

油類を含む環境水からの DNA 抽出および微生物群集構造解析法に関する検討

長野高専 環境都市工学科 非会員 和田 枝麗
 同上 正会員 畠 俊郎

1. はじめに

近年、給油所や工場跡地を中心に地下タンク・地下配管からの油類の漏洩による環境汚染が懸念されている。これに対し、微生物機能により環境中の油類を分解するバイオレメディエーションが注目されている。低環境負荷かつ安価に修復可能という利点があり、実社会でもその有効性が確認されている。一方、油類を分解する微生物そのものに関してはまだ未解明な点が多い。本文では、環境水からの DNA 抽出法および PCR-DGGE 法に基づく多様性評価手法に関して検討した結果を報告する。

2. 実験の概要および手順

本実験では油類を含む地下水を対象とした DNA 抽出方法および、抽出物を用いた PCR-DGGE 法の適用性について検討した。

2.1 DNA 抽出について

本試験で用いた遺伝子解析の流れを図-1に示す。本実験で対象とする環境水サンプルについては菌体濃度が低いと予想されるため事前に濃縮することとした。濃縮方法として $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターによる吸引濾過を用いた。

回収後のメンブレンフィルターを DNA 抽出用の 2mL チューブにセットし、抽出バッファーを加えて Mini Bead-Beater(BIOSPEC 製)による物理は際を用いた。

以降は、ISOIL for Beads Beating (日本ジーン製) の標準プロトコルに従った。

2.2 PCR について

抽出後の DNA サンプルを対象とし、16S rDNA の V3 領域を対象とし、プライマーとして GC-341f&534 を用いた PCR を行った。PCR の温度条件は、 $94^{\circ}\text{C} \times 4$ 分、 $94^{\circ}\text{C} : 20$ 秒、 $53^{\circ}\text{C} : 20$ 秒、 $72^{\circ}\text{C} : 40$ 秒 $\times 40$ 回サイクル、 $72^{\circ}\text{C} : 2$ 分その後 4°C 維持とした。なお、PCR 反応には QuickBath(ThermoGen 社製)を用いた。

PCR 産物の確認には Mupid(コスモバイオ製)を用い、0.7%アガロースゲルを用いた。なお、泳動バッファーには $1 \times \text{TAE}$ を用いることとし、泳動条件は $100\text{V} \times 20$ 分とした。泳動後のゲルは EtBr にて 15 分間染色し、312nm のトランスイルミネーター上に設置して Limited-STAGE(アムズシステムサイエンス社製)を用いて撮影した。

2.3 DGGE について

Mupid により PCR 産物を確認できたものについて濃度勾配変性ゲルを用いた DGGE を行った。これにより、環境水中に含まれる微生物群集構造を可視化することが可能となる。

DGGE に用いた濃度変性剤の組成を表-1に示す。本報告では、研究の初期段階として濃度範囲を 0 ~ 100% に設定した場合についての実験を行った。DGGE の解析には日本エイド社製ミニゲル装置(NB-1490)を用いることとし、泳動バッファーには $1 \times \text{TAE}$ 、泳動条件は $50\text{V} \times 4$ 時間とした。泳動後のゲルは SYBR Green により 20 分間染色し、撮影には Limited-STAGE を用いた。

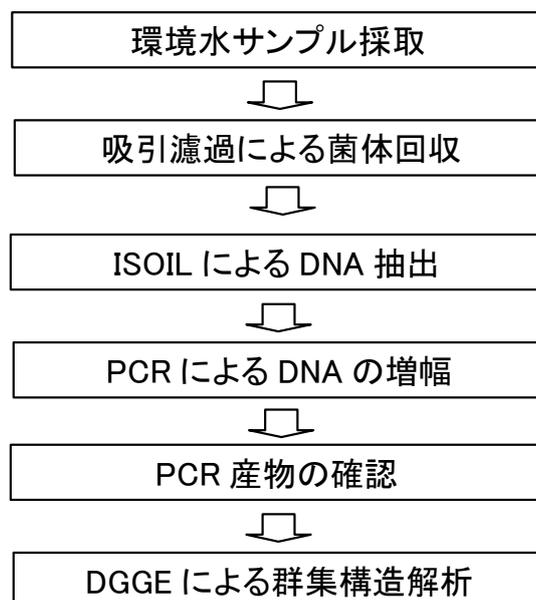


図-1 遺伝子分析の流れ

表-1 変性剤濃度溶液の組成

変性剤濃度	0%	100%
40%Acrylamide/Bis(ml)	25	25
50×TAE	2	2
Formamide(ml)	0	25
Urea(g)	0	42

(100mL あたりの分量)

3. 結果および考察

環境水の濃縮後に抽出した DNA を対象に行った PCR に関する泳動結果を図-2 に示す。なお、DNA 抽出およびサーマルサイクラーによる増幅の有効性を確認するため各環境水について 2 サンプル抽出を行った。

全サンプルについて PCR 産物を確認するとともに、同じ微生物源のサンプルについてはほぼ同じ産物量を確認することができ、抽出および良好な DNA の増幅を確認することができた。

油なし①、②について良好な増幅が、③および④についてわずかな増幅が認められた。油有りについては 1、3 および 4 で良好な増幅が認められたが、油膜を多く含む 2 についてはわずかな増幅となった。この原因として、環境水に含まれる油類の影響が考えられるが詳細については今後検討を進めていきたい。いずれについても 2 ケースほぼ同じ感度で検出されたことから今回提案した DNA 抽出から PCR 反応までの手順は有効であると考えられる。

PCR 産物量に差異が認められるものの、全サンプルについて増幅を確認することができたため、DGGE による群集構造解析を実施した。

DGGE の結果を図-3 に示す。以下、レーンごとに考察する。油なし①、②については同じようなバンドパターンを確認することができた。一方、油なし③についてはほとんど検出できないとともに、油なし④については①、②とは異なるバンドパターンが得られた。以上より、油類を含まない環境水においても採取場所により微生物群集構造が異なることを確認した。

油あり 1、3、4 については多様な微生物を検出できたが、油あり 2 についてはほとんど検出できなかった。この原因としては、サンプルに多量の油膜が含まれたため DNA の抽出効率および PCR 反応が低下したことが考えられる。詳細については今後検討する予定である。油類を含む 1、3、4 については、共通で検出されるものや固有のものなど特徴的なバンドパターンが検出された。以上より、油類の有無および採取場所により微生物群集は特徴的な多様性を持つことが確認された。

4. まとめおよび今後の課題

本研究で明らかとなった知見を以下に示す。

- 1) 油類を含む環境水中に生息する微生物に関し、吸引濾過による濃縮法を提案確認した。
- 2) 提案法による抽出 DNA について良好な PCR 反応および再現性を持つことが明らかとなった。
- 3) PCR-DGGE 法の結果から、油類の有無により微生物群集構造が異なることが明らかとなった。

知見で述べたとおり、本試験では油類の分解に関与していると考えられる微生物の存在を確認することができた。今後は、アクリルアミドゲルの濃度勾配を変えた DGGE による分離精度の向上および、主要なバンドの塩基性配列決定などにより油類の分解に関与する微生物を決定していく予定である。

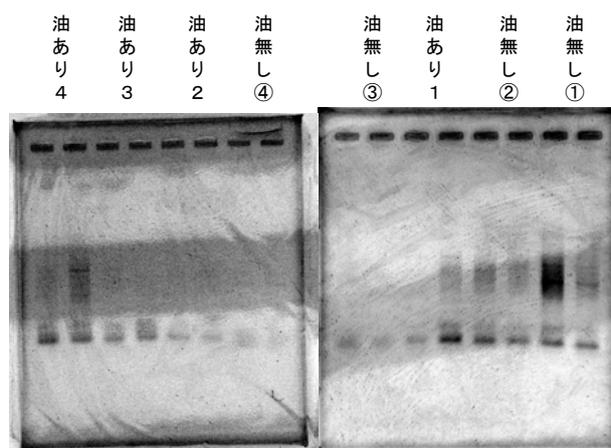


図-2 PCR 産物の確認結果

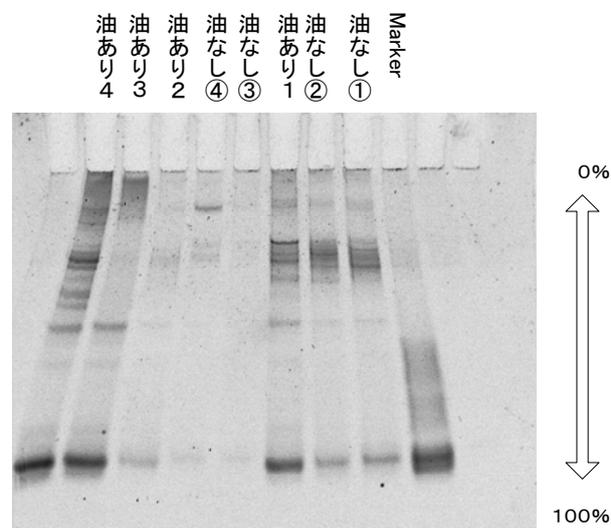


図-3 DGGE のバンドパターン