

次世代シーケンサーを用いた微生物腐食調査のご紹介

はじめに

コロナの流行によりPCR (polymerase chain reaction) という言葉が一般的となりましたが、PCRは微量のRNAやDNAを増幅する技術であり、いまや遺伝子研究に無くてはならない技術です。

今回ご紹介する次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer:NGS)にもこの方法が使用されています。NGSは、2005年ごろから実用的に使われ始めました。遺伝子の塩基配列 (数千万~数億のDNA断片の塩基配列) を高速・同時並行的に読み出せるため、ゲノム解析のハイスループットが進み、ヒトゲノム解読に13年程度かかったものが、数日間で解析可能となりました。また、ゲノムシーケンス以外にも、遺伝子の特定領域のシーケンス、ガンの変異検出、RNAシーケンス (遺伝子の発現解析等) 及びDNA結合タンパク質の機能解析等様々な解析が可能です。当社では、この遺伝子解析技術を金属の微生物腐食調査にも活用していますので、ご紹介いたします。

装置の特徴

Ion GeneStudio™ S5 sys.

(Thermo Fisher Scientific社)

(1) シーケンス原理と応用

本装置のシーケンス原理は、DNAの伸長反応に伴い生成するピロリン酸を検出することでシーケンスを行います。

Ionシーケンサーではピロリン酸の生成をpHの変化により検出します。Ionシーケンサーの解析チップには数百万~数千万の小さなウェル (穴) があり、それぞれのウェルがpHセンサーとなっているため、一回のランで大量の配列を決定することができます。ただし、一つのリードにつき決定できる長さは最大400bp程度です。

適応分野には①メタゲノム解析、②全ゲノムシーケンス、③ターゲットリシーケンス、④環境DNA解析があります。

表1 微生物腐食への関与が想定される細菌とその作用

細菌の種類	作用
鉄酸化細菌	$2Fe^{2+} + 1/2O_2 + 2H^+ \rightarrow 2Fe^{3+} + H_2O$
硫酸塩還元菌	$SO_4^{2-} + 10H^+ + 8e^- \rightarrow H_2S + 4H_2O$
硫酸酸化細菌	$S + 3/2O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$
メタン生成菌	$CO_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow CH_4 + 2H_2O$

孔食部中の細菌のDNA解析: 16S rRNA遺伝子の解析

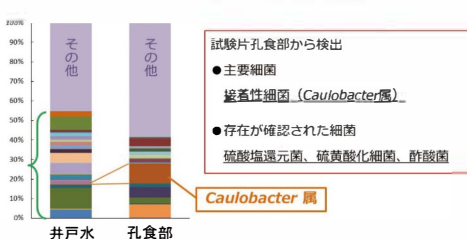


図4 孔食に存在した微生物のNGS解析結果

(2) シーケンス手順

1) ライブラリ調製

解析したいDNAに、Ion S5™でシーケンスするためのアダプター配列を付加します。この調製を終えたサンプルはライブラリと呼ばれます。

2) テンプレート調製

微細な水滴の中にビーズと一分子のライブラリを入れ、その水滴中でPCRを行うことにより一つのビーズにつき一つの配列が付加したビーズを調製します (エマルジョンPCR)。

3) シーケンス

解析チップに調製したテンプレートを流し込むことでチップ上の各ウェルに一つのビーズが入ります。シーケンスを行うと1ウェルに対して一つの配列が得られるので、1ランで最大数千万の配列を同時に決定することが可能となります。

活用事例

金属の微生物腐食調査について

微生物腐食とは、土中または水中に生息する微生物の作用によって、金属材料が腐食 (酸化) 促進される現象を言います。表1にその原因となる細菌とその作用様式を示します。

微生物腐食の特徴として、1) 孔食などの局部腐食を生じる (インク壺状、スケルトン状)、2) 溶接部等に起こりやすい、3) 自然電位の上昇が見られる、4) 腐食進行が速い、5) バイオフィルムの生成が見られる等が上げられます。



図1 試験方法

図2 腐食した試験片の表面観察結果

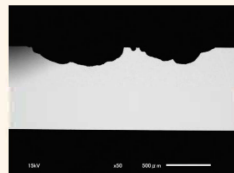


図3 腐食した試験片の断面観察結果

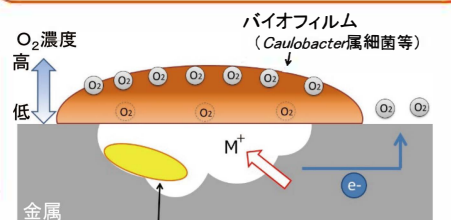


図5 今回の微生物腐食のモデルについて

その中で、1)~3)については、すきま腐食でも認められる現象で、今まですき間腐食として理解されてきた事例に、微生物が関与している可能性があります。事例として、冷却水配管や反応槽内壁の孔食原因調査、各種付着物の微生物、鉄酸化細菌の同定・定量分析等がありますが、微生物の腐食への関与を直接的に証明するためには、①微生物を用いた金属腐食再現方法の確立、②腐食部からの微生物解析方法が必要です。そこで、表1に記載されているような細菌が存在する井戸水を用いて行ったSUS304試験片の腐食再現性試験について、以下ご紹介いたします。

腐食再現性試験について

1) 試験方法

試験片にはSUS304、試験液には井戸水を添加した鉄酸化細菌用培地を用いました。25℃で12週間、静置状態で試験片を浸漬した後、表面および断面の観察と表面に形成された皮膜のDNA分析を行いました (図1)。

2) 試験結果

試験片は、表面を緑色の被膜 (バイオフィルム) で覆われ、その下で孔食が認められ、その表面・断面観察を行いました (図2及び図3)。孔食部に存在する微生物由来DNAを用いて、その種を判別できる遺伝子領域をPCRで増幅させNGSで解析を行いました。その結果、バイオフィルムを形成する接着細菌や硫酸塩還元菌及び酢酸菌等の微生物腐食に関与すると考えられる微生物が検出されました (図4)。

3) 推定モデル

今回の腐食モデルを図5に示しました。まず、①金属表面に被膜形成 (バイオフィルム)、②それに伴う酸素濃度の濃淡現象 (電池現象による金属の溶出)、③被膜下に存在する微生物の代謝物による (酸) 金属の溶出により孔食が発生したと推定されました。

おわりに

鉄鋼材料の腐食が微生物によって促進されることが多く報告されており、その原因となる微生物の遺伝子を解析することにより、微生物を特定することが可能であり、再現試験により①腐食原因の特定、②防止対策及び③新しい材料開発の評価方法にも活用が可能となります。

微生物腐食に関するお悩みがあれば、是非一度ご相談をお願いします。

お問い合わせ先

広畑事業所
バイオ検査部

滝川 健次

TEL: 079-278-5589 FAX: 079-278-5020
takigawa.kenji.x3k@nstec.nipponsteel.com