

(28) トリクロロエチレン汚染現場に注入されたフェノール資化細菌
Ralstonia eutropha KT-1 株の PCR による定量検出

QUANTITATIVE PCR-DETECTION OF A PHENOL-UTILIZING BACTERIUM, *Ralstonia eutropha* KT-1, INJECTED TO A TRICHLOROETHYLENE-CONTAMINATED SITE

中村 寛治*・石田 浩昭*・飯泉 太郎*・渋谷 勝利**・岡村 和夫**

Kanji NAKAMURA, Hiroaki ISHIDA, Taro IIZUMI, Katsutoshi SHIBUYA, Kazuo OKAMURA

ABSTRACT: *Ralstonia eutropha* KT-1 is a bacterium able to degrade trichloroethylene (TCE) by its phenol or toluene-degrading enzyme. Quantitative detection of strain KT-1 was examined with a real time PCR apparatus, in order to monitor the strain released into a field for TCE degradation. A 800 base-DNA fragment, PCR-synthesized by using a primer pair designed based on a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence, was used as a target DNA for the detection. A primer pair with hybridization probes, designed from the sequence of the PCR-synthesized fragment, successfully detected strain KT-1 and detection limit was 20 cell-DNA/PCR-tube. This developed method was applied to the detection of strain KT-1 injected to ground water of a TCE contaminated site in Chiba prefecture. Strain KT-1 in the groundwater was monitored for approximately two months after the injection. The monitoring of strain KT-1 was successfully attained until the detection limit, showing the effectiveness of the quantitative PCR.

KEYWORDS: *Ralstonia eutropha*, trichloroethylene, detection, PCR, REP

1. はじめに

土壌汚染を微生物の力を利用して浄化するバイオレメディエーションには大きく分けて二種類の方法がある。一種類は、土着の微生物を活性化させて浄化を行うバイオスティミュレーション、もう一種類は、特定の微生物を大量に土壌に注入し処理を行うバイオオーギュメンテーションである。トリクロロエチレン (TCE) は、過去、金属部品の脱脂洗浄において長く利用されてきたため、日本の地下水の代表的な汚染物質となっているが、微生物を利用した TCE の処理についても、この二種類の方法が存在する。以下に、その概略を述べる。

現在までに、TCE を炭素源に増殖できる微生物は発見されていないが、メタン資化細菌のメタンモノオキシゲナーゼ¹⁾、トルエン資化細菌のトルエンオキシゲナーゼ^{2,3)}、フェノール資化細菌のフェノールヒドロキシラーゼ^{4,5)}などが TCE を分解する能力を有することが知られている。それゆえ、メタン、トルエン、フェノール等を汚染サイトに直接注入し、土着細菌を増殖・活性化して TCE を分解するバイオスティミュレーションが現場でも検討されている。しかしながら、この様な増殖基質の注入によって出現する分解微生物の

*栗田工業(株)技術開発センター (Corporate Research and Development Center, Kurita Water Industries Ltd.)

**清水建設(株)技術研究所 (Institute of Technology, Shimizu Corporation)

中には、TCE 分解に有効でないものも存在するため⁸⁾、注入物質が無駄に消費されてしまうという欠点を有している。これに対して、予め TCE 分解能を有することが分かっている菌株を、汚染サイトに直接注入するバイオオーギュメンテーションは、この様な問題点を回避できる有効な方法である。しかしながら、日本では、大量の微生物を、環境浄化の目的で自然開放系に放出した経験はないため、その利用に関しては細心の注意が払われるべきである。

開放系での微生物利用に当たっては、まず注入微生物の安全性が確認され、もし地下水を通じて人間の口に入ることがあっても問題がないことが保証される必要がある。また、地下水中に注入された微生物は、速やかにその濃度が減少し、既存の微生物生態系に長期にわたって影響を及ぼさないことが、微生物生態系保全の観点から望まれる。

利用微生物の安全性に関しては、動物試験、従来の病気に関する知見を利用して、確認することは可能である。一方、注入微生物の挙動把握には注入微生物を定量的に検出する手法が必要となるが、決定的な方法が確立されていないのが現状である。そこで近年、簡便である polymerase chain reaction (PCR) 法を利用した定量方法として、PCR 産物のサザンブロットによる検出法⁷⁾、Most Probable Number (MPN)-PCR 法^{8) 9)}、Competitive PCR 法¹⁰⁾などの利用が検討されているものの、実験手順の多さ、希釈した多数のサンプルの処理等の課題があり、現場での利用はあまり進んでいない。

そこで、本研究では、新たな手法として Real Time PCR 装置、LightCycler (Roche 社)、を利用した PCR による特定細菌の定量検出を検討した。具体的には、特異的かつ簡便に、再現性良く対象菌を検出するため、特異性の高いプライマーをデザインすると共に、PCR 反応条件の最適化を行った。検出対象は TCE 分解能を有するフェノール資化細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1¹¹⁾とし、標的 DNA は repetitive extragenic palindromic (REP) sequence からデザインされたプライマーを用いる REP-PCR¹²⁾により合成される DNA 断片とした。REP-PCR により合成される DNA 断片は、簡便に得られ、特定の菌株をサザンブロットにより検出するための標的 DNA として有効であることが、すでに現場試験で確認されている⁷⁾。本研究では最終的に、適用した PCR 法の実用性を検討するため、日本で初めて実施されたバイオオーギュメンテーションにおいて、大量の KT-1 株が注入された TCE 汚染サイトの地下水中での KT-1 株の濃度変化を追跡した。

2. 実験方法および材料

2. 1 細菌

Ralstonia eutropha KT-1 は、千葉県内にある TCE 汚染サイト（本研究でバイオオーギュメンテーションを行うサイト）より単離されたフェノールおよびトルエンを資化できる細菌であり、これらの基質で誘導された酵素によって TCE を分解することができる¹¹⁾。本研究ではこの KT-1 株を検出対象とした。また、後述する標的 DNA の取得においては *Escherichia coli* JM109 を利用した。これらの菌株を室内実験で利用するための培養に関しては、L broth 培地 (Difco 製 Tryptone 10 g, Difco 製 Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, 蒸留水 1 L 中, pH 7.0) を利用し、コロニー形成にはこれに 15 g の極東製精製寒天を添加した L broth 寒天培地を利用した。また、JM109 株の形質転換体の検出には L broth 寒天培地に Ampicillin を添加し、100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度になるように調製した。KT-1 株の培養は 30°C、JM109 株の培養は 37°C で行った。

2. 2 標的 DNA の REP-PCR による合成

KT-1 株から抽出した染色体 DNA をテンプレートに、REP-PCR 用プライマーペア (REP2-I; 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3', REP1-R; 5'-IIICGICGICATCIGGC-3')¹²⁾ (Table 1) を利用し、REP-PCR を行った。反応条件は、de Bruijn らの報告¹²⁾に従い設定した。PCR 合成された DNA はアガロース電気泳動により分離し、約 800 bases の大きさを示した DNA 断片をアガロースゲルより切り出し、標的 DNA と

Table 1 Summary of primers

Used for:	Primer/Probe	Sequence (5' to 3')	References
REP-PCR	REP2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC	12)
	REP1R-I	IIIIICGICGICATCIGGC	12)
Cloning	REP-2IB	CGNCTTATCNGGCCTAC	This study
	REP1R-IB	CGNCGNCATCNGGC	This study
Sequencing	KNA80f	TTCACCGTCATCACCGAAACG	This study
	KNA80r	CATCCGCCAAAACAGCCAAGC	This study
LightCycler	REP-KTf1	GGGCCTACCCACGACTG	This study
	REP-KTr1	CGCATGAGCTGAACAAT	This study
	REP-KTr2	CATCGGGCGCTTGGTG	This study
	REP-KTf3	CGGCCAATCTTGGCTATCACTTAG	This study
	REP-KTr3	CCATCAGTTTCGTGCTCGGGAACAT	This study
	REP-KTf4	CGCCGCTGGGATGATTACGC	This study
	REP-KTr4	CGGGAACATACACGCACTTA	This study
	KT-FITCL	AATTGCCAATCACCCCTCAGTGACTC	This study
	KT-RED640R	GCGGCCTCCAATGCACGACGAAT	This study

I: Inosine

した。標的 DNA をクローニングできるようにするため、上記プライマー中のイノシン(I)を取り除き、新たに、REP-2IB; 5'-CGNCTTATCNGGCCTAC-3' および REP1R-IB; 5'-CGNCGNCATCNGGC-3'(Table 1) を作成、アガロースから抽出した DNA をテンプレートに再び PCR 反応を行った。PCR 増幅の反応液の全容量は 100 μ L とし、2.5 U の Ex Taq DNA polymerase (宝酒造製)、200 μ M の dNTP、5'末端をリン酸化した REP-2IB、REP1R-IB をそれぞれ 20 pmol 使用した。その他の反応液組成は添付のマニュアルに従った。PCR 反応は、Pre-heating; 98°C, 2 分につき、第 1 段階; 94°C, 20 秒、第 2 段階; 44°C, 30 秒、第 3 段階; 72°C, 1 分を 30 サイクル繰り返し、Post extension; 72°C, 7 分を行った。PCR 反応には、PE バイオシステムズ製 GeneAmp PCR System 2400 を利用した。

2. 3 REP-PCR 断片の塩基配列決定

前項で取得した REP-PCR 断片は T4 DNA polymerase (東洋紡製) により、平滑末端化を行い、プラスミド pKNA80[®] のマルチクローニングサイト中の *Sma*I サイトに挿入した。ライゲーション反応には Ligation high (東洋紡製) を使用し、16°C にて一晚反応させた。その後、大腸菌に形質転換させ L broth 寒天培地 (Ampicillin 100 μ g/mL を含む) に塗布、37°C で一晚培養した後、標的 DNA 断片が挿入された pKNA80 を保有するクローンを 3 つ取得した。それらのクローンそれぞれから、プラスミドを抽出、挿入されている REP-PCR 断片の塩基配列を決定した。プライマーとして、pKNA80 のマルチクローニングサイト上流側のプライマー、KNA80f 5'-TTCACCGTCATCACCGAAACG-3'、および下流側のプライマー、KNA80r; 5'-CATCCGCCAAAACAGCCAAGC-3' (Table 1) を利用した。伸長反応には BigDye Terminator Kit (PE バイオシステムズ製) を用い、配列決定には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズ製) を使用した。

2. 4 PCR による KT-1 株の定量

定量的 PCR を行うため、ロシュ・ダイアグノスティック製 LightCycler を使用した。LightCycler では二種類の検出法がある。一種類は、PCR 合成される全ての DNA を、SYBR-Green I (DNA に特異的な色素で、二本鎖 DNA に結合した場合に強い蛍光を発する) を利用して検出する方法 (以下 SYBR-Green 法) である。もう一種類は、PCR 合成される DNA 内部の塩基配列を利用してデザインされた 2 つの連続する蛍光標識 Probe が、標的 DNA に並んで結合した場合のみ検出される方法 (以下 Hybridization-Probe 法) であ

Table 2 Operating conditions for SYBR-Green method

Pre (Type: Denature)				
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	*Acquisition Mode
1	95	120	20	None

Main (Type: Quantification)				
Cycles = 40		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	0	20	None
2	56	10	20	None
3	72	30	2	Single

Melt (Type: Melting Curves)				
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	0	20	None
2	66	10	20	None
3	95	0	0.2	Continuous

Cooling (Type: None)				
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F1/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	40	30	20	None

*Acquisition Mode=Detection of Fluorescence

Table 3 Operating conditions for Hybridization-Probe method

Pre (Type: Denature)				
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F2/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	120	20	None

Main (Type: Quantification)				
Cycles = 50		Fluorescence Display Mode = F2/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	0	20	None
2	54	15	20	Single
3	72	30	2	None

Melt (Type: Melting Curves)				
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F2/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	95	0	20	None
2	44	10	20	None
3	85	0	0.2	Continuous

Cooling (Type: None)				
Cycles = 1		Fluorescence Display Mode = F2/1		
Segment No	Temp. Target(°C)	Hold Time (s)	Slope (°C/s)	Acquisition Mode
1	40	30	20	None

る。本研究では、両方法を検討した。PCR 反応に利用する SYBR-Green 法の反応液の全容量は 20 μ L とし、サンプル 1 μ L に対して、0.5 U の Ex Taq DNA polymerase (宝酒造製)、添付 Buffer (MgCl₂ 含まず) 2 μ L および 10 pmol のプライマーを使用した。その他、dNTP 200 μ M、DMSO 5% (v/v)、SYBR-Green I (FMC 製) 0.0006% (v/v)、MgCl₂ 3 mM、BSA 250 μ g/mL の濃度になるように添加した。Hybridization-Probe 法も基本的な組成は同様で、SYBR-Green I の代わりに、4 pmol の二種類の蛍光標識プライマー (3' FITC 標識、5' LC Red 640 標識) を使用した。定量 PCR に使用した全プライマーは Table 1 に示す通りであるが、最終的に、SYBR-Green 法に対しては、REP-KTf1, REP-KTr1 のプライマーペアを、Hybridization-Probe 法に対しては、これらのプライマーペアに加えて、KT-FITCL および KT-RED640R を Hybridization Probe として使用した。SYBR-Green 法および Hybridization-Probe 法での PCR 反応条件は、それぞれ Table 2, 3 に示す通りである。また、スタンダードとして L broth 培地で培養した KT-1 株より染色体 DNA を、2.9 に後述する方法に従って抽出し、R2A 寒天培地 (Difco 製) で測定した菌数 (過去の実験から、培養直後は、蛍光顕微鏡による全菌数と R2A での計測数はほとんど同じであることが分かっている) を基に、濃度の異なる標準液 (スタンダード) を作成した。

2. 5 KT-1 株の注入

KT-1 株はあらかじめ、外部で大量培養を行い、その凍結菌体を現場に持ち込んで、トルエンによる酵素誘導を行った後、現場実験に使用した。

大量培養には、ポリペプトン 1%、酵母エキス 1%、NaCl 5% の組成の培地を利用した、これらの成分は、脱塩素水道水に溶解させ 30°C で培養を行った。培養には 6 kL の内容積を有する培養槽を利用し、培養液量は 3 kL とした。培養菌体の最終濃度は 600 nm での Optical Density (OD₆₀₀) で 10 となった。培養菌体は、遠心分離器 (ウェストファリヤー製多段分離板型) で処理し、培地成分を除去した後、0.8% の生理食塩水に再懸濁させ、再び遠心分離処理を行った後、回収ベレット (固形分で 167 g-dry weight/L) を約 1 kg に分包して、-20°C で速やかに凍結保存した。

その後、現場に凍結菌体を持ち込み、内容積 1000 L の培養槽内の無機培地 (K₂HPO₄ 0.25 g, KH₂PO₄ 0.076 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, 微量元素溶液 2.5 mL, 蒸留水 1 L 中, pH 7.2±0.2) 800 L に OD₆₀₀=10 になるよう懸濁した。ここで、微量元素溶液の組成は次の通りである (H₃BO₃ 0.232 g, ZnSO₄·7H₂O 0.174 g, Fe₂SO₄(NH₄)₂SO₄·6H₂O 0.116 g, CoSO₄·7H₂O 0.096 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.232 g,

CuSO₄·5H₂O 8.0 mg, MnSO₄·4H₂O 8.0 mg, 蒸留水 1 L 中)。培養槽の気相を純酸素で充たすと共に、懸濁液にトルエンを 2 mM (すべて液中に溶解したとして) の濃度になるよう添加し、密閉状態のまま 20℃で TCE 分解酵素の誘導を行った。添加トルエンが全て消費された後、再び同様のトルエン添加を行い、合計 7 回のトルエン添加を行った。TCE 分解反応を 1 次反応と仮定して、培養菌体の分解速度定数 k_1 を回分試験 (20℃) により測定すると 30 L/g/h となり、誘導は良好に行われたと判断した。

誘導が完了した培養液中の培地成分を除去するために、遠心分離器 (巴工業製 ASM160 AP 型) により 13,500×g で遠心分離操作を行い、回収された菌体ペレットは脱塩素水道水 700 L に再懸濁した (OD₆₀₀=11.2)。この懸濁液を脱塩素水道水で希釈することによって OD₆₀₀=1.0 に調整しながら、地下水中に 10 L/min の流量で 11 時間注入を行った。その後、注入菌体をさらに広い範囲に分散させるため脱塩素水道水のみを同じ流量で 5 時間注入した。注入細菌の回収のため、注入作業終了直後に、注入を行った井戸から 3 L/min の流量で揚水を行った。総注入量は 9.6 m³、揚水量は実験終了までの 51 日間で 220 m³ となった。

2. 6 注入サイトおよび地下水位

注入/揚水井 AR2 およびその周囲のモニタリング井 AM2, AM3, AM4, AM5 を Fig.1 に示す。このサイトの地下の帯水層は地表から約 9.5 m の深さに水面があり、帯水層の厚みは約 10 m である。帯水層を構成する地層は、粒径が比較的均一な透水性の良い細粒砂層で、透水係数は $4\sim6\times10^{-3}$ cm/s である。また、下位の泥質砂岩層は難透水層であり、透水係数は 10^{-6} cm/s 程度である。注入操作終了後、AR2 での地下水位は 3.7 m 上昇、揚水後地下水位は急激に低下し、自然地下水位から約 1 m 下の水位で安定した。サイト周辺の自然地下水流は 5 ~ 10 cm/d であった。

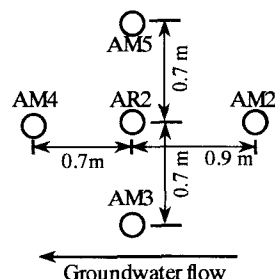


Fig.1 Location of wells

2. 7 地下水サンプリング

地下水サンプリングは KT-1 株注入前に 2 回行った。揚水後は、1 時間後 (2000 年 2 月 6 日) を開始点とし、その後は定期的に 2000 年 3 月 28 日まで継続した。地下水をサンプリングした井戸は、Fig.1 に示す AR2, AM2, AM3, AM4 の 4 ヶ所とした。AR2 では揚水地下水をサンプリングし、AM2, AM3, AM4 では地下 13.5 m から 14.5 m まで採水器 (吉野計器製 SY-IK-B 型 容積 400 mL) を降ろしてサンプリングした。サンプリングした地下水は氷温で保管し、1 日以内に微生物分析に使用した。地下水温は注入時に 22℃まで上昇したが、その後は自然地下水温に近づき、 $17\pm1^\circ\text{C}$ で推移した。試験期間中、地下水 pH は 6.3 ± 0.2 、溶存酸素は 0.7 mg/L 以上となった。

2. 8 地下水中の全菌数の測定

地下水中の全菌数を測定するため、地下水サンプルに 1/3 量の緩衝液 (15% NaCl, 1.5 mM EDTA, 0.3 M リン酸緩衝液, pH 8.5) を加え、エチジウムブロマイド (EtBr) を終濃度が 100 mg/L になるよう添加、室温で 5 分間染色した。染色液は孔径 $0.2\mu\text{m}$ のポリカーボネートフィルター (ミリポア製 GTBP2500) で濾過、細菌をフィルター上に補足した上で、蛍光顕微鏡 (オリンパス製、VANOX-AH2-FL) を使用し、B 励起で計測した。

2. 9 DNA の抽出

地下水サンプルからの DNA の抽出は基本的には既報の論文⁶⁾に従った。地下水中の細菌をフィルターに補足する場合は、100 mL の地下水を使用した。菌体注入直後は菌体濃度が高すぎてフィルター上への捕捉ができなかったため、2 mL の地下水を遠心分離 (8000×g, 15 min, 4℃) で処理し、沈殿した菌体から同様

REP-KTr4 のプライマーペアのデザインした。これらのプライマーペアに関しては、利用した場合に生ずる 2 次構造およびダイマーを OLIGO 4.0 で確認し、これらをなるべく低減させた。

3. 2 SYBR-Green 法による定量検出

合計 4 種類のペアについて LightCycler での測定を、KT-1 株からの抽出 DNA をスタンダードとして検討した。運転条件は基本的には Table 2 に示した通りであるが、Annealing 温度 (Main, Segment No. 2) は、それぞれのプライマーペアについて 50°C~70°C の範囲内で最適化を行った。その結果、REP-KTf1, REP-KTr2 のペア以外の 3 つのプライマーペアは、良好に測定できる条件が見いだされた。次に、これら 3 つのプライマーペアを比較すると、Annealing 温度の最適化を行った際、REP-KTf3, REP-KTr3 および REP-KTf4, REP-KTr4 の 2 つのプライマーペアは、最適温度から 2~4°C ずれた場合、DNA の合成量が著しく低くなったり、時には DNA 合成が全く起こらなくなるなどの不安定さを示すことが明らかとなった。それゆえ、最も安定した結果が得られた REP-KTf1, REP-KTr1 のプライマーペアを KT-1 株の測定に利用することにした。

Fig.4 に KT-1 株から抽出した DNA (1 cell-DNA = 1 cell から抽出された DNA に相当、により表示) をスタンダードとして SYBR-Green 法で測定した結果を示す。横軸は cell-DNA/PCR-tube (対数表示) で、DNA 量を 20 μ L の PCR 反応チューブ当たりの cell-DNA で示している。縦軸は Crossing Point での Cycle Number で、PCR によって DNA の合成量が著しく増加し始めた点 (= Crossing Point) を LightCycler 付属のプログラムにより求め、その時点の PCR 反応の Cycle Number を示してある。この図から分かるように、スタンダードの DNA 量が増加すれば、それに伴って Crossing Point での Cycle Number が低下、つまり合成 DNA が早く検出されることが分かる。本実験では、10 cell-DNA/PCR-tube の範囲まで、KT-1 株を定量的に把握できることが示された。

次に注入試験 12 日前の AM3 地下水から、実験方法に示すように DNA 抽出 (未精製) し、PCR に及ぼす影響を検討した。具体的には抽出 DNA 1 μ L に、1000, 10000 cell-DNA/PCR-tube の KT-1 株スタンダードをそれぞれ加え、それらが正確に測定されるか否かを検討した。その結果、1000 cell-DNA/PCR-tube では PCR 合成は全く観察されず、10000 cell-DNA/PCR-tube では 210 cell-DNA/PCR-tube という測定結果になり、地下水から抽出した DNA には PCR 反応を阻害する物質が含まれることが明らかとなった。そこで、抽出 DNA をファルマシア製カラム MicroSpin-S300HR で精製したのち、同じ試験を行ったところ、1000, 10000 cell-DNA/PCR-tube はそれぞれ 1156, 15580 cell-DNA/PCR-tube と測定され、阻害物質は取り除かれることが明らかとなった。それゆえ、現場試験において全ての抽出 DNA はカラム精製を行うこととした。

また、LightCycler による測定では、Negative Control として、KT-1 株の DNA を全く含まないサンプルも同時

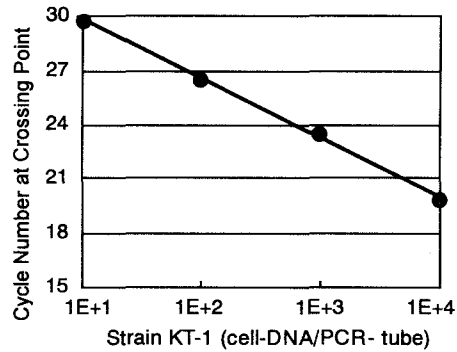


Fig.4 Quantification of strain KT1 by SYBR-Green method

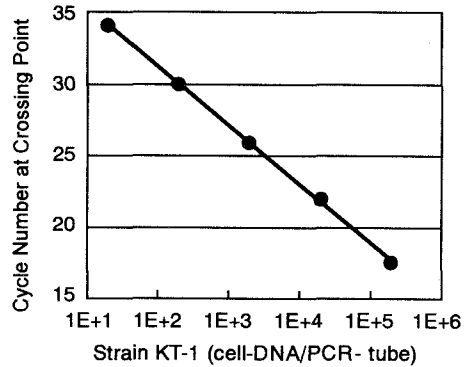


Fig.5 Quantification of strain KT-1 by Hybridization-Probe method

に PCR にかけてが、実験を継続する中で、Negative Control でもサイクル数が 30 を越えた時点で DNA 合成が頻繁に起きてしまうことが明らかとなった。そこで、合成された DNA をアガロース電気泳動で調査した結果、非常に短いサイズの DNA の合成が行われ、これが検出されてしまうことが分かった。このような Negative Control での DNA 合成は、時にはスタンダード DNA を添加した場合より著しかったため、SYBR-Green 法では現場での KT-1 株の定量測定を正確にできないと判断し、さらに特異性の高い検出法である Hybridization-Probe 法の検討を行った。

3. 3 Hybridization-Probe 法による定量検出

上述のように SYBR-Green 法では非特異的に起きる DNA 合成を回避することができなかった。そこで、さらに特異性の高い Hybridization-Probe 法を検討するため、Fig.3 に示すよう、標的 DNA の中央領域を利用して、KT-FITCL および KT-RED640R をデザインした。KT-FITCL の 3' 末端は FITC で標識されており、KT-RED640R の 5' 末端は LC Red640 で標識されている。これら 2 つのオリゴヌクレオチドが同時に DNA にハイブリダイズすると、FITC と LC Red640 の働きによって蛍光が発せられ、これを検出することが可能となる。このように、Hybridization-Probe 法では、まず、特異的なプライマー（ここでは REP-KTfl, REP-KTr1）によって PCR 合成を行い、合成されたものが目的の DNA あるか否かを Hybridization-Probe（ここでは KT-FITCL, KT-RED640R）によって確認できるため、特異性は極めて高くなる。

Hybridization-Probe 法によって KT-1 株のスタンダード DNA を測定した結果を Fig.5 に示す。この結果から、20～200000 cell-DNA/PCR-tube まで広い範囲の濃度で定量測定が可能ながことが分かった。2 cell-DNA/PCR-tube の濃度についても検討を行ったが、測定できる場合とできない場合があり、結果に再現性が得られないことから、定量下限値は、20 cell-DNA/PCR-tube とした。また、SYBR-Green 法のように Negative Control での蛍光は全く検出されず、現場での KT-1 株の定量検出に利用できる可能性が示された。

3. 4 現場地下水へ KT-1 株を注入した場合の TCE 濃度変化

KT-1 株を注入した場合の注入/揚水井戸 AR2 で観察された TCE の濃度変化（PID 検出器を備えた HNU SYSTEMS Inc 製 GC-311 型ポータブルガスクロにて測定）を Fig.6 に示す（X 軸の 0 点は揚水開始時）。注入水にはトレーサーとして Br を添加、その濃度も同時にイオンクロマトによって測定した。Fig.6 には KT-1 株の注入に先立って行われたブランク試験（KT-1 株の菌懸濁液の代わりに同量の脱塩素水道水を注入）の結果も表示した。ブランク試験では注入開始前に 151 $\mu\text{g/L}$ あった AR2 の TCE は脱塩素水道水の注入により急激に検出下限（1 $\mu\text{g/L}$ ）まで低下しているが、揚水を開始すると TCE 濃度の上昇が始まり、約 4 日でほとんど元のレベルに回復している。これに対して、トルエン誘導を行った KT-1 株を注入した場合は、揚水を開始して 2 日間は TCE 濃度が検出下限の 1 $\mu\text{g/L}$ を下回り、約 1 週間経過しても、環境基準値である 30 $\mu\text{g/L}$ を下回っている。一方、ブランクとして加えられた Br はブランク試験と KT-1 注入試験においてほぼ同じ挙動を示している。これらのことから、注入された KT-1 株により、現場地下水中の TCE が分解されたことが明らかとなった。KT-1 を注入した場合の AR2 での TCE 濃度は、その後も上昇を続け、揚水を開始してから約 3 週間での TCE レベルに回復した。

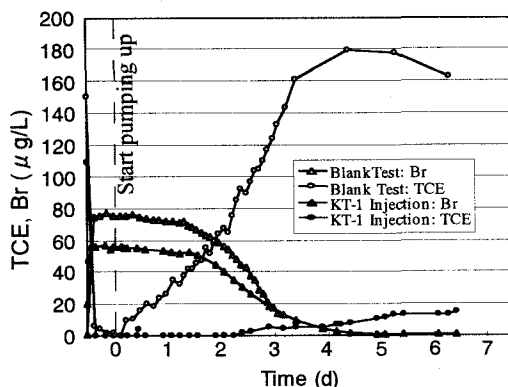


Fig.6 Change of TCE and Br concentrations at AR2

3. 5 現場地下水中の全菌数

KT-1 株の注入を行った場合の現場地下水中の全菌数の経時変化を Fig.7 (図中 X 軸の 0 は揚水開始時) に示す。微生物の注入を完了した後揚水を始め、1 時間経過した後にサンプリングを行いこれを開始点とした。微生物注入の 3 および 12 日前にも全菌数を計測しているが、全ての井戸で約 2×10^5 cells/mL となり、これがサイト内の地下水に生息する元来の全菌数であると判断できる。KT-1 株を注入すると全菌数は注入井 AR2 で 7.1×10^8 cells/mL、まわりのモニタリング井戸 (AM2, 3, 4) では約 3×10^8 cells/mL まで上昇した。

その後揚水を開始すると、全ての井戸において全菌数は速やかに減少し、モニタリング井戸の AM2, 3, 4 では 12 日後にほとんど注入開始前のレベルに戻った。注入を行った AR2 も 12 日後には 10^5 cells/mL のオーダーにまで低下したものの、他のモニタリング井戸の約 3 倍の値となり、その値が約 2 週間継続、揚水開始後約 40 日で他のモニタリング井戸と同じレベルとなった。

これらの結果から分かるように、注入細菌 KT-1 株は、注入直後周りのモニタリング井戸で同じレベルで検出され、KT-1 株が現場地下水中に均一に分散されたことが分かる。また、揚水後の全菌数の推移から、注入された KT-1 株の現場地下水中での濃度は揚水によって速やかに減少し、揚水約 40 日 (注入量の 18 倍の揚水量) で注入前の全菌数レベルに戻るということが明らかとなった。

3. 6 現場地下水中の KT-1 株の定量

KT-1 株の注入を行った場合の現場地下水中での KT-1 株の濃度変化を Fig.8 に示す。実験方法のとおり、通常、地下水 100 mL から細菌が収獲され、抽出 DNA は 50 μ L の TE に溶解するが、DNA 回収率は 47.6 % である。また、LightCycler ではサンプル 1 μ L を使用し、その中の KT-1 株の抽出 DNA の定量下限は 20 cell-DNA である。それゆえ、地下水中の KT-1 株の定量下限値は 21

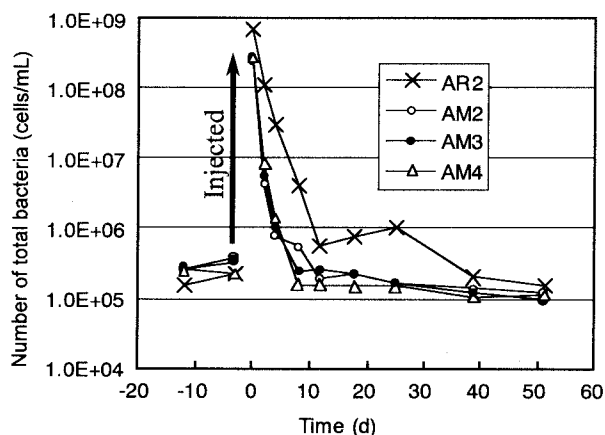


Fig.7 Number of total bacteria in groundwater

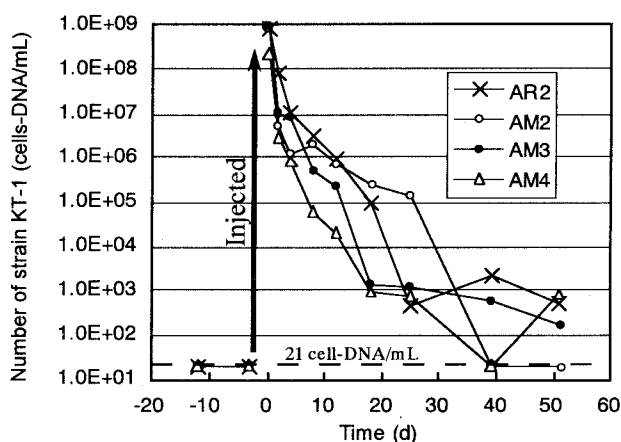


Fig.8 Number of strain KT-1 in groundwater

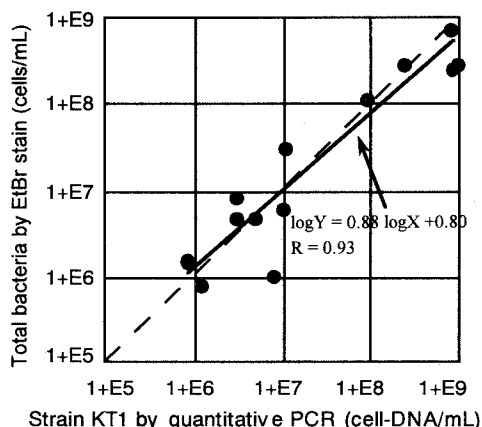


Fig.9 Relationship between total bacteria and PCR-quantified strain KT-1

cell-DNA/mL となる。測定の結果、定量下限を下回った場合は、定量下限を示すラインの下にデータをプロットした。また、定量下限値以下のサンプルに関しては 20 cell-DNA を添加し、それらが検出できることを調べ、阻害物質の影響がないことを確認した。Fig.8 中の測定値は 2 回測定した値の平均値であるが、2 回の測定値を比較し、倍以上の差がある場合は、再度測定を行った。X 軸の 0 点設定は前項の全菌数の場合と同じである。

KT-1 注入前、サンプリングを行った全ての井戸において KT-1 株は全く検出されなかった。KT-1 株注入後は全ての井戸において菌数は 10^8 cell-DNA/mL レベルに増加、揚水後は速やかに減少した。減少速度は井戸によって異なり、最も早く減少したのは AM4 で、続いて、AM3, AR2 となった。AM2 は揚水開始後 4 日目までは順調に低下傾向を示したが、その後減少速度は著しく低下した。また、揚水開始後 51 日目の最終的な到達菌濃度は、減少が停滞傾向にあった AM2 で検出限界 (21 cell-DNA/mL) 以下であったが、その他の井戸では検出され、 $10^2 \sim 10^3 \text{ cell-DNA/mL}$ であった。この結果から、注入された KT-1 株の濃度は 10^2 cell-DNA/mL レベルまでは急速に低下するが、そのレベルで停滞傾向を示すことが明らかになった。

次に定量 PCR によって測定された値の信頼性を検討するため、全菌数との比較を行った。注入前の地下水の中的全菌数はおよそ $2 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ であり、全菌数の値がそれより著しく高くなった場合は、定量 PCR によって測定した KT-1 株の濃度と相関性があると仮定した。注入された菌体懸濁液は、速心分離操作により脱塩素水道水で置換されており、ほかの微生物を増殖させる炭素源は含んでいないことから、注入前の全菌数より高い値が観察される場合は、ほとんどが KT-1 株由来と考えられる。Fig.9 に 10^6 cells/mL レベル以上の全菌数が確認された場合の、定量 PCR との相関を示す。最少二乗法によって求められた関係式は、 $\log Y = \log X$ (破線で表示) にきわめて近く、また、実測値もほとんどこの破線に近いところに分布している。それゆえ、定量 PCR での計測値は信頼性の高いものであると判断できる。

4. 考察

本研究で行った現場試験のように大量の微生物を地下水中に注入する場合、注入微生物を追跡し、それを検出する技術は欠かせないものとなる。本研究で得られた結果から、REP-PCR により増幅される DNA 断片中の塩基配列からデザインしたプライマーを利用する Real Time PCR により、対象微生物の高感度な検出が可能であることが明らかとなった。

REP-PCR により作成される DNA フィンガープリントは株を区別することに利用できることが近年の研究により明らかになってきている¹²⁾。さらに、その PER-PCR により生成される DNA 断片をプローブに、サザンブロットにより対象菌株を検出できることが、現場実験により示されている⁷⁾。これらの結果から、PER-PCR により生成される DNA 断片の塩基配列はその菌株に非常に特異的であると予想でき、その塩基配列を利用してプライマーをデザイン、PCR を行えば対象菌株を PCR により検出できると推測できる。本研究では、その仮定に基づいて実験を進めたが、得られた結果から、これらの推論が妥当であることが示された。

PCR により特定の分解能を有する細菌を検出しようとする場合、分解遺伝子を標的にすることが一般的な方法である。しかしながら、そのためには、あらかじめ分解遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した後、すでに報告されている分解遺伝子と塩基配列を比較し、プローブを作成することになる。一方、REP-PCR ではこの様な特定の遺伝子の取得、および他の遺伝子との比較を行う必要がなく、簡便である。さらに、分解遺伝子などの情報が全くない場合にも利用が可能である。

また、本研究では、SYBR-Green 法のように一組のプライマーのみを利用し、すべての PCR 合成 DNA を検出する方法では、特異的な検出は非常に難しいということも明らかになった。SYBR-Green 法では最終的に Melting curve を出し (Table 2)、合成された DNA 断片が目的のものであるか否かを検討することができる。しかしながら、あくまでも確認作業であり、その後正確な数値を出すことはできない。このように、

間違った値をそのまま使用することはないものの、問題への根本的な解決にはならない。そこで、さらに特異性を高める Hybridization-Probe 法のような手法が不可欠となる。一般的に、PCR 合成 DNA が目的のものであるか否かを確認する方法としては、合成 DNA に対してハイブリダイゼーションを行う⁷⁾が、その操作は煩雑であり、時間を要する。PCR 反応とその合成 DNA の特異性を一度に調べることができる Hybridization-Probe 法は、短時間で多数のサンプルを処理できる点で実用的である。

標的細菌を、より正確に計測する方法としては、Fluorescent in situ hybridization (FISH)法があり、数多くの研究例がある。しかしながら、本研究のように約 2×10^5 cells/mL の全菌数が存在する地下水中で、 2.1×10^1 cell/mL (本研究での検出限界) レベルの細菌を検出しようとした場合、その割合は約 1/10000 となり、FISH 法の顕微鏡による直接観察では、それらを正確に計測することは、原理的に不可能に近い。それゆえ、Hybridization-Probe 法のように、PCR に基づいた検出法は、存在割合の非常に低い微生物を検出する場合に有効な手段となる。

以上のように、本研究の REP-PCR 断片を標的とした Hybridization-Probe 法は、現場で特定微生物の挙動を高感度把握する上で非常に有効な方法であることが明らかとなった。今回のバイオオーギュメンテーションでは、この新手法により、実際の地下水に注入された約 10^9 cells/mL の細菌が、 10^2 cells/mL レベルまでは速やかに減少することを、現場で初めて明らかにでき、その意義は大きい。この残存レベルが高いか否かは、さらに議論の必要があるが、少なくとも 21 cells/mL の検出限界を有する検出法の利用に目処がついたことにより、今後バイオオーギュメンテーションを管理可能なプロセスとして、さらに発展させていけるものと期待したい。

*本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)により委託を受けた「土壌浄化プロジェクト」の一環として地球環境産業技術研究機構(RITE)により実施したものである。

(参考文献)

- 1) Tsien, H.C., G.A. Brusseau, R.S. Hanson, and L.P. Wackett. 1989. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 55, p. 3155-3161.
- 2) Winter, R.B., K.-M. Yen, and B.D. Ensley. 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. Bio/Technology, Vol. 7, p. 282-285.
- 3) Wackett, L.P., and D.T. Gibson. 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 54, p. 1703-1708.
- 4) 中村寛治, 宮地有正. 1992. Phenol Hydroxylase 遺伝子を導入した組換え微生物によるトリクロロエチレンの分解. 環境工学研究論文集, Vol. 29, p. 17-27.
- 5) Fujita, M., M. Ike, J. Hioki, K. Kataoka, and M. Takeo. 1995. Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. J. Ferment. Bioeng., Vol. 79, p. 100-106.
- 6) 中村寛治, 鈴木義彦, 石田浩昭. 1999. フェノールによるトリクロロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の解析. 環境工学研究論文集, Vol. 36, p. 1-10.
- 7) Matheson, V.G., J. Munakata-Marr, G.D. Hopkins, P.L. McCarty, J.M. Tiedje, and L.J. Forney. 1997. A novel means to develop strains-specific DNA probes for detecting bacteria in the environment. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 63, p. 2863-2869.
- 8) Picard, C., C. Ponsonnet, E. Paget, X. Nesme, and P. Simonet. 1992. Detection and enumeration of

- bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. Appl.Environ.Microbiol., Vol.58, p.2717-2722.
- 9) Recorbet, G., C. Picard, P. Normand, and P. Simonet. 1993. Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. Vol.59, p.4289-4294.
- 10) Lee, S.-Y., J. Bollinger, D. Bezdicek, and A. Ogram. Estimation of abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. Appl.Environ.Microbiol., Vol.62, p.3787-3793.
- 11) 渋谷勝利, 岡村和夫. 2000. トリクロロエチレンを対象としたバイオオーグメンテーション利用微生物の特性について. 環境技術, Vol.29, p.380-385.
- 12) de Bruijn, F., J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 58, p.2180-2187.