

活性汚泥法処理水中バクテリオファージの RFLP 法によるプロファイリング

Profiling of bacteriophages in activated sludge by using RFLP method

学籍番号 47-086759
氏名 陳靈佳 (Lin Chia,Tan)
指導教員 佐藤弘泰 准教授

【背景・目的】

近年、活性汚泥中に存在する微生物群を宿主とするバクテリオファージ（以下ファージ）が存在する事がわかってきた。このようなファージは、下水処理のために有用な微生物を溶菌し、下水処理に影響を与える場合もありえる。しかし、こうしたファージについて研究は進んでいない。既往の研究では、ファージを調べるために、パルスフィールド電気泳動法（PFGE 法）が報告されている¹⁾。PFGE 法では、ファージの持つ DNA の大きさに基づいて分離することができる。しかし、活性汚泥中には同じような DNA サイズのファージが出現する傾向があり¹⁾、DNA サイズのみによる分離には限界がある。そこで、制限酵素による切断パターンに基づきプロファイルをとることを試みた。

【実験方法】

実験室活性汚泥からのファージ試料の抽出

精製：実験室で運転している活性汚泥反応槽から処理水を採取し、0.2 μ m のフィルターを用い、バクテリアを除去した。その後、超遠心法（30,000g, 80 分）によりファージを濃縮し、さらに Microcon100 を用い精製した。100 \times TE バッファ中にて、60 $^{\circ}$ C, 20 分間加熱しファージ DNA を抽出した。

パルスフィールド電気泳動法（PFGE 法）：

ファージ DNA を検出するために PFGE 法を用いた。SYBR GreenI で染色観察を行った。

制限酵素断片多型 (RFLP 法)：

精製したファージ DNA を phi29DNA ポリメラーゼ (QIAamp DNA Micro Kit, QIAGEN) で増幅した。制限酵素 (SalI, HindIII) で処理し、アガロース電気泳動により分離し、EtBr で染色し泳動パターンを観察した。

【結果】

3.1 PFGE 法を用いたファージの分離

図 1 はリアクター WL から抽出したファージを PFGE 法で分離した結果を示す。全てのサンプルは、約 48.5kbp のところに、バンドが確認された。

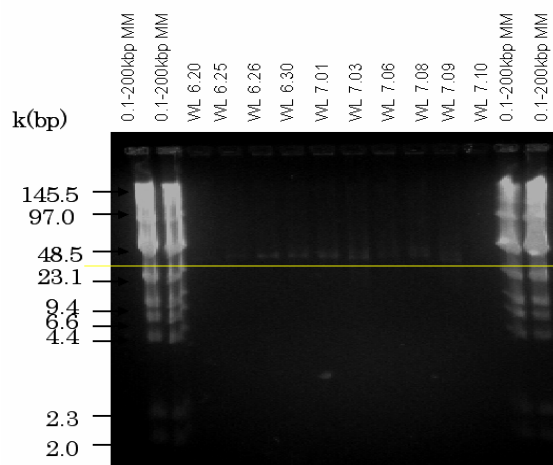


図 1 PFGE で分離したファージ (リアクターWL)

3.2 RFLP 法による分析結果(I)

ここでは活性汚泥処理水から得たファージ DNA 試料を直接制限酵素処理し分析した。

3.2.1 制限酵素 SaI を用いた場合

図 2 と図 3 は、それぞれリアクターWL とリアクターS から抽出したバクテリオファージを SaI 制限酵素でプロファイリングした結果を示す。全てのサンプルは、制限酵素 SaI によって切断されなかった。

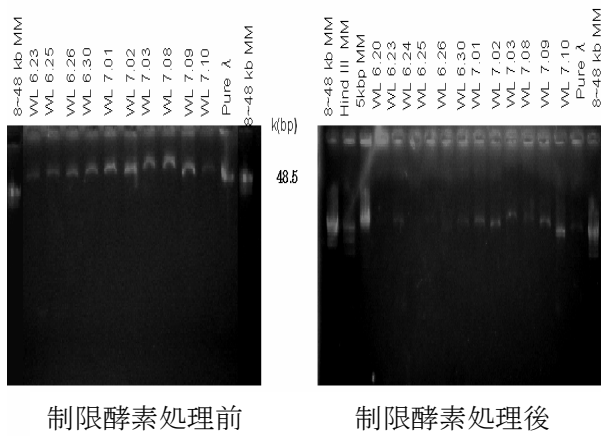


図 2 制限酵素 SaI でファージのプロファイリングした (リアクターWL)

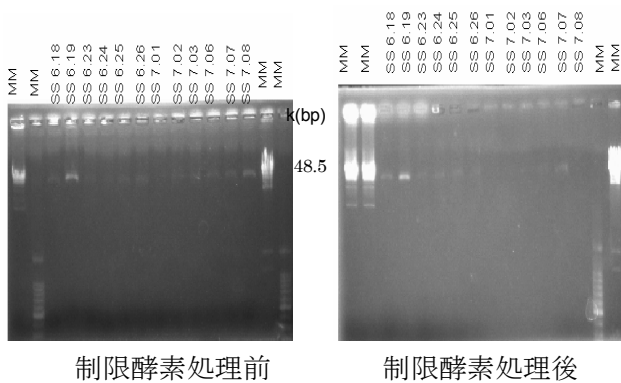


図 3 制限酵素 SaI でファージのプロファイリング (リアクターS)

3.2.2 制限酵素 HindIII を用いたファージのプロファイリングした結果

図 4 と図 5 は、それぞれリアクターWL とリアクターS から抽出したファージを HindIII 制限酵素でプロファイリングした結果を示す。全てのサンプルは、制限酵素 SaI によって切断されなかった。

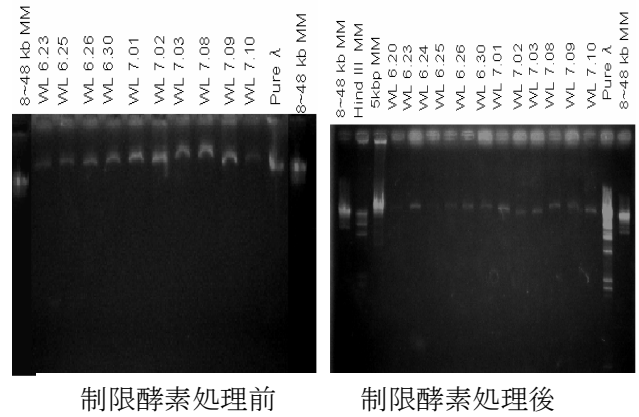


図 4 制限酵素 HindIII でファージのプロファイリング (リアクターWL)

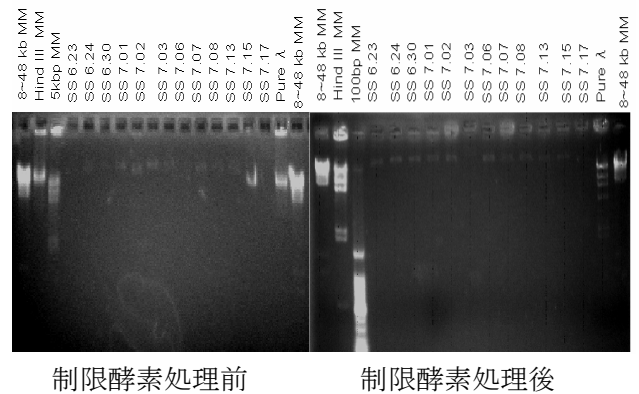


図 5 制限酵素 HindIII でファージのプロファイリング (リアクターS)

3.3 RFLP 法による分析結果(II)

試料から得られたバクテリオファージ DNA は制限酵素では切断されることがわかった。そこで、制限酵素処理に先立ってバクテリオファージ DNA を phi29 DNA ポリメラーゼを用いて増幅し、その後、制限酵素処理を行った。

図 6 では、SalI 制限酵素を用い、プロファイリングした結果を示す。WL6.18, WL6.24, WL6.25, WL7.01 のサンプルは同じような切れパターンを観察された。一方、WL6.23, WL7.07 のサンプルは同じような切れパターンが得られた。更に、WL7.03, WL7.08 のサンプルは、似たような切れパターンを観察できた。

図 7 では、リアクターS から抽出したファージを SalI 制限酵素を用い、プロファイリングした結果を示す。SS6.19, SS6.26 のサンプルは同じような切れパターンが得られた。一方、SS6.23, SS7.01, SS7.02, SS7.03, SS7.06 のサンプルは同じような切れパターンを観察した。

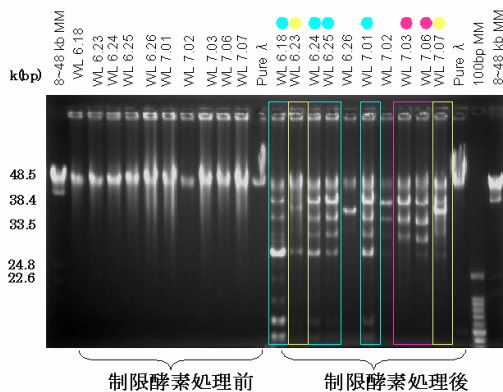


図 6 制限酵素 SalI で処理を行ったバクテリオファージ (リアクターWL)

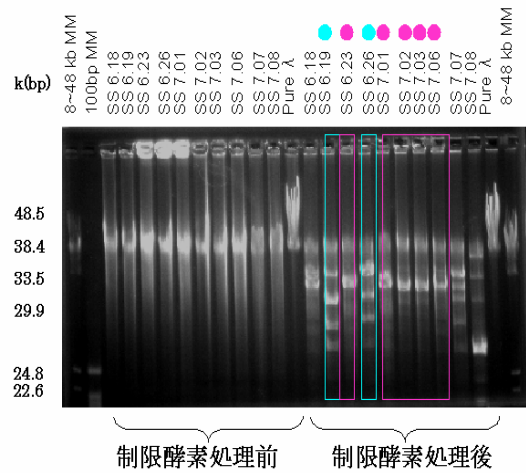


図 7 制限酵素 SalI で処理を行ったバクテリオファージ (リアクターS)

3.3.2 制限酵素 HindIII を用いたファージのプロファイリング

図 8 では、リアクターWL から抽出したファージを HindIII 制限酵素を用いプロファイリングした結果を示す。WL6.18, WL6.24, WL6.25, WL7.01, WL7.06, WL7.07 のサンプルは同じような切れパターンを得られた。

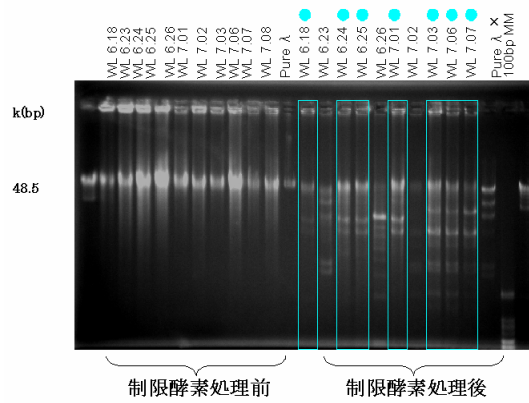


図 8 制限酵素 HindIII で処理を行ったバクテリオファージ (リアクターWL)

表1は、RFLP法を用いバクテリオファージをプロファイリングした結果をまとめた表である。Phi29ポリメラーゼで処理したサンプルは全て制限酵素によって切断され、プロファイリングすることができた。

表1 RFLP法によるバクテリオファージのプロファイリングした結果のまとめ

サンプル	phi29 ポリメラーゼ 処理あり		phi29 ポリメラーゼ 処理なし	
	HindIII	SalI	HindIII	SalI
WL	●	●	×	×
SS	NA	●	×	×
λ pure phage	●	×	●	×

○ 切断された

× 切断されない

NA 未検討

SS リアクターSから抽出したファージ

WL リアクターWLから抽出したファージ

【考察・結論】

Phi29ポリメラーゼの処理なしで、ファージのDNAは制限酵素に切断されない。逆に、Phi29ポリメラーゼを処理したファージDNAは、制限酵素によって切断され、プロファイリングすることができた。切断されない理由としては、DNAのメチル化が関係していると考えられる。ファージは、制限酵素による消化を逃れるために、そのDNAをメチル化している可能性がある。そして、用いた制限酵素のSalIは、このようなメチル化されたDNAを切断することができない。しかし、phi29ポリメラーゼを用いて、ファージのDNAを増幅することで、元々メ

チル化されているDNAは複製されるが、複製されたDNAはメチル化されない状態となる。このことから、SalIで処理できなかったサンプルは、うまく切断できるようにと推測した。また、PFGE法を用いて、バクテリオファージを分離することができた。全てのサンプルにおいて、およそ50kbpのところ、バンドが確認された。(図1)同一のサンプルを更にRFLP法で調べたところ、日毎に異なる切断パターンが観察され、DNAサイズは同じでありながら、日々、異なる種類のバクテリオファージが出現していることを示唆する結果が得られた。(図6)このことから、PFGE法とRFLP法を組み合わせ、バクテリオファージの出現状況に関してより詳しい情報を得ることができるようになった。

【本研究で得た知見と今後の展望】

RFLP法は、PFGE法により分離したバクテリオファージに対して適用することもできると考えられる。PFGE法で、まずはDNAサイズにより分離し、さらに、そのバンドを切り出してRFLP法により分析すれば、バクテリオファージの簡易的な分類のためにも役立つであろう。本研究で開発した手法は、バクテリオファージのダイナミックな変動を捉え、活性汚泥処理水に存在するバクテリオファージの挙動をより詳しく把握するために利用することができる。将来、バクテリオファージの挙動を解明し、また、下水処理のために役立つ技術になることと期待される。

【参考文献】

- 1) Otawa et al. (2007) Microbial Ecology, 53, 143-152