

## LAMP 法を利用した 6 価セレン還元微生物の迅速検出方法の検討

株式会社ケー・エフ・シー (正)○大塚治,(正)西里亮,(正)奥野稔

芝浦工業大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻(非)小竹史哉,(非)山下光雄

## 1. 目的

セレン (Se) は主に火山堆積物に含まれている元素であり、日本では低濃度で広く分布している。このためトンネル掘削に伴って発生するずりに自然由来の Se が含まれることがある。Se は高い毒性を持つことから、土壤汚染対策法で溶出量 0.01 mg/L という厳しい基準が定められた。一般的に重金属は薬剤添加により不溶化されるが 6 価 Se は薬剤との反応性が低く、処理が難しい。筆者らは 6 価 Se 還元微生物 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を土壤に混合するバイオオーグメンテーションにより、幅広い培養条件で土中の Se を環境基準値未満まで不溶化できることを筆者らは報告してきた<sup>1)</sup>。

バイオオーグメンテーションで導入する NT-I 株は生態系や人の健康への影響がない微生物だが、地域環境に配慮し浄化敷地外へ流出していないかの確認を現場でおこなう必要である。したがって迅速・簡便な検出方法が求められる。既存の方法として平板培地培養法はあるが、サンプル採取から検出までに 1 日以上を要する。当日中に検出する方法として PCR 法もあるが、検査から検出までにはサーマルサイクラーや電気泳動装置のような機器が必要となり現場では扱いにくい。そこで我々は LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法に注目した<sup>2)</sup>。LAMP 法は標的遺伝子に対して 4 種類のプライマーを設定し、一定温度で DNA を増幅させる方法である。DNA 増幅の副産物であるピロリン酸と反応溶液に含まれるマグネシウムで白色沈殿が生成し、濁度が増大することで標的遺伝子の有無が検出される。PCR 法と同様に DNA 増幅による標的遺伝子を検出する方法であるが、LAMP 法は反応が一定温度のためサーマルサイクラーは必要なく、増幅産物は目視での検出も可能である。本報告では LAMP 法による 6 価セレン還元微生物 NT-I 株の検出方法の確立を目指し、プライマーを設計し水溶液サンプルおよび土壤サンプルを使って検証した。

## 2. 実験方法

## 2.1 DNA 抽出方法

*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を寒天培地から 1 白金耳コロニーをかきとり、50 mL の TSB 培地(pH7.0)に植菌し 38°C、24 時間振とう培養した。濁度(OD<sub>600</sub>)を測定し、滅菌水で OD<sub>600</sub>=1.0 に調製した。その後、水溶液サンプルからは ISOPLANT(株式会社ニッポン・ジーン)を用いて DNA を抽出した。土壤サンプルからは Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Kit(ZYMO RESEARCH)を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA 溶液の吸光度(260 nm)を測定し、測定値から DNA 濃度を算出した。

## 2.2 LAMP 法による NT-I 株の検出

抽出した DNA を鋳型に用いて Loopamp DNA 増幅試薬キット(栄研化学株式会社)に準じて試験溶液を調製した。試験溶液をリアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA(栄研化学株式会社)で温度 65°C で 120 min 反応させ、次いで 80°C 5 min で反応を停止させた。反応時の吸光度(OD<sub>655</sub>)を時間ごとに測定した。

表 1 設計したプライマーセットの塩基配列

プライマー名	塩基配列
F3	5'- CATTCCGGACATGAACCCG -3'
B3	5'- CGCTTCGGCATGTAGATGTT -3'
FIP	5'- TTCAACGGCCACTTGAGGTGATTCAGAAGGGCGCGGTGTA -3'
BIP	5'- GTGGAAGCGCGTGTCTCTGGGCCCGCGATTCACAGTG -3'

キーワード：LAMP 法, セレン還元微生物, *Pseudomonas stutzeri* NT-I, バイオオーグメンテーション

連絡先 〒347-0010 埼玉県加須市大桑 1 丁目 19 株式会社ケー・エフ・シー加須技術研究所 TEL (0480)76-0095

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 NT-I 株抽出プライマー設計

プライマーは設計支援ツール

PrimerExplorer V5 (栄研化学株式会社, 富士通株式会社) を用いて設計した (表 1). 標的遺伝子は NT-I 株を持つ 6 価セレン還元酵素をコードする構造遺伝子(*serA*)とした。

#### 3.2 NT-I 株 DNA を用いた LAMP 法

NT-I 株培養液から抽出した DNA 濃度は 130  $\mu\text{g/mL}$  だった (表 2). この DNA 溶液を鋳型として, 0.001 ~ 130  $\mu\text{g/L}$  となるよう希釈し LAMP 法を行った (図 2). 鋳型 DNA なし (0  $\mu\text{g/L}$ ) では 65°C で 120 分伸長反応をおこなっても増幅産物は検出できなかった. 鋳型 DNA 濃度が 130  $\mu\text{g/mL}$  では約 40min で DNA 増幅が検出された. 試験をおこなった中での最低濃度である 1.3mg/mL では約 70 分で DNA 増幅が検出された. NT-I 株由来の DNA が 0.001~130  $\mu\text{g/L}$  含むと, LAMP 法で DNA 増幅されると示された. また鋳型 DNA 濃度が高くなるにつれて濁度の増大に要する時間が短くなる傾向がみられた. この結果から設計したプライマーセットで水溶液サンプル中の NT-I 株が検出できることが示唆された。

表 2 LAMP 法と平板培地培養法の検出結果 (○: 検出, ×: 不検出)

	NT-I株添加	抽出DNA濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	検出結果	
			培養法	LAMP法
水溶液サンプル	なし	0	×	×
	有り	0.001-130	○	○
土壌サンプル	なし	5.3	×	×
	有り	7.1	○	○

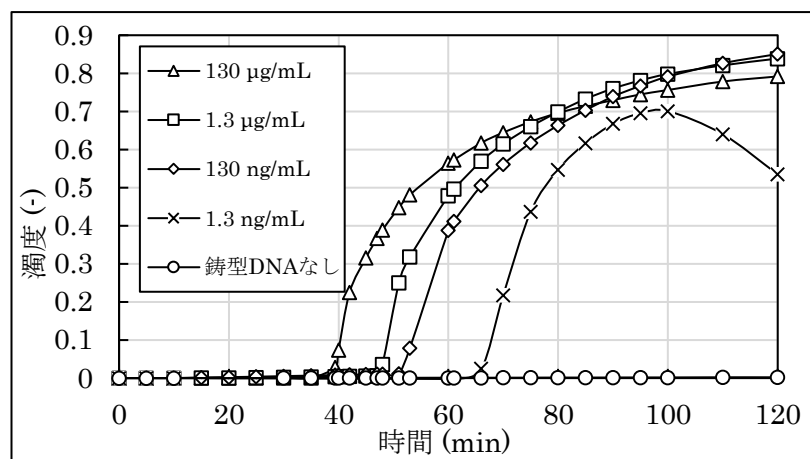


図 1 LAMP 法による濁度揭示変化

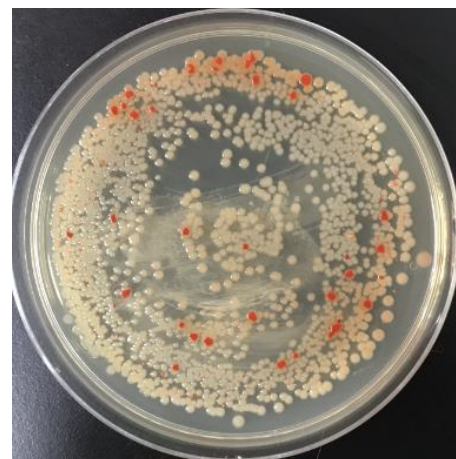


図 2 平板培地培養法 (赤色が NT-I 株)

#### 3.3 土壌サンプルの LAMP 法検出

次に土壌サンプルからの NT-I 株検出を検討した. NT-I 株を添加する前の土壌サンプルからは土着微生物由来の DNA が 5.3  $\mu\text{g/mL}$  抽出できた. NT-I 株を添加する前の土壌サンプルからは LAMP 法による DNA 増幅がみられなかった (表 2). 一方で NT-I 株を添加し, セレンを不溶化した後の土壌サンプルでは約 60 分で LAMP 法による DNA 増幅がみられた. したがって土壌サンプルからも作成したプライマーセットで NT-I 株を検出することに成功した. また LAMP 法による NT-I 株検出は平板培地培養法と同様の結果が得られた (表 2). 以上の結果から LAMP 法は平板培地培養法と比較して簡易に NT-I 株を検出できる方法であると示唆された。

### 4. まとめと考察

本報告では水溶液サンプル, 土壌サンプルともに LAMP 法によって NT-I 株を迅速簡易に検出できることを示した. 昨今バイオフィーマティクスが進みヒ素代謝酵素やテルル還元酵素など土壌浄化に有用な酵素遺伝子が特定されてきているため, LAMP 法は新たな重金属代謝微生物のスクリーニングにも応用できると考える。

参考文献 1) 大塚他, 令和 2 年度土木学会年次学術講演会. 2) A. Alhassan *et al.*, *Veterinary Parasitology*, 143, pp.155-160, 2007.