

VII-40

ビニルクロライドリダクターゼ遺伝子を標的とした定量検出方法の確立

東北学院大学大学院工学研究科

○遠藤 博子

東北学院大学工学部 正会員 中村 寛治

1. はじめに

塩素化エチレンのテトラクロロエチレン（PCE）トリクロロエチレン（TCE）は洗浄剤・溶剤として優れており、長期にわたってドライクリーニングの染抜き、金属・機械等の脱脂洗剤等に使用されてきた。しかし、それらの物質は貯蔵タンク等から漏出し、地下水汚染の原因物質となっている。PCE や TCE は、発がん性や肝機能障害を誘発する可能性が指摘されており、早急な処理が望まれている。一方、PCE や TCE は、嫌気性条件下で微生物の作用により、シスジクロロエチレン（c-DCE）、ビニルクロライド（VC）を経て、無害なエチレン（ETH）に脱塩素化されることが知られている。本反応で、PCE から c-DCE までの変換は土壤中に生息する一般的な微生物によって比較的早い速度で行われる。それに比べ c-DCE から ETH までの反応は極めて速度が遅く、土壤中には c-DCE や VC が残存してしまうケースもある。近年の研究によって、c-DCE は *Dehalococcoides* 属細菌によって速やかに ETH まで変換されることが明らかとなってきた。つまり、*Dehalococcoides* 属細菌の存在が塩素化エチレンの完全な脱塩素化の鍵を握っているといっても過言ではない。これまでに我々は、国内の TCE 汚染サイトに存在する *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA の取得、解析を行い、16S rDNA を標的とした Real-Time PCR による高感度検出法を確立している。しかし、16S rDNA の検出でだけでは脱塩素化を完全に予測するには十分でなく、分解能をコードする分解遺伝子の検出が求められている。本研究では、エチレン化の最終段階である VC のエチレン化の能力をコードしているビニルクロライドリダクターゼ遺伝子の *vcrA* を標的とし、Real-Time PCR による定量検出法を確立すると共に、浄化現場での本遺伝子保有 *Dehalococcoides* 属細菌の挙動把握を試みた。

2. 実験材料および方法

複数の *vcrA* 遺伝子を比較し、DNA 塩基配列のコンセンサス配列の部分を決めた上で、*vcrA* を標的とした検出法を確立する。プライマーは OLIGO プログラムを利用し *vcrA* 塩基配列を基にデザインした。その結果、Upper プライマー：5'-GTG GCG TTG GTG CTC TTA-3'、Lower プライマー：5'-TTG GTT CGT CTT CTT GGT G-3'を最適なプライマーペアとして選出した。次に、選出したプライマーペアで、非特異的な PCR 増幅反応が起きないことを確認するため、ブロック PCR 反応を行った。反応条件は、Pre-heating-95℃、1 分に続き、第 1 段階-95℃、20 秒、第 2 段階-54℃、30 秒、第 3 段階-72℃、45 秒を 30 サイクル繰り返し、Post extension-72℃、7 分を行った。本反応には、宝酒造製 PCR サーマルサイクラー TP-600 を利用した。その後、同じプライマーペアを使って、SYBR Green 法による Real-Time PCR を行った。Real-Time PCR には、ロッッシュ・ダイアグノスティック製 Light Cycler を利用した。

Pre (Type: Denature)

Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment	NdTemp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	60	20	None

Main (Type: Quantification)

Cycles = 40		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment	NdTemp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	0	20	None
2	62	10	20	None
3	72	26	2	Single

Melt (Type: Melting Curves)

Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment	NdTemp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	0	20	None
2	72	10	20	None
3	95	0	0.2	Continuous

Cooling (Type: None)

Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment	NdTemp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	40	30	20	None

*Acquisition Mode=Detection of Fluorescence

図-1 SYBR Green法の検出条件

3. 実験結果および考察

前述のプライマーペアを利用して、TCE 浄化現場の地下水由来の抽出 DNA を対象に、PCR 検出の検討を行った。1 つの現場で、異なる浄化時期に採取された 9 種類の現場サンプル(Sample1~9)を検出対象とした。まず、4 種類の現場サンプルを用い、ブロック PCR を行った。どのサンプルでも 1 本の明瞭な DNA バンドが得られた(結果省略)。それゆえ、本プライマーペアは特異的に *vcrA* を検出できると判断した。

次に、図-1 に示した条件下で、Real-Time PCR を行った。Sample6~9 を用いて Real-Time PCR を行い、図-2 に示す結果が得られた。スタンダード、サンプル共に、一定のサイクル数で DNA 増幅を示す蛍光強度の増加が観察され、設定した条件でサンプル中の *vcrA* が定量検出できることが明らかとなった。また、図-2 の下部に示すとおり、スタンダードでは良好な検量線が得られた。図-3 は Real-Time 測定後、検出対象 *vcrA* の標的 DNA 部分のみが特異的に増幅されているか否かを確認した電気泳動結果である。本結果では標的 DNA 部分のみが確認され、PCR 反応が Real-Time PCR で特異的に進んだことが分かった。

図-4 は検出対象である 9 種類の現場サンプル中の *vcrA* 濃度測定結果を浄化期間に対してプロットしたものである。浄化進行に伴って、*vcrA* が増加しており、浄化の進行に伴ってこの遺伝子を保有した *Dehalococcoides* 属細菌が増加したと判断できる。つまり、本細菌が TCE 汚染現場の浄化に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。ここで開発した検出方法は対象細菌検出のため、浄化現場で有効に利用していく。

参考文献

- 1) 中村寛治ら，地下水中の塩素化エチレン分解菌の検出，EICA，Vol.9，No.1，pp.21-15（2004）

本研究は、NEDO プロジェクト「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発」の一環として実施したものである。

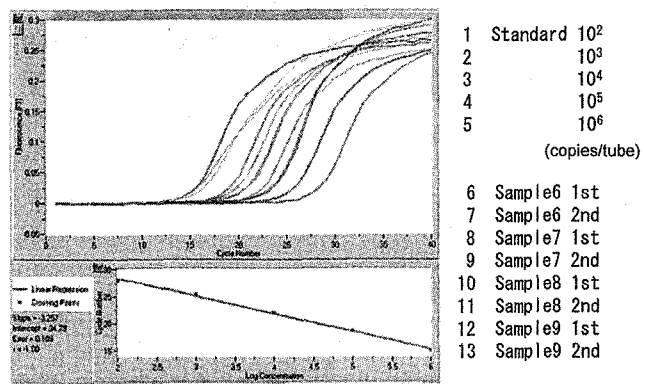


図-2 TCE浄化現場地下水中の *vcrA* 検出結果

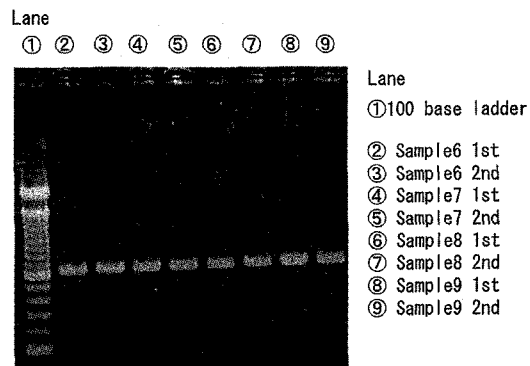


図-3 Real-Time PCRで増幅された *vcrA* の電気泳動による確認

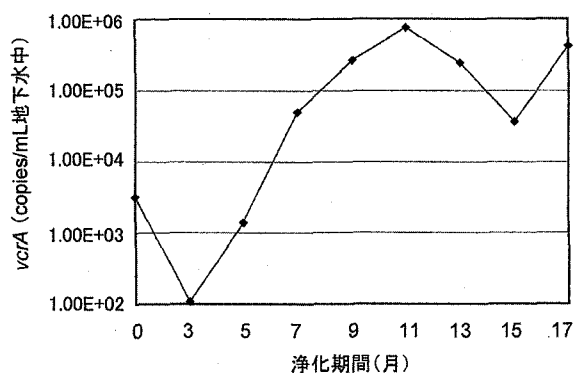


図-4 SYBR Green法の検出結果