

環境ゲノム解析を促進するための新規 DNA 回収手法の開発

長岡技術科学大学 (学) ○関谷 努力 (正) 井町 寛之 (正) 大橋 晶良 (正) 原田 秀樹

1. はじめに

環境中に存在する微生物資源を遺伝子資源として利用しようとする動きは、環境ゲノム解析として欧米諸国を中心に活発に行われている。しかしながら、現在の環境ゲノム解析は構成微生物が極めて限定された複合微生物系には適しているものの、土壌のような多種多様な微生物が混在し、優占種が無いような大多数の環境サンプルには適さない。その大きな理由は、環境中から抽出した多種多様な微生物群集由来のDNAを直接クローン化して解析をおこなうため、目的とするゲノムDNA情報を得るためには莫大な時間と費用が必要になることである。そこで、この問題を解決し、多種多様な微生物が存在する環境から効率的に遺伝子資源を取得する方法論として、微生物菌体からMega (=10⁶) base pairの長さを持つゲノムDNAを抽出し、その中から目的のゲノムDNAを特異的に回収することを考えた (Fig.1)。この方法論を実現するにはDNAの断片化を極力抑えたDNA抽出方法と特異的にゲノムDNAを回収する手法が必要となってくる。そこで本研究では、DNA抽出には微生物のゲノムDNAサイズを決定する際に用いられているDNA抽出キットに着目した。同DNAキットは微生物細胞をアガロースゲルで包埋し、酵素によりDNA抽出することから、長いゲノムDNAを抽出できる可能性がある。また特異的にゲノムDNAを回収する方法には、人工核酸であるPNA (Peptide Nucleic Acid) に着目した。PNAは2本鎖DNAと配列特異的に交雑し、3重鎖を形成するという性質を持っている。従って、ある遺伝子に特異的なPNAプローブを作成すれば、その遺伝子を持つゲノムDNAを特異的に回収できるはずである。

この考えを実現することができれば、環境ゲノム解析にかかる時間と費用を削減するとともに、より高品位なゲノム情報を取得できるようになるのではないかと考えた。そこで本報では、最初の試みとして Mega base pair サイズの長さを持つゲノム DNA を本手法によって特異的に回収可能であるかを検討した結果を報告する。回収したゲノム DNA の長さの推定および DNA 抽出が容易あるという点を考慮して、全ゲノム解析が完了しているグラム陰性の硫酸還元細菌 *Desulfovibrio vulgaris* をモデル微生物として採用した。またゲノム DNA の回収のための PNA プローブは *D. vulgaris* の異化型亜硫酸還元遺伝子の α サブユニットをコードする *dsrA* 遺伝子を標的として設計した。

2. 実験方法

菌体からのDNAの抽出にはCHEF Genomic DNA Plug Kit (BioRad) を用いた。PNAプローブの設計には分子系統解析ソフトARBを用い、*D. vulgaris*の*dsrA*遺伝子に特異的なDvu1438 プローブを作成した。PNAプローブにはN末端にビオチンを標識した。PNAプローブに結合したゲノムDNAを回収するためにストレプトアビジンが修飾してある磁性ビーズを用いた。PNAプローブとゲノムDNAを交雑させる前に、PNAプローブは磁性ビーズと結合させた。PNAプローブとゲノムDNAの交雑はハイブリダイゼーションバッファー (0.01M Sodium Phosphate, 0.005 M Na₂EDTA, 0.0125% SDS) 中で55°C, 1晩行った。その後、磁石によりPNAプロー

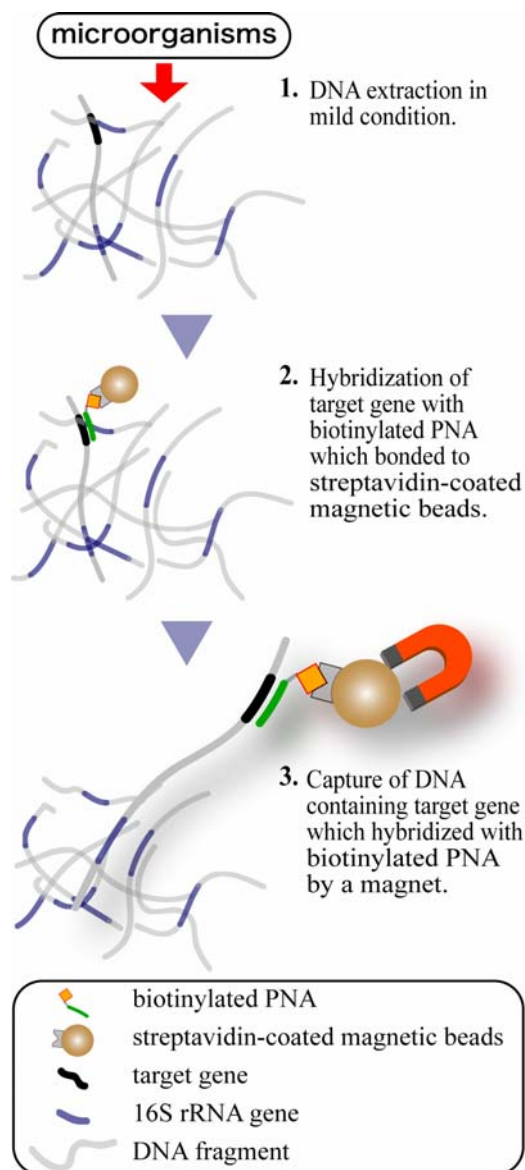


Fig. 1 Schematic illustration of DNA capture method.

Keywords: ゲノム DNA、DNA 抽出、Peptide Nucleic Acid、異化型亜硫酸還元遺伝子、16S rRNA 遺伝子

〒940-2188 長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 環境システム工学系 水圏土壌環境制御研究室

ブが結合したゲノムDNAを回収した。回収したDNAの評価はPCR法を用いて行った。PCR増幅には、おおよそ全ての硫酸還元原核生物の *dsrA* 遺伝子に特異的なプライマーセット (DSR1F (5'-ACCCACTGGAAGCACG-3'), DSR6R-m (5'-TCCTTCCAGGTACCGAT-3')), おおよそ全ての硫酸還元原核生物の *dsrAB* 遺伝子に特異的なプライマーセット (DSR1F, DSR4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3')), おおよそ全ての古細菌 (*Archaea*) の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット (Ar109f (5'-AMDGCTCAGTAACACGT-3'), UNIV1490R (5'-GGHTACCTTGTTACGACTT-3')), おおよそ全て細菌 (*Bacteria*) および古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット (UNIV907F (5'-AAACTCAAAGAAATTGACGGGG-3'), UNIV1490R) を用いた。また, *D. vulgaris* *rrnC* 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット (DvuC-181F (5'-CCGAACGCAAGTAGGGCAAA-3'), UNIV907R-m (5'-CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3')) を作成しPCRに用いた。

3. 実験結果・考察

本研究の目的は、標的とするゲノムDNAを Mega base pair レベルの長いサイズのまま、配列特異的に回収する技術を開発することである。そこで本研究では、最初の試みとしてモデル微生物である *D. vulgaris* と非標的微生物であるメタン生成古細菌 *Methanococcus vannielii* から抽出したDNAを1:1で混合したDNA溶液から、*D. vulgaris* の *dsrA* 遺伝子に特異的なPNAプローブを用いたDNA回収実験を行った(2種混合系)。次に、本手法の環境サンプルへの適用を想定して、多様な微生物が存在する嫌気性汚泥から抽出したDNAにモデル微生物である *D. vulgaris* から抽出したDNAを加えたDNA溶液からPNAプローブを用いてDNA回収実験を行った(複合系)。それぞれの系で回収したDNAの特異性および塩基長の評価はPCR法で行った。本研究で用いた *D. vulgaris* は全ゲノム解析が既に終了している。その配列情報から *D. vulgaris* はゲノムDNA上に5つの *rrn* オペロン (*rrnA* から *rrnE*) を持っており、その中で最も *dsrA* 遺伝子から離れているのは *rrnC* で約1.5 Mbpであることが判った。従って、回収されてきたDNAを用いて *D. vulgaris* の *rrnC* と *dsrA* 遺伝子に特異的なPCR増幅を行えば、少なくとも1.5 MbpのゲノムDNAを得られていることが証明できる。

(1) 2種混合系 (*D. vulgaris* + *M. vannielii*)

PNAプローブで回収したDNAに対して *dsrA* 遺伝子、*D. vulgaris* の *rrnC* 16S rRNA 遺伝子と古細菌の16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いてPCRを行った。その結果、*dsrA* 遺伝子と *D. vulgaris* *rrnC* 16S rRNA 遺伝子の増幅は確認でき、古細菌の16S rRNA 遺伝子の増幅は確認されなかった。*dsrA* 遺伝子が増幅されたことは、回収したDNAがPNAプローブの標的である *dsrA* 遺伝子に特異的に回収されていることを、また、*dsrA* 遺伝子とともに、*rrnC* 16S rRNA 遺伝子が増幅されたことは、回収したDNAが少なくとも1.5 Mbpの長さを持っていることを意味する。このことより、本研究で示したDNA抽出法およびPNAプローブを用いたゲノムDNA回収法を用いることで少なくとも1.5 Mbpの長さを持つゲノムDNAを配列特異的に回収できることが示唆された。

(2) 複合系(*D. vulgaris* +嫌気性汚泥)

D. vulgaris と嫌気性汚泥からそれぞれから抽出したDNAを混合し、その混合DNA溶液からのDNA回収実験を行った。ここでは、DNAの磁性ビーズによる非特異的巻き込みの発生を考慮して、その有無を調べるために上記のDNA回収と同じ行程を、PNAを添加せずに行うネガティブコントロールも通常のDNA回収と併せて行った。回収したDNAとPNAを添加せずに行うネガティブコントロールに対して、*dsrA* 遺伝子、*D. vulgaris* の *rrnC* 16S rRNA 遺伝子と細菌・古細菌の16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセットを用いたPCRを行った。その結果、*dsrA* 遺伝子および *D. vulgaris* *rrnC* 16S rRNA 遺伝子の増幅は、PNAプローブを用いて回収したDNAのみで確認された (Fig.2, lane 2, 3, 6 and 7)。

しかし、細菌・古細菌の16S rRNA 遺伝子の増幅は、ネガティブコントロールにおいても微量ながら確認された (Fig.2 lane 10 and 11)。この結果は、回収したDNAの大部分が標的とするDNAであるが、その中に微量ではあるが、標的としないDNAが混入していたことが考えられた。

以上の結果から、本研究で示したDNA抽出法およびPNAプローブを用いたゲノムDNA回収法を用いることにより少なくとも1.5 Mbp以上のゲノムDNAを遺伝子特異的に回収できることが示唆された。しかしながら、現段階では十分に配列特異的なDNA回収はできていないため、現在、この点について検討を行っている。

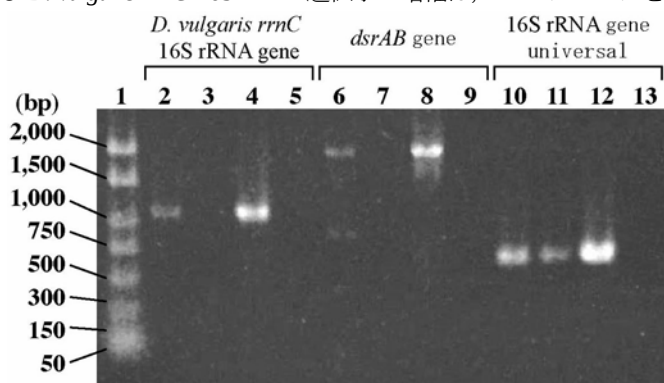


Fig.2 PCR amplification of *D. vulgaris* *rrnC* 16S rRNA gene, *dsrAB* gene and 16S rRNA universal for the DNA captured. 1: DNA marker, 2-5: Amplified for *rrnC* 16S rRNA gene, 6-9: Amplified for *dsrAB* gene, 10-13: Amplified for 16S rRNA gene universal, 1, 6 & 10: PCR fragment obtained from DNA captured by Dvu1438 PNA probe, 3, 7 & 11: same as lane 1, 6 & 10 but without addition of the PNA probe, 4, 8 & 12: positive control for PCR, 5, 9 & 13: negative control for PCR.