

II-585

粘土鉱物、フミン酸及び金属塩による
ポリメラーゼ連鎖反応阻害

麻布大学環境保健学部 正会員 土佐光司
同上 正会員 平田 強
同上 田口勝久

1. はじめに

水中微生物の検出・同定方法は現在のところ培養法に基づく方法が主流である。しかし、これらの方法は、一般に繁雑でしかも同定の完了までに長期間を要する。従って、水の微生物学的安全性を評価するにあたって、より短時間で簡便に病原微生物を検出する方法が必要とされている。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は *in vitro* で酵素反応によりDNAの特定領域を数時間で 10^6 倍以上にも増幅でき、生命科学分野で広範に利用されている。PCRを用いれば試料水中の標的遺伝子1個、すなわち検出の対象とする微生物1個体をも理論的には検出可能である。また、PCRは対象とする微生物のDNAを検出の標的とするため、特定種の検出のみならず、グループの検出もまた可能である。

しかし、PCRの水中微生物検出への適用性の検討は未だ不十分である。なかでも、PCRは環境水中の種々の成分により阻害を受け、標的DNAがほとんどの増幅されなくなることが知られている。従って、PCRを環境水中の微生物の検出に適用するにはこれらの阻害物質に関する情報の収集が必要である。我々は、PCRを用いた水中細菌の検出について、粘土鉱物、フミン酸及び金属塩がポリメラーゼ連鎖反応に及ぼす影響を実験的に検討したのでここに報告する。

2. 実験方法

硫酸アルミニウム、塩化鉄（Ⅲ）、硫酸マンガン（Ⅱ）及びフミン酸は純水に溶解し、オートクレーブしたものをそれぞれ添加した。フミン酸は本研究で用いた濃度では完全には溶解しなかったが、アルカリ添加の影響を避けるため、完全には溶解させないまま用いた。カオリン及びベントナイトもまた純水に懸濁し、オートクレーブしたものを反応液に用いた。添加濃度は反応液中の最終濃度で示した。また、金属塩は各金属濃度で示した。

PCRによる細菌遺伝子の増幅はBej *et al.* の方法¹⁾ を一部変更して以下の手順で行った。

Escherichia coli (ATCC 11775, 基準株) を標準寒天平板培地に塗抹し、36℃で一昼夜培養した。培養後、形成された数個の集落を白金耳で釣菌し、精製水に懸濁させた。菌液は濁度からその菌数を推定し、阻害効果を検討する物質を所定濃度含む溶液中に 10^3 cfu/5 μ L含まれるように再調製し、試料とした。

試料5 μ Lを0.5 mLのマイクロ遠心管に分取し、融解緩衝液（1×PCR緩衝液、0.05 mg/L プロテナーゼK、0.001% SDS）を50 μ L加えた。試料は37℃で1時間インキュベートして細胞壁を融解した後、90℃で5分間加熱してプロテナーゼKを不活化した。

次に、PCR反応液（1×PCR緩衝液、0.2 mM dNTP、1 μ M各プライマー、20単位/mL Taqポリメラーゼ）を50 μ L加え、94℃で2分間の変性の後、94℃で35のPCRサイクル（94℃ 1分の変性、50℃ 1分のアニーリング、72℃ 1分の伸長）を16 SリボソームDNAを標的として行った。プライマーは真正細菌に共通であると考えられている配列と相補的な配列のものをを用いた²⁾。サイクル終了後、72℃でさらに10分間合成し、その後、4℃で保存した。

増幅DNA溶液は5 μ Lを4% Nu-Sieveアガロースゲルで電気泳動した。泳動終了後、エチジウムブロマ이드染色し、紫外線の照射下で所定のバンドが肉眼で明瞭に観察されたものを+（陽性）、弱いバンドが観察されたものを±、全くバンドが観察されなかったものを-（陰性）とした。

3. 結果

実験結果を表1に示した。フミン酸は試験した0.5～1000mg/Lの全範囲で反応を阻害した。硫酸マンガン(Ⅱ)は試験した0.05～1000mgMn/Lの範囲では反応を阻害しなかった。硫酸アルミニウムは5～10mgAl/Lで、鉄は0.5～1.0mgFe/Lで、ベントナイトは1～5mg/L、また、カオリンは10～100mg/Lの間でPCRの阻害が生じ、これらの濃度を越えると増幅は十分に行われず、増幅DNAのバンドは肉眼では全く観察されなくなった。

表1 濁度、フミン酸及び金属塩によるポリメラーゼ連鎖反応阻害

添加濃度(mg/L)	硫酸アルミニウム	塩化鉄(Ⅲ)	硫酸マンガン(Ⅱ)	フミン酸	ベントナイト	カオリン
0.1	+	+	+	NT	NT	NT
0.5	+	+	+	—	+	+
1	+	—	+	—	+	+
5	+	—	+	—	—	+
10	—	—	+	—	—	+
50	—	—	+	—	—	±
100	—	—	+	—	—	—
500	NT	NT	+	—	—	—
1000	NT	NT	+	—	NT	—

(注) NT；試験せず

4. 考察

粘土鉱物（カオリン及びベントナイト）によるPCR阻害は、吸着などの固形粒子が存在することによる影響なのか、粘土鉱物の構成成分が溶解して阻害作用を示すのかといった理由は現在のところ不明である。

フミン質によるPCRの阻害は環境水について既に幾つかの報告例がある³⁾。本研究でもこれらと同様にフミン酸による強いPCR阻害がみられた。

金属塩によるPCR阻害はpH変化が関与している可能性もある。今後の検討が必要である。

環境水中の病原微生物濃度は必ずしも高濃度ではない。また、PCRは通常100μL程度の反応液量で行われる。従って、PCRによって水中微生物を直接検出する際にはろ過や遠心などの濃縮操作が必要な場合が多い。濃縮操作をおこなう場合は低分子の溶存物質よりはむしろこれらの濃縮操作で対象微生物と同時に濃縮される高分子物質や懸濁物質による阻害効果のほうが大きくなると考えられる。本研究ではカオリンやベントナイトのような懸濁物質や高分子物質であるフミン酸による強いPCR阻害が示された。これらの阻害効果を除去するためには洗浄あるいは抽出操作が必要となる。しかし、分子生物学で通常用いられるDNA抽出操作は繁雑でかなりの時間を要するため、簡便で効率のよい方法の開発が必要である。

<参考文献>

- 1) Bej, A. K. *et al.* (1990) *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 307-314
- 2) 小柳津広志 (1992) 「微生物の生態18」(日本微生物生態学会編), 51-60, 学会出版センター, 東京.
- 3) Rodfers, M. R. *et al.* (1993) *Wat. Sci. Tech.*, 27 (3/4), 85-88