

2009 年度 修士論文

活性汚泥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)

陳靈佳

(Tan, Lin Chia)

東京大学大学院新領域創成科学研究科

社会文化環境学専攻

目次

第1章 序論	1
1.1 研究の背景	3
1.2 研究の目的	4
1.3 論文構成	4
第2章 既存の知見整理	5
2.1 廃水処理と微生物	5
2.1.1 活性汚泥	5
2.1.2 活性汚泥の中に存在する微生物およびバクテリオファージ	6
2.2 バクテリオファージとは	7
2.3 既存のバクテリオファージ解析手法	9
第3章 パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) を用いたバクテリオファージの分離	10
3.1 実験背景とその目的	10
3.2 活性汚泥サンプル	10
3.3 実験方法	10
3.3.1 検討実験(1)バクテリオファージの DNA 抽出条件の確認	12
3.3.2 検討実験(2)精製工程におけるファージの回収率の検討	13
3.3.3 検討実験(3) ゲルにロードする試料量の検討	13
3.3.4 検討実験(4) Phi29 ポリメラーゼを用いたファージ DNA の増幅	13
3.3.5 検討実験(5) 蛍光染色剤の検討	14
3.4 各検討とその結果	15
3.4.1 バクテリオファージ DNA の抽出条件の確認	15
3.4.2 精製工程におけるファージの回収率の検討	16
3.4.3 ゲルにロードする試料量の検討	17
3.4.4 Phi29 ポリメラーゼを用いたバクテリオファージ DNA の増幅	17
3.4.5 蛍光染色剤の検討	18
3.4.6 PFGE 法で分離したバクテリオファージ	22
3.5 考察・結論	24

第 4 章 制限酵素断片多型法 (RFLP 法) によるバクテリオファージのプロファイリング	25
4.1 実験背景とその目的	25
4.2 実験方法	26
4.3 実験結果	29
4.3.1 λ ファージを用いた制限酵素処理の検討	29
4.3.2 制限酵素を用い、バクテリオファージのプロファイリングの試み	31
4.3.2.1 SalI 制限酵素によるプロファイリング (リアクターS から抽出したバクテリオファージ)	31
4.3.2.2 HindIII 制限酵素によるプロファイリング (リアクターS から抽出したバクテリオファージ)	32
4.3.3 制限酵素を用い、バクテリオファージのプロファイリングの試み	
4.3.3.3 SalI 制限酵素によるプロファイリング (リアクターWL から抽出したバクテリオファージ)	33
4.3.3.4 HindIII 制限酵素によるプロファイリング (リアクターWL から抽出したバクテリオファージ)	33
4.4 制限酵素に切断されない理由およびその対策	35
4.5 Phi29 ポリメラーゼを処理し、制限酵素を用いたバクテリオファージのプロファイリング	35
4.5.1 SalI 制限酵素によるプロファイリング (リアクターS から抽出したバクテリオファージ)	35
4.5.2 SalI 制限酵素によるプロファイリング (リアクターWL から抽出したバクテリオファージ)	36
4.5.3 HindIII 制限酵素によるプロファイリング (リアクターWL から抽出したバクテリオファージ)	37
4.6 phi29 ポリメラーゼ処理の時間の検討	38
4.7 RFLP 法の結果のまとめ	39
4.8 考察・結論	40
第 5 章 結論	45
5.1 総括と今後の展望	45
謝辞	47
参考文献	48

第 1 章 序論

1.1 研究の背景

活性汚泥の中に存在する微生物は、有機物、富栄養化の原因となる窒素やリンを除去するという主な役割を果たしている。しかし、こうした活性汚泥の中の微生物を溶菌するバクテリオファージが存在するという報告された (Ewert and Paynter, 1980, Hantula et al., 1991)。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と考えられる。しかし、このようなバクテリオファージに関して調査するために有効な手段は限られており、そのために研究はほとんど進んでいない。

バクテリオファージを検出するために用いられている方法の一つとして、Adams (1959) によって開発されたブランクアッセイ法 (寒天重層法) がある。しかし、この方法では、寒天培地上で培養することのできない細菌を宿主とするバクテリオファージに対して適用することができないという欠点がある。活性汚泥中には多様な細菌が存在しているが、その多くは寒天培地上で培養する事は困難であり、従って、この方法は、活性汚泥処理水中のバクテリオファージを調べるために適当ではない。

近年、Wommack et al. (1999a; Wommack et al., 1999b) が、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) を用い、海洋に分布するシアノバクテリアを溶菌するファージのコミュニティを解析した。この方法を用いると、バクテリオファージを宿主細菌を用いて分離しなくても、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。分離培養が困難なバクテリオファージを調べるために、適した方法であると考えられる。

同じ方法で、Ottawa et al. は、様々な下水処理場の活性汚泥やその処理水中に存在するバクテリオファージ DNA を抽出し、PFGE 法により分離することに成功した。異なる下水処理場から抽出したサンプルにもかかわらず、全ての試料に共通して出現するバクテリオファージが存在することも分かった。(小田和、2006)

異なる下水処理場で、異なる環境で運転されているにもかかわらず、同じような DNA サイズを持つバクテリオファージが検出されたことは興味深い。同じ種類のバクテリオファージであるのか、それとも異なる種類のバクテリオファージがたまたま同じ DNA サイズを持っているのか、どちらであろうか。そこで、バクテリオファージ DNA を別な方法で分析する手法を確立しようと考えた。

1.2 研究の目的

本研究の最終目的としては、PFGE 法とは異なる分離原理でバクテリオファージをプロファイリングする新しい方法を確立することである。

S. H. Lee (学位論文)は、制限酵素断片多型 RFLP 法を用い、精製したバクテリオファージを、制限酵素で切断し、泳動パターンを観察した。この方法は、制限酵素を用い、バクテリオファージの特定塩基配列を認識し、DNA を切断する。バクテリオファージは、種ごとに塩基配列を持っているため、制限酵素によって切断するパターンも異なる。この方法を用いると、同一の DNA サイズを持つバクテリオファージでも、その相違を明確にする事ができるはずである。

そこで、本研究では次の検討を行った：

1. パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) による処理水中バクテリオファージのプロファイリングの確認
2. 制限酵素断片多型法 (RFLP 法) の適用性の検討
3. パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) に加え、RFLP 法を用いることで、処理水の中に存在するバクテリオファージの情報をより正確に把握することができる。

1.3 論文の構成

第 1 章 はじめに

本研究の背景、目的および論文の構成を述べた。

第 2 章 知見の整理

本研究に関わる知見を整理した。

第 3 章 パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) を用いるバクテリオファージの分離

第 4 章 制限酵素断片多型法 (RFLP 法) を用いるバクテリオファージのプロファイリング

第 5 章 総括

本研究で得られた知見をまとめた。

第 2 章 知見の整理

はじめに、活性汚泥法と活性汚泥中の微生物の生態を紹介する。その後、バクテリオファージの生活環を整理する。

2.1 廃水処理と微生物

2.1.1 活性汚泥法

活性汚泥法は世界で広く用いられている下水処理の方法の一つである。この方法は、20世紀初頭に欧米で確立され、その後、日本でも多く用いられるようになった生物学的処理法である。

図 2-1 は活性汚泥法のフローチャートを示す。活性汚泥法では、先ず曝気槽において、活性汚泥を下水と混合し、あそこに空気を吹き込む。これによって、活性汚泥中の微生物は下水中の有機物を摂取し、増殖のために利用する。これによって、有機物は下水処理から取り除かれる。

下水と活性汚泥は曝気槽を出ると、沈殿地に流入する。沈殿池では、活性汚泥の方が水より比重が大きいため、汚泥は底に沈む。沈んだ汚泥は、再び下水処理のために用いられる。

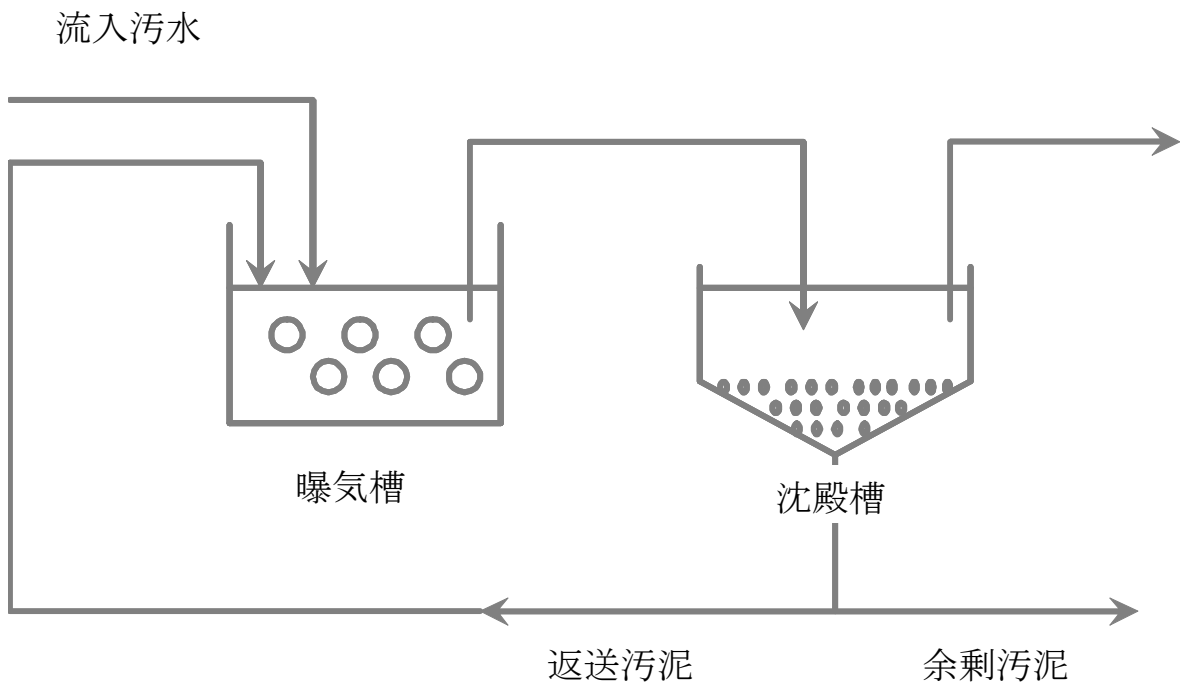


図 2-1 活性汚泥法のフローチャート

2.1.2 活性汚泥の中に存在する微生物およびバクテリオファージ

活性汚泥の中に存在する微生物は、流入水に含まれる有機物を摂取することで、水を浄化する。彼らの一生の間に、下水と接触し、好気的な代謝し、沈殿地で沈む。このようなサイクルは何回も繰り返す。最終的には余剰汚泥として下水処理プロセスから取り除かれ、汚泥処理に回される。図 2-2 は活性汚泥中の微生物の生態を示す。

このような下水処理に有用な微生物を宿主し、彼らを溶菌していくバクテリオファージが存在することが報告された。Ewert and Paynter (1980)が活性汚泥プロセスとその流入下水中のファージ数を電子顕微鏡で計数し、処理に伴ってファージの粒子が増えることを報告された。更に、Hantula ら (1991)は、活性汚泥から分離した細菌の多くに、それを宿主とするバクテリオファージがいたと報告された。また、Lee et al. (2006) は、リン除去する細菌の一つである *Microcylunatus phosphorus* という細菌を宿主とするバクテリオファージを分離することに成功した。

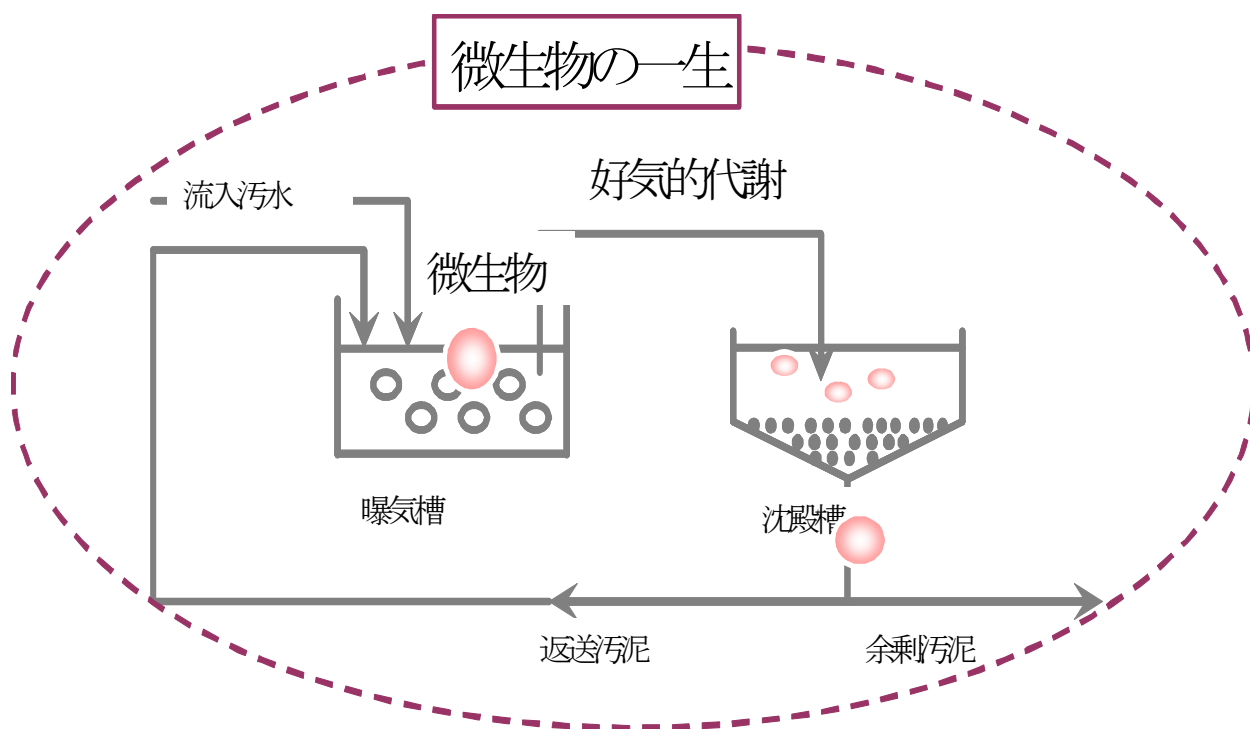


図 2-2 活性汚泥中の微生物の生態

2.2 バクテリオファージとは

バクテリオファージは、1915年に Twort et al.によって発見された細菌に感染するウイルスである。その大きさは25~200nm程度で、一本鎖あるいは二本鎖のDNA 或いはRNAの核酸とそれを包む蛋白質コート（キャプシド）から構成される。バクテリオファージの形状はさまざまであり、単純な正二十面体様のキャプシドをもつものや、キャプシドに付随した尾部をもつもの、更にキャプシド自体が線状のものなどが知られている。

図 2-3 はバクテリオファージの感染パターンを示す。バクテリオファージには2種類の感染パターンがある。ファージが感染すると、細菌内で増殖し、最終的には完全に宿主を溶菌し、死滅させる「ビルレントファージ」と、ファージが感染しても増殖・溶菌が起こらず、ファージゲノムを宿主染色体上に留まらせたまま潜む「テンプレートファージ」である。

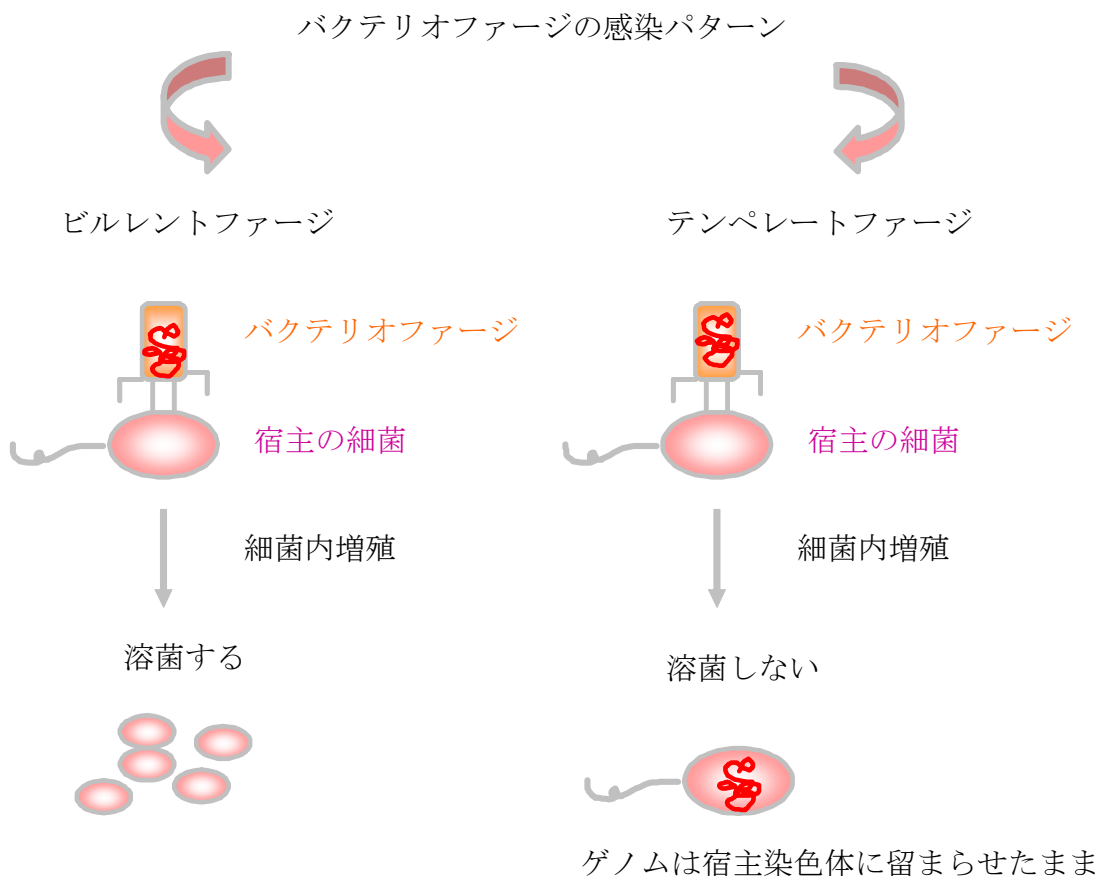


図 2-3 バクテリオファージの感染パターン

図 2-4 はバクテリオファージの生活環を示す。ファージが宿主を溶菌し、増殖する「溶菌プロセス」とファージのゲノムが宿主に組みこまれたまま安定化する「溶原化プロセス」がある。前者はビルレントファージ、後者はテンプレートファージである。

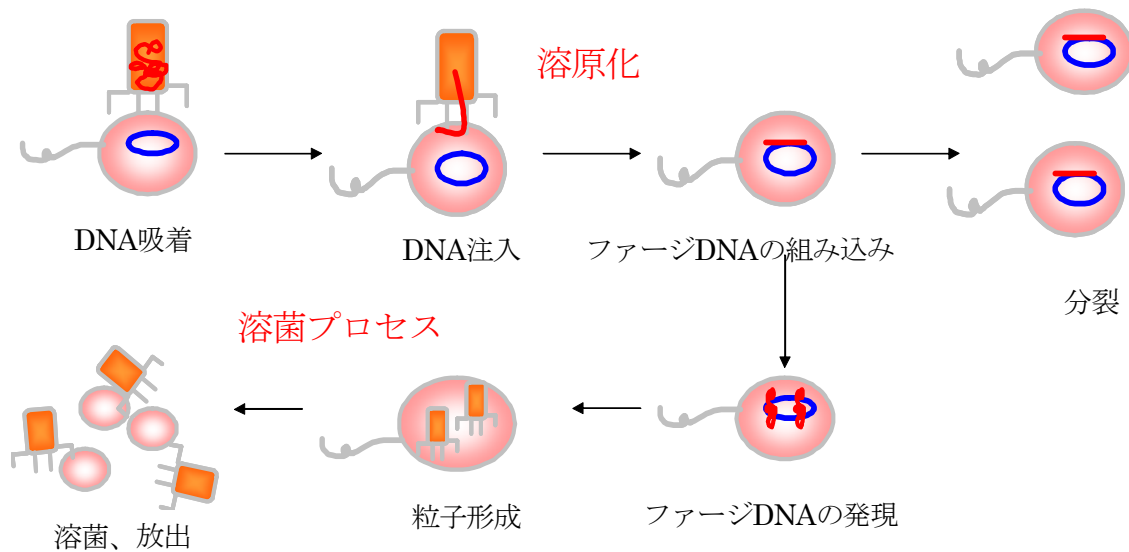


図 2-4 バクテリオファージの生活環

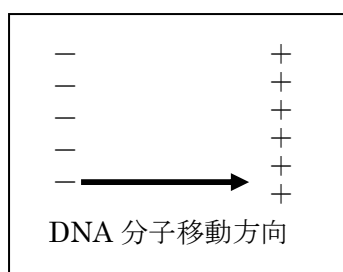
「ビルレントファージ」の生活環は、吸着、ファージ DNA の宿主への注入、ファージ DNA の発現、ファージ粒子の構築、ファージ粒子の放出のステップからなる (Duckworth, 1987)。吸着においては、ファージが特定の宿主と接触し、ファージ側の尾先端部などにある接着部位と宿主側のレセプターが結合する。その後、細胞壁がファージの特殊な酵素によって貫通され、ファージゲノムが宿主細胞内へ移行される。ファージゲノムは宿主ゲノム内に組み込まれる、或いは細胞質内に浮遊して存在する。その後、宿主の蛋白質発現機能によって、ファージ DNA が複製されるとともに、 capsid、尾部などのファージ粒子の構成に必要とされる部品が発現・翻訳される。これらの部品が組み立てられると成熟したファージ粒子が完成する。この段階では初めてファージゲノムから溶菌酵素が発現する。この溶菌酵素は宿主細胞へのペプチドグリカン層などをターゲットとして作用し、内部から宿主細胞の細胞壁を破壊する。

一方、「テンプレートファージ」、「溶原性ファージ」、「偽溶原性ファージ」、「プロファージ」は、感染するが、溶菌せずに宿主ゲノムに組み込まれたり、宿主内プラスミドとなって安定化するものや、直ちには溶菌はしないが、そのうちに溶菌するファージである。(Ackermann and DuBow, 1987)

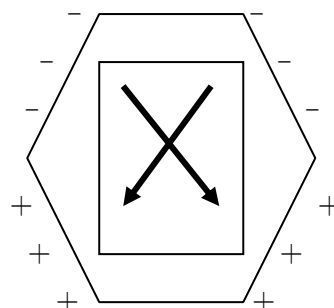
2.3 既存のバクテリオフェージ解析方法

2.3.1 パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法)

パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) は、細菌種を株で区別することを目的として用いられる。(Bohm and Karch, 1992)。一般のアガロース電気泳動法と違った、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) は、一方向に電場をかけるのではなく、2 方向に交差に電場をかける。これによって、高分子の DNA 分子をスピンさせながら泳動させることで分離することが可能になる。



⇒数 kb 以下の PCR 産物・DNA 断片



⇒ 数 10 kb 以上高分子の DNA

(a) 通常のアガロース電気泳動

(b) パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法)

図 2-5 通常のアガロース電気泳動とパルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) の違い

Otawa et al. (2006) は、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) を用い、バクテリオフェージの分離に成功した。この方法を用いると、バクテリオフェージが持つ DNA サイズに基づいて分離することができる。そこで、どのような DNA サイズのバクテリオフェージが存在するのか、調べることができた。

第 3 章 パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) を 用いるバクテリオファージの分離

3.1 実験背景と目的

2 章では、既往の研究でバクテリオファージを調べるために用いられてきた方法を紹介した。その一つの方法としては、パルスフィールド電気泳動法がある。この方法を用いると、バクテリオファージの持つ DNA の大きさに基づいて分離することができる。しかし、ほぼ同じ大きさの DNA を持つバクテリオファージは分離することができないし、あるいは大きさが違っていても似た系統のバクテリオファージである場合もあると考えられる。とはいえ、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) を用いると、DNA サイズの違いに基づいてバクテリオファージを簡易に分離分析できるという利点がある。

本章では、活性汚泥中のバクテリオファージを PFGE 法により分析した。

3.2 活性汚泥サンプル

2 つの実験室内活性汚泥リアクター S および WL から活性汚泥処理水を採取した。いずれも Sequential batch reactor (SBR) 法で運転されており、温度はほぼ 23°C の室内に設置されていた。いずれの装置も汚泥滞留時間 (Sludge Retention Time, SRT) は 10 日であり、水理学的滞留時間 (Hydraulic Retention Time, HRT) は 8 時間で、リアクター S は pH7~8、一方、リアクター WL は 6.67 時間で運転されていた。

3.3 パルスフィールド電気泳動法によるバクテリオファージの分析

3.3.1 実験方法

パルスフィールドゲル電気泳動法によるバクテリオファージの分析は小田和の方法 (小田和、2006 年) に従って行った。

まず、採取した処理水を 0.22 μm のフィルターによりろ過した。ろ液の中に存在する遊離の DNA や RNA を除去するために、DNase と RNase 処理を行った。DNase I (フナコシ、東京) と RNase A (和光純薬、東京) をそれぞれ最終濃度で 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、37°C で 30 分反応した。

処理後のサンプル 26ml を、超遠心分離機でバクテリオファージを濃縮した。ここでは、Hitachi Koki CP80WX 超遠心機、Hitachi 社のアングルロータ RP70T-457 を用いた。遠心速

度は 30,000×g, 遠心時間 80 分、温度 20℃で運転した。

遠心分離終了後、上澄みをデカントにより除去し、沈殿しているバクテリオファージを 800 μ l の 100×TE バッファーに懸濁し、4℃にて保存した。

濃縮したバクテリオファージを、Microcon-100 ユニット (Milipore, Bedford, MA, USA) を用いて精製した。まず、濃縮ファージサンプルを Microcon-100 カラム (青色円筒状のもの) 内に移し、カラムを付属チューブにセットした。キャップを閉め、1000×g の速度で遠心した。フィルター表面が完全に乾燥せずにカラム内のフィルターの淵に 10 μ l ほどのサンプルが残っている状態で、8 分ほど遠心した。遠心が終わったら、100×TE バッファー 50 μ l を添加し、更に 1000×g, 8 分遠心した。この時も、膜表面が完全に乾燥しないように、カラム内のフィルターの淵に 10 μ l ほどのサンプルが残っているように、適宜遠心時間を調整した。同じよう操作を更に 2 回繰り返した。最後に、10 μ l の 100×TE バッファーを添加し、フィルターに触れる事がなく、ピペットで剥がすための吸引、吐出を繰り返した。カラムを新しい遠心チューブに反対向きにセットし、250×g で 1 分遠心を行い、DNA を溶出した。およそ、15 μ l のファージ精製液が得られた。その後、ウオーターバスを用いて、60℃, 20min 加熱処理し、濃縮したバクテリオファージから、DNA を抽出した。

抽出した DNA を DR-III Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、PFGE 電気泳動を行った。ゲルは 0.5×TAE 溶液にアガロース (SeaKem Gold agarose, FMC, Rockland, ME, USA) を 1% 添加し作成した。ゲルにサンプルをアプライする際には、10×ローディングバッファー (Takara, 東京) を 10 分の 1 量を添加し通常の 100 μ l チップとピペッターを用いた。泳動時のアガロースゲル濃度は 1%, 電圧は 6V/cm, 泳動時間は 18 時間、温度は 14℃、バッファー 0.5×TAE, スイッチタイムは 1-10 秒で行った。分子量マーカーとしては Mixture of Molecular Weight Marker for DNA 0.1-200kbp from Lambda phage (Sigma-Adrich, St. Louis, MO, USA)、CHEF DNA Size Standards-8-48kbp (Bio-Rad Laboratories), DNA Size Standards-5Kb Ladder (Bio-Rad Laboratories) 用いた。泳動終了後、1×SYBR Green I (FMC Bio-products, Rockland, ME, USA) を用いて 30 分間蛍光染色し、GelDoc (BioRad, USA) を用いて撮像した。

図 3-1 では、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) の流れを示している。

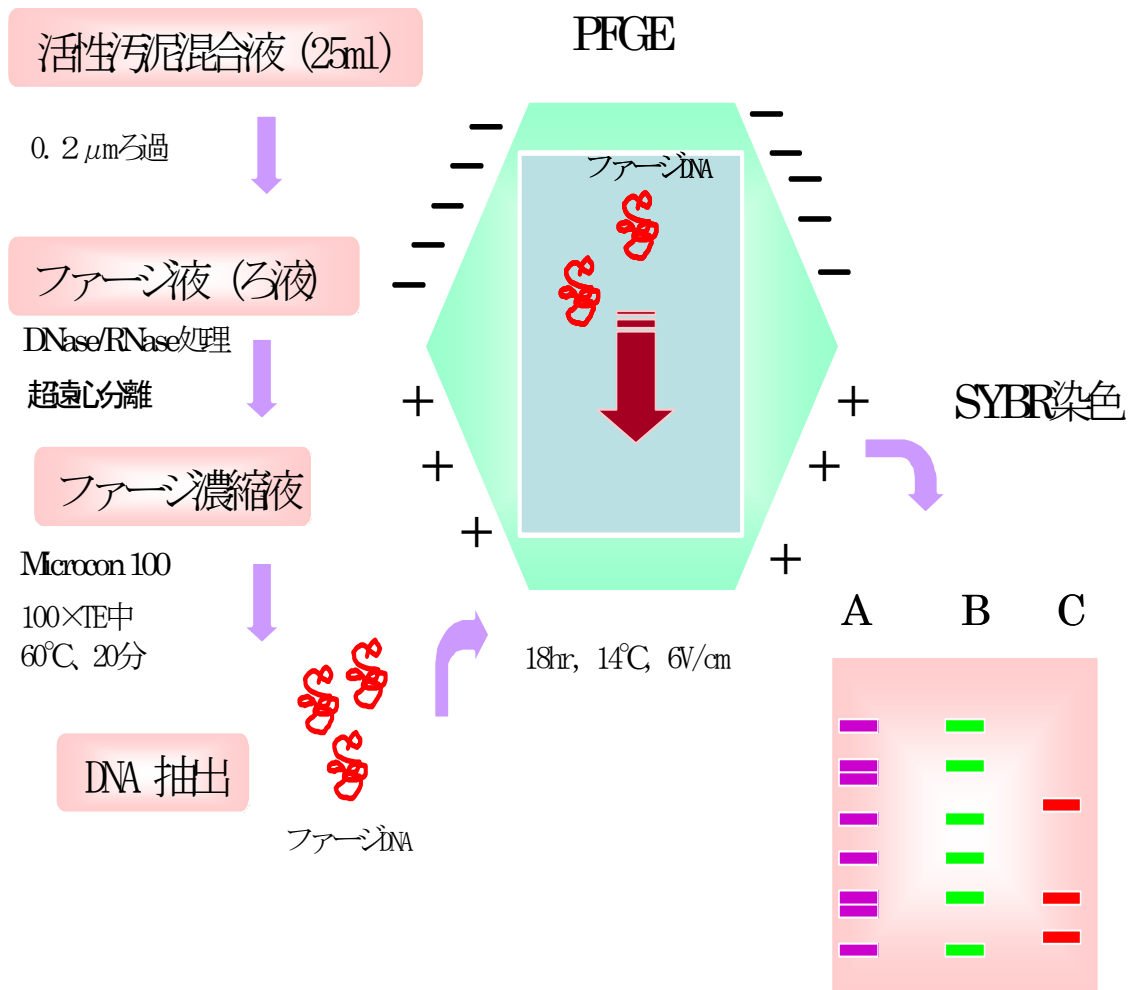


図 3-1 パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) の流れ

ここでは PFGE 法による電気泳動に関して、次のような検討をした。

検討実験 (1)

バクテリオファージの DNA 抽出条件の確認

実験開始当初、PFGE 法での電気泳動はうまくいかない事が多かった。そこで、バンドをうまく分離するために、次のような検討実験を行った。うまくいかない理由の一つとして、バクテリオファージの DNA をカプシドから抽出する際、DNA が壊れてしまう可能性が考えられた。そこで、DNA を抽出する前に (すなわち図 3-1 の Microcon による処理の前の段階で)、活性汚泥処理水から得られたファージ試料に λ ファージ DNA を加え、DNA 抽出を行い、その後、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) にかけて、観察した。もし、抽出条件が不

適切であり、この抽出操作中にバクテリオファージが壊れたのだとしたら、PFGE 結果では λ ファージのバンドも確認されない。逆に、PFGE 法の結果では、 λ ファージのバンドが確認されることができたら、バンド薄さの原因は、抽出段階の以外にあると考えられる。

ロードした活性汚泥ファージ DNA の量と λ ファージの量を表 3-1 に示す。

表 3-1 DNA を抽出する際に加えた λ ファージの量とサンプルの量

試料名・試料採取日	サンプル量 (μ g)	λ ファージの量 (μ g)
リアクターS 6.23	1.8	
リアクターS 6.24	2.2	
リアクターS 6.25	2.2	
リアクターS 7.01	2.5	
リアクターS 7.02	1.9	
リアクターS 7.03	1.3	
リアクターWL 6.23	1.1	1.36
リアクターWL 6.24	0.3	
リアクターWL 6.25	1.8	
リアクターWL 7.01	0	
リアクターWL 7.02	3.2	
リアクターWL 7.03	0.5	

検討実験 (2)

精製工程におけるバクテリオファージの回収効率の検討

精製に用いる限外ろ過膜として、Microcon-100 (Milipore, Bedford, MA, USA) を当初用いていたが、研究の途中でスピニング X-UF コンセントレーター (Corning) に変更した。それにあたって、同程度の性能を得ることができるかどうか検討した。

検討実験 (3)

ゲルにロードする試料量の検討

ゲルにロードする試料の量が泳動結果に及ぼす影響を検討した。試料が少なすぎればバンドを観察することができず、また、多すぎると分離がうまくいかない可能性がある。ここでは活性汚泥から得たバクテリオファージ DNA 試料ではなく、Pulse marker 0.1~200kbp

分子量マーカーを用いて検討した。

検討実験 (4)

Phi29 ポリメラーゼを用いたバクテリオファージ DNA の増幅

バクテリオファージの DNA 量を十分に得ることができなかつた場合、例えば PCR 反応のように、DNA の量を増幅することができるとう便利である。しかし、活性汚泥のファージ DNA の場合は PCR 法で増幅することはできない。適切なプライマーが存在しないからである。一方 phi29 ポリメラーゼ (QI Amp DNA Micro Kit, QIAGEN) はプライマーがなくとも DNA を増幅することができる酵素として知られている。ここでは phi29 DNA ポリメラーゼを用いて試料 DNA を増幅し、PFGE により分離できないか、検討した。

実験方法は次の通りである。

● 試料の作製

Buffer D1: Buffer DLB, 9 μ l + nuclease free water 32 μ l

Buffer N1: Stop solution, 12 μ l + nuclease free water 68 μ l

Master mix: Nuclease free water 10 μ l + reaction buffer +

DNA polymerase 1 μ l

サンプルの量: 10ng

先ず、2.5 μ l の鋳型の DNA をチューブに取った。その後、2.5 μ l の buffer D1 を加えてボルテックスし、スピンドウンした。室温で 3 分間を置いた。それから、5 μ l の buffer N1 を加えボルテックスし、スピンドウンした。試料に 40 μ l の master mix を加え、30°C で 16 時間を反応させ、65°C, 3 分間酵素を失活させた。

検討実験 (5)

蛍光染色剤の検討

PFGE 法にかけた後、泳動パターンを観察するために、DNA を蛍光染色する。SYBR Green I が用いられる事が多いが、安全性が高く感度も良好な Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (和光純薬工業株式会社) (以下 Gel Red) により代替できないか、検討した。SYBR Green I (FMC Bio-products, Rockland, ME, USA) は 1× の濃度で、また、Gel Red は 1× の濃度で調製し、いずれも 30 分間染色し、観察した。

3.4 各検討とその結果

3.4.1 バクテリオファージ DNA の抽出条件の確認

活性汚泥から得たファージ試料にλファージ DNA を加え、ファージから DNA を抽出する操作を行った。その結果を図 3-2 に示す。

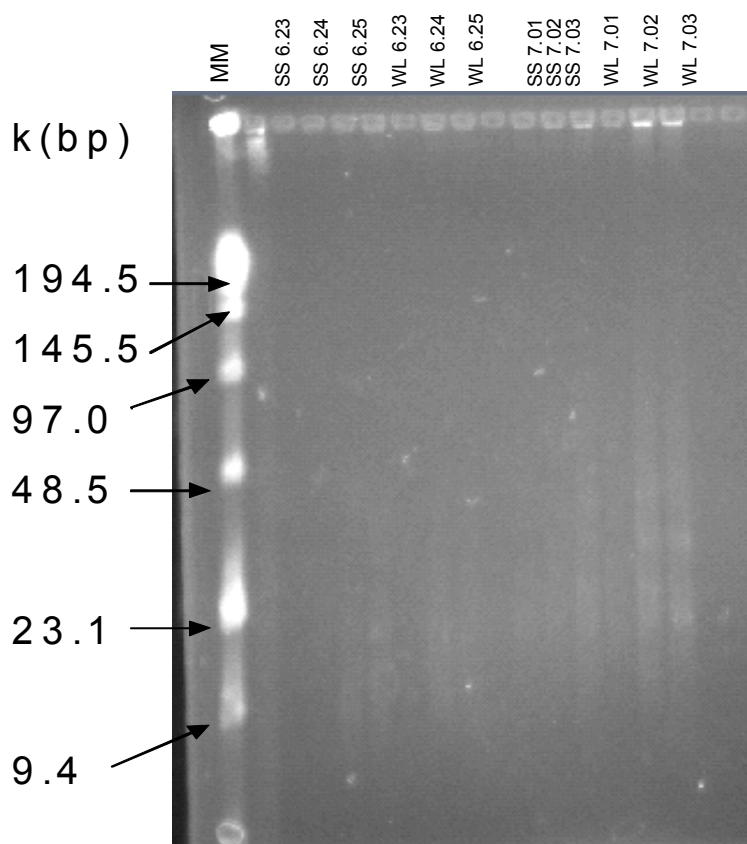


図 3-2 λファージ添加によるファージ DNA 抽出条件の確認

Lane1: 0.1~200kbp Pulse marker

Lane2: リアクター-S から抽出したバクテリオファージ 6月23日

Lane3: リアクター-S から抽出したバクテリオファージ 6月24日

Lane4: リアクター-S から抽出したバクテリオファージ 6月25日

Lane5: リアクターWL から抽出したバクテリオファージ 6月 23 日
 Lane6: リアクターWL から抽出したバクテリオファージ 6月 24 日
 Lane7: リアクターWL から抽出したバクテリオファージ 6月 25 日
 Lane8: リアクターS から抽出したバクテリオファージ 7月 01 日
 Lane9 リアクターS から抽出したバクテリオファージ 7月 02 日
 Lane10 リアクターS から抽出したバクテリオファージ 7月 03 日
 Lane11 リアクターから抽出したバクテリオファージ7月 01 日
 Lane12 リアクターWL から抽出したバクテリオファージ7月 02 日
 Lane11: リアクターWL から抽出したバクテリオファージ7月 03 日

SS6. 23, SS6. 24, SS6. 25, WL6. 23, WL6. 24, WL6. 25 のサンプルはスミアなバンドが得られた。SS7. 03, SS 7. 02, SS7. 03 のサンプルではおよそ 48. 5kbp のところに薄いバンドが確認された。また、SS6. 25, WL6. 24, WL6. 25, SS7. 02, SS7. 03, WL7. 02, WL7. 03 のサンプルは、およそ 23. 1kbp のところに薄いバンドが確認された。

バンドのはっきり観察できないことから、バクテリオファージが成功に抽出したかどうかを判断することができない。それによって、同じような条件で、バクテリオファージは、成功し抽出したかの実験を第 4 章の 4. 3. 1 の実験結果に示してある。

3.4.2 精製工程におけるファージの回収率の検討

表 1 Micoron™ 100 とスピん X-UF コンセントレーターを用い、
 精製したバクテリオファージの回収量

サンプル	DNA 回収率	
	Microcon-TM 100 (%)	スピん X-UF コンセントレーター (%)
WL6.26	0.11	0.08
WL6.30	0.11	0.08
WL7.01	0.09	0.13
WL7.03	0.4	0.11
WL7.08	0.15	0.16
WL7.09	0.21	0.2
WL7.10	0.12	0.07

DNA 回収率

$$= (\text{DNA 最終濃度} \times \text{サンプルの量} / \text{DNA 最初濃度} \times \text{サンプル量}) \times 100\% \quad (\text{式 1})$$

両方の精製チューブによるバクテリオファージの回収量の差は、 $\pm 0.1 \sim 0.4$ の範囲内にある。この結果から、Microcon に代えて X-UF コンセントレーターを用いても問題ないと考えられる。

3.4.3 ゲルにロードする試料量の検討

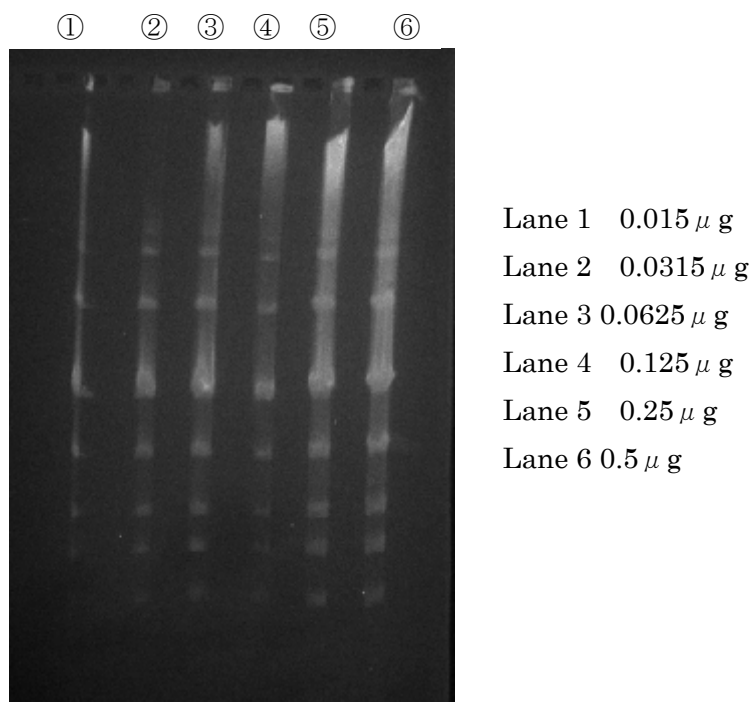


図 3-3 Pulse marker 0.1~200kbp を用い、PFGE に載せる分子量マーカの量の検討

図 3-3 は Pulse marker 0.1~200kbp を用い、ゲルにロードする試料量の検討の結果である。0.5 μg の分子量マーカを載せた Lane ⑥ ではスメアなバンドが得られた。載せる分子量マーカの量を減らせば減らすほど、バンドがくっきりとなるのが分かった。lane1 には、0.015 μg の分子量を載せた。バンドはスメアとなっていない。そして、くっきりとしたバンドが得られた。このような結果から、載せる分子量マーカの量を最小限をすることで、スメアなバンドを抑えることができると分かった。分子量マーカを観察できる範囲で、尚且つスメアなバンドを抑制するには、今後の PFGE 実験に載せる分子量マーカの量を 0.02 μg は最適な範囲であると考えられる。

3.4.4 Phi29 ポリメラーゼを用いたバクテリオファージ DNA の増幅

バンドは薄くて、なかなか観察できない原因の一つとしては、DNA の量は少なかつたであると考えられる。そこで、任意の DNA template をターゲットし、増幅できる phi29 ポリメラーゼを用い、DNA を増幅した後、PFGE にかけた。また、phi29 ポリメラーゼで増幅してないサンプルと比較してみた。

(a) Phi29 ポリメラーゼで増幅したサンプルを PFGE にかけた結果

材料：リアクターS、リアクターWLWasana&Li から抽出したバクテリオファージ

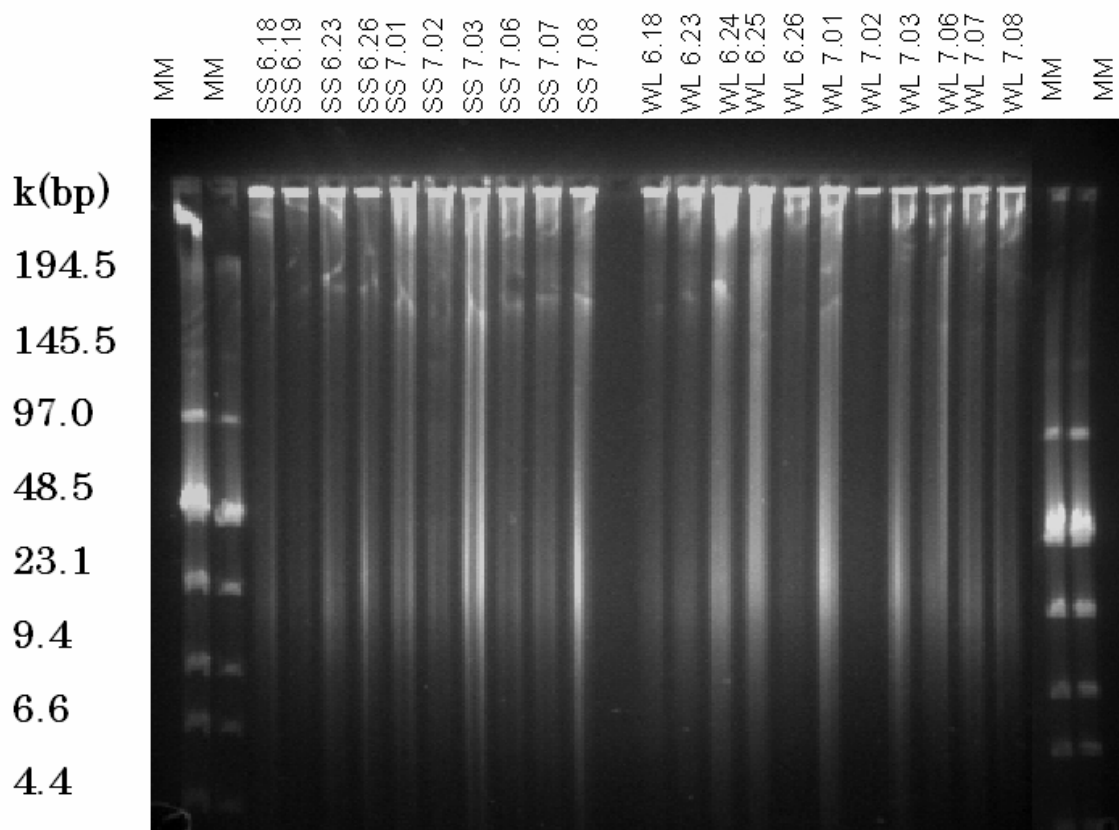


図 3-4 (a) リアクターS、Wasana&Li さんのリアクターから採取した上澄みで抽出したバクテリオファージを phi29 ポリメラーゼで処理し、PFGE で分離した結果

PFGE 条件：

6V/cm, 18hr, 14°C, スイッチタイム 1~10, 0.5×TBE, 2%Sea Kem Agarose

SS6.23, SS6.26, SS7.01, SS7.02, SS7.03, SS7.06, SS7.07, SS7.08 のサンプルは、194.5kb のところにバンドが確認された。更に、SS7.02 のサンプルでは、145.5kbp や 97.0kbp のところに、バンドが確認された。但し、今回のサンプルは、PFGE にかける前に、phi29 ポリメラーゼで処理を行った。この処理によって、元々のバクテリオファージの長さに影響を与えたと考え、phi29 ポリメラーゼ処理を行わずに、PFGE でバクテリオファージを分離する必要があると考えられる。

(b)Phi29 ポリメラーゼで増幅なしのサンプルを PFGE にかけた結果

材料：リアクターS から抽出したバクテリオファージ

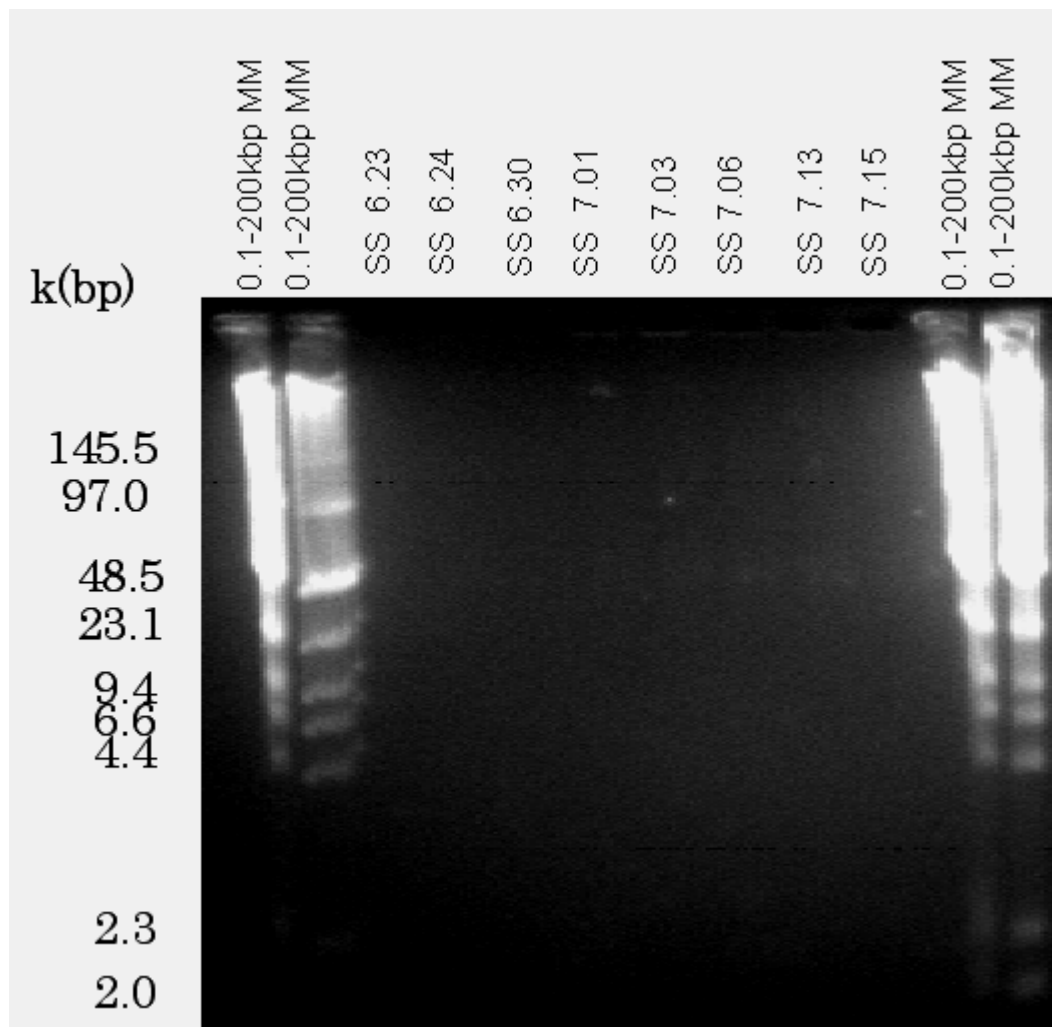


図 3-4(b) phi29 ポリメラーゼで処理を行わずに、PFGE 法を用いたバクテリオファージの分離

PFGE 条件：

DNA 濃度 $0.02 \mu\text{g}$, 6V/cm, 18hr, 14°C, スイッチタイム 1~10, 0.5×TBE, 2%Sea Kem Agarose

SS7.01, SS7.03, SS7.06, SS7.13, SS7.15 のサンプルは、およそ 48.5kbp のところにバンドが確認された。確認されたバンドが薄くて、抽出したバクテリオファージは少なかつたせいであると考えられる。今回用いたサンプルを精製した際に、違う種類の精製チューブを用いた。そこで、精製今まで用いた精製チューブと新しいチューブのバクテリオファージの回収量の実験を行った。

図 3-4 (a) と図 3-4 (b)を比較してみたところ、phi29 ポリメラーゼで増幅したサンプルは、バンドらしいものが確認されたが、それはバンドであると判断することができない。更に、サンプル全体はスメアになった。

一方、図 3-4 (b)は、くっきりとしたバンドが確認された。また、バンドはスメアにならなくて、バックも現れない。

このような結果から、PFGE にかけるサンプルは、phi29 ポリメラーゼ処理を行うと、バンドはスメアになり、うまく分離できないことがわかった。それによって、今後の実験は、phi29 ポリメラーゼ処理なしで、PFGE にかけた。

今まで、PFGE にかけたサンプルは、Sybr Green を用いて染色を行った。実験室内で、2種類の染色剤を用い、それぞれの結果を比較してみた。

3.4.5 蛍光染色剤の検討

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧

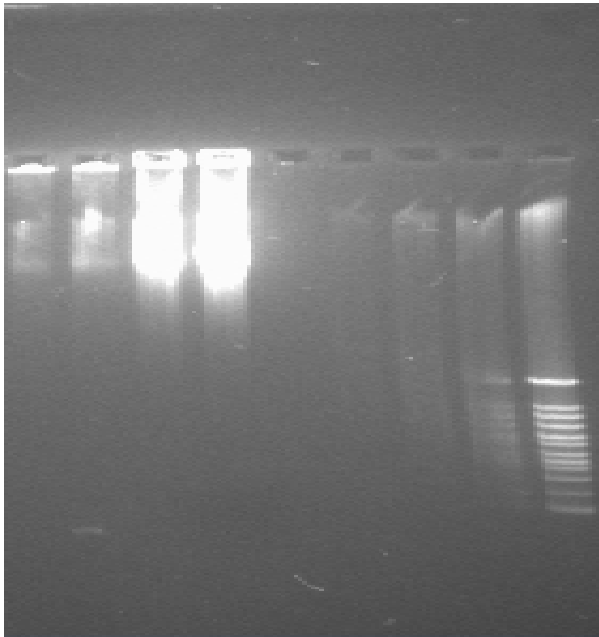


図 3-5 (a) Sybr Green を用いた分量マーカの染色

Lane 1 CHEF DNA Size Standards 0.025 μ g
 Lane 2 CHEF DNA Size Standards 0.05 μ g
 Lane 3 CHEF DNA Size Standards 0.10 μ g
 Lane 4 CHEF DNA Size Standards 0.2 μ g
 Lane 5 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.02 μ g
 Lane 6 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.05 μ g
 Lane 7 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.1 μ g
 Lane 8 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.2 μ g

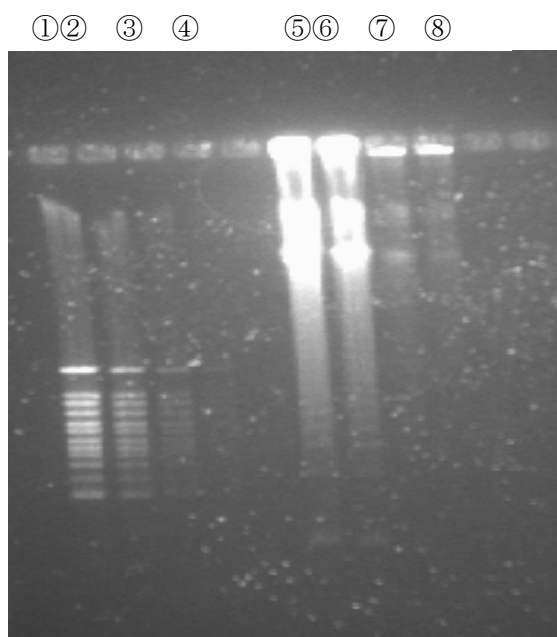


図 3-5(b) Gel Red を用いた分子量マーカーの染色

Lane 1 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.02 μ g
 Lane 2 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.05 μ g
 Lane 3 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.1 μ g
 Lane 4 DNA Siza standards 5kbp ladder 0.2 μ g
 Lane 5 CHEF DNA Size Standards 0.2 μ g
 Lane 6 CHEF DNA Size Standards 0.10 μ g
 Lane 7 CHEF DNA Size Standards 0.05 μ g
 Lane 8 CHEF DNA Size Standards 0.025 μ g

図 3-5 (b) Gel Red の結果では、図 3-5 (a) Sybr Green で検出できなかったバンドを検出できたことがわかった。この結果から、今後の PFGE 結果は、Sybr Green で染色するのではな

く、Gel Red で染色することに決めた。

3.4.6 PFGE 法で分離したバクテリオファージ

3.4.1 から 3.4.5 の検討実験の結果を踏まえ、PFGE 実験を行った。

(a)材料：リアクターS1 から抽出したバクテリオファージ

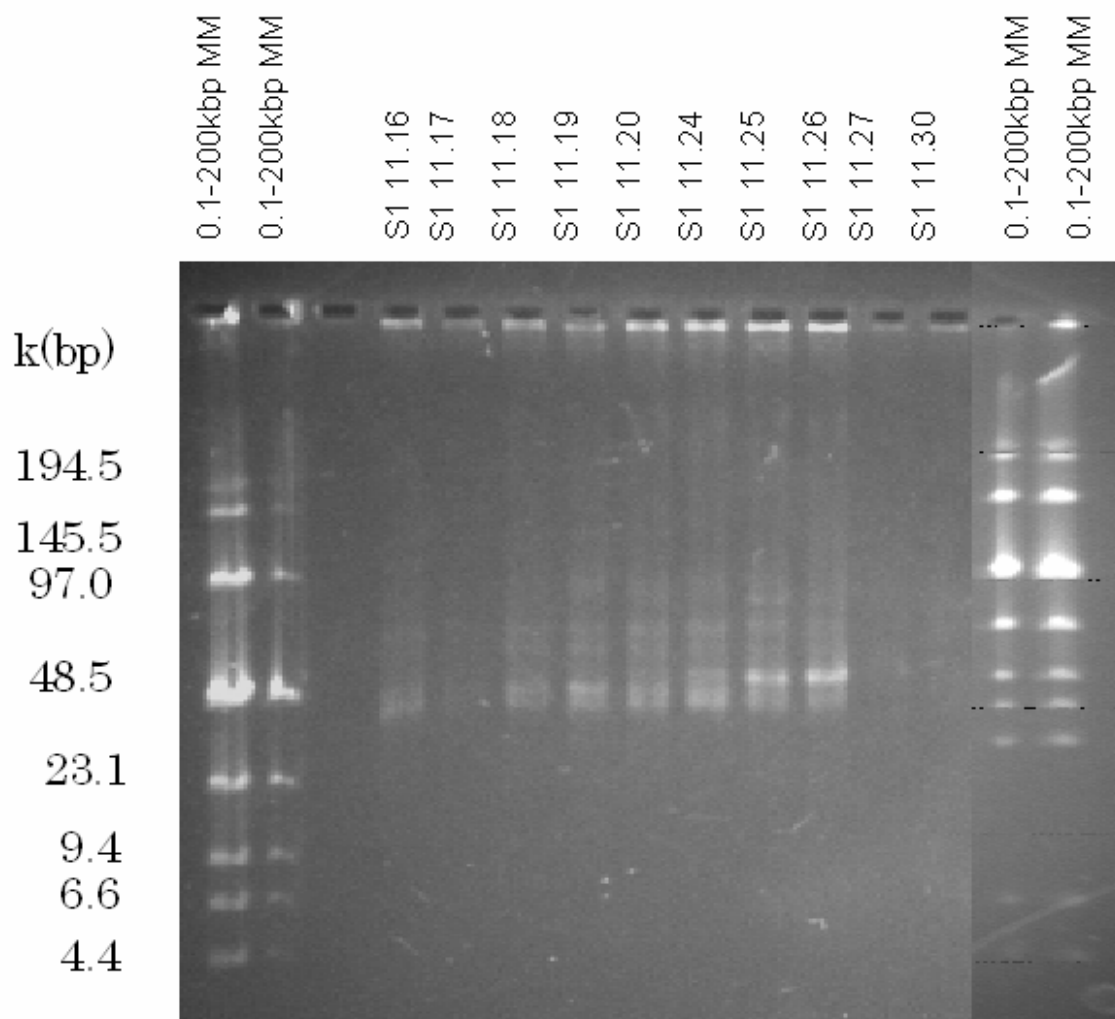


図 3-6 (a) PFGE 法を用いたバクテリオファージの分離

PFGE 条件：

DNA 濃度 $0.02 \mu\text{g}$, $6\text{V}/\text{cm}$, 18hr , 14°C , スイッチタイム $1\sim 10$, $1.0\times\text{TAE}$, $2\%\text{Sea Kem Agarose}$, Gel Red stain

図 3-6(a)は、リアクターS から抽出したバクテリオファージを PFGE 法で分離した結果

である。分子量マーカーやサンプルのバンドは、きれいに分離された。S1 11.16, S1 11.18, S1 11.19, S1 11.20, S1 11.24 のサンプルは、48.5kbp, 48.5~97.0kbp のところにバンドが確認された。S1 11.25, S1 11.26 のサンプルでは、48.5kbp よりやや上のところにバンドが確認された。

(b)材料：リアクターWL から抽出したバクテリオファージ

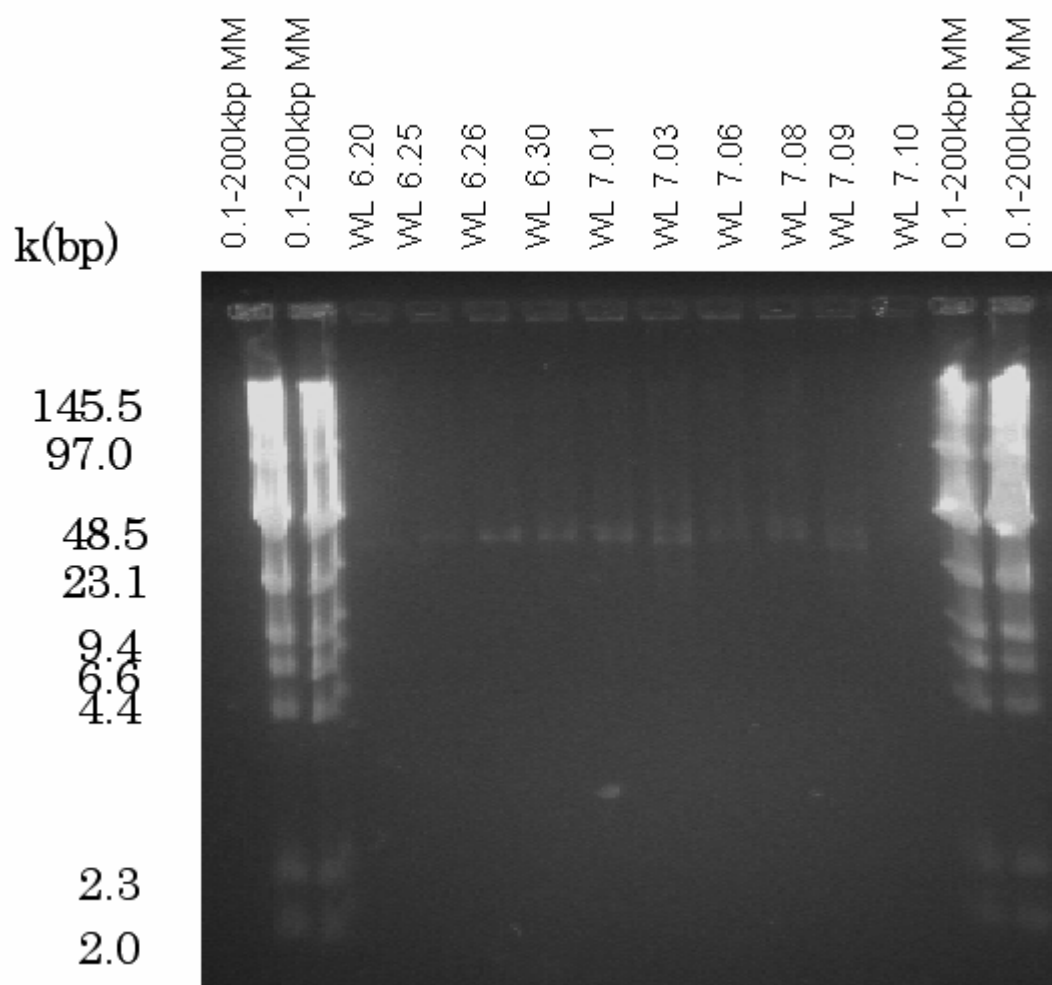


図 3-6(b) PFGE 法を用いたバクテリオファージの分離

PFGE 条件：

DNA 濃度 $0.02 \mu\text{g}$, 6V/cm, 14hr, 14°C, スイッチタイム 1~10, $0.5 \times \text{TBE}$, 2%Sea Kem Agarose, Gel Red Stain

図 3-6(b)はリアクターWL から抽出したバクテリオファージを PFGE 法で分離した結果

である。全てのサンプルにおいて、おおよそ 48.5kbp のところにバンドが確認された。WL7.01, WL7.03, WL7.08, WL7.09 のサンプルは、二つのバンドが重なっていることが確認された。

3.4.1 から 3.4.5 の検討実験の結果を踏まえ、PFGE 法でバクテリオファージを分離することに成功した。

3.5 考察・結論

本研究では、PFGE 法を用い、バクテリオファージを分離するには、いろいろ困難に直面した。なかなかきれいな泳動パターンを得ることができず、問題を克服するために多くの時間を費やしてしまった。うまくいかなかった原因は、現在次のように捉えている。

- 抽出時の問題：ファージを試料から抽出する際に、初期の段階では 1×TE バッファーを用いていた。小田和は 1×TE ではファージ DNA が残存する DNase によって分解されてしまうことを報告し、100×TE を用いる事でその問題を解決している。本研究でも 100×TE を導入し、その後、うまくいくようになった。
- 試料の DNA 濃度を確認していなかった：PFGE 法にかけるときに、どの程度の量の試料 DNA が必要なのか、また、多すぎるとどうなるのか、把握していなかった。本研究では後半では試料の DNA 濃度を必ず定量するようにした。
- PFGE 装置本体に問題があった：本研究で用いていた PFGE 装置は一時期水温の制御がうまくいかず、本来 14°C ± 2°C 程度で制御されるはずが、10°C ~ 18°C 程度の間で変動していた。泳動槽内にガラス棒温度計を沈め水温を確認するようにした。また、装置を修理したのち、水温変動の問題は改善された。
- 試料のピペッティングを最低限にするようにした：一般に高分子 DNA を用いる際には DNA が物理的に切断されてしまうのでピペッティングは避けた方がよいと言われている。しかし、本研究でははじめのころはそのことを知らず、よく混ぜるためにしっかりとピペッティングを行っていた。それが仇となった。

さらに、本研究では手法を改善するために、限外ろ過膜を比較検討し、また、結果的に適用できないと判断したものの、phi29DNA ポリメラーゼでの試料の増幅について検討した。更に、蛍光染料もより安全なものを導入することができた。

いろいろの検討実験を踏まえた上、最終的には PFGE 法を用いてバクテリオファージを分離することに成功した。

第4章 制限酵素断片多型法 (RFLP 法) による

バクテリオファージのプロファイリング

4.1 実験背景と目的

第3章では、バクテリオファージを分離するために、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) を用いた。この方法では、どのような DNA サイズのバクテリオファージが存在することを調べることができた。そこで、バクテリオファージをより詳しくプロファイリングするために、本章では制限酵素断片多型 (RFLP 法) を用いた。

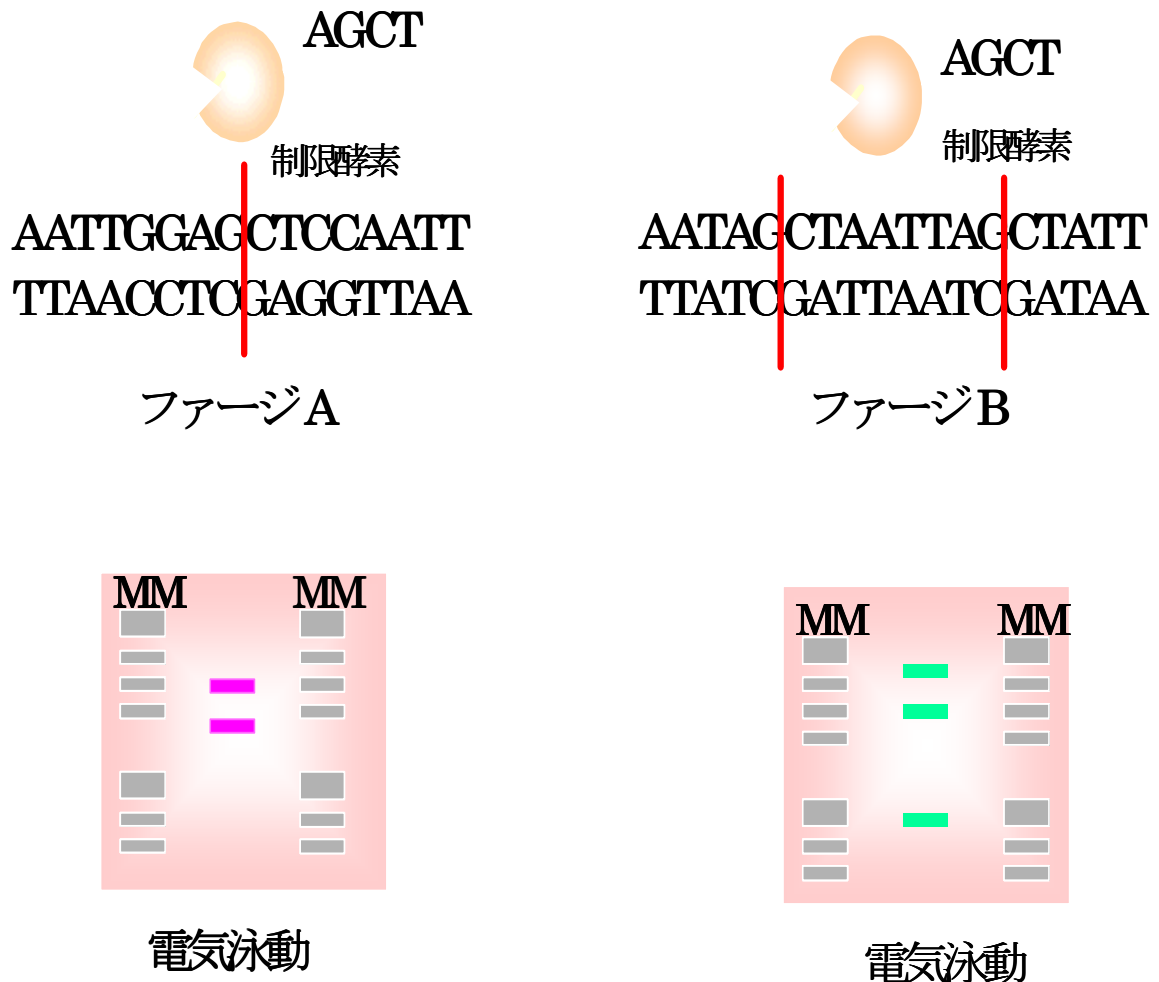


図 4-1 制限酵素断片多型法 (RFLP 法) の原理

図 4-1 の左上にバクテリオファージの塩基配列、右上のバクテリオファージの塩基配列が示されている。実験に用いた制限酵素は、ある特定の塩基配列 AGCT を認識する。例えばこの例ではバクテリオファージ A の場合は、認識される配列は一箇所しかない。制限酵素はこの一箇所の塩基配列をを意識し、一箇所のみを切断する。よって、得られる電気泳動パターンは図の左下になる。一方、バクテリオファージ B は、制限酵素に 2 箇所を認識される。制限酵素はこの 2 箇所を切断することで、図 4-1 の右下のような切断パターンが得られる。

4.2 実験方法

本実験で用いた試料は PFGE 法と同じ試料である。試料を採取し、さまざまな濃縮・精製の操作を経てカプシドからファージ DNA を抽出するまでの操作は PFGE 法の場合と同じである。(3.3.1 参照)

まず、採取した処理水を $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターによりろ過した。ろ液の中に存在する遊離の DNA や RNA を除去するために、DNase と RNase 処理を行った。DNaseI(フナコシ、東京) と RNaseA(和光純薬、東京)をそれぞれ最終濃度で $10\ \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、 37°C で 30 分反応した。

処理後のサンプル 26ml を、超遠心分離機でバクテリオファージを濃縮した。ここでは、Hitachi Koki CP80WX 超遠心機、Hitachi 社のアングルロータ RP70T-457 を用いた。遠心速度は $30,000\times g$ 、遠心時間 80 分、温度 20°C で運転した。

遠心分離終了後、上澄みをデカントにより除去し、沈殿しているバクテリオファージを $800\ \mu\text{l}$ の $100\times\text{TE}$ バッファーに懸濁し、 4°C にて保存した。

濃縮したバクテリオファージを、Microcon-100 ユニット (Milipore, Bedford, MA, USA) を用いて精製した。まず、濃縮ファージサンプルを Microcon-100 カラム (青色円筒状のもの) 内に移し、カラムを付属チューブにセットした。キャップを閉め、 $1000\times g$ の速度で遠心した。フィルター表面が完全に乾燥せずにカラム内のフィルターの淵に $10\ \mu\text{l}$ ほどのサンプルが残っている状態で、8 分ほど遠心した。遠心が終わったら、 $100\times\text{TE}$ バッファー $50\ \mu\text{l}$ を添加し、更に $1000\times g$ 、8 分遠心した。この時も、膜表面が完全に乾燥しないように、カラム内のフィルターの淵に $10\ \mu\text{l}$ ほどのサンプルが残っているように、適宜遠心時間を調整した。同じよう操作を更に 2 回繰り返した。最後に、 $10\ \mu\text{l}$ の $100\times\text{TE}$ バッファーを添加し、フィルターに触れる事がなく、ピペットで剥がすための吸引、吐出を繰り返した。カラムを新しい遠心チューブに反対向きにセットし、 $250\times g$ で 1 分遠心を行い、DNA を溶出した。およそ、 $15\ \mu\text{l}$ のファージ精製液が得られた。その後、ウオーターバスを用いて、 60°C 、20min 加熱処理し、濃縮したバクテリオファージから、DNA を抽出した。

抽出した DNA を制限酵素処理を行った。用いた制限酵素としては SalI と HindIII である。それぞれ制限酵素の処理条件を表 4-1 と表 4-2 に示してある。 37°C で 2 時間制限酵素処理

後、65°Cで10分酵素を失活させた。制限酵素で処理したサンプルをアガロース電気泳動にかけ、EtBrで染色し、泳動パターンを観察した。また、制限酵素断片多型法（RFLP法）の実験の流れは、図4-2に示してある。

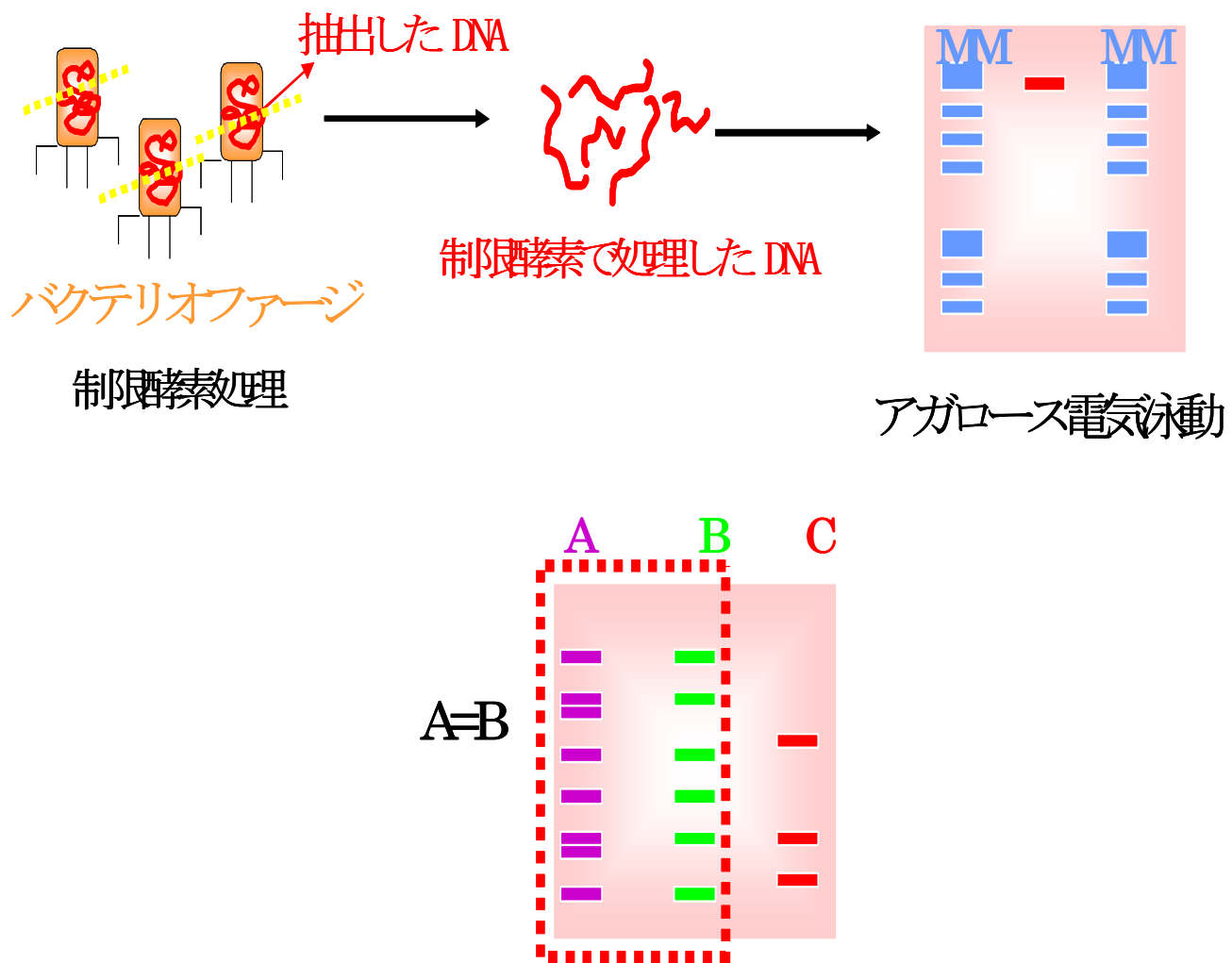


図 4-2 制限酵素断片多型（RFLP法）の実験方法

表 4-1 SaII 制限酵素処理の反応条件

Component	Final conc	Volume
DNA sample	0.25 μ g	-
100 \times BSA	1 \times	1
10 \times NE buffer	1 \times	1
restriction enzyme	20unit	1
ddH2O	-	-
		13 μ l

表 4-2 HindIII 制限酵素処理の反応条件

Component	Final conc	Volume
DNA sample	0.25 μ g	-
10 \times NE buffer	1 \times	1
restriction enzyme	20unit	1
ddH2O	-	-
		10 μ l

本格的な実験を始める前に、用いる制限酵素は、サンプルをうまく切断できるかどうかという検討実験を行った。

表 4-3 λ ファージを用いた検討実験

	サンプル量 (μ g)	λ ファージの量 (μ g)
リアクターS 6.18	1.2	
リアクターS 6.19	3.6	
リアクターS 6.23	1.8	2.04
リアクターWL 6.18	0.9	
リアクターWL 6.19	0.1	
リアクターWL 6.23	1.1	

4.3 実験結果

4.3.1 λファージを用いた制限酵素処理の検討

(a) 材料：リアクターS, リアクターWL から抽出したバクテリオファージ
制限酵素：SalI

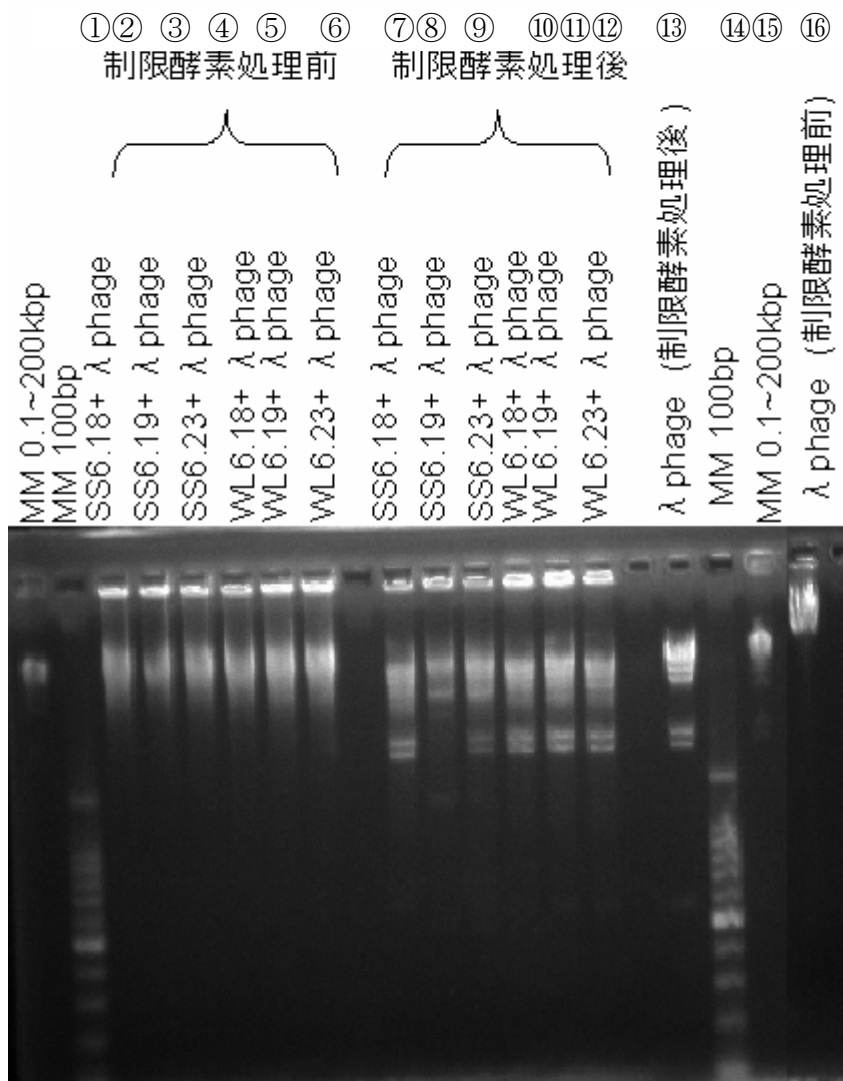


図 4-3 λファージを用いた制限酵素の検討

Lane①～⑥は、制限酵素 SalI の処理を行う前の結果である。

Lane⑦～⑫は、制限酵素 SalI の処理を行った後の結果である。

図 4-3 では、λファージを用いて、SalI 制限酵素の検討実験結果である。

Lane16 はλファージを制限酵素で処理する前の結果で、lane13 は制限酵素処理で行った結果である。この結果からλファージは、SalI 制限酵素により切断できることが分かった。

また、今回のバクテリオ DNA を抽出する際に、λファージを加えた。λファージは無事に検出することができるという結果から、バクテリオファージ DNA を抽出する際に、温度などの要因によって壊れていないことが分かった。

(b)材料：リアクターS, リアクターWL から抽出してバクテリオファージ

制限酵素：HindIII

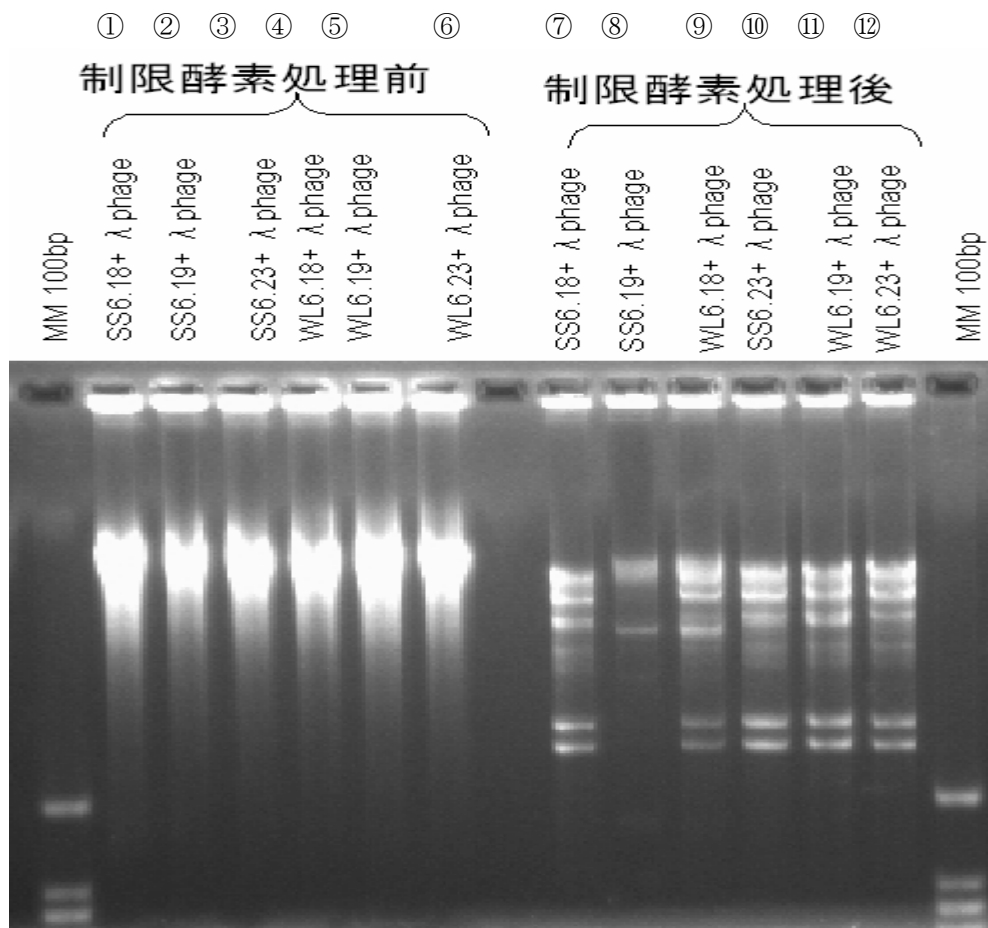


図 4-4 λファージを用いた制限酵素の検討

図 4-4 はλファージを用いて、SalI 制限酵素の検討実験結果である。

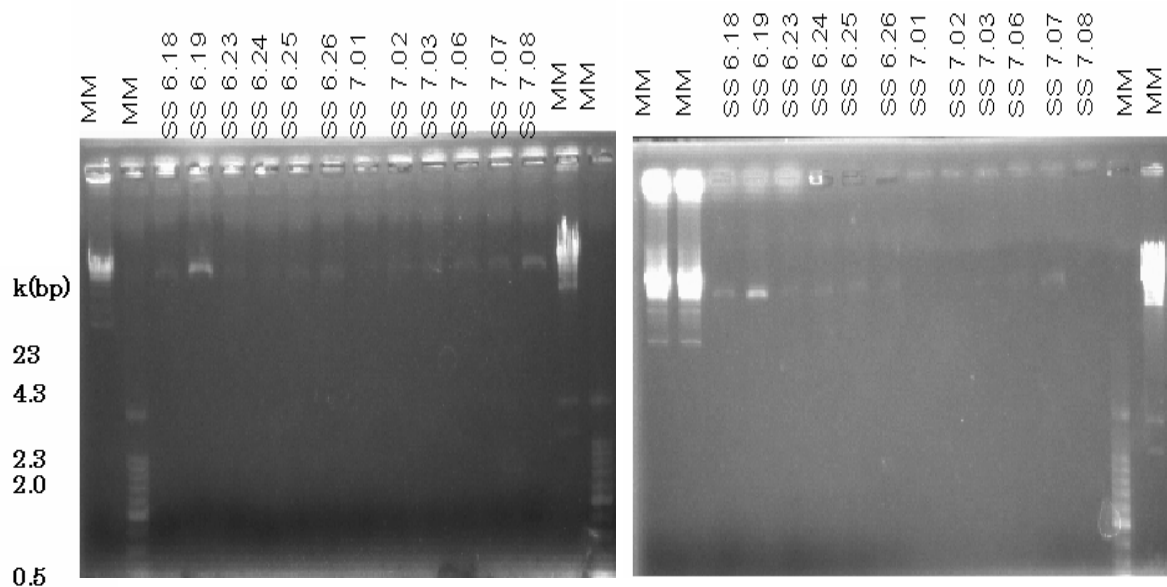
Lane①～⑥は、制限酵素 SalI の処理を行う前の結果である。

Lane⑦～⑫は、制限酵素 SalI の処理を行った後の結果である。

この結果によって、バクテリオファージは HindIII で切断することができることが分かった。

4.3.2 制限酵素を用い、バクテリオファージのプロファイリングの試み

4.3.2.1 SalI 制限酵素によるプロファイリング



(a) SalI 制限酵素処理前

(b) SalI 制限酵素処理後

図 4-5 SalI 制限酵素を用いたプロファイリング

図 4-5 は、SalI 制限酵素を用いたプロファイリングした結果である。図 4-5(a)は制限酵素処理前の結果、図 4-5(b)は制限酵素処理後の結果を示している。

全てのサンプルは、SalI 制限酵素により切断されなかった。

4.3.2.2 HindIII 制限酵素によるプロファイリング

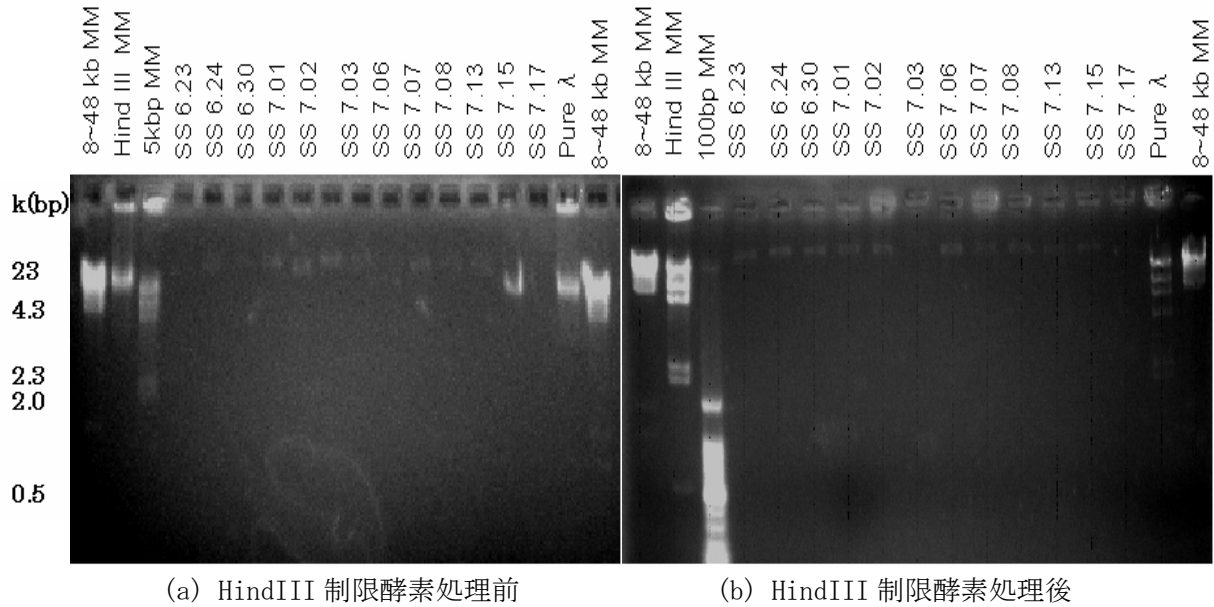


図 4-6 HindIII 制限酵素を用いたプロファイリング

図 4-6 は、HindIII 制限酵素を用いたプロファイリングした結果である。図 4-6(a)は制限酵素処理前の結果、図 4-6(b)は制限酵素処理後の結果を示している。

全てのサンプルは、HindIII 制限酵素により切断されなかった。

活性汚泥リアクターS および WL から得た試料を SalI および HindIII を用いて消化し、RFLP により解析した。図 4-5 および図 4-6 はそれぞれお活性汚泥リアクターS の試料を SalI および HindIII をもちいて解析した結果である。また、図 4-7 および図 4-6 はそれぞれお活性汚泥リアクターWL の試料を SalI および HindIII をもちいて解析した結果である。

いずれの場合も、残念ながら制限酵素での消化はうまくいかなかった。

4.3.3.3 SalI 制限酵素によるプロファイリング

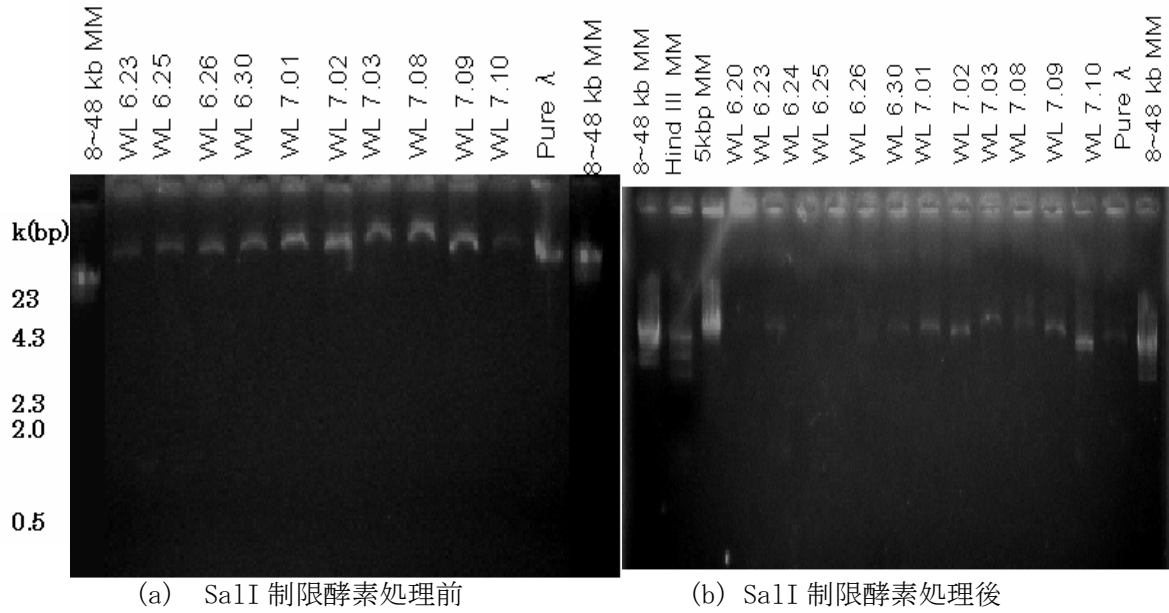


図 4-7 SalI 制限酵素を用いたプロファイリング

4.3.3.4 HindIII 制限酵素によるプロファイリング

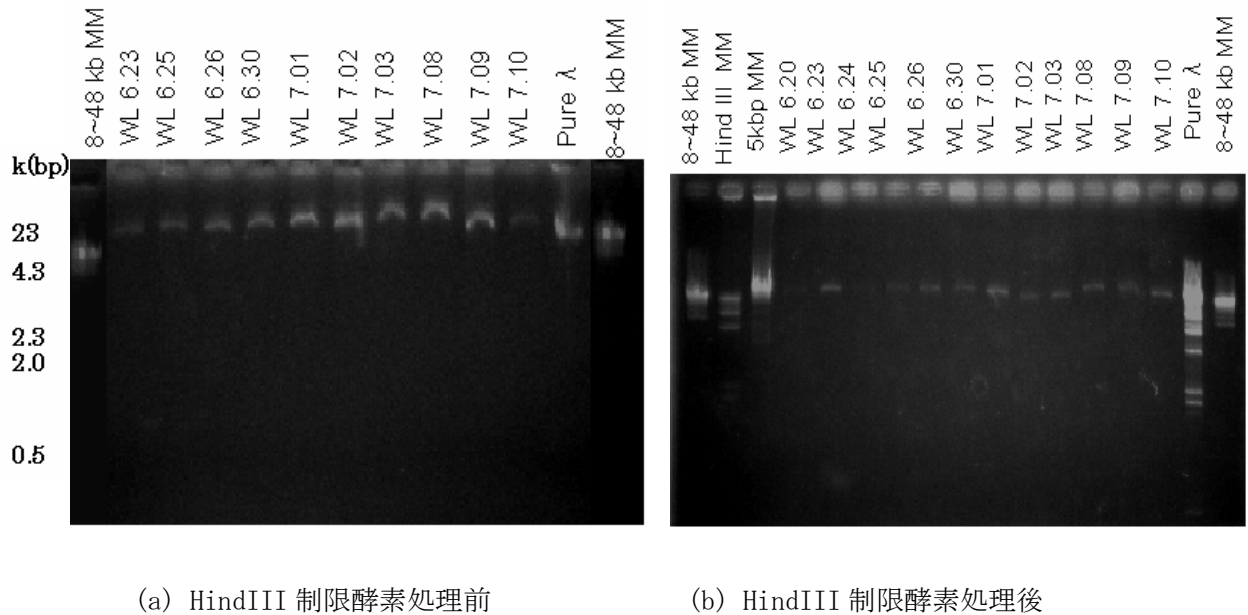


図 4-8 HindIII 制限酵素を用いたプロファイリング

4.4 制限酵素に切断されない原因およびその対策

図 4-9 では、バクテリオファージ DNA が制限酵素に切断されない理由とその対策を示す。ファージは、自己防衛のために、その DNA はメチル化されている状態となる。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。そして、考え出した対策方法としては、phi29 ポリメラーゼを用いて、ファージの DNA を増幅することである。このポリメラーゼを用いると、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。

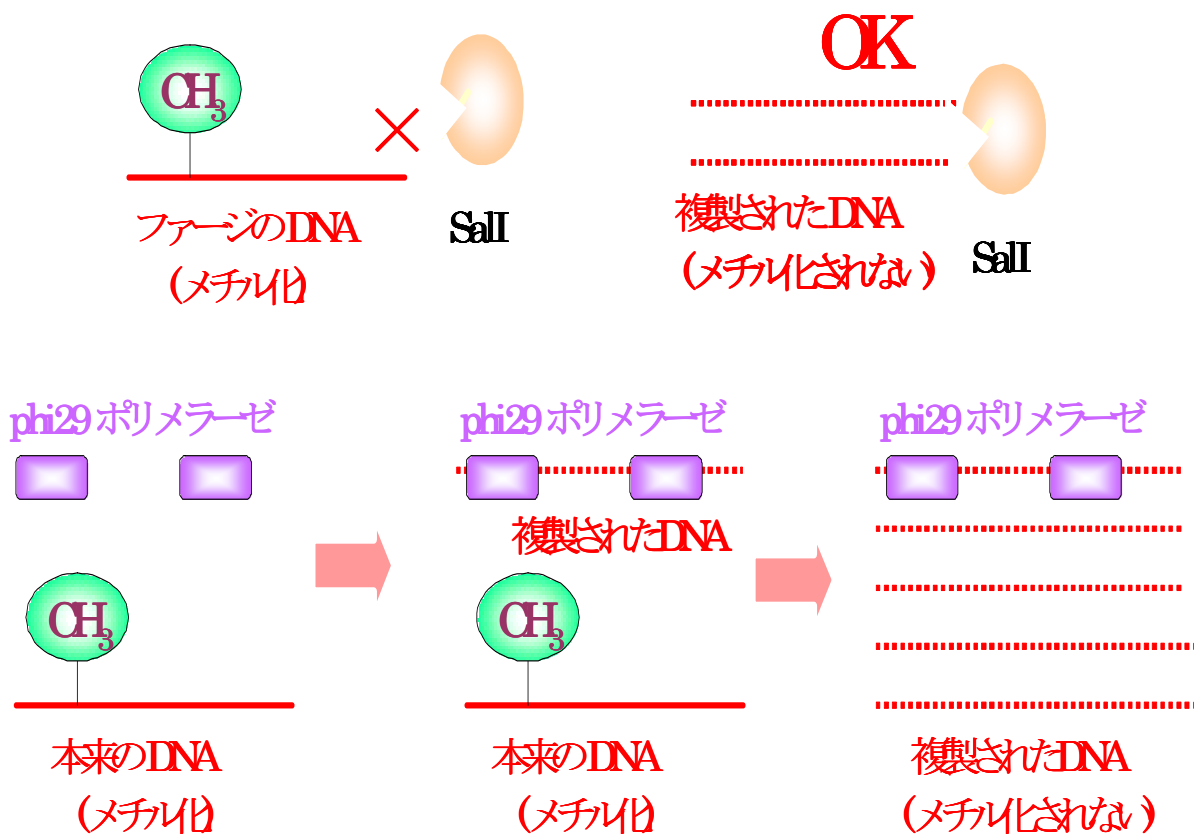


図 4-9 制限酵素に切断されない理由とその対策

4.4 章ではバクテリオファージ DNA が制限酵素に切断されない理由とその対策方法を述べた。4.5 章では、その対策方法として phi29 ポリメラーゼでバクテリオファージを処理し、RFLP 法を用いたバクテリオファージのプロファイリングした結果である。

4.5 Phi29 ポリメラーゼを処理し、制限酵素を用いたバクテリオファージのプロファイリング

4.5.1 SalI 制限酵素によるプロファイリング

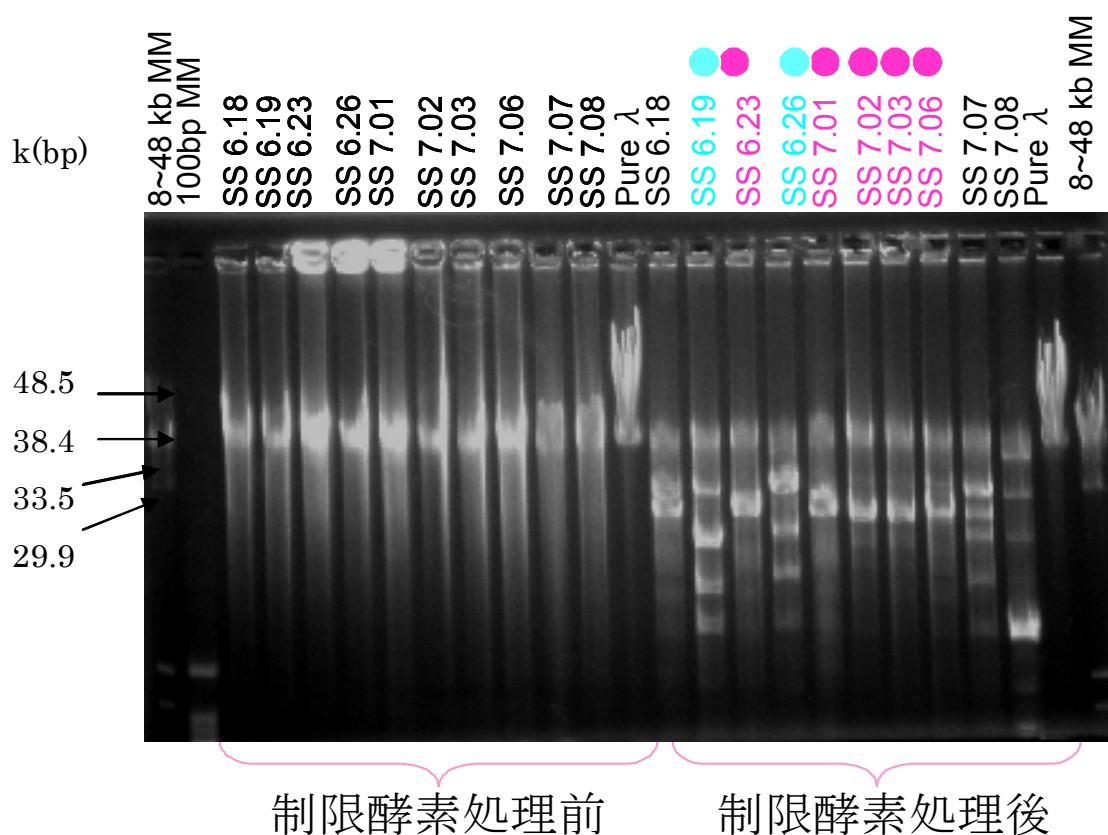


図 4-10 SalI 制限酵素を用いたバクテリオファージのプロファイリング

図 4-10 では、SalI 制限酵素を用いたバクテリオファージの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にうまく切断され、プロファイリングすることができた。更に、SS6.19, SS6.26[●] のサンプルは同じようなプロファイリング結果を得られた。更に、SS6.23, SS7.01, SS7.02, SS7.03, SS7.06[●] は同じようなプロファイリング結果を得られた。

4.5.2 SalI 制限酵素によるプロファイリング

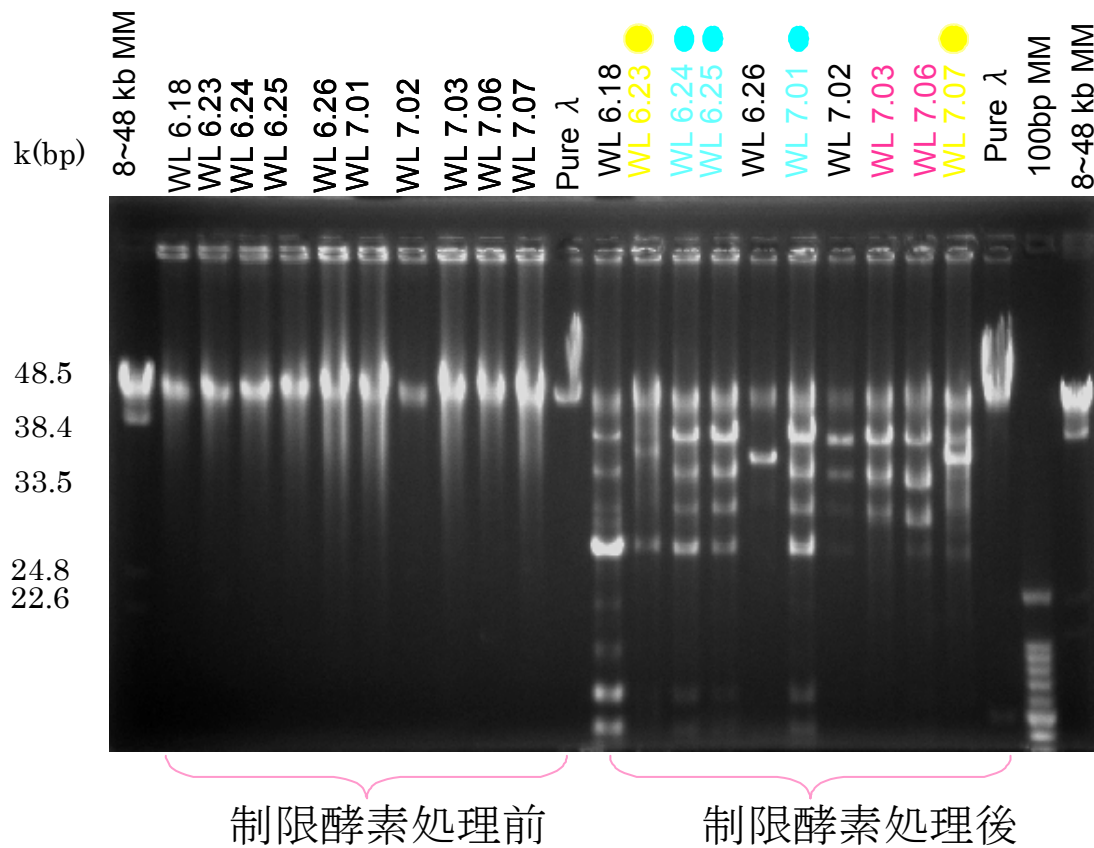


図 4-11 SalI 制限酵素を用いたバクテリオファージのプロファイリング

図 4-11 では、SalI 制限酵素を用いたバクテリオファージを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にうまく切断され、プロファイリングすることができた。更に、WL6.23, WL7.02 ● は同じプロファイリング結果を得られた。WL6.24, WL6.25, WL7.01 ● は同じようなプロファイリング結果、WL7.03、WL7.06 のサンプルは ● 似たプロファイリング結果を得られた。

4.5.3 HindIII 制限酵素によるプロファイリング

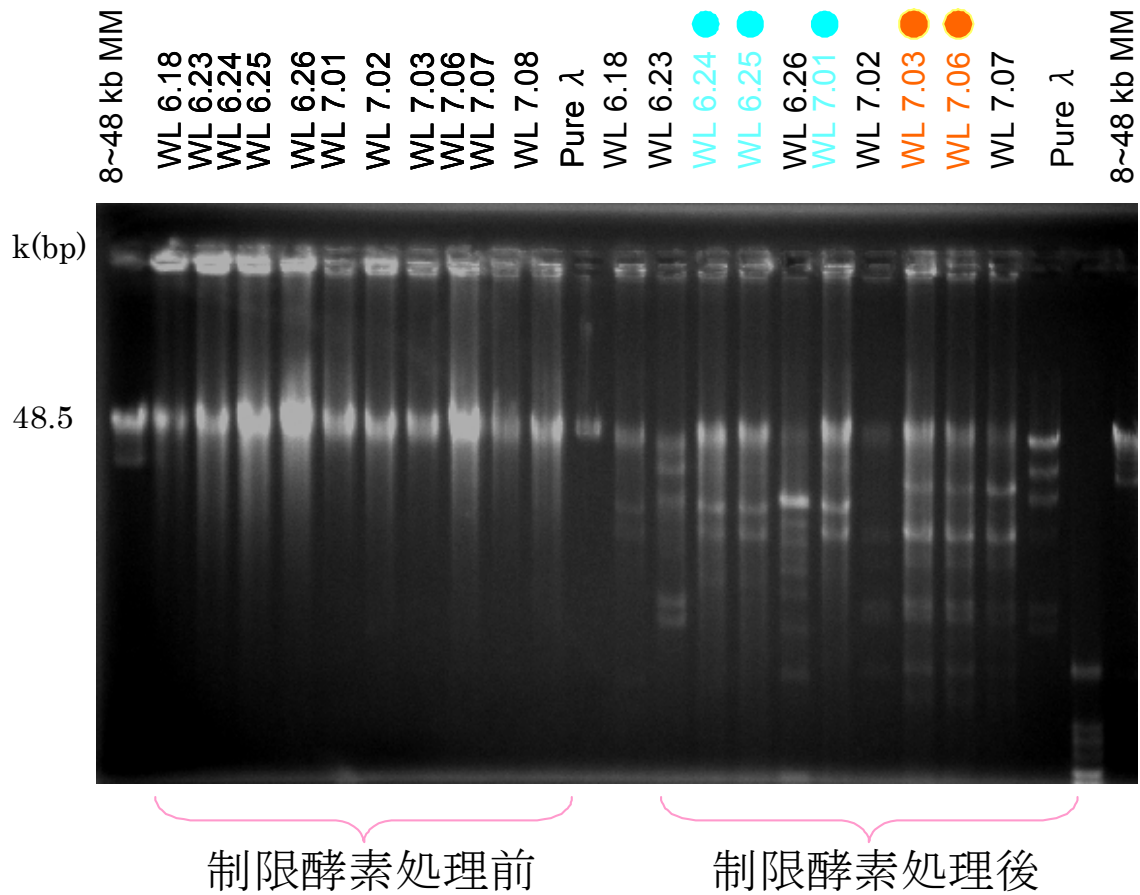
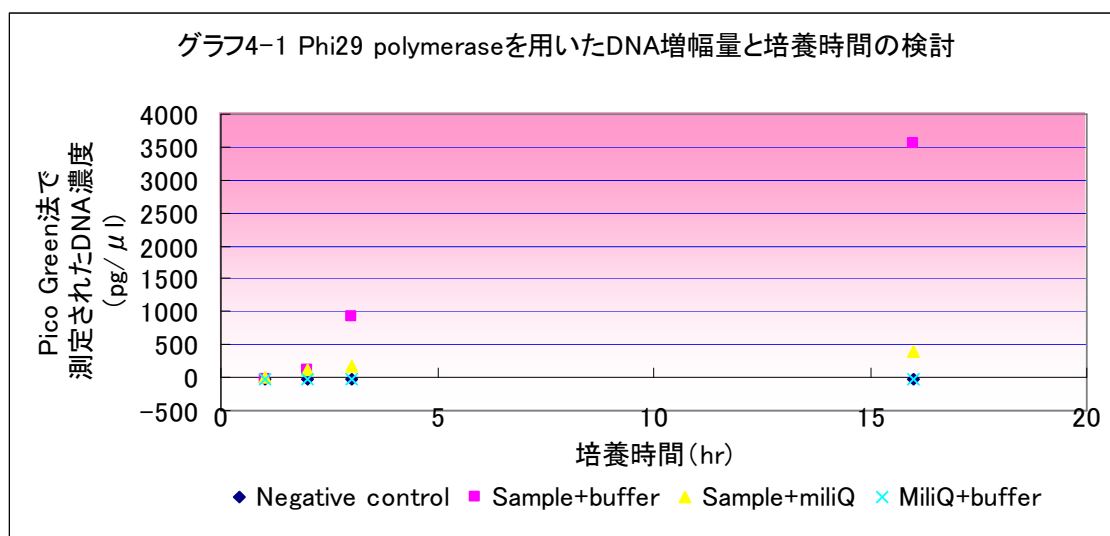


図 4-12 HindIII 制限酵素を用いたバクテリオファージのプロファイリング

図 4-12 では、HindIII 制限酵素を用いたバクテリオファージを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にうまく切断され、プロファイリングすることができた。更に、WL6.24, WL6.25, WL7.01 ● は同じようなプロファイリング結果、WL7.03、WL7.06 のサンプル ● は似たプロファイリング結果を得られた。

4.6 phi29 ポリメラーゼでの処理の時間検討

今まで、phi29 ポリメラーゼを用い DNA を増幅した実験ですが、ネガティブコントロールの実験を検討していない。ここで、培養時間に対して、ネガティブコントロールやサンプルの増幅度合いを調べた。用いたサンプルとしては、11月26日にリアクターS1から抽出したバクテリオファージの DNA である。



グラフ 4-1 に示してあるように、ネガティブコントロールやバクテリオファージ DNA+phi29 ポリメラーゼ+バッファー、バクテリオファージ DNA+mili Q, miliQ+phi29 ポリメラーゼ+バッファーは、培養時間が増えるにもかかわらず、DNA の濃度はほとんど増幅してないことが分かった。それに対して、バクテリオファージ DNA+バッファー+phi29 ポリメラーゼのサンプルでは、時間が増えると共に、DNA 濃度が増加した。このような結果から、phi29 ポリメラーゼを用い、バクテリオファージを DNA を増幅する時間は、16 時間までは適切な時間であると考えられる。

※しかし、同じような条件で、実験を行い、Negative control でも増えることが観察されたときがあったので、それについて再検討する必要があると考えられる。

- ◆ Negative control (Phi29 ポリメラーゼ+バッファー)
- バクテリオファージ+phi29 ポリメラーゼ+バッファー
- ▲ バクテリオファージ+miliQ
- × miliQ++phi29 ポリメラーゼバッファー

4.7 RFLP 法結果のまとめ

表 4-4 各リアクターから採集した上澄みを RFLP 法による
バクテリオファージのプロファイリング結果

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

WL: リアクターWL から抽出したバクテリオファージ

SS: リアクターSS から抽出したバクテリオファージ

NA: 未実験

● : 切断された

× : 切断されない

表 4-4 に、リアクターS および WL から採取した上澄みを RFLP 法で、バクテリオファージのプロファイリングの試みの結果を示す。Phi29 ポリメラーゼで処理しないサンプルは、制限酵素によってうまく切断されなかった。一方、Phi29 ポリメラーゼで処理したサンプルは、すべて制限酵素による切断することができ、プロファイリングすることができた。

4.8 考察・結論

最初に、制限酵素を用い、バクテリオファージをプロファイリングすることができなかった。その原因は4.4章で説明した。そして、4.4章で説明してある対策方法を用い、制限酵素処理はうまくいった。

RFLP法を用いて、バクテリオファージをプロファイリングした結果、日々違う種類のバクテリオファージが出現し、ダイナミックな変動が観察された。今回の実験では、その変動を及ぼす原因を調べることができなかった。それは今後の課題として残されている。また、本研究では、一日の中に、一回しかサンプリングしないので、今後は、一日の中複数回のサンプリングすることで、そのバクテリオファージのダイナミックな変動をより正確に追跡することができると思われる。

3章では、PFGE法を用いて、バクテリオファージの分離に成功したことを述べた。図3では(3章にも示してある)PFGE法を用いて、バクテリオファージを分離した結果を示す。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。それは同じような種類のバクテリオファージであると考えられたが、RFLP法で調べたら、それぞれが違う種類のバクテリオファージであるのが分かった。(図4-11)それについての考察は図4-13に示してある。バクテリオファージのDNAには、可変部位が存在する。この可変部位は、環境内のいろいろな微生物のDNAを受け入れることができる。例えば、バクテリオファージAは40kbpの分子量を持っている。一方、バクテリオファージBは70kbpの分子量を持っている。そして、微生物Aは60kbp、微生物Bは30kbpの分子量のDNAを持つ。バクテリオファージAのDNA可変部位に、微生物Aが入る込むによって、バクテリオファージAは100kbpになる。同じくバクテリオファージBは微生物BのDNAを受け入れることで、バクテリオファージBは100kbpになる。このことから、PFGE法にかけると、100kbpのところ、バンドが観察されるはずである。そのとき、同じ種類のバクテリオファージであると間違っ判断されることがある。

また、図4-14にはSalI制限酵素とHindIII制限酵素を用いたバクテリオファージを示す結果である。図4-14(a)は6.24, 6.25, 7.01の試料(●)と7.03, 7.06の試料(○)で、それぞれ切断パターンが似通っていた。このようにグルーピングできる傾向は、HindIIIによる解析の結果4-14(b)でも確認された。異なる制限酵素にもかかわらず、似たようなプロファイリング結果が得ることができた。

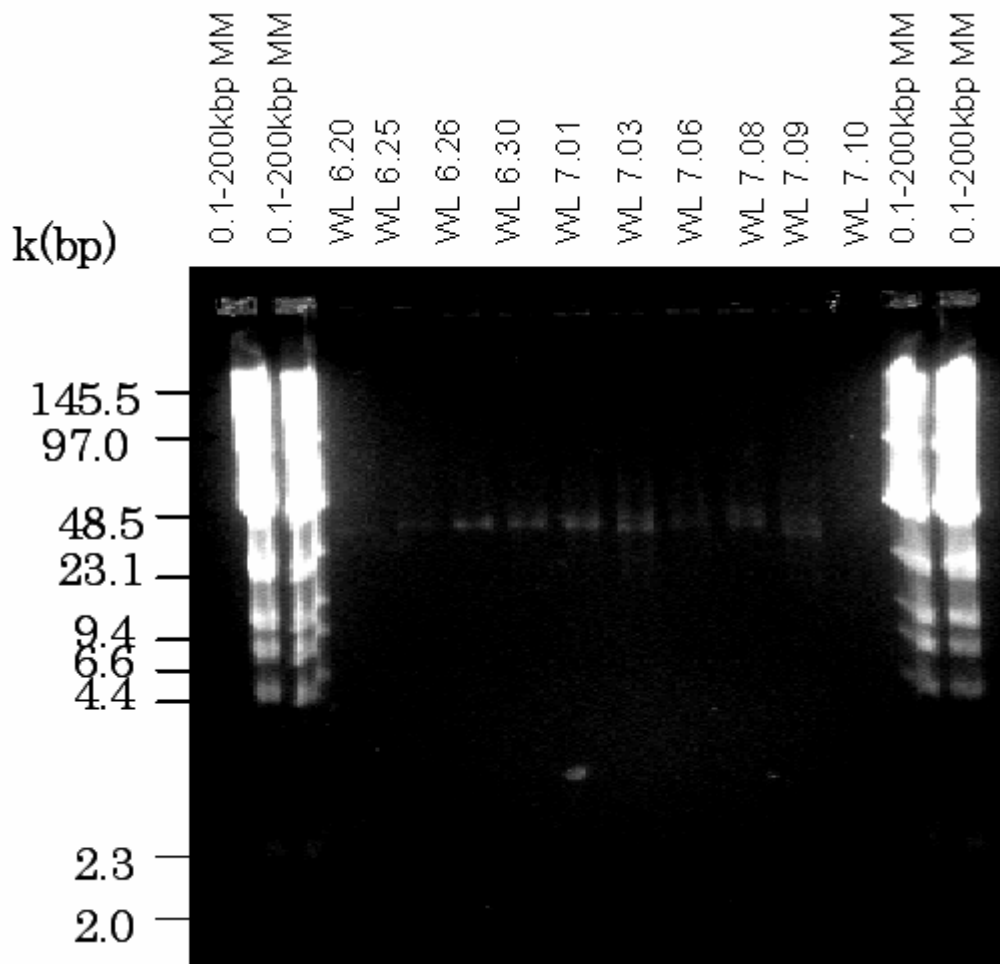


図 3 PFGE 法を用いたバクテリオファージの分離

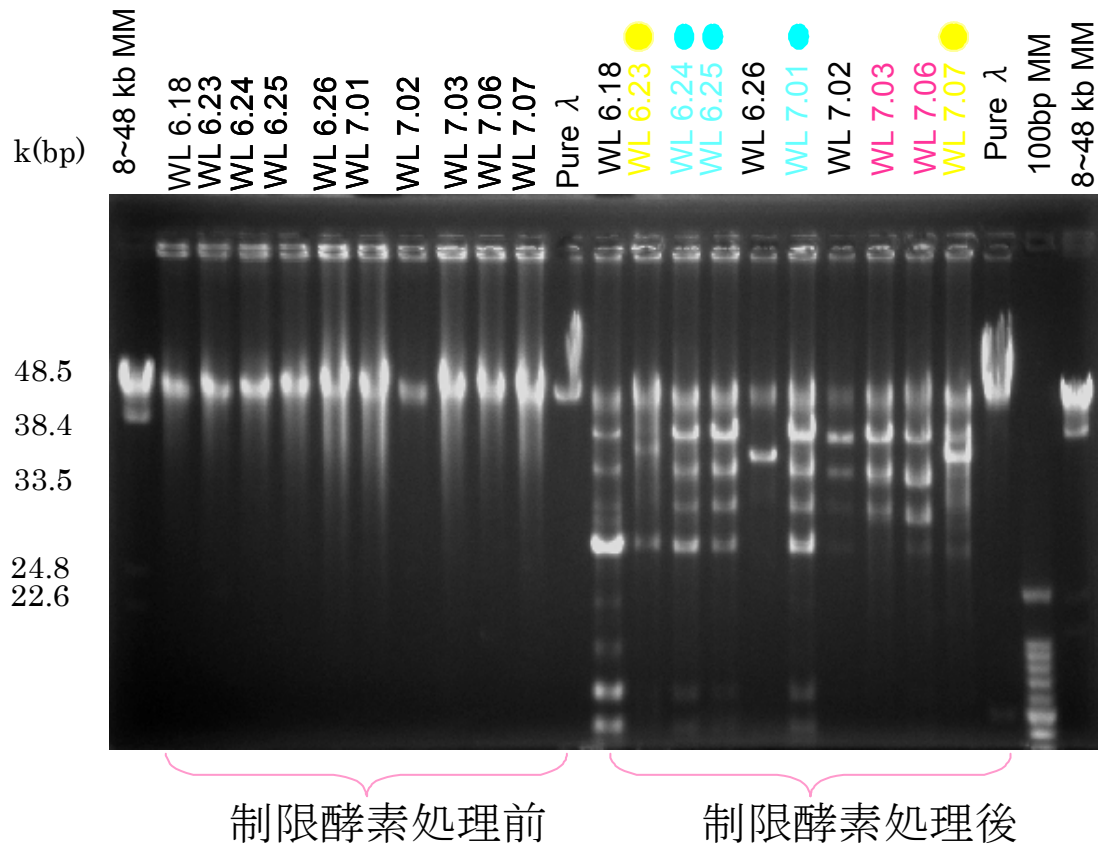


図 4-11 SalI 制限酵素を用いたバクテリオファージのプロファイリング

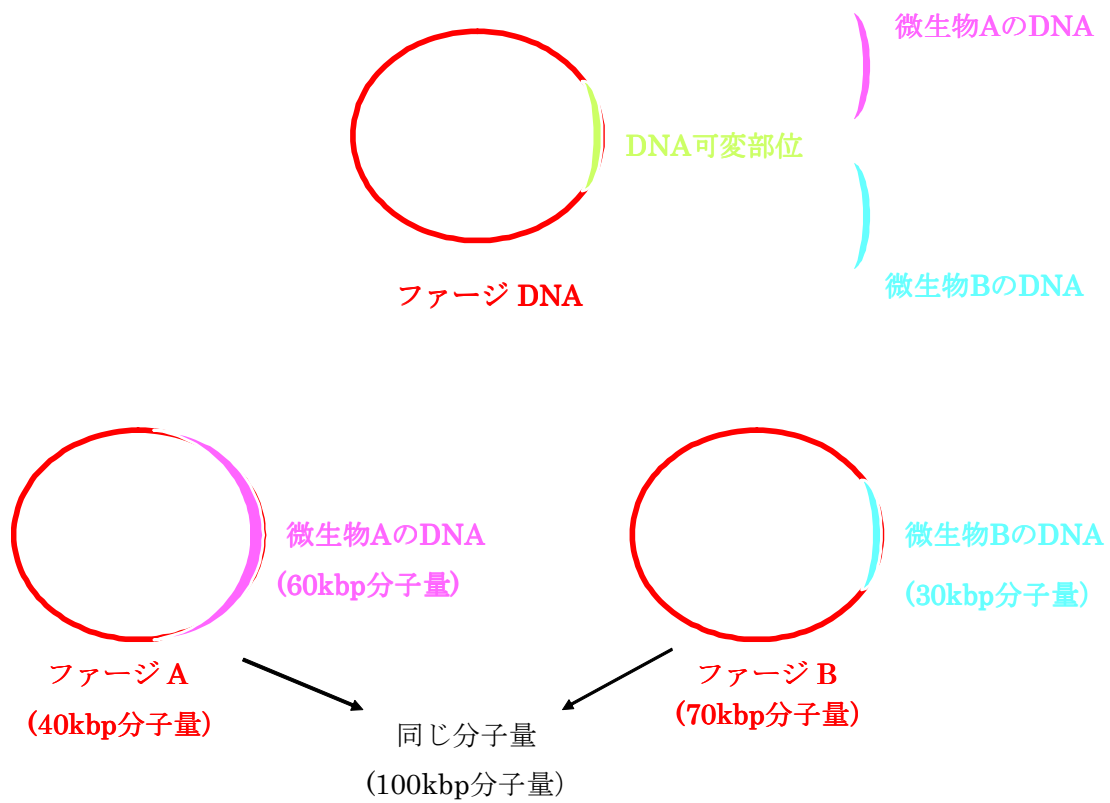


図 4-13 バクテリオファージ DNA の性質

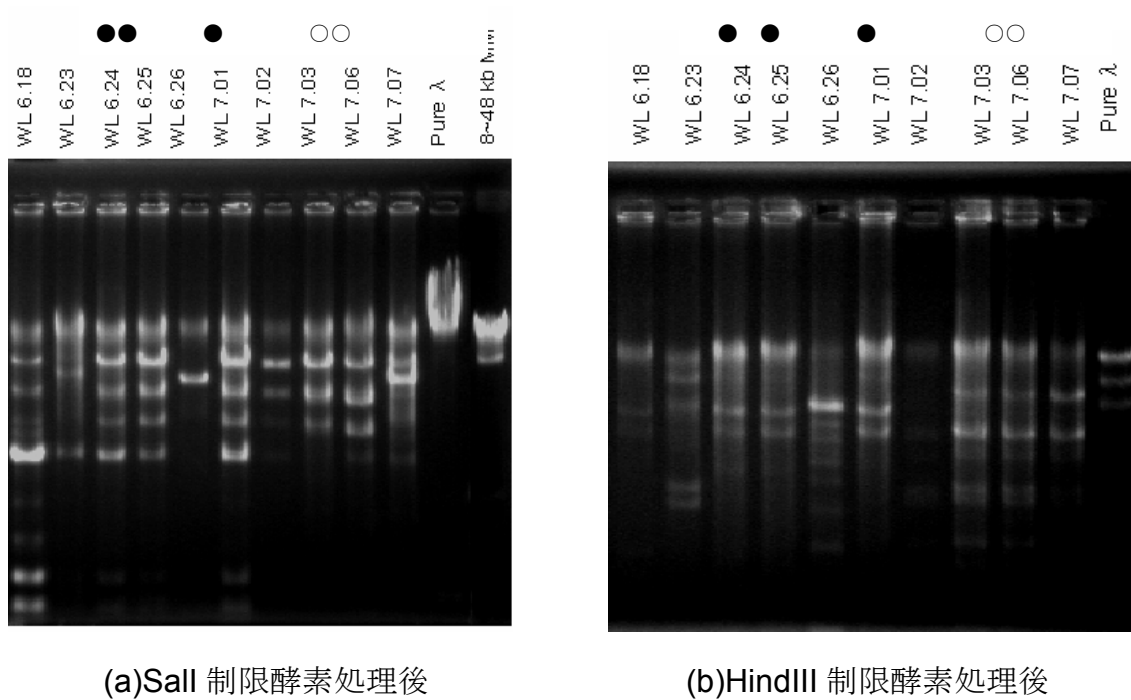


図 4-14 SalI 制限酵素と HindIII 制限酵素を用いたバクテリオファージのプロファイリング

●まとめ：

以上の考察を踏まえて、本研究を通じて、分かったこととしては次のようになる。

1. PFGE 法だけでは、バクテリオファージをプロファイリングするために、情報源としては足りない。
2. RFLP 法を用いて、バクテリオファージをプロファイリングするのは適切な方法であると考えられる。

第 5 章 総括

5.1 総括と今後の展望

本研究では(1)パルスフィールドゲル電気泳動法での分離の確認、(2)制限酵素断片多型法 (RFLP 法) のバクテリオファージをプロファイリングへの適用、(3) パルスフィールド電気泳動(PFGE 法)に加え、RFLP 法を用いることで、処理水中に存在するバクテリオファージの情報をより正確に把握することができることを、本研究の目的とした。

第 3 章では、実験室で運転していたリアクターから抽出したバクテリオファージをパルスフィールド電気泳動(PFGE 法)で分離を試みた。検討実験を踏まえ、最終的には、PFGE 法を用い、バクテリオファージを分離することに成功した。

違うリアクターにもかかわらず、バクテリオファージのバンドは、およそ 50kbp のところに確認された。

第 4 章では、実験室で運転していたリアクターから抽出したバクテリオファージを制限酵素断片多型法 (RFLP 法) でプロファイリングすることを試みた。試料から得られたバクテリオファージ DNA は、SalI や HindIII によって消化されず、したがって、RFLP を行うことはできなかった。しかし、Phi29 ポリメラーゼで処理した結果、バクテリオファージ DNA は制限酵素によって切断することができ、泳動パターンを観察することができた。日々、異なる切断パターンが観察されることができた。また、違う制限酵素を用いたにもかかわらず、似たようなプロファイリング結果を得られた。

以上の結果を踏まえ、第 3 章でパルスフィールド電気泳動(PFGE 法)を用い、同じ DNA サイズのバクテリオファージが活性汚泥処理水の中に存在することがわかった。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発生していることを示唆する結果が得られた。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。

また、制限酵素断片多型法 (RFLP 法) では、今回 2 種類の制限酵素を用いた。違う制限酵素を用いたが、同じ日に抽出したバクテリオファージの DNA は、同じプロファイリング結果を得られた。制限酵素の種類によらず、同じバクテリオファージの DNA であれば、同じプロファイリング結果を得られたことから、RFLP 法が信憑性が高いと思われる。

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。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と、うれしいと思う。

謝辞

多くの方々のご指導やご協力で、本論文を無事に書き上げました。この場を借りて、お礼を申し上げたいと思います。

指導教官の佐藤弘泰先生、副指導教官の鯉淵幸生先生、副査の味埜俊先生、この2年間大変お世話になりました。特に指導教員の佐藤弘泰先生、多忙の中にもかかわらず、実験方法をご丁寧に教えていただきました。また、実験はうまくいかないときに、一々一緒に検討し、解決方法を教えてくださったおかげで無事に実験を進むことができました。また、研究以外の知識をいろいろと教えてくださり、初めてわかったことがたくさんありました。佐藤弘泰先生のご指導の下で、研究のことはもちろん、社会のこともたくさん勉強できました。心より感謝いたします。また、本研究では、佐藤弘泰先生は運転されていたリアクターからバクテリオファージの試料をいただき、無事に実験を進むことができました。本当にありがとうございます。

副指導教員の鯉淵幸生先生は、異なる視点からご指摘を頂きました。今まで気がついてないところに、どのように考察すべきかを教えていただきました。ありがとうございました。

また、味埜・佐藤研究室を卒業され、現在、東北大学大学院農学部資源生物学専攻で助教をされていらっしゃる小田和先生は、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE 法) について、ご丁寧に教えてくださり、無事に実験を行うことができました。

そして、押木守さんをはじめとして、Wasana さん、Li さん、先輩方々、いろいろ、本当にありがとうございます。特に、本研究では、バクテリオファージのサンプルは Wasana と Li さんが運転されていたリアクターからいただき、無事に実験を進めることができました。本当にありがとうございます。

最後ですが、味埜・佐藤研の皆様、どうもありがとうございます。

Terima Kasih (ありがとうございます)

参考文献

- Ackermann, H.W. 1999. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv Virus Res* 51: 135-201
- Ackermann, H.W. and DuBow, M.S. 1987. Viruses of prokaryotes. In: general properties of bacteriophages, vol.I. CRC Press, Boca Raton. P202
- Adams, M.H.1959. *Bacteriophages*. New York: Interscience Inc
- Duckworth, D. 1987. History and basic properties of bacterial viruses. In: Phage Ecology (Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Bitton, G., Eds), pp.1-44. John Wiley & Sons, New York
- Ewert, D.L. and Paynter, M.J.1980. Enumeration of bacteriophages and host bacteria in sewage and the activated sludge treatment process. *Appl Environ Microbiol* 39: 576-583
- Hantula, J., Kurki, A., Vuoriranta, P., and Bamford, D. 1991. Ecology of bacteriophages infecting activated sludge bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57: 2147-2151
- Khan, M.A.2001 Isolation, Characterization of bacteriophages and Their Potential Significance in the Activated Sludge Processes, 学位论文
- Khan, M.A., Satoh, H., Katayama, H., Kurisu, F. and Mino, T.2002a Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Res* 36: 3364-70
- Lee, S.H., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T.2006 Isolation, Characterization of bacteriophages specific to *Micrococcus phosphovorans* and their application for rapid host detection. *Lett Appl Microbiol* 42:259-264
- Lee, S.H., Otawa, K., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T.2006b. dynamic behavior of phage-host system related to *Micrococcus phosphovorans* in activated Sludge with host inoculation. *J Microbial Biotechnol* 16: 1518-1522
- Steward, G.F., Smith, D.C. and Azam, F.1996. Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi seas. *Mar. Ecol Prog Ser* 131:287-300

Stephen M., Gerald F., Douwe van., The impact of bacteriophage genomics. Elsevier.15:94-99

Wang, Q., Yongqi S. , Vu Thi Thu Huong, Woojun P., Joog-Moon P., Cheek J
Fine-Scale Population Structure of *Accumulibacter* phosphates in Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludge. *J. Microbial. Biotechnol* 1290-1297

Wommack, K.E., Ravel, J., Hill, R.T, and Colwell, R.R.1999a. Hybridization analysis of Chesapeake bay virioplankton. *Appl Environ Microbiol* 65:241-250

Wommack, K.E., Ravel, J., Hill, R.T, Chun, J. and Colwell, R.R.1999b. Population dynamics of Chesapeake Bay virioplankton: total- community analysis by Pulsed- Field Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65: 231-240

Otawa, K., Lee, S.H., Yamazoe, A., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T. 2007. Abundance, diversity, and dynamics of bacteriophages in activated sludge processes. *Microb Ecol* 53: 143-152

小田和賢一、2006 分子生物学的手法による活性汚泥中のバクテリオファージの分布および挙動の解析、学位論文

川喜田愛郎 (2008) 『生物と無生物の間』岩波新書

Stephen T. Abedon (2008) *Bacteriophage Ecology* CAMBRIDGE

George A. wistreich (1997) *Microbiology Laboratory* Second Edition PRENTICE HALL

Richard Calendar (2006) *The bacteriophages* Second Edition OXFORD