

## <研究発表>

# ITS領域をプローブとしたPCE分解菌等検出用DNAマイクロアレイの作製

Detection of PCE-degrading bacteria from environment using ITS-based DNAmicroarray

中原大輔、Randolph Scott Jr.、高見澤一裕

岐阜大学 応用生物科学部 生物反応工学講座 環境微生物学研究室

Daisuke Nakahara, Randolph Scott Jr., Kazuhiro Takamizawa

Gifu University Faculty of Applied Biological Science Environment Microbial Engineering and Technology

Key Word: Bioremediation, PCE, *cis*-DCE, DNA Microarray,

### 1. 要約

バイオレメディエーションを行うにあたって環境汚染物質分解菌を検出できれば、その汚染サイトに環境汚染物質分解菌を活性化させるための適切な栄養を添加することによってバイオレメディエーションの一つであるバイオステミュレーションが可能になるために有用であると考えられる。

当研究室によって開発されたDNAマイクロアレイは実際のサンプルからPCE分解菌を検出、定量することができる。16S-23S rDNA間ITS領域を用いて6つの条件を基にプローブを設計することで、種レベルで識別して検出することに成功している。これらのプローブを持つDNAマイクロアレイは競合ハイブリダイゼーションを行うことで、間違っただハイブリダイゼーション(クロスハイブリダイゼーション)を避けて特異的に目的の菌株を検出できることが示唆された。また、新たに設計したPCE、*cis*-DCE、ノニルフェノール分解菌を含む5菌株のプローブも特異的に目的の菌株を検出できることが示唆された。

### 2. 実験材料及び方法

使用したPCE、*cis*-DCE分解菌は*Clostridium bifermentans* DPH-1、*Desulfitobacterium* sp. strain Y51、*Clostridium* sp. strain KYT-1、*Clostridium* sp. strain DC1、の4菌株である。それぞれのPCE、*cis*-DCE分解菌の分解物質および分解産物をTable 1にまとめた。またノニルフェノール分解菌である*Pseudomonas veronii* INA06株も使用した。

Table 1. PCE、*cis*-DCE分解菌の分解物質と分解産物

菌名	分解物質	分解産物
<i>Clostridium bifermentans</i> DPH-1	PCE	<i>cis</i> -DCE
<i>Desulfitobacterium</i> sp. strain Y51	PCE	<i>cis</i> -DCE
<i>Clostridium</i> sp. strain KYT-1	<i>cis</i> -DCE	ethene, CO <sub>2</sub> *
<i>Clostridium</i> sp. strain DC1	<i>cis</i> -DCE	ethene, CO <sub>2</sub>

#### \*現在解明中

各菌株のゲノムDNAを抽出し、63F primerとLDBact 132R primerを用いて16S-23S rDNA間ITS領域をPCR法を用いて増幅した。その後これらPCR産物のクローニングを行い、ITS領域のシークエンスを行った。シークエンスによって得られたITS領域から最適なプローブを設計するために以下の条件を基準にした。

- すべてのプローブは長さが40 merでNearest-Neighbor Methodにより計算されたTm値が85~105°Cであること
- 同じ塩基またはA+T、G+Cが連続して5つ以上並んでいないこと
- プローブが自己プライミングしないこと
- 特異的に目的の菌を検出するため、BLASTにかけたとき他の4菌株や異なる菌と相同性がないもの
- プローブ同士の配列が重複していないこと

- ITS 配列のアンチセンス 5'末端にプローブが位置しないものを選択した

以上の条件を基に1菌株に対して5つプローブを設計した。また、各プローブの5'末端にアミノ基を修飾した。それぞれのプローブは *C. bifermentans* DPH-1 を DPH、*D. sp. strain* Y51 を Y51、*C. sp. strain* KYT-1 を KYT、*C. sp. strain* DC1 を DC1、*P. veronii* INA06 を INA06 と命名した。設計したプローブを 50 μM の濃度で TAKARA-Hubble スライドガラス (TAKARA) にスポットして DNA マイクロアレイを作製した。作製した DNA マイクロアレイを評価するために競合ハイブリダイゼーションを行った (65°C、4 時間)。競合ハイブリダイゼーション後のスライドガラスを洗浄し、完全に乾燥させた。その後、スライドガラスはスキャナー (GTMAS Scan II、Nippon Laser & Electronics. LAB) を用いて目的サンプルの Cy3 とリファレンスサンプルの Cy5 の蛍光シグナルを検出した。その後、ソフト Array Pro Analyzer (Media Cybernetics) を用いて蛍光強度比 (Cy3/Cy5) を算出した。

### 3. 実験結果及び考察

当研究室では、すでに PCE 分解菌を検出するための DNA マイクロアレイが設計されている。この DNA マイクロアレイを用いて、PCE 分解菌の検出と定量を行った結果を Fig. 1 に示した。ここでは、汚染されていない箇所の地下水と土壌をコントロールとし、汚染地下水の上流部と下流部の中間地点に栄養源(トルツメル)を注入している。それぞれ汚染地下水の上流と下流の土壌サンプルと地下水サンプルを DNA マイクロアレイに供した。菌株 A~P はそれぞれ PCE、cis-DCE 分解菌である。Q は PCE から直接 ethene まで脱塩素化できる唯一の菌株である。Fig. 1 の結果から、栄養源を添加することによって水サンプルでは A、G、M の菌株が、土壌サンプルでは A、G、J、M の菌株が非常によく増殖されたことがわかる。

この DNA マイクロアレイに今回使用した 5 菌株を特異的に検出できるプローブを追加するために、*C. bifermentans* DPH-1 を目的サンプルとして競合ハイブリダイゼーションを行った結果を Fig. 2 に示した。特異的に DPH-1 のプローブだけが競合してハイブリダイズしていることを示す黄色のシグナルを与えた。DPH-1 プローブ以外は Cy5 標識してあるリファレンスサンプルだけがハイブリダイズしていることを示す赤色のシグナルが観察された。また、これらのシグナル値のスカッタープロットから蛍光強度比を算出したところ、各プローブは目的菌に対してだけ特異的に高い蛍光強度比を示した。これらの結果から目的サンプルでない場合はリファレンスサンプルによってブロッキングされることにより特異的に目的の菌株を検出できることが示唆された。

地下水中の PCE 分解菌の DNA マイクロアレイ分析

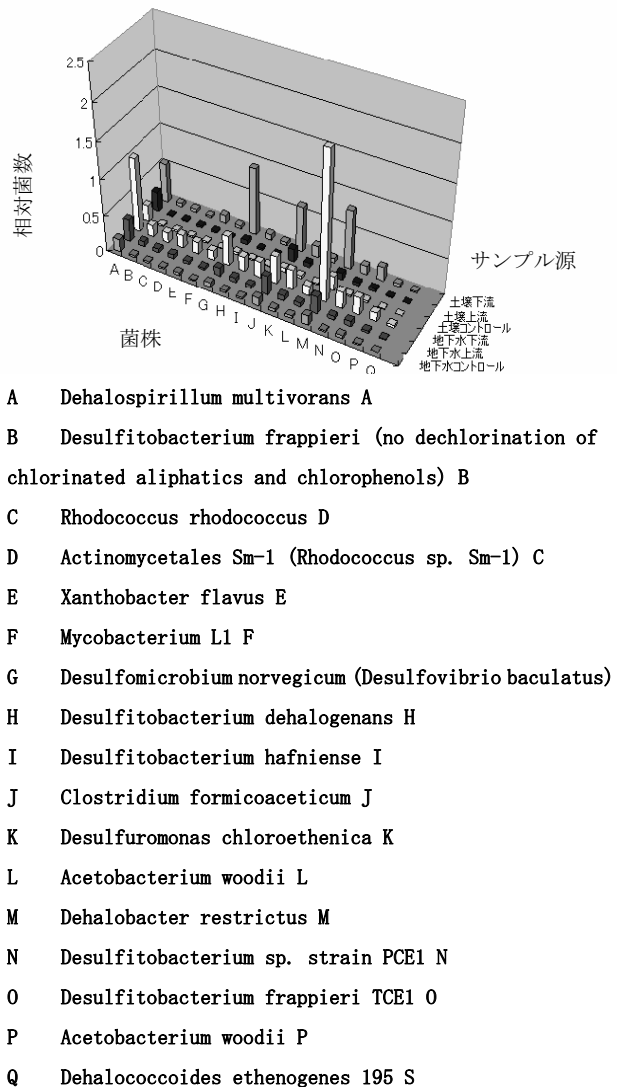
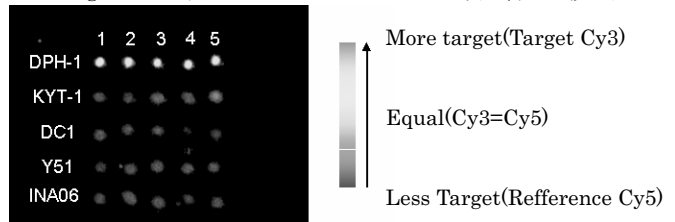


Fig. 1 実際のサンプルからの PCE 分解菌の検出



- DPH①-⑤: *C. bifermentans* DPH-1 のプローブ
- KYT①-⑤: *C. sp. strain* KYT-1 のプローブ
- DC1①-⑤: *C. sp. strain* DC1 のプローブ
- Y51①-⑤: *D. sp. strain* Y51 のプローブ
- INA06①-⑤: *P. veronii* INA06 のプローブ

Fig. 2 目的サンプル *C. bifermentans* DPH-1