

教育 GP : 環境技術者育成を目的とした遺伝子解析セミナー — ゴミ固形燃料の微生物相解析

小原裕治¹ 西山正晃² 高見徹³ 山田健太郎⁴ 小西忠司⁵

¹機械工学科, ²都市システム工学科, ³都市システム工学科, ⁴大分大学, ⁵機械工学科

ゴミ固形燃料—Refuse Derived Fuel(以下RDF)とはJIS Z 7302で、廃棄物を原料として、圧縮成型、押し出し成形などによって固形化した燃料とされているリサイクル燃料である。RDFを貯蔵するサイロでは火災や爆発事故が度々発生しており、事故の原因の1つとしてRDFに生息している微生物による生物学的発熱や水素などの可燃ガスの発生が挙げられている¹⁾。本セミナーではRDFに生息する微生物のDNAを抽出し、Polymerase Chain Reaction法(以下PCR法と言う)で16S リボソームDNAを増幅、その後クローニングを経て微生物のDNAの塩基配列を決定した。その後データベースに公開された微生物のDNAの塩基配列情報と比較することでRDFに生息する微生物の同定を行った。

キーワード： 火災, RDF, 微生物相解析

1. 緒言

国内でのRDF貯蔵サイロの事故は2003年8月に三重県桑名市で火災爆発事故が、同年9月に福岡県大牟田市で火災事故が、さらに同年10月に石川県羽咋郡で燻焼事故が発生している。このうち三重県桑名市のRDF貯蔵サイロの火災爆発事故では死者2人、負傷者5人という悲惨な結果を招いた。火災に至る過程は、生物学的発熱により室温近傍から80℃までRDFの昇温が開始し、温度上昇に伴い酸化反応等によりRDFの昇温が継続。100℃近傍で生物学的発熱が終息した後、酸化反応等でさらにRDFが昇温していき着火に至ったと推定されている²⁾。Fig.1には三重県多度町RDF貯蔵サイロで使用されていたものと同等のRDFの写真を示す。

今回のセミナーではRDFに存在する微生物のDNAを解析することで微生物を同定することが目的である。

最初のステップとして、RDFに生息する微生物のDNAを抽出し、PCR法で16S リボソームDNAを増幅する。PCR法とは2本鎖DNAの加熱すると2本の1本鎖DNAになり冷却すると相補的な塩基が結びつき再び1本の2本鎖DNAになる特性を利用しており、DNAの増幅範囲を決定する役割をもつプライマー、DNA合成酵素の一種であるTaq Polymeraseを加えた後PCRサイクルを繰り返し行い変性、アニーリング、伸長の3行程からなるDNA合成反応をさせることでDNAを増幅する手法である。また、16S リボソームDNAとは16S リボソームRNAをコードしたDNAで約1600塩基対からなる。16S リボソームDNAを選択して増幅するのは、塩基配列から系統樹を作成するために十分な

情報量を持つ、全生物に共通する塩基配列を持つと同時に種に固有な塩基配列も持つ、保存性が高いというような特性があるためである。

第2のステップとして、16S リボソームDNAを増幅したのちクローニングを経て微生物のDNAの塩基配列を決定する。クローニングではPCR法で増幅された16S リボソームDNAは多数の微生物の16S リボソームDNAが混合しているため、クローニング過程で微生物1種ごとの16S リボソームDNAを得る。クローニングはライゲーション、形質転換、コロニーダイレクトPCRの3つの工程に分けられる。ライゲーションとは制限酵素でベクターと呼ばれる環状DNAの一部を切断し、ベクター切断部に任意のDNAを組み込んだ後、リガーゼと呼ばれる酵素でベクターと任意のDNAを固定することである。その後DNAを取り込み得る能力を持つコンピテントセルと呼ばれる細胞にライゲーションしたベクターを取り込ませる。形質転換とは抗性物質耐性など本来持たない形質を持つようになることである³⁾。コンピテントセルにはCa処理した大腸菌が多く用いられている。コロニーダイレクトPCRではコンピテントセルにコロニーを形成させコンピテントセルが外来のDNAを取り込んでいるか否かを調べた上で、コンピテントセルに取り込まれている外来DNAをPCR法で増幅する。今回はベクター切断部にPCR法で増幅した16S リボソームDNAを固定することで、微生物1種ごとの16S リボソームDNAを得る。

最後のステップとしてデータベースに公開された微生物のDNAの塩基配列情報と比較することでRDFに生息する微生物を相解析する。



Fig.1 Photograph of RDF

2. RDFに含まれる微生物と真菌のDNA抽出

RDFを蒸留水100mlで懸濁し、80 μ mのプレフィルター(Millipore社, AP2504700)でろ過した標準サンプル、標準サンプルにLB基礎培地を加えて37 $^{\circ}$ Cで好気培養した好気サンプル、同様に嫌気培養した嫌気サンプルの3種類とした。サンプルからのDNA抽出はZRFungal/Bacterial DNA Kit (ZYMO RESEARCH)を使用し、各サンプルから100 μ lのDNAを抽出した。抽出手順は同キット添付のプロトコールに従った。

3. PCR法による16S リボソームDNAの増幅

(1) PCR用MasterMixの作製

1.5mlのマイクロチューブ(以下MasterMixチューブと言う)にDNase-RNase-Free水(インビトロジェン社, 10977-015)を147 μ l注入する。10 \times Ex Taq Buffer(タカラバイオ社, RR001A)をスピンドウンした後、20 μ lを、MasterMixチューブへ注入し良く混合する。混合後、dNTP Mixture(タカラバイオ社, RR001A)を同様にスピンドウンし16 μ lをMasterMixチューブへ注入、混合する。次にプライマー16S-27F(greiner bio-one社),10uMをスピンドウンし4 μ lをMasterMixチューブへ注入し良く混合する。同様に16S-1492R(greiner bio-one社),10uMをスピンドウンした後4 μ lをMasterMixチューブへ注入し良く混合する。最後に冷凍庫からEx Taq(タカラバイオ社, RR001A)を取り出しEx Taq1 μ lをMasterMixチューブに注入し良く混合し192 μ lのMasterMixを作製した。

(2) PCR法による増幅16S リボソームDNAの増幅

PCR用チューブ(Axygen社, PCR-02-C)を4本用意し、それぞれにMasterMixを48 μ lずつ注入する。3本のPCR用チューブに3サンプルから抽出したDNAをそれぞれ2 μ lずつ注入する。残りのPCR用チューブ1本にはDNase-RNase-Free水を注入する。注入後はPCR用チューブの底部に気泡が付着していないことを確認し、PCRに設置しTable.1の条件で16SリボソームDNAを増幅する。

(3) 電気泳動による16S リボソームDNAの確認、回収

電気泳動はDNAが負に帯電している特性を利用している。TBE Bufferに浸したアガロースゲルにDNAとマーカーを注入後電流を流すことで、負に帯電しているDNAが一極側から+極側へと泳動する。このときアガロースゲルの作用により長い塩基対からなるDNAの泳動距離は短く、短い塩基対からなるDNAの泳動距離は長くなるためDNAの塩基長が判別される。従って約1600塩基対の16SリボソームDNAが増幅していることがわかる。

16SリボソームDNAを増幅後、4本のPCR用チューブから10 μ lずつDNAを取り、それぞれ96wellプレートに注入し、注入したDNAにローディングダイ(Biolabs社, N3200S)を2 μ lずつ注入、混合し各12 μ lとする。電気泳動装置(アドバンス社, Mupid-2plus)に使用済みTBE Bufferを加え、0.8%アガロースゲル(以下ゲルと言う)を設置する。設置後、ゲルのウェル部にローディングダイを混合したDNAを12 μ l注入し100Vで30分間電気泳動する。30分後、16SリボソームDNAが正しく増幅されていることを、UVトランスイルミネーター(UVP社, LM-20)で確認する。電気泳動の結果はFig.2に示す。濃い赤色バンド部に16SリボソームDNAがある。

確認後、TBE Bufferを未使用のものに取り替え確認時と同様に電気泳動をする。電気泳動後、バーナーで火炎滅菌したカッターでゲルの濃い赤色バンド部を1つずつ切り出しそれぞれ1.5mlのマイクロチューブへ入れる。切り出したゲルの質量を電子天秤で測定し、ゲル質量100 μ gにつき200 μ lの割合でNT3(日本ジェネティクス社, 740609-50)をゲルが入ったチューブへ注入する。注入後55 $^{\circ}$ Cに設定したブロックインキュベーター(アステック社, BI-525A)にチューブを設置しゲルを溶解する。溶解したゲルをそれぞれ回収チューブの上部へ移し、遠心分離機で12000r.p.m.で1分間遠心する。回収チューブの下部に分離された液体を捨て、回収チューブの上部に洗浄Bufferを600 μ l注入し、遠心分離機で12000r.p.m.で1分間遠心する。回収チューブ下部の液体を捨て、何も入れずにさらに遠心分離機で12000r.p.m.で2分間遠心する。回収チューブ下部を新しいチューブに取り替え、TE Bufferを15 μ l注入し1分間静置する。静置後、遠心分離機で12000r.p.m.で1分間遠心し16SリボソームDNAを回収する。

Table.1 PCR conditions I

1 cycle:	94 $^{\circ}$ C-2:00min
35 cycle:	94 $^{\circ}$ C-0:30min
	→ 55 $^{\circ}$ C-0:30min
	→ 72 $^{\circ}$ C-1:30min
1 cycle:	72 $^{\circ}$ C-5:00min
	4 $^{\circ}$ C- ∞

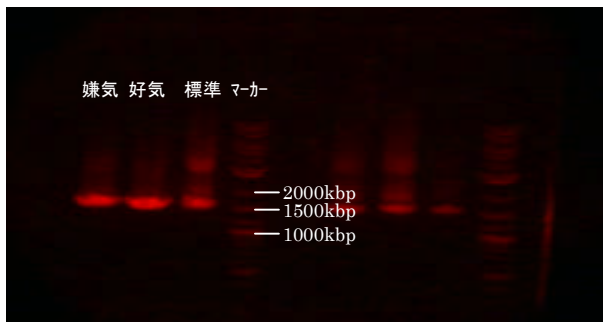


Fig.2 The result of Electrophoresis

4. クローニング

クローニングの概略図をFig.3に示す。今回のセミナーでは、標準サンプルから十分な量の16S リボソームDNAが回収できたため、バイアスのかかった好気サンプル、嫌気サンプルのクローニングは行わず、標準サンプルのみをクローニングした。

(1) ライゲーション

-80℃で冷凍保存された pT7 Blue T-Vector(ベクター) (タカラバイオ社, 69820-3)と Ligation Mix(リガーゼ) (タカラバイオ社, 6023)を取り出し、氷上におき解凍する。解凍後、遠心分離機でスピンドウンし、ライゲーション溶液用チューブへ回収した 16S リボソーム DNA の PCR 生成物を 4μl 注入する。次に pT7 Blue T-Vector を 1μl 注入し混合、続いて Ligation Mix を 5μl 注入し混合する。混合が終了したら 16℃に設定したブロックインキュベーターに 1 時間ライゲーション溶液用チューブを入れライゲーションする。

(2) 形質転換

-80℃で冷凍保存された SOC(タカラバイオ社, 69820-3)を取り出しチューブに 1ml ずつ分注する。-80℃で冷凍保存されたコンピテントセル(TOYOBO, DNA-903)を氷中で解凍する。解凍後、遠心分離機でスピンドウンしコンピテントセル 50μl をライゲーション溶液用チューブへ注入し混合する。混合後氷中に 5 分間静置し、その後 42℃に設定した恒温槽に 45~60 秒間浸すことでヒートショックを加え、その後 2 分間氷上に静置する。SOC1ml が入っているチューブに移し混合する。

(3) コロニーダイレクトPCR

SOCとコンピテントセルの混合溶液50mlをクリーンベンチ内で乾燥させたLB/Ampプレートに入れ、火炎滅菌したコンラージ棒でLB/Ampプレートに混合溶液をストリークする。その後別のLB/Ampプレートに混合溶液量を100mlを入れて同様にストリークする。全混合液をLB/Ampプレ

ートに接種し37℃インキュベーターで1晩静置する。

翌日、コロニーが形成されていることを確認した後、10×Ex Taq Buffer16μl, dNTPMix12.8μl, Primer, (M13rev,10mM)3.2μl, Primer(M13-40,10mM)3.2μl, EX Taq0.8μl, DNase-RNase-Free水124μlを混合し計160μlのPCR用MasterMixを作製する。作製後MasterMixをPCR用チューブ8本に20μlずつ注入し、各々にLB/Ampプレートに形成された白色コロニーからランダムに7つ選びそれぞれのサンプル名をD1~D7としてPCR用チューブ1本につき1つずつ注入し混合した。その後Table.2の条件で16S リボソームDNAを増幅する。

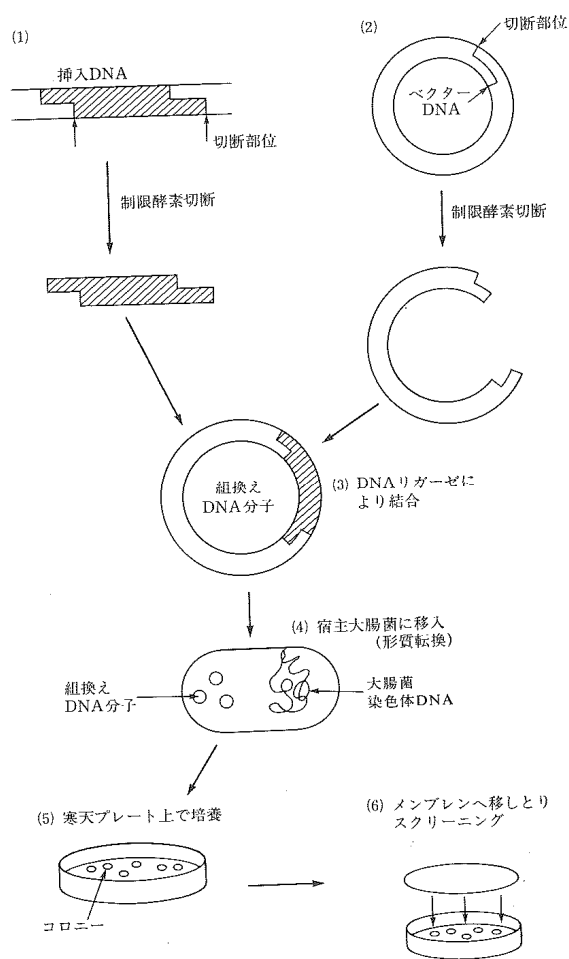


Fig.3 Cloning outline⁴⁾

Table.2 PCR conditions II

1 cycle:	94℃- 5:00min
30 cycle:	94℃- 0:30min
	→ 55℃- 0:30min
	→ 72℃- 1:30min
1 cycle:	72℃- 5:00min
	4℃-∞

5. RDFに含まれる細菌と真菌の同定結果

(1) 塩基配列決定

塩基配列決定法にはマクサム-ギルバート法やサンガー法などがある⁵⁾が今回の塩基配列決定は株式会社リバネスへ委託した。コロニーダイレクトPCR後溶液を精製し、新しい1.5mlマイクロチューブにDNase-RNase Free水を45 μ l注入し、チューブに精製した溶液を注入、混合して濃度調整をしたのち、D3~D7の5個のサンプルの塩基配列決定を株式会社リバネスに委託した。

(2) 類似塩基配列決定

塩基配列決定後に類似塩基配列の決定を行う。類似塩基配列決定はGENETYXソフトで行った。類似塩基配列決定を行った結果をTable.3に示す。

サンプル名ごとに類似度の高かった微生物が候補として挙げられており、coverageは比較対象となる塩基配列のうち何%の塩基配列と比較できたかを表す、またidentitiesは類似度の高さと、比較した塩基配列中いくつかの塩基が一致したかを、gapsは塩基配列中の塩基が切断されていた数を表している。

6. 結果

D3はcoverage, identitiesが共に高く塩基配列の違いも726個中6個と少ない。また候補の微生物も1種のみなためD3は*Paenibacillus graminis*と断定した。D4は塩基配列の違いが739個中約40個と多くgapsも10個あるため候補の微生物ではないとわかった。また候補の微生物が全て*Clostridium*属に属していることからD4は*Clostridium*属に属している新種の微生物と断定した。D5は塩基配列の違いとgapsも多いため候補の微生物ではないとわかった。また候補の微生物が全て*Brevibacillus*属に属していることからD5は*Brevibacillus*属に属する新種の微生物と断定した。D6はcoverage, identitiesが高く、塩基配列の違いも3, 4個と少ないが、どの候補も類似した結果を示しているため断定には至らず、D6は3候補のうちのどれかであろうと推測される。D7はcoverage, identitiesが高く塩基配列の違いも804個中1個と非常に少なく、候補の微生物も1種のみなため、D7は*Clostridium beijerinckii*と断定した。この*Clostridium beijerinckii*は水素を発生する水素産生菌である。

7. 結論

(1) RDFにはRDF貯蔵サイロの爆発原因の1つと考えられている水素を発生する微生物、*Clostridium beijerinckii*が存在していることがわかった。

(2) *Clostridium*属と*Brevibacillus*属の新種と思われる微生物の存在が明らかになった。

Table.3 BLAST result

D3: <i>Paenibacillus graminis</i> coverage 100%, identities 99% (720/726)
D4: <i>Clostridium beijerinckii</i> coverage 98%, identities 94% (698/739) gaps 10/739 <i>Clostridium roseum</i> coverage 98%, identities 94% (696/739) gaps 10/739 <i>Clostridium acetobutylicum</i> coverage 98%, identities 94% (696/739) gaps 10/739 <i>Clostridium diolis</i> coverage 98%, identities 94% (695/739) gaps 10/739
D5: <i>Brevibacillus reuszeri</i> coverage 96%, identities 90% (710/786) gaps 27/787 <i>Brevibacillus panacihumi</i> coverage 96%, identities 90% (708/785) gaps 25/785 <i>Brevibacillus brevis</i> coverage 96%, identities 89% (707/787) gaps 29/787
D6: <i>Clostridium puniceum</i> coverage 100%, identities 99% (737/740) <i>Clostridium favosporum</i> coverage 100%, identities 99% (737/740) <i>Clostridium corinoform</i> coverage 100%, identities 99% (736/740)
D7: <i>Clostridium beijerinckii</i> coverage 100%, identities 99% (803/804)

参考文献

- 1) 独立行政法人消防研究所, 消防研究所研究資料71号 RDF火災に関する調査研究報告書(平成15年度), pp.20, 2006.
- 2) 独立行政法人消防研究所, 消防研究所研究資料71号 RDF火災に関する調査研究報告書(平成15年度), pp.9, 2006.
- 3) 小野寺一清, 野沢明美, 海老原充, 組換えDNA実験ノート<基本操作編>, pp.127, 1991.
- 4) 小野寺一清, 野沢明美, 海老原充, 組換えDNA実験ノ

一ト<基本操作編>,pp.6,1991.

- 5) 小野寺一清, 海老原充, 野沢明美, 組換えDNA実験ノ
一ト<応用操作編>,pp.131,1995.