

pmoA 遺伝子を標的とした PCR 法によるメタン酸化細菌の検出方法の基礎的検討

大成有楽不動産(株)テクノセンター 正会員 ○沖田 紀子
 大成建設(株)技術センター 正会員 高畑 陽
 (独)国立高等専門学校機構 大分工業高等専門学校 正会員 帆秋 利洋

1. はじめに

メタン酸化細菌は多様な環境に棲息している好気性細菌であるが、ほとんど酸素が存在しない微好気環境¹⁾や嫌氣的な硝酸還元領域²⁾において生育可能な種が存在していることが近年報告されている。*pmoA* 遺伝子は、メタン酸化細菌だけが持つ固有の遺伝子であり、環境中に存在するメタン酸化細菌を PCR 等により検出する場合に適した遺伝子領域である。本報では、南海トラフのメタンシープおよび一般海底から採取した海底堆積物表層および海水を用いて、メタンを唯一の炭素源として好氣的または嫌氣的に培養し、土壌中における *pmoA* 遺伝子を持つメタン酸化細菌の培養前後における挙動を定量 PCR によって確認した結果について報告する。

2. 試験方法

2.1 培養試験に用いた海底土壌および海水試料

土壌は伊勢湾沖の東部南海トラフにおける海底メタン湧出域である S1 (北緯:34°04.72'N, 東経:137°47.24'E, 水深:629m, ボックスコアラー採泥) および一般海底 AT2 (北緯:33°56.95'N, 東経:137°18.35'E, 水深:1152m, マルチプルコアラー採泥) を供試試料とした。海水試料は土壌を採取した近傍の海域でニスキン採水器にて採取し、濾過滅菌処理をして使用した。

2.2 海底土壌および海水試料を用いた培養方法

容積約 122 mL のガラスバイアル瓶に土壌を約 2mL ずつ入れ、濾過海水を 50 mL ずつ分注し、ブチルゴム栓で密栓した。好気条件では気相部の空気を 20mL 抜き、メタンを 20mL、酸素を 30mL 添加し、メタン:酸素が 1:2 になるように置換した。嫌気条件では気相部を 50mL がメタン、50mL が窒素になるように置換した。各条件のバイアル瓶は各条件 4 本ずつ作成し、4°C および 20°C の恒温室でそれぞれ半年間静置培養した。

2.3 定量 PCR による *pmoA* 遺伝子コピー数の測定方法

培養前後のバイアル瓶内の試料を 50mL 容の遠沈管に移し、8,000rpm で 10 分間、4°C で遠心し、その沈殿物を DNA 抽出キット (ISOIL Large for Beads, NipponGene 社) を用いてゲノム DNA を抽出した。各培養条件から得られたゲノム DNA を、SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time, Takara 社) と表-1 に示すプライマーセット P1³⁾ を用いて定量 PCR 装置 (QuantStudio 6 Flex, Thermo Fisher 社) により表-2 の条件で分析した。

表-1 *pmoA* 遺伝子を標的としたプライマーセット (P1)

プライマー名	塩基配列	増幅サイズ
pmof1	5'-GGGGGAACCTTCTGGGGITGGAC-3'	330bps
pmor	5'-GGGGGRCIACGTCITTACCGAA-3'	

表-2 PCR 反応条件

PCR反応条件	
95°C-1分	初期変成
↓	
95°C-30秒 55°C-15秒 72°C-30秒	
↓	PCR反応 40サイクル
95°C-15秒 55°C-1分 72°C-15秒	
↓	
95°C-15秒 55°C-1分 72°C-15秒	融解曲線
↓	
95°C-15秒 55°C-1分 72°C-15秒	

3. 試験結果

好気条件および嫌気条件における培養前後における土壌中の定量 PCR による *pmoA* 遺伝子コピー数の変化を図-1 および図-2 にそれぞれ示す。この結果、全ての培養前試料で *pmoA* 遺伝子は検出されなかった。一方、幾つかの培養後試料では、メタンシープだけでなく一般海底から採取した試料でも *pmoA* 遺伝子コピー数が増加した。

キーワード メタンガス検出, メタン酸化細菌, *pmoA* 遺伝子, 定量 PCR

連絡先 〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成有楽不動産(株)テクノセンター TEL045-812-1460

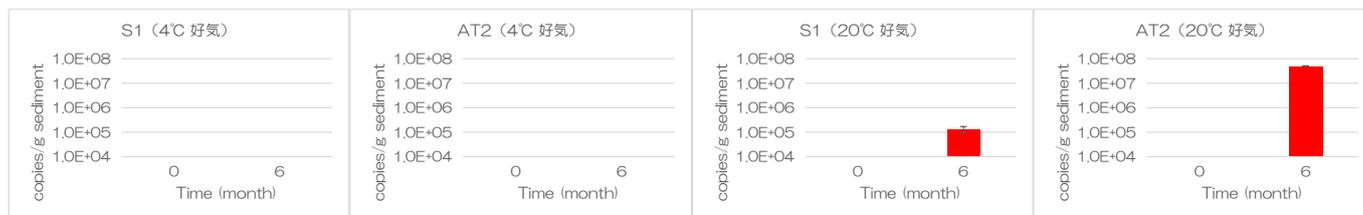


図-1 好気条件での培養前後における *pmoA* 遺伝子コピー数の増減

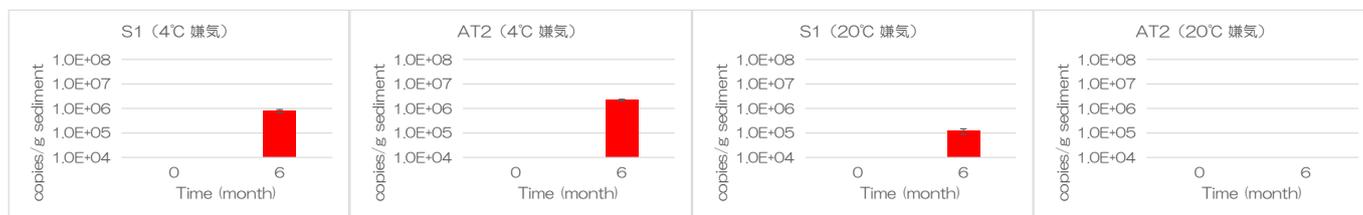


図-2 嫌気条件での培養前後における *pmoA* 遺伝子コピー数の増減

好気条件では、4°Cの培養条件では *pmoA* 遺伝子が検出されなかったが、20°Cの培養条件でメタンシーブ試料だけでなく、一般海底試料でも *pmoA* 遺伝子を持つメタン酸化細菌が検出された (図-1)。この結果から、今回培養に用いた試料には 20°Cで増殖するメタン酸化細菌が海底に広く存在しているが、海底付近における低温環境ではメタン酸化細菌は半年間で増殖することが難しいと推測された。

一方、嫌気条件では、好気条件と異なり、4°Cでの培養後にはメタンシーブ試料だけでなく、一般海底試料からも *pmoA* 遺伝子が比較的高濃度で検出された (図-2)。20°Cの培養条件では、メタンシーブ試料から *pmoA* 遺伝子を持つメタン酸化細菌が低濃度で検出されたが、一般海底試料では検出されなかった。嫌気培養において一般的に増殖が難しい4°Cでメタン酸化細菌がより多く増殖した要因として、海洋底は酸素がほとんど無く温度も 4°C程度で低い環境であり、また S1 サイトでは長期間に亘って海底からメタンが湧出し続けたことにより、その環境に適応した好冷性のメタン酸化細菌が潜在しているものと推察する。

4. まとめ

一般的に、メタンは土壌細菌によって分解されやすいため、地盤内にメタンガスの発生源があっても、地上に移行する間に微生物分解を受け⁴⁾、地上部でメタンガスを検出することは難しい。しかしながら、継続的にメタンが供給される土壌では周辺環境と比較してメタン酸化細菌数が増えるため、PCR法を用いればメタンガスの排出源を地上近くで特定できる可能性がある。今後、土木工事におけるメタンガス由来の爆発や酸欠事故などに対する安全性確保のためのモニタリングや温暖化に寄与するメタンガスの地盤における発生源の推定を行うために、本技術の応用が期待される。

謝辞

本研究は、経済産業省の委託により実施したメタンハイドレード資源開発研究コンソーシアム (MH21 フェーズ 1 (2001年～2008年)) に得られた成果に基づいている。メタンハイドレード資源開発研究コンソーシアムメンバー及び多くの関係者の御協力に感謝します。

参考文献

- 1) T. Hayashi *et al.* : Distribution and Phylogenetic Characteristics of the Genes Encoding Enzymes Relevant to Methane Oxidation in Oxygen Minimum Zones, Res. J. Environ. Sci., 1(6), pp.275-284, 2007.
- 2) H. Kojima *et al.* : Community structure of planktonic methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir characterized by dominance of phylotype closely related to nitrite reducer. Scientific Reports Vol.4, No.5728, 2014.
- 3) Y. S. Cheng *et al.* : Detection of Methanotrophs in Ground water by PCR, Appl. Environ. Microbiol., Vol.65, No.2, pp.648-651, 1999.
- 4) Marielle Saunio *et al.* : The Global Methane Budget 2000-2017, Earth System Science Data, 12, pp. 1561-1623, 2020.