli</i> JM103	thi
8.	<i>Escherichia coli</i> C600(pBR325)	leu, thr, thi (CV: Ap ^r , Tc ^r , Km ^r)
9.	<i>Escherichia coli</i> C600(pLFR1)	leu, thr, thi (CV: cos, mob, Tc ^r)
10.	<i>Escherichia coli</i> C600(RP4)	leu, thr, thi (MP: tra, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r)
11.	<i>Escherichia coli</i> JM103(pKT230)	thi (CV: mob, Km ^r , Sm ^r)
12.	<i>Pseudomonas putida</i> PpG1064(NAH)	Phe ⁺ , Ben ⁺ , trp (NDP: Nah ⁺ , Sal ⁺ , tra, nahA~J)
13.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AC31(SAL)	met (NDP: Sal ⁺ , tra, nahG~J)
14.	<i>Escherichia coli</i> C600(pBH100)	leu, thr, thi (RP/pUC19: lac/p, Ap ^r , pheB)
15.	<i>Escherichia coli</i> C600(pBH500)	leu, thr, thi (RP/pKT230: mob, Sm ^r , pheB)
16.	<i>Escherichia coli</i> C600(pHF1000)	leu, thr, thi (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahA~D, E ⁺)
17.	<i>Escherichia coli</i> C600(pHF400)	leu, thr, thi (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahG, H ⁺)
18.	<i>Escherichia coli</i> C600(pHF201)	leu, thr, thi (RP/pUC19: lac/p, Ap ^r , nahG ⁺ , H~J)
19.	<i>Escherichia coli</i> C600(pCF32)	leu, thr, thi (CV: Ap ^r , Sm ^r , Km ^r , xylE)
20.	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440(pBH500)	Ben ⁺ (RP/pKT230: mob, Sm ^r , pheB)
21.	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (pHF1000)	Ben ⁺ (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahA~D, E ⁺)
22.	<i>Pseudomonas putida</i> BH(pHF400)	Phe ⁺ , Ben ⁺ , pheB (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahG, H ⁺)
23.	<i>Pseudomonas putida</i> PpG1064(pHF400)	Phe ⁺ , Ben ⁺ , trp (RP/pKT230: mob, Sm ^r , nahG, H ⁺)

Phe⁺: フェノール分解能有り、Ben⁺: 安息香酸分解能有り、Nah⁺: ナフトレン分解能有り、Sal⁺: サリチル酸分解能有り、BHC⁺: ベンゼンヒドロキシ化分解能有り

leu: ロイシン要求性、thr: スレオニン要求性、thi: チロシン要求性、met: メチオニン要求性

CV: クロニングベクター、MP: モビライザー、RP: 組換えプラスミド/構築ベクター、NDP: 分解プラスミド

Ap^r: アムピシリン耐性、Tc^r: テトラサイクリン耐性、Km^r: カナマイシン耐性、Sm^r: ストレプトマイシン耐性

pheB: *P. putida* BH染色体上カテコール分解遺伝子、nahA~J: NAH7プラスミド上ナフトレン分解遺伝子、

xylE: TOLプラスミド上カテコール分解遺伝子、*: 一部が存在

○活性汚泥細菌：肉エキス、ペプトン及び尿素を主成分とする合成下水で長期間馴養した活性汚泥の凍結乾燥標品を、合成下水(TOC=100mg/ℓ)120mℓに10mg植菌し28℃、120rpmで一晩回転振盪培養したもの(試料1)、この2mℓをさらに合成下水(TOC=300mg/ℓ)及び、サリチル酸を500mg/ℓの濃度で含む合成下水200mℓにそれぞれ植え継ぎ、同様の培養を行ったもの(前者：試料2、後者：試料3)から細菌を分離した。

○コロニープロットング：供試菌株をCGY寒天培地(カシトン5g、グリセリン5g、酵母エキス1g、寒天1.5g/ℓ)上に敷いたニトロセルロースフィルターに妻楊子を用いてレプリカし、30℃で1日培養した後、0.5M NaOH溶液で溶菌処理し、さらにフィルターを1M Tris緩衝液(pH7.4)に15分間、1.5M NaCl-0.5M Tris緩衝液(pH7.4)に5分間浸し、2×SSC(0.3M NaCl,0.03M クエン酸ナトリウム)をしみこませたろ紙上で吸引乾燥後、70℃で3時間焼付けDNAをフィルター上に固定した。

○ハイブリダイゼーション及び検出：プローブがフィルター自身に結合するのを防ぐため、プレハイブリダイゼーションを行った後、pheBプローブを用いたハイブリダイゼーションを行い、プローブを相同性を示すプロットに結合させた。検出はジゴキシゲニンに特異的に結合する抗体接合体(抗ジゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼ接合体)と5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル1燐酸及びニトロブルー-テトラゾリウムの酵素反応による青色の発色により行った。

表2 典型菌株の検出結果

3. 実験成績及び考察

(1)典型菌株へのハイブリダイゼーション：表1の各種典型菌株へのpheBプローブによるハイブリダイゼーションの結果を表2に示した。pheB遺伝子を持つ菌株は、それが染色体上にあるかプラスミド上にあるか、あるいはそのコピー数(BH株：1コピー、pBH100：50コピー、pBH500：20コピー)に関わらず、全てハイブリダイズ反応を示した。このことからpheB遺伝子をもつ株が検出できることが確認された。一方、pheBプローブはここで試験された他の菌株へは、ハイブリダイズしなかった。一般に、C2,30をコードする遺伝子には高い相同性があると報告されているが、今回試験に用いたpheBプローブが、他のC2,30遺伝子(xylE及びnahH)保持株に対してもハイブリダイズしなかったことはpheBプローブが高い特異性をもつことを示唆しており、興味深い。以上より、pheBプローブはC2,30をもつ芳香族化合物分解菌を広範に検出することはできないが、pheB遺伝子を保持する分解菌を特異的に検出する上で有効なプローブであることが示唆された。

No.	C2,30遺伝子	呈色反応
1.	<u>pheB</u>	+
2.	—	—
3.	—	—
4.	—	—
5.	—	—
6.	—	—
7.	—	—
8.	—	—
9.	—	—
10.	—	—
11.	—	—
12.	<u>nahH</u>	—
13.	<u>nahH</u>	—
14.	<u>pheB</u>	+
15.	<u>pheB</u>	+
16.	—	—
17.	—	—
18.	<u>nahH</u>	—
19.	<u>xylE</u>	—
20.	<u>pheB</u>	+
21.	—	—
22.	<u>pheB</u>	+
23.	—	—

(2)活性汚泥細菌へのハイブリダイゼーション：

本法を活性汚泥中での特定細菌の検出に利用する際、バックグラウンドとなる他の活性汚泥細菌へのハイブリダイズ特性が検出を大きく左右すると考えられる。そこで各種活性汚泥試料から分離された細菌に対してハイブリダイゼーションを行い、その結果を表3に示した。別途行った資化能確認試験より今回試験

表3 活性汚泥細菌の検出結果

分離源	供試 コロニ- 総数	呈色反応		
		+	±	-
試料1	42	0	10	32
試料2	45	0	12	33
試料3	17	0	1	16

に供した活性汚泥細菌には、サリチル酸やフェノールの分解菌が多く含まれていたことが分かっているが、それにもかかわらず何れの菌株もpheBプローブにハイブリダイズしなかった。このことから本プローブは、活性汚泥中の他の分解菌をバックグラウンドとしても、pheB遺伝子保持株を特異的に検出することが可能であることが示唆された。なお、弱い発色反応(表中"±"表示)を示す株が若干認められたが、これは溶菌時にフィルター上に残された残留物(デブリ)が洗浄によっても除去されず発色したものと思われる。