

A-08

環境微生物の至適生育温度と rDNA の GC 含量の関係に着目した
新規遺伝子解析法

きむら ひろゆき すぎはら まき はなだ さとし

○ 木村 浩之¹, 杉原 麻生², 花田 智²

¹静岡大学 理学部, ²産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門

【目的】地殻内微生物生態系という新たなる対象の研究を、大深度掘削によって行おうとする試みが近年盛んになってきている。しかし、地下深部の地熱高温環境に生存する好熱菌および超好熱菌をターゲットとした遺伝子解析を行う際、掘削に用いられる掘削水中に存在する好冷菌または中温菌由来の遺伝子による汚染が問題となっている。16S rRNA 遺伝子(rDNA)の GC 含量は、生物の至適生育温度と良い相関関係を示すことが知られているので、その変成温度の差を利用し、高い至適生育温度を持つ微生物(好熱菌や超好熱菌)の rDNA のみを選択的に解析する手法を検討した。

【方法】異なる至適生育温度を持つ 3 種類の標準菌株[中温菌 *Escherichia coli* (16S rDNA の GC 含量 : 54.4%), 好熱菌 *Thermaaeromonas toyohensis* (59.4%), 好熱菌 *Oceanithermus* sp. (62.7%)]に加え、複合生態系として温泉水(76°C)と河川水(14°C)中の微生物群集を対象としそれぞれの 16S rDNA の PCR 産物の融解温度の差を解析した。さらに、これら産物を様々な温度で熱処理し、ExonucleaseI で分解することにより低 GC 含量(中温性微生物由来の) 産物の選択的除去を試みた。

【結果・考察】3 種類の標準菌株の融解曲線分析より、好熱性細菌由来の 16S rDNA は高 GC 含量であるがために高い融解温度を示し、逆に中温性細菌由来のものはより低温で融解した。この温度の差を利用し ExonucleaseI による中温性細菌由来産物の選択的な除去が可能であることが確かめられた。さらに、微生物群集を対象とした実験でも、温泉水に由来する 16S rDNA は、河川水由来のものより 1.5°C~2.0°Cほど高い融解温度を示す事が分かり、クローン解析の結果から、融解温度の差を狙った熱処理で河川由来のものの混入を抑え、温泉水由来の 16S rDNA を特異的にクローン化できることが明らかになった。大深度掘削試料の研究の際、掘削水からの中温性細菌の混入を防ぐため、滅菌水を常時使用する方法や閉鎖系循環等、様々な方法が考案されている。しかし、これらの方法は、大規模で高額なものにならざるをえない。本研究は、安価に、かつ特別な装置を用いることなく、掘削水からのコンタミネーションを除去できる方法があることを示した。(shkimur@ipc.shizuoka.ac.jp)