

Ⅶ-271

環境試料からのDNAの抽出とMPN-PCR法による定量に関する検討

大阪大学工学部 （正会員）池 道彦、藤田正憲、
浅野健一郎、立石尚広、清 和成

1. はじめに

化学物質による環境汚染を微生物の力を利用して分解・浄化するバイオレメディエーションにおいては、汚染現場における分解微生物の挙動を正確にモニタリングすることが重要である。従来、微生物のモニタリングには選択培地を用いた平板培養法やMPN法のような表現型による手法が採用されてきたが、これらの方法では、いわゆるnon-culturableな微生物を検出できず、また検出感度が高くないという問題があり、DNAやPNAを指標とした遺伝子型によるモニタリング技術の開発が望まれるようになってきた。ここでは、環境試料中からDNAを直接抽出し、MPN-PCR法によって特定遺伝子・微生物の高感度な検出を行うモニタリング技術の確立を目的として、基礎的な検討を行った。

2. 実験材料及び方法

本研究を通じて、研究室で分離されたフェノール分解菌*Pseudomonas putida* BH株を指標菌に使い、本菌株（及びその遺伝子）の環境試料からの検出の可能性を検討した。

（1）環境試料からのDNA抽出法の検討

大阪大学吹田キャンパス付近の2つの池（以降、A池・B池）から水試料を採取し、これを環境試料のモデルとした。各池水試料20mlにLB培地で培養し、洗浄したBH株を約 1.0×10^8 cell加え、凍結融解法（抽出法I: Kumeda and Asao, 1996, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2947-2952）、SDS法（抽出法II: Zhou et al., 1996, Appl. Environ. Microbiol., 62, 316-322）、凍結融解-プロテアーゼK法（抽出法III: Mayer and Palmer, 1996, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2081-2085）、及び超音波破碎-凍結融解法（抽出法IV: Porteur and Armstrong, 1993, Curr. Microbiol., 27, 115-118）の各方法によるDNA抽出を比較した。各抽出法で得られた試料中のDNAは特異的蛍光プローブであるHochst 33258 (Wako)を用いて、分光蛍光光度計（励起波長 351nm、蛍光波長 460nm）にて定量し、回収量より抽出効率を評価した。また、BH株が染色体上にもつカテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子(*pheB*)の一部(921bp)を増幅するプライマーのセット（図1）を使用したPCR法により、DNA抽出試料と、これを限外ろ過カートリッジ(Millipore, Ultrafree-Probind)で粗精製した精製試料から特異的DNA塩基配列を検出する試みを行い、DNA増幅に及ぼす影響についても評価した。ここでPCR法は常法に従い、熱変性による1本鎖化は95℃で1分間、プライマーとのアニーリングは50℃で2分間、ポリメラーゼによるDNA鎖の増重は72℃で2分間の条件で行い、25サイクル後のDNA断片の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。

正鎖側プライマー	5' - ATG AAA AAA GGC GGA ATT CGC CCC G - 3'
逆鎖側プライマー	3' - TCA GGT GAG CAC GCT CGA GAA ACG T - 5'

図1 PCR反応に使用した*pheB*検出用プライマー

（2）MPN-PCR法によるDNAの定量性の評価

無菌水に懸濁したBH株からDNA抽出を行い、これを濃減希釈した各希釈試料3本に対して、PCR反応を行い、電気泳動でバンドが現れた試料をポジティブ反応とみなすMPN（MPN-PCR法）の測定を行った。これにより、試料中の標的DNAコピー数（BH細胞数に等しい）を推定し、顕微鏡により測定した総菌数との相関を調べることによって、MPN-PCR法の定量性を評価した。

キーワード： 環境試料、DNA抽出、MPN-PCR法、モニタリング

連絡先： 〒565 吹田市山田丘2-1 TEL 06-879-7672 FAX 06-879-7675

3. 実験結果及び考察

（1）環境試料からのDNA抽出法の比較検討

各抽出法により池水試料に添加したBH細胞から回収されたDNAの収量を表1に比較した。なおここで、BH細胞を添加しないコントロール系からのDNA収量は、無視しうるレベルにあった。

DNA回収量は抽出法IVで最も高く、BH株の理論的なDNA含有量から計算するとほとんどの細胞からDNAを抽出・回収できたものと考えられた。また、抽出法I及びIIIでも比較的高いDNA回収率が得られたが、抽出法IIでは極めて低い回収率にとどまった。これらの結果から各方法に種々の改変を加えて同様の検討を行ったところ、超音波処理及びPVPP（ポリビニルポリピロリドン）処理がDNAの抽出効率の向上に有効であることが示された。特に超音波処理のような物理的な細胞破碎は有効であったことから、抽出法IVでは凍結融解と超音波破碎の両者が併用されたため極めて高い収率が得られたものと考えられた。また、いずれの抽出法でも、DNA回収量はバックグラウンドとなった池水試料の種類による影響をほとんど受けなかった。

これらの処理で得られた試料に対してPCRを行い、特定DNAの増幅・検出を試みたところ、未精製試料ではいずれの抽出法でも目的領域の増幅バンドを認めることができず、環境試料中に含まれている何からの物質によるPCR反応の阻害が示唆された。限外ろ過膜による処理を行った粗精製試料については、A池試料では抽出法I、III、及びIVで、B池試料では抽出法I及びIVで増幅バンドが確認された。このことから、抽出法I及びIVでは不純物の混入が少なく、簡単な精製でPCR反応が行える試料となることが示唆された。

表1 各種DNA抽出法の比較

	DNA回収量 (mg/l)		PCR反応			
	A池試料	B池試料	A池試料		B池試料	
			精製前	精製後	精製前	精製後
抽出法I	0.382	0.435	—	+	—	+
抽出法II	0.048	0.021	—	—	—	—
抽出法III	0.220	0.310	—	+	—	—
抽出法IV	1.08	1.177	—	+	—	+

（2）MPN-PCR法によるDNAの定量性

図2にMPN-PCRに供したBH株の細胞数と求められたMPNの関係を示した。MPN-PCRによって求められたDNA数（増幅対象となる領域）は細胞数と正の相関を示し、ある程度の定量性があることを示したものの、その値はDNA抽出に供された細胞数の100分の1に過ぎず、正確なDNA（細胞数）の測定には至らなかった。これは抽出・精製操作でのDNAのロスとPCR反応における増幅限界に依存するものと考えられる。

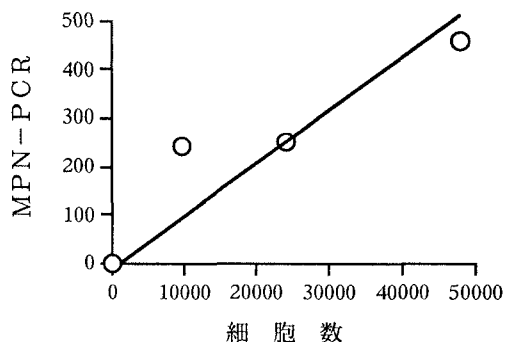


図2 MPN-PCR法による特定DNAの定量性

4. まとめ

抽出法IVを適用することによって環境試料中からDNAを効率よく回収することができ、これを粗精製すればPCR反応にも適用できることが明らかになり、また、MPN-PCR法によって特定DNAのある程度の定量が可能であることも示された。両法を組み合わせることにより、環境中に存在する特定DNA（DNA群）あるいは細菌（細菌群）をモニタリングできる可能性が示されたものといえる。今後は、より検出感度を高めるとともに、ターゲットを絞った実用的検討が望まれる。