

環境サンプルからの微生物同定に関する簡易手法の検討

奥村 裕、黒川 忠英、坂見 知子、齊藤憲治((独)水研セ・東北水研)、
鈴木敏之((独)水研セ・中央水研)、 神山孝史((独)水研セ・瀬戸内水研)

はじめに

近年、船舶のバラスト水や、水産生物の移動により、バラスト水中や生物に付着した微生物が他地域へ移動し、生物多様性を攪乱することが問題となっている。天然環境中の微生物は9割以上が培養困難とされるため、その群集解析は、培養を用いず、微生物の遺伝子を環境から直接取り出し解析するメタゲノム解析により行われることが多い。メタゲノム解析では、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法による微生物遺伝子の増幅が重要となるが、環境サンプル中には腐植酸や、植物色素、タンパク、多糖類など、PCRを阻害する夾雑物が多く含まれるため、煩雑な精製処理をくり返し行わなければならない場合が多く、ボトルネックとなることが多い。

また、植物プランクトン群集の解析では、顕微鏡による同定は熟練と時間を要するため、分類群に固有な植物色素の組成や濃度をHPLC(高速液体クロマトグラフィー)により分析し、解析ソフトにより分類群ごとに群集組成を把握する方法が一般的に行われる。しかし、ソフトのインストールや使用方法などもかならずしも簡単ではなく、色素分析後の解析が問題となることが多い。

そこで今回、底泥、海水試料から煩雑な精製処理を繰り返さずにPCRを行う方法について、陸上土壌の分析法を参考に、PCR反応の阻害を中和する試薬であるアンブダイレクトを用いたPCR法について検討を行った。また、HPLCによる色素分析の結果は、環境汚染物質の発生起源を推定する際に利用するCMB(ケミカル・マス・バランス)法を用いた解析方法について検討を行ったので報告する。

実験方法

底泥は2008年4月25日に松島湾櫃ヶ浦(ひつぎがうら)干潟より、海水は5月12日に東北区水産研究所地先の松島湾、および2007年5月に石巻湾より採取した。

底泥は、アンブダイレクトを用いた陸上土壌の分析法を参考に、底泥500mgに溶解液(Tris・HCl pH8.0 20mM, EDTA 5mM, SDS 0.3%, Proteinase K 200 μ g/ml)1mlを加えボルテックス後、55℃1時間、95℃5分加熱し、10000g、10分遠心後、上清を希釈しPCRの鋳型とした。

海水は500mlずつ5回、目合い0.45 μ mのセルロースメンブランフィルターでろ過し、各フィルターについてそれぞれ以下の処理を行った。1)溶解液1mlを加えボルテックス後、55℃1時間、95℃5分加熱、フィルター除去後、10000g \times 10分遠心、上清を数段階に希釈し鋳型とした。この処理に加え2)ガラスビーズでボルテックスを行った。3)イソプロパノール沈殿を行った。4)フェノールクロロフォルム抽出(抽出の際はフィルターを除去せず)、イソプロパノール沈殿を行った。5)フィルターを除去して4)の処理を行った。

PCRで使用したプライマーは、1)バクテリアや葉緑体の16SrRNAをコードする遺伝子を増幅できる既知のプライマー(F357; CCT ACG GGA GGC AGC AG と、R907; CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT)、2)プライマー設計ソフトのprimer3により得た真核生物の18SrRNAをコードする遺伝子を増幅できるプライマー(FM664; CYG CGG TAA TTC CAG CTC と、RM1540; TTY CTT TAA GTT TCA GCC TTG C)、3)植物プランクトンのPsbA(葉緑体の光化学系D1タンパクの反応中心をコードする)遺伝子を増幅できるプライマー(PsbAF745; TTC GGT CAA GAA GAA GAG ACT TA と、PsbAR1010; TTC GTG CAT TAC TTC CAT ACC)の3ペアとした。

PCRの反応条件は95℃10分→(94℃30秒→55℃1分→72℃1分)(40サイクル)→72℃7分とした。PCRは反応液にアンブダイレクトを使用した場合と使用しない場合で行い、PCR産物は電気泳動によりバンドの有無を確認した。

また、植物プランクトン色素を基にした群集組成の解析は、CMB法を用いて以下の手順で行った。1)既知の分析方法に従い海水試料からHPLCを用いた色素分析を行い、色素ごとに濃度を測定した。2)得られた色素濃度値をエクセルアドインソフトのCMB8.2J(フリーソフト)に代入した。3)文献データを基に、分類群ごとの色素組成をCMB8.2Jに代入した。4)CMB8.2J上でマクロを実行した。

結果と考察

底泥試料からのPCRは、反応液にアンブダイレクトを用いた場合、どのDNA断片も良好な増幅が確認された。一方、反応液にアンブダイレクトを用いない通常のPCRではDNA断片の増幅が確認されなかった。同様に、海水試料についても、精製の有無にかかわらず、アンブダイレクトを反応液に用いた場合、どのDNA断片も良好な増幅が確認された。精製処理をせずに種々の試料からアンブダイレクトを用いたPCRの実施例が報告されているが、今回、底泥や海水試料からも精製処理なしにPCRが可能であることがわかり、ハイスループットな解析を行う際に有効と考えられた。

CMBによる解析の結果、各色素濃度(実測値)と計算による推定濃度は統計的にもよく一致していた($\chi^2=0.62$, $R^2=0.99$, percent mass values=101.6%)。また、CMB法により得られた海水中の群集組成は珪藻(65%)>ブラシノ藻(11%)>クリプト藻(8%)>ハプト藻(6%)>ペラゴ藻(5%)>渦鞭毛藻(5%)と推定され、過去の知見との比較からも妥当と推察された。以上より、CMB法を用いても色素によるプランクトン群集組成の推定が可能と考えられた。