

高効率・高成功率PCR酵素『KOD FX Neo』を用いた環境・生態系サンプルからの簡便な検出法

県立広島大学 生命環境学部 有馬 寿英 先生・西村 和之 先生
東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 小林 哲大・歌島 悠

はじめに

環境微生物学、そしてその産業利用に向けては、環境・生態系サンプルは様々な側面において重要であるとともに、その研究対象の一つであります。そこに生息する微生物の生態・機能などに関する科学的知見の蓄積は、環境微生物学を支える個別技術素材を提供するためには必要不可欠です。しかし、その重要性及び可能性は認識されながら、その全体像を知ることは非常に困難であります。

従来の微生物検出・同定は、希釈平板法などによりそのコロニーに関する形状・色、そして資化性などの特徴を観察することにより行われてきました。しかしながら、従来法ではその結果が得られるまでには数日～数週間を要する上、難培養性微生物のその検出は極めて困難であると言われていました。近年、PCR法を利用することによって、微生物における特定DNA領域を増幅、そしてそのサイズや塩基配列情報などにより検出・同定が可能になるとともに、新規性の高い遺伝子群(酵素遺伝子など)を含む未開拓遺伝子資源としての利活用を行うことも期待されています。

そこで今回は、『KOD FX Neo』と簡便な前処理を組み合わせることによって、環境・生態系サンプルからDNAを精製することなく、そのPCR増幅を行うことを試みました。以下にその方法、及び結果をご紹介します。

方 法

1. 前処理

環境・生態系サンプルは、本学部のある庄原キャンパス周辺の雑木林から腐朽材と腐葉土を採取し、その一部をサンプルとしました。そして、図1に示すアルカリ溶解法にてそのライセートを調製しました。なお、本溶解法ではサンプルは完全に溶解しませんので、ご注意ください(完全に溶解させる必要はありません)。また、必要に応じて、滅菌水による希釈を行いました。

2. PCR反応

PCR反応は、(1)で調製したライセート1 μ lを直接PCR反応液に添加し、以下の条件にて実施しました。

①反応液組成

PCR grade water	10 μ l
2x PCR buffer for KOD FX Neo	25 μ l
2mM dNTPs	10 μ l
10pmol / μ l Primer #1	1.5 μ l
10pmol / μ l Primer #2	1.5 μ l
前処理ライセート	1 μ l
KOD FX Neo (1.0U/ μ l)	1 μ l
Total reaction volume	50 μ l

Target 1: 16S ribosomal RNA (bacteria)

Primer #1: GTTTGATCCTGGCTCA

Primer #2: TACCAGGGTATCTAATCC

Target 2: ITS (fungi)

Primer #1: GTAACAAGGTYTCCGT

Primer #2: CGTTCTTCATCGATG

Target 3: tRNA-Leu (plant)

Primer #1: CGGACGAGAATAAAGATAGAGT

Primer #2: TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA

環境・生態系サンプル 100mg

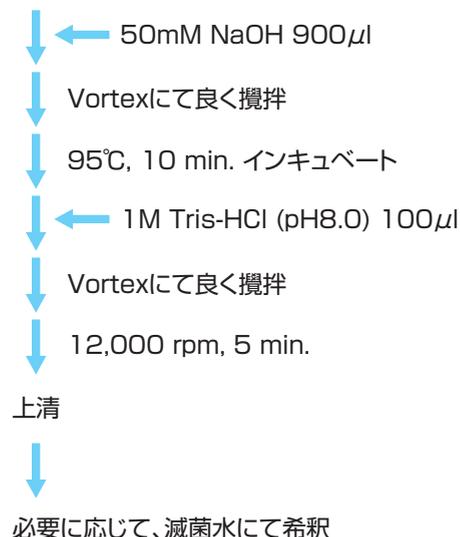


図1. ライセート調製方法
(アルカリ溶解法)

②PCRサイクル

94℃ 2 min.
↓
98℃ 10 sec. ←
X℃ Y sec. 30~50 cycles
68℃ Z sec.

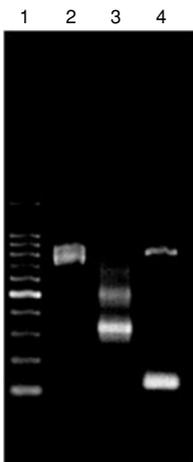
Target 1: X; 55℃, Y; 30 sec., Z; 60 sec., 30 cycle
Target 2: X; 50℃, Y; 5 sec., Z; 10 sec., 50 cycle
Target 3: X; 60℃, Y; 10 sec., Z; 10 sec., 50 cycle

図2. PCRサイクル

結果及び考察

PCR産物は、1.5%アガロースゲルに5µlアプライして解析を行いました。その結果、何れのサンプル・プライマーを用いた場合でも、明瞭なその増幅を確認することができました（図3、4）。さらに、Target 2 (ITS (fungi)) においては、そのPCR産物をクローニング、そしてシーケンス解析などを行った結果、使用したサンプルには木材腐朽菌である*Perenniporia subacida* (腐朽材)、森林環境下において生息することが知られている*Russula*属 (腐葉土) などとともに、data baseに登録されていない塩基配列が幾つか確認できたため、未同定株が存在している可能性があることも明らかになりました（図3、4）。これらの結果より、それぞれの環境下において適応可能な微生物が生息し、その異なる微生物叢を構成していることが示唆されます。特に、未同定株のその存在は、未開拓遺伝子資源を利活用するためのその候補の一つになると考えられます。

今回、KOD FX Neoを用いることにより、DNA抽出過程におけるそのバイアスをより少なくした簡便な前処理によって得られるDNAを鋳型としてPCR法による増幅が可能でした。そして、KOD FX NeoはTaq DNA polymeraseの約11倍の正確性を有していることから、PCRエラーによる誤判定の減少が期待され、今回のような塩基配列解析を基本とした環境・生態系サンプルにおける微生物の分類・同定などには適していると思われる。このことは、環境微生物学とその関連研究分野などでの遺伝子レベルの研究において、その適応が可能であると考えられます。



1: 100bp DNA ladder
2: Target 1 (bacteria)
3: Target 2 (fungi)
4: Target 3 (plant)

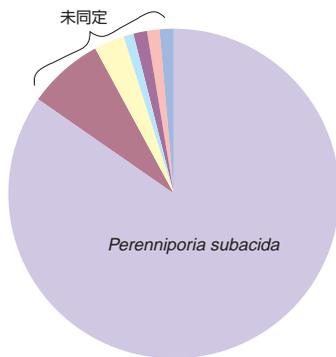
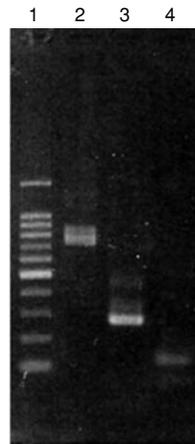


図3. 泳動結果と微生物叢 (腐朽材)



1: 100bp DNA ladder
2: Target 1 (bacteria)
3: Target 2 (fungi)
4: Target 3 (plant)

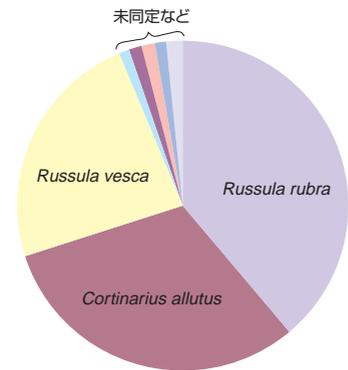


図4. 泳動結果と微生物叢 (腐葉土)

まとめ

DNA抽出に関する従来法は時間と労力などを必要とし、さらには有害なタンパク質変性剤を用いる機会があるため、多数のサンプルを処理することは困難と危険を伴う上、実験廃液処理に関するコストも必要となります。一方、図1に示した前処理は、特別な機器類や有害試薬を使用することなく、環境・生態系サンプルからPCR法において使用可能なゲノムDNAを簡便・迅速に抽出できる手法であり、KOD FX Neoと組み合わせることによって、クルードサンプルからの遺伝子増幅を実現することができます。

➔ KOD FX Neoに関する商品情報は、本誌p3をご覧ください。