

II-85 底泥微生物からのDNA回収手法に関する検討

東北学院大学 学生員 ○尾崎 剛
東北学院大学 佐々木義則
東北学院大学 正員 石橋 良信

1. はじめに

水域環境や土壌環境の維持や改善にとって、微生物は物質の循環やエネルギーの流れを通して重要な役割を担っている。特定微生物の分解や生産に関与する微生物の機能は遺伝子型としてプラスミド中の遺伝子に由来する 경우가多いが、自然界中に薄く分布するプラスミドを回収し、その遺伝子型や微生物界における分布の状態を調べることは、実験室で培養された培養細胞から性質の知られたプラスミドを回収する場合に比較して多くの困難がある。本実験においては、従来法では困難であった環境中の微生物から低濃度のプラスミドを定量的に抽出する方法を確立することを目的とし、そのはじめとして R.J. Steffan, R.M. Atlas et al.の手法¹⁾について追試した。

2. 実験の方向性²⁾および Steffanの方法によるDNAの回収概説

本実験は、特に近年進展の著しい遺伝子工学上の研究手法を用いて、微生物種ごとに特異的な核酸断片をDNAプローブを用いて定量的に把握することで環境中での微生物の動態を追跡することであるが、実験本来の流れは、上記総論の目的に加えて、回収したプラスミドのDNAをクローニング法あるいは *in vitro* で増幅し、このDNAを酵素ラベルその他によって、標識してDNAプローブを作成する。さらに、DNAプローブ法の活用にあたって、環境中の特定のDNAを保有する微生物をコロニーハイブリダイゼーション法またはドットハイブリダイゼーション法などによって、その生存の有無および生存数の推定などを行うためのモニタリング方法を確立することを目的としている。しかしながら、本実験では、この段階までは行っていない。

SteffanらはCell extraction methodとDirect lysis methodを比較している。Cell extraction methodは土中の有機物質を取り除く目的にpolyvinylpolypyrrolidon(PVPP)を併用しながら、遠心分離で土粒子から菌を分離し、その後、溶菌、DNAの回収、CsCl密度勾配遠心法、hydroxyapatite column chromatographyによる精製の過程をとりながら、DNAをとる方法である。Direct lysis methodは同様のプロセスをとるが、PVPP併用の下、DNAをアルカリ法で処理し、エタノールに変わるPEGによる沈澱、CsCl密度勾配遠心法やhydroxyapatite column chromatographyでDNAを抽出精製する方法である。本稿では、DNA収量を多くする必要性から選択したDirect lysis methodを中心に報告する。

3. 試料および実験方法

1) 菌株の調整

使用菌株は大腸菌 HB101（プラスミド pBR322 を保持する）を使用した。pBR322 は抗生物質アンピシリン、テトラサイクリン、ストレプトマイシンに対して耐性である。前培養は L-broth 500 ml に大腸菌 HB101 を接種し、37 °C で一晩振とう培養した。実験に供した菌数は、アクリジンオレンジ法で計測し、平均 6.5 ×

10⁸ 個/mlであった。また、混入した土は畑土を滅菌して使用した。

2) DNAの回収

実験は Steffanらの方法の内、direct lysis method に準拠して行った。(data not shown)

4. 実験結果および考察

本法はDNAが大量に回収できると予想される故にdirect lysis method に多くの実験と時間をかけた。実験の結果、目的とするpBR322のバンドを抽出することはできなかった。しかしながら、多くの場合、染色体DNAと思われるバンドがみられた。写真-1はCsCl密度勾配遠心法を行う前に、プラスミド存在の確認を行った試料について示したものである。

染色体DNAについて、direct lysis method は物理的な力を作用させ、細胞の破壊を効果的にしているきらいがあり、この余力が染色体DNAの一部切断に関与したと思われる。目的のプラスミドpBR322を回収することはできなかった理由として、SDS の取扱いと処理の不完全、DNAを分解する酵素 (DNase) の除去を不徹底、フェノール処理の不徹底、RNase 処理や Proteinase 処理を行っていないこと等があげられる。今後これらの使用を検討すべきである。また、遠心分離機を使用に際して、プロトコールとは異なる機器の使用および回転数の微妙な違いが影響しているものと思われる。

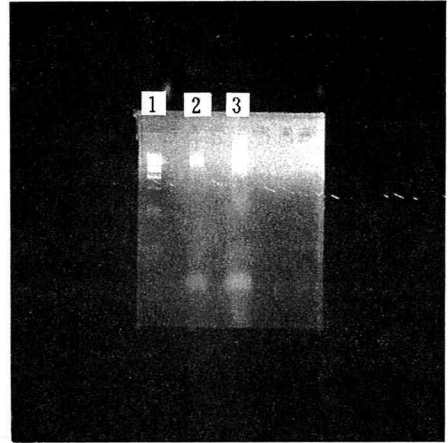


写真 - 1

- 1: サイズマーカー (λ DNA)
- 2 回収 DNA
- 3

5. おわりに

本研究の最終目標は底質を含む水環境の汚濁状況をDNAプローブを用いて診断することにある。従って、研究のプロセスとして、1)底泥細菌からのプラスミドDNAの回収、2)PCR法による微量DNAの増幅、3)DNAプローブの作成などこれらのステップをふまねばならないが、基礎であるプラスミドのより短時間に、より簡便に、かつ精度よい回収法の確立が急務であることを痛感している。

最後に、本実験を遂行するにあたり御教示賜った東北大学遺伝生態研究センター菊本敏雄助教授に感謝する。なお、実験は本学遠藤銀朗助教授との共同研究であることを付記する。

参考文献

- 1) Steffan R.J, R.M. Atlas et al.,: Recovery of DNA from Soils and Sediments, Appl. Environ. Microbiol. 54, No.12, pp.2908-2915, 1988.
- 2) 遠藤銀朗: 東北電力(株) - 東北学院大学環境防災研、研究打ち合せ試料、1989-12.