

納豆菌のコロニーダイレクト PCR

小方 友貴*, 安川 洋生**

(2019年2月15日受理)

Yuki OGATA, Hiro YASUKAWA

Direct PCR from a Colony of *Bacillus subtilis* (natto)

1. はじめに

PCR (ポリメラーゼ連鎖反応; Polymerase Chain Reaction) は, DNA の研究対象や検出対象となる領域を迅速に増幅する技術であり, 今日では基礎研究, 応用研究, 臨床, 犯罪捜査, 等の様々な分野で広く利用されている。反応原理は明快で理解しやすく, 作業手順も簡単であることから, 高校の発展的授業の一部として行われることもある。その場合は精製された DNA を用いることがほとんどであろうと思われる。一方, 生命科学分野の実験では, 生物試料から抽出し精製した DNA を用いることもあるが, 粗精製の試料を用いることもある。また, 対象が微生物の場合は, DNA の抽出・精製というステップを行わずに生物試料を直接 PCR に供する場合もある。

寒天培地で培養した細菌のコロニーを釣菌し, DNA を抽出・精製することなく直接 PCR に供するコロニーダイレクト PCR (CD-PCR または cdPCR) は, 微生物学や遺伝子工学の分野では汎用される手法の一つである。大腸菌 (*Escherichia coli*) 等のグラム陰性細菌の場合は細胞壁が薄いため PCR の反応過程で菌体が破壊されやすく良好な試験結果が得られることが多い。一方, 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等のグラム陽性細菌の場合は, 細胞壁が厚く菌体が破壊されにくいいため cdPCR で良好な結果を得ることは難

しく, 再現性に問題のあることが知られている。

高校で生徒に PCR を体験させる場合, 精製した DNA 試料を用いると, それは一見したところ無色透明の液体であるため, 生徒にとっては生物を想起することは難しいと思われる。望ましくは生物試料を用いて実験を行いたい, 生物試料から DNA を抽出し精製する作業も体験させると長時間を要するため所定の時間内に収まらない。生物試料を用いることと, 時間を短縮することを両立させるには, 細菌を試料とした cdPCR がよいかもしれない。細菌には様々な種類があるが, 高校生が取り扱うには, 病原性や感染性の心配がなく, 培養の簡単な納豆菌が適している。本菌を含む枯草菌 (*Bacillus subtilis*) はグラム陽性細菌であるが, cdPCR の結果は良好であることは経験から知られており, そのため納豆菌の cdPCR も難しくはないと思われる。そこで筆者は, 学校現場での展開を念頭に置きながら, 納豆菌の cdPCR の可能性について検討した。

検討時には複数種の PCR 用酵素を試用したが, 本稿ではその内の改変型 KOD DNA ポリメラーゼの結果を示す。KOD DNA ポリメラーゼは, 鹿児島県の小宝島にある硫気孔から単離された超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD 1 株がコードする DNA ポリメラーゼであり, 高校の教科書等に紹介されている Taq DNA ポリメラーゼ (*Thermus*

* 岩手大学教育学部, ** 岩手大学教授

aquaticus がコードする DNA ポリメラーゼ) に比べて DNA 合成速度, 正確性ともに高いことが知られている。これを改変し至適化した改変型 KOD DNA ポリメラーゼは, 1 kb までの伸長反応であれば 1 秒で行える。汎用の Taq DNA ポリメラーゼの伸長速度は 1 秒間に数十から 100b であるため, 改変型 KOD DNA ポリメラーゼを用いることにより PCR を短時間で終わることが可能となる。

2. 材料と方法

市販の納豆の表面をエーゼで掻き取り, これを終濃度 1% のグルコースを含む LB 寒天培地に塗布して終夜 37°C で培養した後, 納豆菌のコロニーが形成されていることを確認して実験に供した。PCR には KOD One PCR Master Mix-Blue (TOYOBO) を用いた (反応系 50 μ L)。プライマーはホスホマイシン耐性因子 (*fosB* 遺伝子) の一部 (381bp) を増幅する 5'-gtggagataaaaggaatcaatcactgc と 5'-tcgaagcctgtcttgaagggtccggatg を用い, それぞれ終濃度が 0.5 μ M になるように反応系に加えた。反応条件は, 98°C \times 10 秒 \rightarrow 55°C \times 5 秒 \rightarrow 68°C \times 1 秒, を 1 サイクルとしてこれを 35 サイクル行った。反応後の試料の 10 μ L を 1.5% のアガロースゲルにアプライし, 100V (定電圧) にて電気泳動した後, ゲルスキャナーで画像を取得した。画像の処理は Photoshop にて行った。

3. 結果と考察

3.1. 釣菌量の検討

寒天培地上に多数形成されたコロニーの内の 3 個について, 爪楊枝で釣菌し, 50 μ L の PCR カクテルに懸濁して PCR した。3 個のコロニーの内, 1 個については爪楊枝の先端に目視で何も確認できない程の微量を釣菌し, 別の 1 個については爪楊枝の先端に目視でかろうじて確認できる程度の菌量を釣菌し, 残りの 1 個については爪楊枝の先端に目視で容易に確認できる程度の菌量 (1 mm³ 程度) を釣菌した。その結果, いずれにおいても DNA が検出された (図 1 A)。図には示さないが,

同じアガロースゲルの別のレーンで電気泳動した DNA サイズマーカー (100bp ラダー) との比較から, この DNA の分子サイズは妥当であり, また, プライマーを添加しない反応系では DNA が検出されなかったことから, この DNA は *fosB* 遺伝子の一部が増幅された PCR 産物であると判断した。

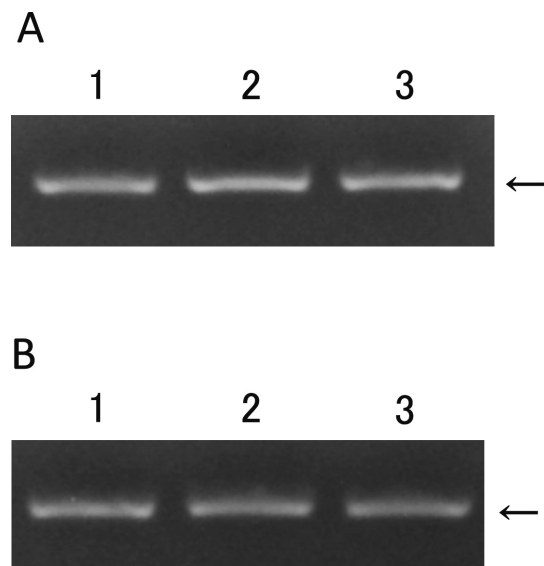


図 1. 釣菌量及び釣菌部位の違いの影響

(A) 釣菌量の違いの影響。レーン 1 は爪楊枝の先端に目視で何も確認できない程の微量を釣菌した結果, レーン 2 は爪楊枝の先端に目視でかろうじて確認できる程度の菌量を釣菌した結果, レーン 3 は爪楊枝の先端に目視で容易に確認できる程の菌量を釣菌した結果。(B) 釣菌する部位の違いの影響。レーン 1 はコロニーの頂部から釣菌した結果, レーン 2 はコロニーの側上部から釣菌した結果, レーン 3 はコロニーの側部から釣菌した結果。いずれも爪楊枝の先端に目視で何も確認できない程の微量を釣菌した。

一般に, cdPCR では菌量が多いと反応が阻害されることが知られており, 反応系に投入する菌量は少ない方がよい。しかし, 今回の試験では爪楊枝の先端に目視で容易に確認できるほどの菌量 (これは cdPCR には十分に多い菌量) でも良好な結果が得られた。

納豆菌を寒天培地で培養すると頂部表面が硬く乾燥したコロニーを形成することが多い (菌株, 培地組成, 培養条件による)。そこでこのような硬く乾燥した表面からサンプリングしても cdPCR ができるかどうか確かめた。寒天培地上に形成さ

れたコロニーの内の1個について、コロニーの頂部（硬く乾燥した表面）、斜め上部、側部から爪楊枝で釣菌し、50 μ LのPCRカクテルに懸濁してPCRした。その結果、いずれにおいてもPCR産物が検出された（図1B）。

納豆菌の発育した寒天培地を乾燥しないようにシールして冷蔵庫で保管し、1ヶ月後にコロニーの頂部（硬く乾燥した表面）、側上部、側部から爪楊枝で釣菌しcdPCRに供したところ、いずれにおいても十分に明瞭なPCR産物が検出された（data not shown）。納豆菌の発育した寒天培地は用時調製が望ましいが、適切に保管すれば1ヶ月程度は良好な結果が得られるため、多忙な学校教員も時間に余裕を持って実習の段取りができると思われる。

3.2. 実験実習への展開

平成30年度の岩手大学教育学部2年生対象の「生物学実験Ⅱ」において、実習生17名（理科教育科の学生16名と特別支援教育科の学生1名）に納豆菌のcdPCRを指導した。17名はいずれも2年生対象の講義「生物学B」でPCRの原理について受講済みであるが、精製試料を用いたPCRも、cdPCRも、微生物を扱う実験も未経験であった。実習生を4～5名ずつの班に分け、納豆菌の発育した寒天培地（前日までに準備しておいた）を配布し、適宜指示をしながらコロニーを1個ずつ釣菌させcdPCRを行った。反応産物を電気泳動した結果17試料の全てでPCR産物が検出され、初心者でも納豆菌のcdPCRができることが分かった。

電気泳動後、泳動パターンをゲルスキャナーで取り込み、PCで適切に加工してから印刷し、片対数グラフ用紙とともに実習生に配布した。なお、アガロースゲルには実習生のPCR産物の他にDNAサイズマーカーもアプライして泳動しておいた。実習生には、DNAサイズマーカーについて起点から各DNA断片までの長さを測定し片対数グラフ用紙にプロットして検量線を作成すること、次にPCR産物について起点からの長さを

測定し検量線にプロットして鎖長を求めること、を指示した。実習生は片対数グラフ用紙の使用法を知らなかったが、簡単に説明することで全員がPCR産物の鎖長（測定値）を求めることができた。別途、ゲノムデータベースで納豆菌*fosB*の塩基配列を検索し、プライマーのアニーリング位置からPCR産物の塩基数を求め測定値との違い（測定誤差）について検討するように指示した。

なお、この実験実習では実習生にcdPCRを体験させて今日の生命科学分野の基礎的な技術であるPCRを理解させることを目的の一つとしているが、それに加え「納豆は納豆菌により作られる発酵食品であり、その表面には納豆菌が発育している」ことも作業を通して確認させ、「発酵」と「微生物」についてあらためて学ばせることも目的としている。そのため、cdPCRの前に時間を設けて納豆菌のコロニーを観察させた。

3.3. 実習生の評価

実習終了後に納豆菌のcdPCRについての感想を、無記名でレスポンスカードに書かせて回収した。その中から代表的な意見を幾つか抜粋して以下に記載する。

- ・PCRは言葉による説明だけでは理解しにくい。実際に菌のコロニーから釣菌し、結果を見るといった過程からPCRを理解し、DNA増幅に触れることで、高校以降の生命科学分野へのつながりを見いだすことができると考える。
- ・座学で学ぶより実際に実習を行って現物を見る方がより深く学ぶことができると感じた。
- ・cdPCRでは調べたいものをダイレクトに使用している。そのため実物をみながら実習できる。今回は時間の都合上、培地での作業は行わなかったが、そこまで行くとさらに理解が深まるのではないかと思う。（培地での作業とは、培地の調製や納豆菌の塗布及び培養のことと思われる）
- ・高校生物の実験ではDNA溶液からPCRを行うと聞いたが、それでは“DNAは生物由来で遺伝子の正体”ということが実感をもって理解できないのではないかと考えた。今回の実験でcdPCR

を行ってみて実感を少し持てたように感じる。

・納豆菌はみんなが知っている菌だ。自分たちの知っている菌を実験材料にすることでその実験に対する意識は、全然知らない菌を使うよりも高くなると思う。

このように実習を行うことで、PCRについての理解が深まったという意見が多数あり、実習生には有意義であったと思われる。また、DNA抽出液からPCRを行うよりも、実習生自らがコロニーから釣菌して行うcdPCRの方が実感をもちやすいということも感想から分かった。

4. おわりに

本稿で述べたように、納豆菌のcdPCRは適切に指導することにより初心者でも容易に結果を出せることが分かった。実習生も興味を持って実習に参加できたようで、教育効果も高いと思われる。

cdPCRは理系学部在籍し生命科学を学ぶ学生にはよく知られた実験手法の一つであるが、本学教育学部の学生にとっては本稿に記載の実習を計画するまで知る機会がなかった。理系学部の学生であれば当然のように知っている知識や手技の中には学校教育に展開できるものがcdPCRの他にもあるかもしれない。学校教育の質的向上を図るために、学部の垣根を超えた交流が望ましいと考える。