

未培養微生物群からの 23S rRNA 遺伝子塩基配列情報回収法の開発

東北大学 (学) ○白取 早恵, (正) 久保田 健吾, 東北大 (正) 原田 秀樹

1. はじめに

微生物を研究する上で、rRNA 遺伝子を用いた系統解析は重要なツールである。塩基配列情報から群集構造や多様性を明らかに出来るだけでなく、未培養微生物を同定するための指標にもなる。さらに、塩基配列情報をもとに設計されたプライマーやプローブは特定の標的微生物の検出や定量に利用出来る。また、rRNA 遺伝子は全生物において普遍的に存在し、全生物が持つ共通の塩基配列領域と種に特異的な塩基配列領域が存在する等の特徴を持つ。以上の理由から、近年の微生物学において rRNA 遺伝子を用いた系統解析が広く用いられている。

原核生物の rRNA 遺伝子は 16S, 23S, 5S rRNA 遺伝子の 3 つであり、これらは *rrn* オペロンを形成している。その中でもユニバーサルプライマーが存在する、塩基長が適切である等の理由から 16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析が主流であるが、他の塩基配列情報を用いて系統解析を行うことも可能である。特に、16S rRNA 遺伝子の 2 倍の塩基長を持つ 23S rRNA 遺伝子や超可変領域である ITS 領域を用いた系統解析は有用だと言われている。

一方で、16S rRNA 遺伝子以外の rRNA 遺伝子や ITS 領域を用いた系統解析に関する研究はあまり進んでいない。例えば、現在までに蓄積されている 23S rRNA 遺伝子の塩基配列情報は 16S rRNA 遺伝子に比べて 1/20 程度である。しかもこれらは培養可能な微生物群から得られたデータのみであり、培養可能である *Proteobacteria* と *Firmicutes* の 2 つの門がそのデータの 7 割を占める。現段階では 23S rRNA 遺伝子の下流に未培養微生物群を含むユニバーサルプライマーが存在しないため、23S rRNA 遺伝子情報を回収するためには特定の種に特異的なプライマーを用いるかゲノムの全長を決定する以外に方法は無く、これらの手法では蓄積される塩基配列情報に偏りがある上に膨大な時間と手間を要する。さらに、5S rRNA 遺伝子の塩基配列情報

は 16S rRNA 遺伝子に比べて 1/400 程度であるため、23S rRNA 遺伝子よりも塩基配列情報に偏りがある。従って、16S rRNA 遺伝子以外の塩基配列情報を回収するためには *rrn* オペロンの塩基配列情報回収法を確立する必要がある。

rrn オペロンの塩基配列情報回収法が確立されれば、rRNA 遺伝子同士や ITS 領域をリンクさせて系統解析を行うことやプライマー、プローブに利用出来る領域が増えるだけでなく、16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析では同定出来ない微生物群の検出や未培養微生物群の 23S rRNA 遺伝子の塩基配列情報の回収、23S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーを設計することが出来る。そこで本研究では *rrn* オペロンの中の 16S rRNA 遺伝子から 23S rRNA 遺伝子までの塩基配列情報の回収を目指し、5S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーに着目して新規技術の開発を行う。

2. 実験方法

2.1 サンプルと DNA 抽出

本研究では、全ゲノム配列が決定されている *Clostridium acetobutylicum* と *Escherichia coli* K12 株を用いた。ゲノム DNA の抽出は、環境中に存在する微生物の高分子 DNA 抽出に適した Meta-G-Name™ DNA Isolation Kit を使用した。また、環境試料は宮城県にある埋立処分場浸出水処理施設の硝化槽からサンプリングした浸出水を用いた。環境試料は夏と冬の 2 回サンプリングを行い、ISOIL for Beads Beating を使用して DNA 抽出を行った。

2.2 23S rRNA 遺伝子塩基配列情報回収法の確立

16S rRNA 遺伝子上流から 5S rRNA 遺伝子上流までの DNA 領域 (4.5 kb 以上) の伸長、増幅、回収を行うために正確性が高く、長い領域の増幅が可能な Phusion® High-Fidelity PCR Kit を使用し PCR を行った。フォワードプライマーは 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーである EUB8f を用い、リバースプライ

キーワード 23S rRNA 遺伝子, 未培養微生物群, 塩基配列情報

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 TEL022-795-3584

マーは *C.acetobutylicum* の 5S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーと蓄積された 5S rRNA 遺伝子塩基配列情報を収集した知見¹⁾を参考に設計した *Bacteria* に特異的なプライマーの 2 種類のプライマーをそれぞれ用いた。伸長時間は 2 min (1 kb / 15~30 sec) に設定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 *C.acetobutylicum* に特異的な 5S rRNA 遺伝子プライマーの評価

C.acetobutylicum の 5S rRNA 遺伝子に特異的なリバースプライマーを用いて PCR を行い、Phusion DNA ポリメラーゼによる 4.5 kb 以上の伸長・増幅が可能かを検証した。16S rRNA 遺伝子上流から 5S rRNA 遺伝子上流までの塩基長の最小値は、16S rRNA 遺伝子(約 1.5 kb)と 23S rRNA 遺伝子(約 3 kb)を足した約 4.5 kb である。したがって本研究では、4.5~5 kb のバンドが得られれば、目的の塩基長が得られたと判断した。検証の結果、本実験で使用した 4.5 kb 付近に単一のバンドが得られたことから目的の塩基長を得る事に成功した (Fig. 1)。

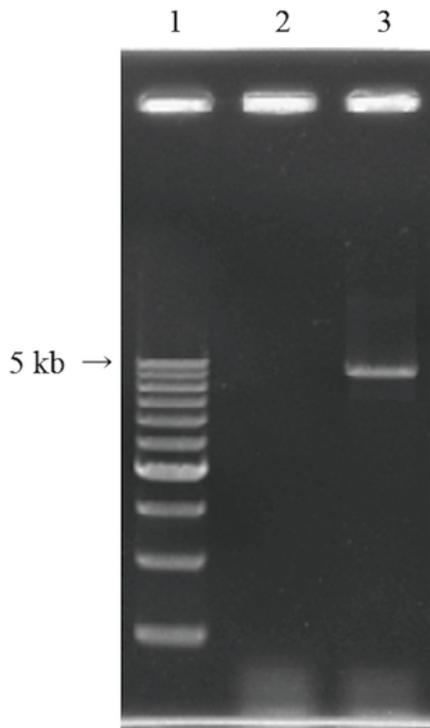


Fig. 1. Phusion DNA polymerase による DNA 増幅結果
1 : 分子量マーカー, 2 : ネガティブコントロール, 3 : *C. acetobutylicum*

3.2 5S rRNA 遺伝子 *Bacteria* Primer の環境試料への適応

本研究で設計した 5S rRNA 遺伝子に特異的なリバースプライマーを用いて PCR を行い、目的の塩基長が得られるかを検証した。その結果、*C.acetobutylicum* と *E.*

coli K12 株だけではなく、環境試料からも 4.5 kb 付近のバンドが得られたことから目的の塩基長を得る事に成功した(Fig. 2)。

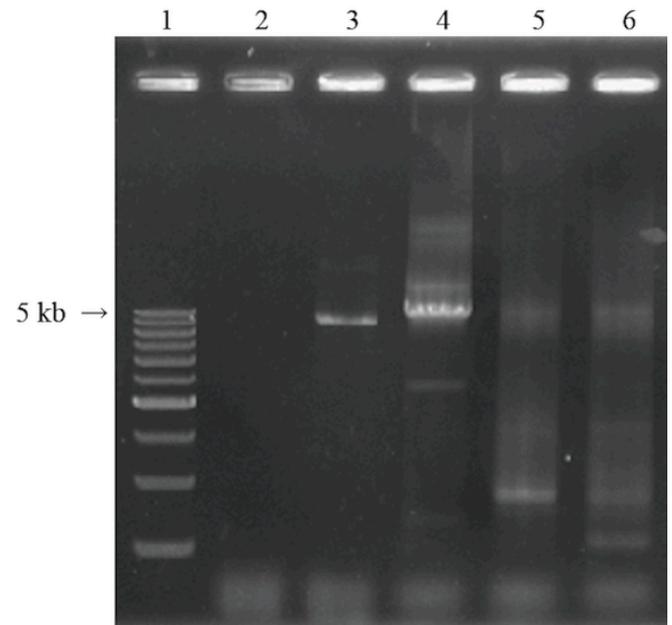


Fig. 2. 環境試料における PCR 結果

1 : 分子量マーカー, 2 : ネガティブコントロール, 3 : *C. acetobutylicum*, 4 : *E.coli* K12 株, 5 : 環境試料 (夏), 6 : 環境試料 (冬)

4. 総括と展望

以上の結果より、以下の 2 つの知見が得られた。

1)3.1 の結果より Phusion DNA Polymerase は 4.5 kb 以上の伸長及び増幅が可能である事が確認出来た, 2)3.2 の結果より本研究で設計した 5S rRNA 遺伝子に特異的なリバースプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子上流から 5S rRNA 遺伝子上流までの塩基配列情報が回収可能である可能性が示唆された。

今後は、本研究で設計した Primer を用いて伸長・増幅した環境試料由来の PCR 産物に対してクローニング、シーケンスを行う。シーケンスの結果を基に未培養微生物群から塩基配列情報が得られるか等の検討を行う。また、同一の環境試料から作成した 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析結果と比較も行う予定である。

参考文献

1) Szymanski *et al.*, 2002, *Nucleic Acids Res.*, 30 : 176-178