

遺伝子マーカーを用いたシアン化合物分解微生物の検出及びモニタリング法の開発

大成建設㈱ 技術センター 正会員 ○片山 美津瑠
 大成建設㈱ 技術センター 正会員 高畑 陽
 大成建設㈱ 技術センター 正会員 帆秋 利洋
 大成建設㈱ 技術センター 正会員 藤原 靖

1. 研究の背景および目的

シアン化合物は微生物による分解を受けることが知られていることから、広範囲に拡散したシアン汚染地下水を対象とした浄化対策として原位置（非掘削）バイオレメディエーション技術の開発を進めている。これまでに筆者らは、シアン化合物によって汚染された地盤を対象としたバイオスティミュレーション試験を実施し、本法によるシアン化合物の浄化効果を確認している¹⁾。

微生物によるシアン化合物の浄化経路の一つとして、微生物由来のロダニーズ酵素がチオ硫酸塩を用いてシアンを解毒化する経路（ $\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$ ）がある。著者らはこの浄化経路に基づいて、様々なシアン汚染地下水を用いた室内試験にてチオ硫酸塩の供給による浄化促進効果を確認している²⁾。したがって、ロダニーズ酵素を生産する微生物の検出技術を確立することは、汚染サイトにおける有用菌の存在確認に基づいた浄化予測や浄化期間中の微生物活性化状況を把握するために有用であると考えられる。しかしながら、このようなシアン浄化微生物を特異的かつ網羅的にモニタリングする方法についての研究報告例はなかった。

本報では、ロダニーズ酵素をコードする遺伝子（ロダナーゼ遺伝子）に着目し、PCR法にて浄化に関わる微生物を特異的に、また簡便かつ短時間で検出できる方法を確立し検証した結果を報告する。

2. 試験方法

2.1. ロダニーズ遺伝子の特異的に検出するプライマーの設計

ロダニーズ遺伝子の特異的かつ網羅的に検出できるプライマーを設計するにあたって、既知のロダニーズ保有微生物である *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株、*Nocardioideis* sp. HG-2 株等のロダニーズ酵素のアミノ酸配列をシークエンス解析結果もしくは遺伝子データベースから入手し、ClusterW を用いてロダニーズ酵素配列のアライメントを作成した。同アライメントから各配列間にて保存性の高い領域を見出し、同アミノ酸配列を基にロダニーズ遺伝子検出用の縮合プライマーを設計した。

2.2. ロダニーズ遺伝子検出用プライマーの有効性の確認

上記で設計したプライマーの有効性を確認するために、シアン浄化微生物の *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株と *Nocardioideis* sp. HG-2 株、シアン浄化能力を持たない *Escherichia coli* JM109 株と *Thermotoga maritima* のゲノムを使用したロダナーゼ遺伝子の PCR による増幅試験を行った。PCR 反応により増幅した DNA 断片は 2% のアガロースゲルを利用した電気泳動にて確認した。

2.3. ロダニーズ遺伝子検出用プライマーを用いたシアン浄化微生物のモニタリング

既知のシアン浄化微生物である *Nocardioideis* sp. HG-2 株を、シアン化合物としてジシアノ銀酸カリウムを全シアン濃度として約 11 mg/L 含む無機塩培地を使用して 30℃ で振とう培養を行った。培養条件は HG-2 株を接種しない無菌条件、チオ硫酸塩を含む条件、チオ硫酸塩を含まない条件の 3 種類を用意した。試験開始から 7 日後おきに各条件の培養液の一部を採取し、全シアン濃度の変化を測定した。また培養液中の微生物から DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によりロダニーズ遺伝子の定量評価を行った。

キーワード シアン化合物、バイオレメディエーション、遺伝子マーカー

連絡先 〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設㈱技術センター 土木技術研究所 水域・生物環境研究室

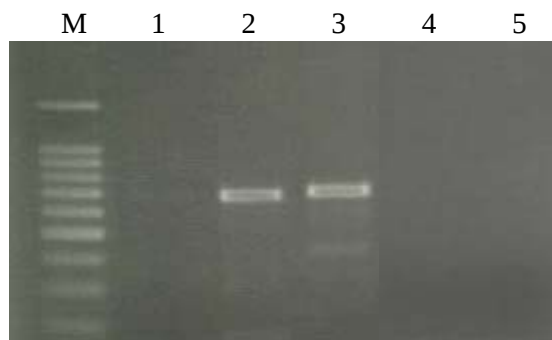
TEL: 045-814-7226 FAX: 045-814-7257 E-mail: ktytmr00@pub.taisei.co.jp

3. 試験結果

3.1. ロダニーズ遺伝子検出用プライマーの有効性の確認

2.1.で設計したプライマーを用いたロダニーズ遺伝子の増幅試験結果を図-1の電気泳動写真に示す。

本試験では、*P. aeruginosa* PAO1株と *Nocardioide*s sp. HG-2株のゲノムを使用した場合のみ、プライマーの設計領域に相当する長さのDNA断片の増幅が確認された。これらのDNA断片を精製しシーケンス解析に供したところ、各微生物が保有するロダニーズ遺伝子の配列と一致した。一方、ネガティブコントロールとした *E. coli* JM09株と *T. maritime*からはDNA断片の増幅は検出されなかった。



M : DNAサイズマーカー、1 : ブランク、
2 : *P. aeruginosa* PAO1株
3 : *Nocardioide*s sp. HG-2株、
4 : *E. coli* JM109株、5 : *T. maritime*

3.2. ロダニーズ遺伝子検出用プライマーを用いたシアン浄化微生物のモニタリング

チオ硫酸塩を供給したHG-2株の培養液では、培養開始から全シアン濃度の減少が見られ、約2週間後には検出限界値を下回った(図-2)。この培養条件では2週間後までにロダニーズ遺伝子量が初期値の約10倍程度にまで増加していることが確認された(図-2)。一方でチオ硫酸塩を供給しない条件、無菌条件では全シアン濃度の変化はほとんど見られず、前者ではロダニーズ遺伝子量の増加は確認されなかった。

図-1 ロダニーズ遺伝子の増幅結果

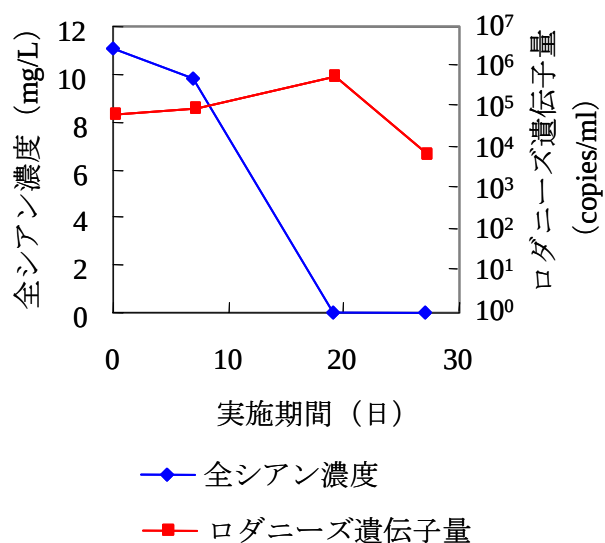


図-2 全シアン濃度とロダナーゼ遺伝子量変化

4. まとめ

本研究では、まず微生物のシアン浄化に関わるロダニーズ遺伝子に着目し、各微生物が保有する様々なロダナーゼの配列から保存性の高い領域を見出し、同遺伝子の特異的に検出するプライマーの設計に至った。本プライマーを使用しシアン浄化微生物と浄化能力を持たない微生物のゲノムにてPCRによるロダニーズ遺伝子の増幅試験を行ったところ、シアン浄化微生物のみから同遺伝子の増幅が確認され、本プライマーが同遺伝子の特異的に増幅するのに使用できることが示された。さらに、シアン浄化微生物をシアン化合物存在下にて培養した結果、シアン化合物の減少とリンクしたロダニーズ遺伝子量の増加が確認されたことから、シアン化合物のバイオレメディエーション適用時においても同プライマーを使用した遺伝子マーカー検出法で浄化微生物の活性をモニタリングできる可能性が示された。

実際の地盤中では複雑な微生物相が形成されており、バイオレメディエーションにも複数種の微生物が関与して浄化が行われていると考えられる。このような複合系の微生物に対して、本研究で定めた遺伝子マーカーにてシアン浄化微生物の検出及びモニタリングを実施することが、実際の浄化時に適用できるかを判断する上で重要になると考えられる。

5. 参考文献

- 1) 片山美津瑠ら、土木学会年次学術講演会、第62回講演概要集、pp.29-30, VII-015, 2007.
- 2) 高畑陽ら、土木学会年次学術講演会、第61回講演概要集、pp.277-278, VII-139, 2006.