

納豆を出発材料とした納豆菌遺伝子のダイレクト PCR

小方 友貴*, 安川 洋生**

(2020年2月21日受理)

Yuki OGATA Hiro YASUKAWA

Direct PCR Amplification of Genes of *Bacillus subtilis* (*natto*) Cells Grown on Natto Beans

1 緒言

DNAの研究対象領域や検出対象領域を迅速に増幅するPCR(ポリメラーゼ連鎖反応; Polymerase Chain Reaction)は, 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。反応原理は理解しやすく, 作業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を用いることが多いと思われるが, 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, 高校生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出発材料として実験を行いたい, 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し, 精製度によっては想定通りの結果が得られない場合もある。これらの問題を解消しつつ生物試料を用いるには, 寒天培地で培養した細菌を試料として, DNAの抽出と精製をすることなく直接PCRをするコロニーダイレクトPCR(cdPCR)がよいと思われる。その場合の菌種としては, 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であろう。このような観点から, 筆者らは納豆菌のcdPCRを検討し, 初心者でも良好な結果が得られることを報告した(小方&安川, 2019)。

筆者らは, より短い時間内にPCRを学ばせる

方法として, 納豆菌を培養することなく, 納豆から納豆菌を採取して直ちにPCRを行う実験を検討したのでその結果を報告する。なお, 本稿では培養せずにPCRすることをダイレクトPCRと呼ぶこととし, 以下, dPCRと記す。

2 材料と方法

爪楊枝で市販の納豆の表面から粘物質(糸)を採取し, これを100 μ Lの滅菌水に懸濁し, 懸濁液の2 μ LをdPCRに供した。反応にはKOD One PCR Master Mix-Blue (TOYOBO)を用いた(反応系25 μ L)。プライマーはホスホマイシン耐性因子*fosB*の一部(381bp)を増幅する5'-gtggagataaaaggaatcaatcacttgcと5'-tcgaagcctgtcttgaagggtccggtatgを合成し使用した(いずれも終濃度を0.6 μ Mとした)。反応条件は, 98 $^{\circ}$ C \times 10秒 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C \times 5秒 \rightarrow 68 $^{\circ}$ 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, 10 μ Lを1.5%のアガロースゲル(所定量のエチジウムブロミドを含む)にアプライし, 100V(定電圧)にて電気泳動した後, Glite 900BW Gel Scanner (Pacific Image Electronics Co.,Ltd)で画像を取得した。画像の処理はPhotoshop (Adobe Systems Inc.)にて行った。

3 結果と考察

3-1 先行試験

研究室に所属する学生と共に先行試験を行った。納豆の粘物質（糸）を、各自が爪楊枝の先端に目視できる量、あるいは目視では確認できない程度の量を採取し、滅菌水に懸濁してdPCRに供した。その結果、いずれにおいても増幅産物が検出された（図1）。

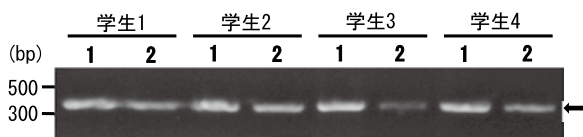


図1. 採取量の影響。4名の学生が納豆の粘物質（糸）を、目視できる量（1）、あるいは目視できない微量（2）を採取し、滅菌水に懸濁してdPCRに供した。増幅産物を矢印で示す。

一般的にPCRは夾雑物により反応を阻害されることが多いため、反応液に添加する微生物試料は微量である方が成績が良い。しかし、本反応系においては目視できる量の試料であっても良好な結果が得られた。初心者には目視できる量の試料を扱う方が安心できるであろうから、それを標準的な操作として指導するのが良いと思われる。

3-2 実験実習への展開

2019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16名を対象にdPCRを指導した。16名のほとんどは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の経験も生物試料を用いたdPCRの経験もなかった。実習生を4名ずつの班に分け、市販の納豆を配布し、爪楊枝で粘物質を採取させてdPCRを行った。反応終了後に一部をアガロースゲルにアプライして電気泳動し、泳動終了後に電源をオフにしてから紫外線（254nm）を照射して、実習生全員で増幅産物を確認した（図2）。実習に参加した16名の全試料で増幅産物が検出され、適切な指導の下であれば初心者でも納豆からdPCRできることが分かった。

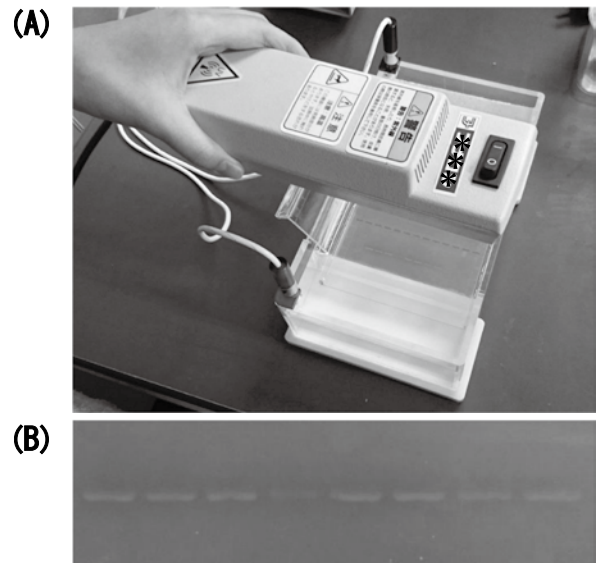


図2. 実習における増幅産物の観察。(A) 電気泳動後に電源をオフにし、アガロースゲルに紫外線を照射して増幅産物を確認している様子。(B) アガロースゲル内の増幅産物。この1枚のゲルには8名の実習生の増幅産物をアプライし電気泳動した。

電気泳動の結果を観察させた後、実習生には初歩的なバイオインフォマティクスを学ばせるために、ゲノムデータベースでFosBの相同タンパク質を検索しアライメント図と分子系統樹を作成してアミノ酸配列の比較解析をするように指示をした。これについては本稿では詳細は割愛するが、どの実習生も班のメンバーと協働して作業を進めることができた。相同タンパク質の検索や相同遺伝子の検索はゲノムデータベースの使用法を理解すれば作業することができ、アライメント図や分子系統樹の作成も公開されている解析ソフトを利用すれば比較的容易に作業を進めることができる。そのため高校の教育現場でも展開が可能であると思われる。

3-3 受講生の評価

実習終了後に納豆菌のdPCRについての意見を、無記名でレスポンスカードに書かせて回収した。肯定的な意見が多く、それらを集約すると次の通りであった。

「講義で聞くだけよりはPCRの流れや結果を見ることができ、講義だけでは分からなかったことや器具も理解することができた。」

「納豆は身近なものであり安全で安価であるため実験材料として良いと思った。身近なものを扱うことで PCR 実験に対する視野が広がった。」

一方、「危険な操作があることなどを考えると実際に高校で行うには難しいと思った。」のようにやや慎重な意見もあった。危険性については事前に十分に説明をし、実施にあたっては十分な安全対策をとったが、それがかえって一部の学生に不安を抱かせたのかもしれない。しかし、PCR や電気泳動に限らず、どの分野においても機器や試薬を使用する実験は危険を伴う。そのことを生徒に理解させ、その上で事故を回避するためにどうすべきかを理解させ実践させる必要があり、それも実習の目的の一つであると考えられる。

4 結言

本稿で述べたように、納豆菌の dPCR 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たようで、教育効果も高いと思われる。

PCR 用の酵素として高校の教科書等で紹介されるのは *Thermus aquaticus* の DNA ポリメラーゼ (Taq DNA ポリメラーゼ) であり、研究現場でもこの酵素やこれを改変した酵素が汎用される。本稿では、超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD 1 株の DNA ポリメラーゼを人工的に改変した酵素 (改変型 KOD DNA ポリメラーゼ) を使用した。この改変型酵素は PCR に至適化されており、1000bp までの伸長反応であれば 1 秒で行える (メーカー資料による)。筆者の所属する研究室では納豆の糸の主成分の生合成に関与する遺伝子 (*ywsC*) を標的とした dPCR を検討しており、その際には 1182bp を増幅するために 1 秒を設定し良好な結果を得た (佐々木 & 安川, 2019)。このように改変型 KOD DNA ポリメラーゼを用いることで長い領域も短時間で増幅することが可能となり、時間の制約の多い高校でも有用であると思われる。

また、改変型 KOD DNA ポリメラーゼは、Taq DNA ポリメラーゼでは PCR が困難な試料からで

も良好な結果を得られることが多い。例えば、グラム陽性球菌や酵母を前処置せずに PCR する場合、Taq DNA ポリメラーゼでは良好な結果が得られにくい。改変型 KOD DNA ポリメラーゼでは良好に増幅できる (メーカー資料による)。そのため本稿で示した方法を適用して、ヨーグルトを出発材料とした乳酸菌 (乳酸発酵をするグラム陽性球菌やグラム陽性桿菌、ピフィズス菌、等) の遺伝子や市販のパン酵母の遺伝子の PCR も可能かもしれない。

本稿に記載した dPCR は cdPCR の変法と言えらる。cdPCR そのものは、生命科学系の学生の多くが知っている基本的な実験法の一つである。生命科学系の学生であれば当然のように知っている実験法の中には他にも学校教育に適用できるものがあるかもしれない。学校教育の質的向上を図るためにも、分野の垣根を超えた交流が望ましいと考えられる。

参考文献

- 小方友貴 & 安川洋生 (2019) 納豆菌のコロニーダイレクト PCR, 岩手大学教育実践総合センター研究紀要, 18, pp41-44.
- 佐々木知美 & 安川洋生 (2019) 納豆から直接 PCR してネバネバに関連する遺伝子を増幅する実験. 日本科学教育学会研究会研究報告, 34, pp19-22.