

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 北川 航
2. 養成カリキュラム名： 特定微生物モニタリングのための検出マーカーと定量化技術の開発
3. 養成カリキュラムの達成状況

特定遺伝子の特異的検出を可能にする、遺伝子へのマーカー配列の導入手法を確立した。本手法を複数の遺伝子、複数の導入箇所、複数の導入配列について検討し、本手法が普遍的に用いる事が出来る、簡便で高効率であることを示した。さらに構築したマーカー導入遺伝子その酵素活性を維持しており、また狙い通り活性汚泥など環境サンプルから特異的に検出可能である事を示した。現在これらの安定性に付いて評価を行っているところであり、カリキュラムの達成状況はほぼ当初の予定通りであるといえる。

4. 成果

課題・目的

意図的もしくは非意図的に特定微生物が環境中に放出(導入)された場合(環境汚染物質を分解する微生物の導入など)、その微生物がどのような挙動を示すのかを把握するため、特異的に検出・追跡する必要がある。しかし環境中に多種多様な微生物が存在する中から、導入微生物をどのように特異的に検出・定量するかが問題になる。このような微生物の追跡には当該微生物株固有の遺伝子を用いて定量検出するのが望ましいと考えられるが、対象となる微生物株のどの遺伝子が他の微生物にはない固有の遺伝子かを検索するのは事実上不可能である。しかし人工的に導入微生物にその株特有のマーカーを付与できれば、特異的な検出・追跡が可能になると考えられ、そのマーカー付与に関わる技術が求められる。

また環境浄化などのためにある微生物を環境中に導入する場合、汚染物質分解遺伝子を意図的にプラスミドなどの核外遺伝子上に導入する場合は考えられる。しかし、プラスミドは接合伝達などによって他の微生物に転位する可能性がある。この場合、宿主自身と共に、組み換えたプラスミドを追跡しなければ、導入微生物の“遺伝子”を追跡することにはならない。また、分解遺伝子を意図的に染色体DNAに組み込んだ場合でも、やはりその遺伝子が他の微生物に伝播する可能性があり、染色体・プラスミドを個別に検出する技術が必要になる。

これらの課題の解決のため、

- 1) 遺伝子に特異的検出を行うためのマーカーを付与する手法の確立
 - 2) マーカー導入した遺伝子の特異的検出
- の上記2点についての研究を行った物を報告する。

1)-1 マーカー導入手法

環境に導入した組み換え体中の組み換え遺伝子の特異的に検出するためには、すでに環境中に存在する類似の遺伝子とは異なる特徴を持たせる(マーキングする)必要がある。対象とする遺伝子に任意のDNA配列をマーカーとして付加し、その配列をターゲットとしたPCRを行うことによって特異的検出が可能になるはずである。ここで目的遺伝子の酵素活性を損なうことなく、自然界には存在しないような配列をその遺伝子内に挿入する手法が必要である。特異的検出をするための配列(マーカー配列)とその導入法の開発にあたり以下の点を考慮した。i) PCRによる特異的検出を可能にするため最低数塩基以上の配列を導入する。ii) マーカー配列を導入した遺伝子の酵素活性が消失しないように挿入箇所、配列長を検討する。iii) マーカー配列導入法として簡便で汎用性の高い手法を構築する。以上を踏まえ、遺伝子DNAへのマーカー配列導入法について、一つの有用な手法を考案し以下のように試験した(手法の詳細については特許出願準備中ですので割愛させていただきます)。

1)-2 *tfdA* をモデル遺伝子としたマーカー配列導入試験

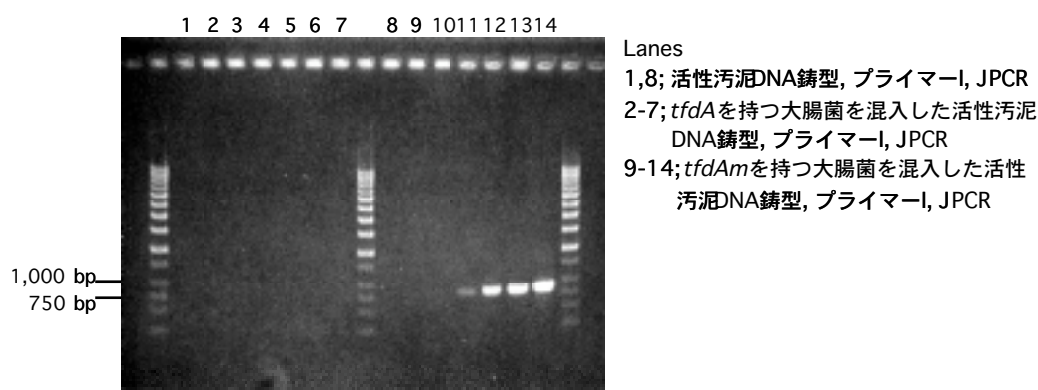
今回モデル遺伝子として、除草剤として使用されてきた2,4-Dの初発分解遺伝子である *tfdA* を用い、本手法によるマーカー配列の導入を試み、マーカー導入した変異型遺伝子、*tfdAm* を得た。

2) 環境サンプルからの *tfdAm* の検出

次に、実際の環境サンプルなどから特異的に *tfdAm* を検出することが可能であるかを確認するため、浄水場の活性汚泥からの検出を試みた。活性汚泥中には1mlあたり 10^8 - 10^9 の微生物が存在すると言われており、このような多種多様な微生物が存在する条件下でも特異的検出が可能であることは実際の応用に必須の条件であると考えられる。

tfdAm 遺伝子をプラスミド上に持つ大腸菌を活性汚泥に混入し、その状態で全DNAを抽出し鋳型として用い、上記のプライマーを用いてPCR検出を行った。結果を図1に示す。レーン2-7(*tfdA*)、9-14(*tfdAm*)は10mlの活性汚泥あたりそれぞれ 10^1 - 10^6 細胞の大腸菌を混入してDNAの抽出を行い、それぞれを鋳型にしてPCRを行っている(プライマーI, Jは導入のマーカー配列をターゲットにしたPCRプライマー)。ここに示すように、*tfdAm* を混入した活性汚泥からのみの検出が確認された。このことから、本手法により多種多様な微生物が存在する環境サンプルからでもマーカーを導入した目的遺伝子の特異的に検出可能であることが示され、構築した手法の有用性が示された。

図1 活性汚泥からの *tfdAm* の特異的検出



5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)
ありません

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)
ありません

(3) 特許等 (出願番号を記載)
出願準備中