

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658067

研究課題名（和文） 多孔質鏟を用いたメタゲノミクス～環境影響評価からスクリーニングまで

研究課題名（英文） Metagenomics using porous arrowhead devices; from environmental assessment to screening

研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA TOSHIAKI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：80241777

研究成果の概要（和文）：

環境メタゲノミクスのツールとして、多孔質構造素材で作成した鏟を提案した。これに試料を染み込ませ、土壤に刺すことによって、各種化学物質の微生物叢への影響評価を、またスクリーニング対象を鏟に浸透させることによって、特定機能を持つ微生物の集積を試みた。その結果、鏟から対象物質を徐々に放出することによってその周辺に固有の微生物叢を生じさせることに成功した。さらに、鏟の間隔は 5cm 程度で十分であり、省スペース、かつ環境負荷の少ない実験が可能であることも明らかにした。今後、本手法のような安価かつ手軽なメタゲノム技術が開発されることを期待している。

研究成果の概要（英文）：

As a tool of environmental metagenomics, an arrowhead device made of porous material was suggested. Impacts against microbial flora of various chemical compounds were investigated by using this device. In addition, accumulation of microorganisms with specific function is tried by infiltrating a screening object into this device. As a result, I succeeded to produce specific microbial flora to the outskirts of this device by gradually releasing a target material from it. Furthermore, around 5cm was enough for the distance of the arrowhead to get good result. Thus this method is space-saving. This method must be a cheap, and simple metagenome technology in future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：環境微生物

## 1. 研究開始当初の背景

環境中から培養を介さず直接回収した DNA(メタゲノム)の解析技術の進展によって、これまで研究対象外であった難培養性の環境微生物へのアプローチが可能になった。しかし、この手法をバイオレメディエーション実施時の環境影響評価に用いるために必要なマイクロコズム構築法は、まだ発展途上の段階にある。さらに、本技術をメタゲノム

中からの有用遺伝子の取得(メタゲノムスクリーニング)に応用しようとする、膨大なライブラリーを対象とする必要がある。これを軽減するためには、目的の遺伝子を有する微生物の集積が効果的であることが以前より指摘されてきた。

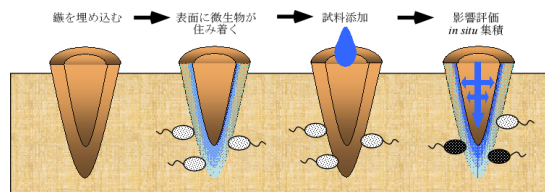
## 2. 研究の目的

本研究では、媒体として多孔質構造素材

(焼き締め土器)で作成した鏝(やじり)を提案する。この鏝に試料を染み込ませ、土壌に突き刺すことによって、土壌環境と同じ微生物叢を鏝表面に転写する(*in situ* マイクロコズム)機能と、種々の評価物質(環境汚染物質等)を鏝内部から表面へ徐々に浸透させる(徐放性担体)、の2つの機能を待たせる。これにより、*in situ*において各種化学物質の微生物叢への影響評価を、環境負荷を最小限にしつつ効率的に行う。また、スクリーニング対象を鏝に浸透させることによって、メタゲノムスクリーニングの問題点であった特定機能を持つ微生物の集積を *in situ*で行えるようになり、高価な機材を用いることなくスクリーニング効率を飛躍的に高めることを目的としている。

鏝の大きさは直径15mm、長さ50mm程の三角錐状で、内部は空洞になっている。この鏝は当初「素焼き」を用いたが、強度とDNA抽出効率に問題があったため、より高温の「焼き締め」という手法で製作している。これまでに、5回の大幅な改良を加え現在に至る。

以下に鏝の使用法とその原理を示す。なお、これまでの検討結果から、あらかじめ供試土壌を水に懸濁して鏝に染み込ませる処理を行うと、5-10日で表層の微生物叢が土壌と同じになることが見出されている。また、鏝内部にラードを染みこませ、土壌に突き刺し微生物叢の解析を行ったところ、無添加の鏝が土壌と同じ微生物叢を維持したのに対し、ラード添加鏝では数日で微生物叢に変化が現れ、10日目には特異的な微生物叢が構築された。一方土壌にラードを直接鋤込み、土壌の微生物叢を解析したところ、ラード添加鏝表層と同様に微生物叢の変化があったものの、その多様性は低く、かつ時間の経過とともに微生物叢は元に戻ってしまった。以上の結果より、鏝の有効性についての予備検討はほぼ終了している。そこで本研究ではこの鏝を用いて実際に各種資料を添加して環境影響評価及びメタゲノムスクリーニングを行い、その有効性を立証する。



### 3. 研究の方法

#### 1) 供試物質の鏝への添加方法の検討

本法では、内部に添加した試料が鏝表面へ浸透することによって鏝表面に連続的に供給される。そのためその浸透速度は極力一定に保たれる必要がある。そこで、鏝への効果的な試料添加方法を検討した。

これらについて、一定期間毎の鏝表面の供

試物質濃度をGC-MS またはLC-MSによって分析し、最適な添加方法・添加量を決定した。目標としては4週間程度一定濃度が維持できる条件を目指した。また、脂肪酸炭化水素分解(*Aik*)・芳香族炭化水素分解(*CI20, CI30*)遺伝子についてもPCR-DGGEにて解析を行った。

#### 2) 環境影響評価への応用(原油を用いた微生物叢影響評価)

試料として性質の異なる原油サンプル(重質油および軽質油:研究室保有)を用いて、原油の種類が微生物叢に与える影響の違いについて検討した。畑土壌に鏝を刺し、微生物叢の安定を待って各種原油を内部に添加した。一定期間ごとに鏝を取り出して、表層からDNAを抽出して16SrDNAを増幅し、定量PCR-T-RFLP法にて微生物叢の群集構造を定性的・定量的に解明し、汚染原油の種類と微生物叢への影響を比較した。

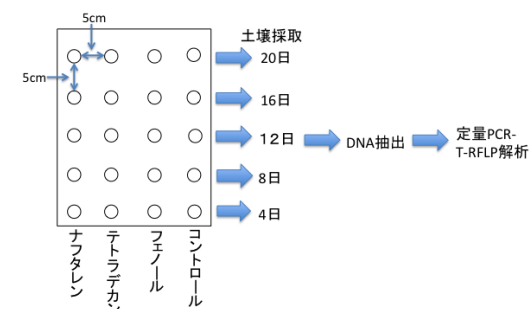
### 4. 研究成果

#### 1) 供試物質の鏝への添加方法の検討

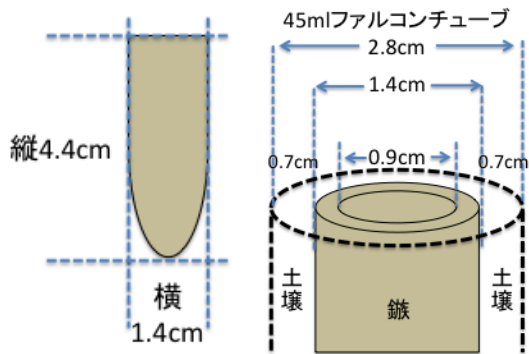
フタ付きタッパーに畑地土壌を充填し、マイクロコズムを作成した。畑地土壌からDNAが抽出できることはアガロース電気泳動によってバンドを確認した。鏝は各物質につき5本ずつ準備した。添加物質については以下に示す。

- ・テトラデカン 原液 2ml + 珪藻土 500mg
- ・フェノール原 2ml + 水 1ml + 珪藻土 750mg
- ・ナフタレン 500mg + ジエチルエーテル 500  $\mu$ l
- ・コントロール (無添加)

鏝の配置は下図に示した。これまでの検討結果では、鏝間の距離を5cm離すことでクロスコンタミを起こさないことが示されていたことから、本実験でも5cm間隔で鏝を埋設することとした。



埋設した鏝の周辺土壌を一定期間ごとに採取した。採取方法としては、底をくりぬいた50mlのディスポチューブを土壌に挿して、鏝を中心として周囲0.7cmまでの均一な距離の土壌を採取することとした。(次図)。



採取した土壌は 45ml ディスポチューブに入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。採取後は土壌 0.75g から DNA を抽出し、以降の実験に用いた。

次いで、鍬周辺の土壌で、添加物質の浸透に応じて分解遺伝子が集積しているか調べるために、定量 PCR を行った。

DNA 定量用外部標準サンプルとしては *AlkB*、*C120* の遺伝子配列を持つ *R. erythropolis* JCM2843 と *R. rhodochrous* NCIMB13259 を NB 培地に平板培養し、DNA を抽出した。抽出した DNA は PCR 増幅後、1.5%アガロースゲルで泳動し、262bp、280bp のバンドを切り出し精製した。精製後、DNA 濃度を  $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に希釈した。この時のコピー数を算出し、定量値から g soil あたりのコピー数を算出した。

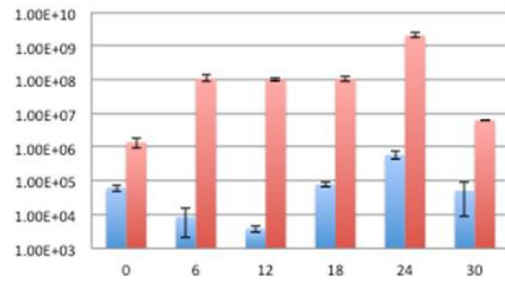
サンプルはテトラデカン、フェノール、ナフタレンを添加した鍬周辺土壌から 6、12、18、24、30 日後に抽出した DNA  $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  を使用した。定量 PCR には Light Cycler 1.5 を用いた。以下に *alkB*、*C120* 定量のためのプライマー配列を記載した。定量は各サンプル 2 連で行い、定量値と標準偏差を求めた。

alkB F	5'-GGCGAAAGCTTCTRKACVTT-3'
alkB R	5'-CCGTAGTGCTCGAKRTACTT-3'
C120 F	5'-GCGACCGTCGAHCTSTGGCA-3'
C120 R	5'-TCGCCCTCGAWGTWGAKCTG-3'

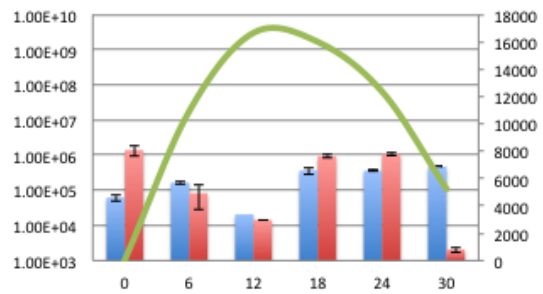
定量 PCR の結果を以下に示した。コントロールでは *alkB*(青)が  $10^4$ - $10^5$  オーダー、*C120*(赤)が  $10^6$ - $10^8$  オーダーで検出された。比較すると、テトラデカン、ナフタレンにおいて徐々に増加するものの *alkB* は変化がなく、*C120* はコントロールより低い値を示した。また、フェノールにおいては、*alkB* は検出されず、*C120* がコントロールより高い値を示した。

(青 : *alkB* 赤 : *C120* 折れ線 : 濃度)

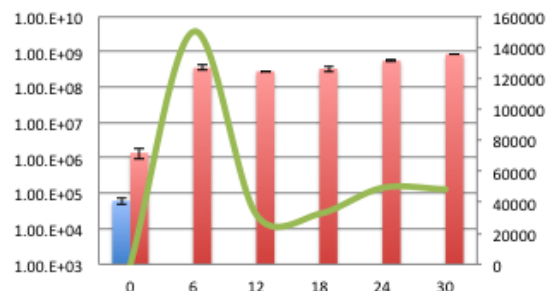
### コントロール



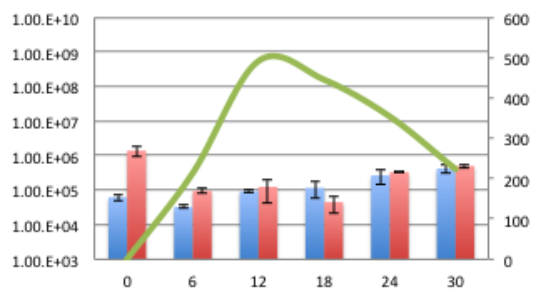
### テトラデカン



### フェノール



### ナフタレン



## 2) 環境影響評価への応用 (原油を用いた微生物叢影響評価)

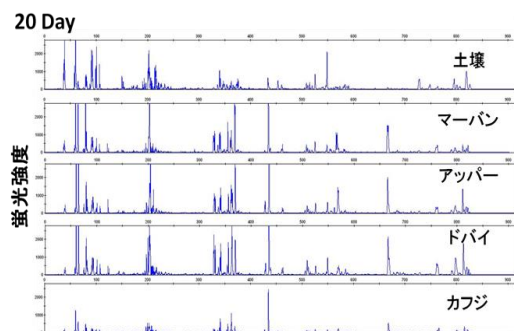
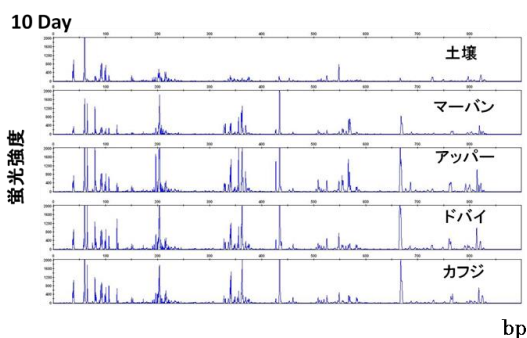
採掘油田、性質の異なる 4 種の原油を用いることとした。原油とは油田が採掘後、ガス、水分、異物などを大まかに除去したもの石油を指す。黒くて粘り気のある液体であり、さまざまな分子量の炭化水素の混合物が主成分である。他に硫黄、酸素、窒素を含む化合

物を少量含む。組成は炭素が 83-87%, 水素が 11-14%, 硫黄が 5%以下, その他の元素は 2%以下とされている。採掘産地により炭素と水素以外の組成は大きく異なる。本実験で使用した原油を下表に示す

原油の性質	採掘油田	原油比重	硫黄分
超軽質油	マーバン油田	45° API	0.62 %
軽質油	ザカム油田	34 ~ 37° API	1.5 ~ 2.0 %
中質油	ドバイ油田	31.7° API	1.93%
重質油	カフジ油田	28.5° API	2.7 %

土壌に鍬を 5cm 間隔で埋設し, 微生物が土壌と等しくなったと考えられた 24 時間後に各種原油を 800  $\mu$ l 添加した。10 日, 20 日後に回収し, T-RFLP 解析を行った。プライマーは真正細菌の 16srRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマー 10F および 907R を用いた。

T-RFLP プロファイルを下図に示す。T-RFLP プロファイルより, 0 日の段階で土壌中の微生物が原油に反応し, 微生物叢が変化した。20 日目においても 10 日目と同様の傾向を示した。



本研究では, 多孔質構造素材で作成した鍬に試料を染み込ませ, 土壌に刺すことによって, 各種化学物質の微生物叢への影響評価を, またスクリーニング対象を鍬に浸透させることによって, 特定機能を持つ微生物の集積を試みた。その結果, 鍬から対象物質を徐々に放出することによってその周辺に固有の微生物叢を生じさせることに成功した。さらに, 鍬の間隔は 5cm 程度で十分であり, 省スペース, かつ環境負荷の少ない実験が可能であることも明らかにした。

メタゲノム技術は環境微生物学の最先端であるが故に, その技術開発は高価な機器や大規模な研究組織, 機材を必要とする方向に向かいやすく, 本手法のような単純な手法には目が行かないきらいがある。しかし, この分野の発展のためにも, 若手や個人研究者が独創的な発想を手軽に実行に移せる環境が必要であるのではないか。今後, 本手法のような安価かつ手軽なメタゲノム技術が開発されることを期待している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 敏明 (NAKAJIMA TOSHIAKI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 80241777