

Ⅱ—97 環境微生物のPCR-DNAハイブリダイゼーション法による検出と
rRNAの塩基配列の決定

東北学院大学工学部 学生員 ○及川 栄作
同 宮田 高明
同 横田 晶

1. はじめに

環境生態系における生物の分布状況や生物学的廃水処理プロセスにおける微生物の挙動と処理特性との関係を把握するうえで、特定の生物の特定の遺伝子または遺伝物質（DNAまたはRNA）を定量対象とすることは今後重要な方法の一つになるものと考えられる。これまでの方法論では、視覚的に識別し認識できる動植物の場合を除いて、環境生態系の維持に寄与している生物（特に微小生物）の種類や機能を定量的に調査することは困難であるとされてきた。しかし、近年発展の著しい遺伝子工学的手法の一つである遺伝子プローブ（gene probe）法を用いることによって、環境微生物生態系や廃水処理微生物生態系の中の特定の微生物を検出し定量できる可能性が高く、本方法の生態学的活用方法の確立がもたれる。

本研究では、遺伝子プローブによる微生物検出の標的とする遺伝物質として、原核生物に共通に存在しかつ微生物の種または属によって固有の塩基配列部分を有する16SリボソームRNA（以下、単にrRNAと記す）を利用することを最終目的として、まず通常の培用法では検出が困難で生態のよく知られていない硝化細菌をモニタリングするのに必要とされるDNAプローブを作成するため、RNAの塩基配列の決定実験を行なった。また、ごく微量にしか存在しない微生物を遺伝子プローブによって検出するためには、微生物細胞数を増大させることなく標的とする遺伝物質のみを大量に増幅させて、検出感度を高めることが必要となる。本研究では、この方法として近年医学診断分野で活用されはじめているポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCR法と記す）を環境微生物や廃水処理微生物の検出に活用することを試みた。

2. 実験方法

硝化細菌のRNAの塩基配列の決定実験においては、DNAプローブによるハイブリダイゼーション検出の研究材料として、他栄養硝化細菌 *Arthrobacter grobiformis* IF03062株からの全RNAをフェノール法によって抽出し、これを逆転写酵素を用いたダイレクト ジデオキシ シーケンス法によって16S rRNAの塩基配列を決定した。この際のプライマーDNAとしてDNAシンセサイザーによって合成した16塩基～18塩基のユニバーサルプライマーを用いた。PCR法による環境微生物の検出実験においては、土壤細菌であり植物病原菌として知られている *Erwinia carotovora* 1068株の染色体のペクチン酸分解酵素をコードする遺伝子領域（PAL 1）のDNAを標的として、まず一夜培養した菌液を $10^{-1} \sim 10^{-16}$ まで10倍希釈を行なったものから染色体の抽出操作を行なった後に、PCR反応によって増幅し、その増幅産物をアガロースゲル電気泳動法によって検出する実験を行なった。このPCR法のプライマーDNAとしては同じくDNAシンセサイザーによって合成した2種の20merのDNAを用いた。また、実際の環境中に存在するこのような細菌を検出することを模擬して、この細菌の一夜培養液を滅菌土壌に混合し、菌体と土壌とを分離したのち、染色体の抽出回収をして前述のPCR反応を行なって回収菌体の存在を確認する実験をおこなった。

3. 実験結果

逆転写酵素を用いたジデオキシ法によって決定した他栄養性硝化細菌 *A. grobiformis*のRNAの部分塩基配列を図-1に示した。この塩基部分は、大腸菌RNAの5'末端から数えて1234～1366番の塩

基部分に相当する。疑問符で示したものは塩基種が特定できなかったものであるが、塩基種の特定期間部分だけについて大腸菌のものと比較した結果、比較的良好に配列の一致する部分とかなり相違する部分とが存在することが知られた。他の微生物のRNAとも比較して、塩基配列が本細菌のみに特異的な部分が特定できれば、それを遺伝子プローブとして用いることによって混合系における本細菌の検出に使用可能なプローブを開発することが可能となる。

図-2に、土壌細菌 *E. carotovora* の一夜培養菌液を $10^{-1} \sim 10^{-13}$ まで10倍希釈し、その希釈液から常法にしたがって染色体を抽出しPCR法によってDNA (PAL 1の約530bp部分)を増幅させて電気泳動によって検出した結果を示した。これによって元の培養菌液の *E. carotovora* の細胞存在量を推定した結果 10^{12} /mL程度となることが知られ、PCR法によればほぼ1細胞の存在が検出できるものと考えられた。

同様に *E. carotovora* を滅菌畑土に土100g当たり 10^4 CFUだけ混合した後、常法にしたがって染色体を抽出回収し、PCR反応(25サイクルで1回の反応を終了)を行ない、前記PAL 1のDNA部分の増幅を行なった。PCR反応は一度だけではなく1回終了したものをさらにテンプレートとして反応系を構成させて繰り返すことを行なった結果、図-3に示したように2回繰り返した後(トータルサイクル数50回)から電気泳動によって増幅されたPAL 1部分の検出が可能となり、土壌における *E. carotovora* の存在を検出できた。

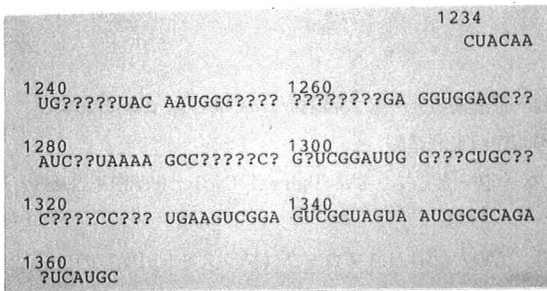


図-1 他栄養性硝化細菌 *A. grobiformis* の16S rRNAの部分塩基配列

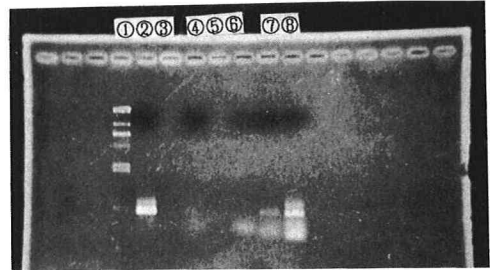


図-2 希釈した *E. carotovora* の染色体DNAのPCR増幅結果(2回=50サイクル)

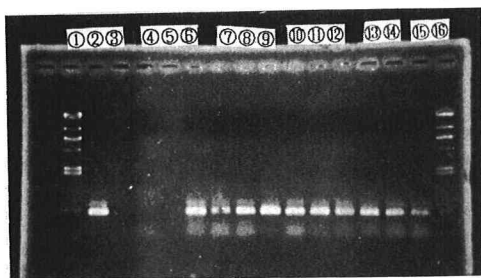


図-3 土壌から回収した *E. carotovora* のDNAのPCR増幅による検出結果

- ① λ phage DNA / Hind III
- ② pNN101(+)コントロール PCR 25cycles
- ③ ブランク
- ④ 滅菌土エルビニア未放出回収後、染色体抽出操作後
PCR 2回目 total 50cycles(-)コントロール
- ⑤ ブランク
- ⑥ 滅菌土エルビニア放出回収後、染色体抽出操作後
PCR 1回目 total 25cycles
- ⑦ " " PCR 2回目 total 50cycles
- ⑧ " " PCR 3回目 total 75cycles

- ① λ phage DNA / Hind III
- ② pNN101(+)コントロール 25cycles増幅サイズマーカー
- ③ ブランク
- ④ DNAなし(-)コントロール 25cycles増幅
- ⑤ ブランク
- ⑥ 希釈 10^{-3} 25cycles増幅 total 50cycles
- ⑦ 10^{-12} " "
- ⑧ " " " "
- ⑨ 10^{-3} " "
- ⑩ 10^{-12} " "
- ⑪ 10^{-3} " "
- ⑫ 10^{-12} " "
- ⑬ 10^{-3} " "
- ⑭ 10^{-12} " "
- ⑮ 10^{-3} " "
- ⑯ 10^{-12} " "
- ⑰ 10^{-3} " "
- ⑱ 10^{-12} " "
- ⑲ 10^{-3} " "
- ⑳ 10^{-12} " "
- ㉑ 10^{-3} " "
- ㉒ 10^{-12} " "
- ㉓ 10^{-3} " "
- ㉔ 10^{-12} " "
- ㉕ 10^{-3} " "
- ㉖ 10^{-12} " "
- ㉗ 10^{-3} " "
- ㉘ 10^{-12} " "
- ㉙ 10^{-3} " "
- ㉚ 10^{-12} " "
- ㉛ 10^{-3} " "
- ㉜ 10^{-12} " "
- ㉝ 10^{-3} " "
- ㉞ 10^{-12} " "
- ㉟ 10^{-3} " "
- ㊱ 10^{-12} " "
- ㊲ 10^{-3} " "
- ㊳ 10^{-12} " "
- ㊴ 10^{-3} " "
- ㊵ 10^{-12} " "
- ㊶ 10^{-3} " "
- ㊷ 10^{-12} " "
- ㊸ 10^{-3} " "
- ㊹ 10^{-12} " "
- ㊺ 10^{-3} " "
- ㊻ 10^{-12} " "
- ㊼ 10^{-3} " "
- ㊽ 10^{-12} " "
- ㊾ 10^{-3} " "
- ㊿ 10^{-12} " "