

兵庫県北部温泉地に生息する好熱性細菌叢の比較および 細菌叢解析の生徒実験への展開を目指して

羽深健治

笠原 恵

1 研究目的

高等学校「生物」で扱われるバイオテクノロジーに関する実験（PCR、電気泳動、大腸菌の形質転換、遺伝子組換え、塩基配列解析など）の内容は多岐にわたっており、これらの学問領域は近年発展目覚ましく、将来、生命科学がさらに発展した世界に生きる高校生が今身につけておくべき知識として今後も益々重要になってくるものと考えられる。机上の学習だけでは、これらの実験の意味や、データの解析手法などの理解に困難を伴い、習得のためには実際に自ら実験をやってみることが最重要である。しかし、予算や時間など制約のある教育現場において、これらを実践している学校は限られている。申請者勤務校においては遺伝子解析のための実験器具や試薬などが一部整っており、これらの設備を有効に活用し、今後継続的に実施できる形の生徒実験を工夫して考案したいと考えた。近年、腸内フローラと健康状態・精神疾患との関連が話題になるなど、メタゲノム解析が一般的になっているが、高価な実験装置がない高等学校においても、従来の電気泳動などの手法を工夫することで細菌集団の解析が可能であり、肉眼では不可視な生物が身近な場所で多様な生態系をなしているということを知ることは、大きな教育的な価値があると言える。

そこで、本研究では身近に生息する微生物の分離・同定を行い、その過程を通して遺伝子のはたらきやその多様性について学ぶことができる生徒実験の開発を目的に研究を行った。高温環境に生きる好熱性細菌に着目し、城崎温泉と湯村温泉それぞれの湧出湯における細菌叢を比較し、高等学校生徒が実施できる形の生徒実験へ還元することを目指した。これまでの研究（平成30年度大学院同窓会会員と大学教員との共同研究）において、城崎温泉から採取した湧出湯から、環境DNAの解析により目的としていた好熱性細菌の存在を複数種確認することができた。また、平成30年度に採択された共同研究に係る生徒課題研究の成果が認められ、本年度SSH生徒研究発表会（令和元年8月開催）において申請者勤務校生徒4名がその成果を学校代表として

ポスターで発表した。本研究では美方郡新温泉町の湯村温泉から好熱性細菌を分離し、城崎温泉とその細菌叢を比較することを目的とした。

好熱性細菌とは、極限環境に生息する微生物の一つで、温泉や熱水域、強く発酵した堆肥などに生息する。生物工学上有用な酵素を生産するなど、他の生物にはない特徴を多く持つ。また、原始の地球における熱水噴出孔においても生息していたと考えられることから、原初生命に近い生き物と考えられており、生物学的に大変興味深い生物である。これらをはじめとする微生物を分離し、遺伝子の塩基配列決定などにより種を同定し、系統を明らかにすることを目指した。湯村温泉においては98℃ほどの高温泉が常時湧き出ており、日本に数ある温泉の中でも際立った高温環境が成立していると予想され、城崎温泉とは異なる細菌種の存在が期待できた。

得られた実験結果や、その過程を通して得た知見をもとに、学校現場において継続的に実行可能な微生物学実験の有り様について、特に細菌叢解析の汎用的実施について検討した。

2 研究方法

兵庫県豊岡市の周辺にある自然環境から試料採取し、好熱性細菌の存在を探索した。これらをはじめとする微生物由来のDNAを分離し、16S rRNA 遺伝子の解析によって系統を明らかにすることを試みた。なお、一連の実験は申請者勤務校の在学生徒2名（理数科1学年生）と協同して行った。

（1）環境DNAの抽出とPCR、電気泳動によるDNAの存在の確認

2019年11月の早朝6時頃、湯村温泉荒湯周辺にて採水した（兵庫県美方郡新温泉町湯，図1）。湯村温泉では98℃の高温泉が毎分470Lも湧出しているとされ、実測値では80℃程度であった。荒湯の湯壺の数か所から採水した。加えて、湯壺に付着していた緑色の藻類も採取した。



図1 湯村温泉での採水の様子

また、付近を流れる春來川の川辺からも湯気が立ち上っている箇所があり、この地点からも砂利を掘り起こして湯水を採取した（図2）。



図2 採水した川辺の様子

温度計をさすと温度は60℃程度であった

採水した各試料（荒湯源泉，下段の湯壺の湯，川の水，足湯の湯，川辺の湧出湯，下段の湯壺の藻，卵壺の藻）を，ガラス製のフィルターホルダーを用いて，それぞれの水1 L程度を直径47 mm，孔径0.22 μmのメンブレンフィルターで吸引ろ過し，フィルターに捕集された試料からDNAを抽出した。DNA抽出はDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行い，方法はキット付属

のプロトコルに従った。微生物の系統解析に広く利用されている16S rRNA 遺伝子を対象に，PCR でDNAを増幅した。プライマーには先行研究と同様の細菌用のプライマー（10F/800Rのプライマーセット；10F:5'-GTT TGA TCC TGG CTCA-3'，800R:5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'）に加えて，古細菌DNAを対象としたプライマー（340F/1000Rのプライマーセット；340F:5'-CCC TAY GGG GYG CAS CAG-3'，1000R:GGC CAT GCA CYW CYT CTC-3'）も用いた。好熱性の微生物には古細菌も多く，好熱性古細菌の存在を期待した。PCR後の試料を2%アガロースゲルを用いてTAEバッファー中で電気泳動し，DNAの有無を確認した。DNAの染色にはミドリグリーンアドバンス（日本ジェネティクス）を用い，予めアガロースゲルに混合して使用した。

（2）変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）

DGGEとは，変性剤（尿素・ホルムアミド）濃度勾配をもつポリアクリルアミドゲルを使用して行う電気泳動のことで，塩基配列の異なるDNAどうしを簡便に分離できる手法である。DNA移動度が上がるにつれて変性剤濃度が高くなるように作成したポリアクリルアミドゲルを用いてDNAを電気泳動すると，ある変性剤濃度で2本鎖DNA間の水素結合が切断され，2本鎖から1本鎖DNAに変性する。しかし，プライマーで付加したGCクランプ部分は結合力が強いため2本鎖を維持し，その結果DNAは3方に伸びた形（Y字型）になる。かさ高くなったDNAは，変性した時点でゲル内のその位置に留まることになる。塩基配列によってDNAの変性のしやすさは異なるため，配列の異なるDNAは異なる位置にバンドを形成し，分離が可能となる。本実験では30%～60%変性剤濃度勾配下で分離を行った（変性剤濃度100%は尿素7 M，ホルムアミド40%に相当）。

DGGE用のGC配列を付加したプライマーセットを用いて，PCRを行った。プライマー配列は既報に従った（Forward primer; F984GC: 5'-cgc ccg ggg cgc gcc ccg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gAA CGC GAA GAA CCT TAC-3'，Reverse primer; R1378: 5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'，小文字はGCクランプ）。アガロースゲル電気泳動でDNA増幅が確認できたので，同

試料を用いて DGGE を行った。電気泳動装置は日本エイド一社の NB-1480A を用いた。30%~60%の範囲の変性剤濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを作製し、TAE バッファーを用いて 55°C・100 V の条件で約 130 分間泳動した。泳動後のゲルをガラス板から剥がし、DNA 染色液に 70 分間浸漬した。DNA の染色にはアガロースゲル電気泳動と同様にミドリグリーンを用い、TAE バッファーに 15 μ L/100 mL 加えて DNA 染色液とした。その後、純水に浸漬し 30 分間脱色したのち、トランスイルミネーターで蛍光を観察した。

3 結果と考察

(1) 環境DNAの抽出とPCR、電気泳動によるDNAの存在の確認

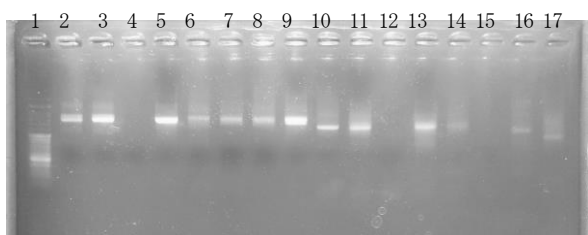


図3 16S rRNA 遺伝子増幅後のアガロースゲル電気泳動

1:50bp DNA Ladder, 2-9:10F/800Rプライマーセットを使用, 10-17:340F/1000Rプライマーセットを使用, 2・10:荒湯源泉, 3・11:下段の湯壺の湯, 4・12:川の水, 5・13:足湯の湯, 6・14:川辺の湧出湯, 7・15:水道水(陰性対照), 8・16:下段の湯壺の藻, 9・17:卵壺の藻

図3に示すように、各地点から採取したほとんどの試料についてDNAの増幅が確認できたが、川からの採水試料についてはいずれのPCRにおいてもDNA増幅が確認できなかった。他のほとんどの試料でDNA増幅が確認できたことを考えると、川の水だけに細菌・古細菌由来DNAが含まれていないとは考えにくい。おそらくDNA抽出時の操作の誤りによるものである。フィルターろ過はガラス製のフィルターホルダーとナス型フラスコをつなぎ、ポンプで吸引する形式で行ったが、このやり方で環境水中の細菌由来DNAをうまく捕集できることが先行研究に引き続き確認できた。対照として水道水を吸引ろ過し、同様の手技によりフィルターからDNA

を抽出し実験を行うと、わずかながらDNAの増幅が見られた。生徒と共に行うという時間の制約などから、用いるガラス器具などを連続して繰り返し使用し複数試料を扱わなければならない、次亜塩素酸処理などをその都度行うことはできなかった。コンタミネーションを完全に除くことができなかった。細菌を対象にする限り、高等学校の設備で滅菌や除DNA処理を完璧に行うのは難しいと考える。しかしながら、のちにうまくDGGEによって各細菌・古細菌由来のDNAを分離し、塩基配列を解析して種を同定できさえすれば、それほどコンタミネーションの影響を気にしなくてもいいのではないかと考えている。古細菌DNAを対象にしたレーン10~17の結果について、湧出湯試料において増幅が確認でき、何らかの高温環境独特の古細菌が生息しているのではないかと考えられた。

(2) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)

DGGEを試みたが、全体としてスミアなバンド(連続的に上下に伸びた不鮮明なバンド)が観察され、明確に分離したバンドはほとんど得ることができなかった(図は不掲載)。原因として様々な要因が考えられるが、電気泳動時の電圧が高いこと、ウェルに注いだ試料の量が適切でなかったこと、自作の濃度勾配ゲルがうまくできていなかったことなどが挙げられる。特に、濃度勾配ゲルの作製については、円筒型のグラジエントミキサーを使用して濃度の異なる二液体を徐々に混ぜながら、チューブを通して溶液を重力によりガラスプレート層に滴下する形で作っていたが、意図したような濃度勾配が綺麗に形成されているのか十分に検証しておらず、うまく作るには習熟が必要であると感じた。比較的単一であると観察できた湧出湯試料のバンドを3か所切り出し、-60°Cで冷凍保存した。再度DGGEを試みることを、および切り出したゲルからDNAを抽出し塩基配列解析を委託することを予定していたが、新型コロナウイルス蔓延防止のための休校措置の影響により生徒との協同実験を続けることが困難になり、計画を遂行することができず、各塩基配列を解析して生物種を同定するには至らなかった。

城崎温泉での湧出湯を用いて行った先行研究におい

では、採水試料に含まれるDNAの塩基配列解析の結果、*Chloroflexus aurantiacus* という好熱性の光合成細菌、*Thermosynechococcus* 属および*Leptolyngbya* 属の好熱性のシアノバクテリアを同定することができたが、いずれも湧出湯が流れる岩肌に固着して生活する光合成生物と考えられた。今回、湯村温泉での細菌叢を調べるにあたって、光合成生物以外の好熱性細菌の存在を確認したいというねらいもあったが、種の同定や系統の比較解析には至らず残念であった。なお、湯村温泉においても湧出箇所付近で温泉藻を確認しており、城崎温泉と同様の細菌が生息していることは十分に考えられる。

(3) 細菌叢解析の生徒実験への展開を目指して

近年では、次世代シーケンサーの発展に伴って、メタゲノム解析が容易にできるようになり、細菌叢の解析も盛んに行われている。高校生が行う環境中の生物の塩基配列解析について考えると、次世代シーケンサーを用いて環境中のDNAを網羅的に解析することは設備や費用面などからあまり現実的ではなく、実施できるのはごく一部の学校で、自然科学部や課題研究による有志の生徒による取り組みに限られると考えられる。加えて、先端機器で実験の過程をすべて解決してしまえば教育的効果も薄い。それに対し、DGGEをはじめとする従来の細菌叢解析方法は、PCRを用いた例えば16S rRNA遺伝子などゲノム中の特定領域の増幅産物（アンプリコン）を対象とする手法ではあるものの、今でも十分に利用可能であり、培養法で確認することが難しい種々の微生物種の存在を迅速かつ簡便に発見する手段として有用であると考えられる。前述したように、濃度勾配ゲルの作製などに手間はかかるが、DGGEは他のDNA解析手法（T-RFLP法やFISH法など）と比較して制限酵素や蛍光標識試薬が不必要で、高価な蛍光解析機器や画像解析装置がなくともアガロースゲル観察用のトランスイルミネーターがあれば簡易的に泳動像の解析が可能であり、サーマルサイクラーや水平型電気泳動槽、マイクロピペットなどが揃っている環境であれ

ば、DGGE用の電気泳動装置一式を用意することで高校でも比較的簡単に実施できる。教科書の範囲からはかなり逸脱してしまい、手間はかかるが、生物集団のDNA解析は地域に生息する生物種の系統解析から腸内フローラの解析に至るまで応用範囲が広い。特に、自然科学部や課題研究における研究の一手段として継続的・汎用的に利用できるのではないかと考えている。

一方で、DGGEによる細菌叢解析を普段の通常授業で扱うことはあまり現実的ではない。勤務校においては、分子生物学分野の実験として、ALDH2遺伝子型の判定を題材にしたPCRと電気泳動の実験、pGLOバクテリア遺伝子組換えキット（Bio-Rad）を用いた大腸菌の遺伝子組み換え実験を実施している。ALDH2遺伝子型の判定には、一塩基多型によるDNAプライマー末端とゲノム間の塩基対形成の有無を利用するが、教科書ではそもそもPCRが設計したプライマーを用いた任意の特定領域の増幅手法であるということを明確に扱っておらず、その内容と比較すると上記の実験でさえ発展的な題材である。

4 まとめ

湧出湯を美方郡新温泉町の湯村温泉から採水し、DNAを分離した。PCRを用いて16S rRNA遺伝子を増幅したところ、細菌由来および古細菌由来と思われるDNAの増幅が確認できた。DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）により各DNAの分離を試みたが、良好な結果を得るには至らず、塩基配列の解析をすることはできなかった。しかしながら、高温の湧出湯に好熱性の細菌・古細菌がいる可能性は高いと考えられた。

5 参考文献

Gantner S et al. (2011) Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples, *J Microbiol Methods*, Jan;84(1)