

N-1 環境微生物の機能と系統分類を結び付ける新規DNA回収技術

○関谷 努力^{1*}・井町 寛之²・大橋 晶良³・原田 秀樹⁴

¹住友重機械工業株式会社 (〒141-8686 東京都品川区北品川 5-9-11 住友重機械ビル)

²独立法人海洋研究開発機構 (〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15)

³長岡技術科学大学 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡 1603-1)

⁴東北大学 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

* E-mail: Dry_Sekiya@shi.co.jp

1. はじめに

現在、環境中の微生物群集構造を解析するための手法として、クローン解析などの特定の遺伝子を分子マーカーとした解析手法が広く用いられている。これらの手法を用いて 16S rRNA 遺伝子を対象とした解析を行うことで環境中に存在する微生物種の分類系統的な多様性を、また微生物の代謝機能を司る機能遺伝子を対象とした解析を行うことで、特定の物質の代謝機能を有する微生物の多様性を推定することが可能である。しかしながら、従来のクローン解析では DNA 回収の行程において DNA が断片化されてしまい、同一の微生物の系統分類と機能遺伝子それぞれからの解析結果を結び付けて理解することは難しく、特定の物質の代謝機能を持つ微生物がどのような系統分類に属するものであるかを推定することは困難である。

そこで、環境中の微生物群集から 16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子を同一の DNA 鎖上を含む様な長さを持つゲノム DNA を抽出し、そのゲノム DNA 群集のなかから標的とする遺伝子の塩基配列を持つものを特異的に回収する (図 1)。そして回収した DNA に対して機能遺伝子と 16S rRNA 遺伝子について解析を行うことで、微生物の系統分類と機能を結びつけて理解することが出来るのではないかと考えた。細菌の全ゲノム DNA の長さは大腸菌で 46 Mega base pair (Mb)、多くの細菌・古細菌も同様に数 Mb 程度の長

さであることから、16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子を同一の DNA 鎖上を含むためには、Mb レベルの長さの DNA を回収すればよいはずである。しかしながら、現在 Mb レベルの長さの DNA を配列特異的に回収する手法の報告はなく、前述の微生物解析方法論を実現するためには、新たに DNA 回収手法を開発する必要がある。

本研究では、標的核酸に対する高い親和性と配列識別能を併せ持つ PNA (Peptide nucleic acid) を応用し、新規 DNA 回収手法の開発を行った。

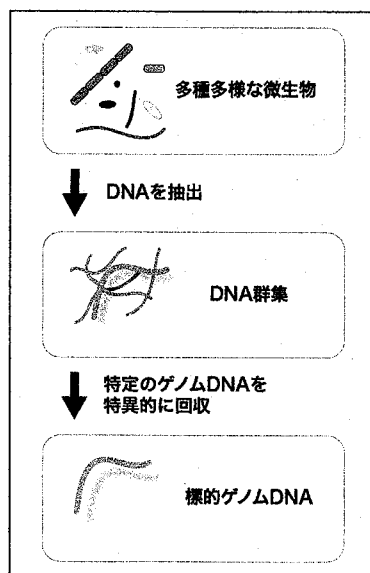


図1. 新規DNA回収手法概念図

2 実験方法

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、モデル微生物である *D. vulgaris* とその他の微生物からそれぞれ抽出した DNA を混合し、その中から *D. vulgaris* の DNA を特異的に回収できるか検討した。そしてその DNA が、i) 配列特異的に回収できるか、ii) Mb レベルの塩基長であるかの 2 点を PCR により評価した。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 *m* オペロン (*mA* から *mE*) を持っており、その中で最も *dva* 遺伝子から離れているのは *mC* で約 15 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 *mC* と *dva* 遺伝子に特異的な PCR 増幅を行えば、少なくとも 15 Mbp のゲノム DNA を得られていることが証明できる。

(1) 微生物細胞からの DNA の抽出

実験に用いるモデル微生物は、回収したゲノム DNA の長さの評価及び DNA の抽出が容易であることを考慮して、全ゲノムの塩基配列が決定しているグラム陰性細菌 *Desulfovibrio vulgaris* を用いた。また、非標的微生物としてメ

タン生成古細菌 *M. variabilis* を用いた。菌体からの DNA の抽出は DNA の切断を極力避けるため、Lysozyme 及び Proteinase K による抽出方法を用いた。DNA を配列特異的に回収するために、PNA を用いた。PNA プロープのは *D. vulgaris* の *dva* 遺伝子に特異的な Dvu1438 を作成した。PNA プロープには N 末端にピオチンを標識した。

(2) ストレプトアビジン被膜チューブを用いた DNA 回収手法の検討

ストレプトアビジン (SA) 被膜チューブを用いて DNA の回収を行った。まず、PNA プロープと標的 DNA の交雑を行い、次に SA 被膜チューブに添加し、PNA プロープを介して DNA をチューブに結合させた。その後、SA 被膜チューブ内を洗浄して PNA と交雑していない非標的 DNA を除去した (図 2)。そして、PNA プロープと DNA を乖離させて標的 DNA の回収を行った。

(3) 回収した DNA の評価

回収した DNA の評価は PCR 法を用いて行った PCR 増幅には、モデル微生物 *D. vulgaris* の *dva* 遺伝子を標的とするプライマーセット (DSR6F-m & DSR9R-m)、対照系として用いた *M. variabilis* の 16S rRNA 遺伝子を標的とするプライマーセット (Ari109f & UNIV1490R)、*D. vulgaris* *mC* 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット (DvuC-181F & UNIV907R-m) を作成し PCR に用いた。増幅した PCR 産物は電気泳動を行い、標的 DNA 回収の成否を判断した。

3. 実験結果及び考察

(1) DNA 回収条件の検討

まず、19 kb の短い PCR 産物を標的とした DNA 回収実験を行い条件の検討を行った。PCR 産物は、*D. vulgaris* の DNA の PNA 認識領域 (*dva* 遺伝子) を含む領域 (*dvaAB* 遺伝子) を鋳型として作成し、*M. variabilis* から抽出した DNA と 3 段階の比率 (PCR 産物:*M. variabilis*=1:1, 1:9, 1:99) で混合した。そこから回収した DNA は、*dva* 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により PCR で評

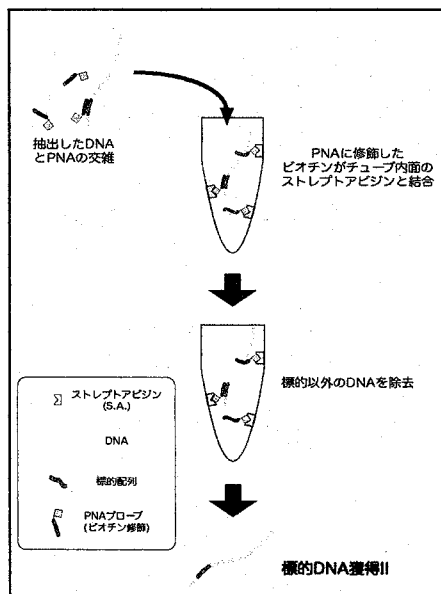


図2. S.A.チューブ法概念図

価した。その結果、反応液の NaCl 濃度を 80 mM 以下、交雑温度を 50°C 以下の条件において、すべての混合比率で *M. vanielii* は検出されず、*dsrA* 遺伝子の特異的な回収が確認された(図 3)。

(2) *D. vulgaris* ゲノム DNA 回収の試み

最適化した条件に基づいて、*D. vulgaris* と *M. vanielii* の混合 DNA から *D. vulgaris* のゲノム DNA の回収を試みた。その結果、混合溶液から回収した DNA において標的である *dsrA* 遺伝子、*mC* 16S rRNA 遺伝子だけでなく、わずかながら非標的微生物 *M. vanielii* に由来する古細菌の 16S rRNA 遺伝子も検出され、非特異的な DNA の回収が確認された(図 4)。このことから PCR 産物で決定した条件をゲノム DNA に直接適用できないことが明らかになった。また、対照系の *M. vanielii* の DNA のみの系では、一切 DNA の回収は確認されず、この対照系の結果と PCR 産物を用いた実験の結果から PNA プローブと *M. vanielii* の DNA が交雑しないことは明らかである。それにも関わらず、非特異的に DNA が回収された原因については、PNA プローブと交雑した *D. vulgaris* のゲノム DNA が *M. vanielii* の DNA と非特異的に交雑していたことが考えられた。

PNA/DNA の交雑と DNA/DNA の交雑の熱安定性が反応液の NaCl 濃度から受ける影響は大きな差があり、DNA/DNA の交雑の熱安定性が低下する低 NaCl 濃度条件において、PNA/DNA の交雑の熱安定性は増加する。そこで、DNA/DNA の交雑を抑制するため NaCl 無添加、高交雑温度(60-80°C)条件での DNA 回収を検討した。その結果、交雑温度 70°C において、標的 DNA の存在率 50%、10% の DNA サンプルから *D. vulgaris* に由来する *dsrA* 遺伝子と *mC* 16S rRNA 遺伝子の回収が確認され、非標的微生物である *M. vanielii* 由来の 16S rRNA 遺伝子は検出されなかった(図 5)。

(4) まとめ

純菌を用いたモデル系において、標的 DNA の存在率が 10%以上の DNA サンプルから、少なくとも 1.5 Mb 以上の長さのゲノム DNA を配列特異的に回収することに成功した。このことから、微生物の存在率が 10%以上という制限はあ

るものの、培養に依らずに環境中の微生物の機能と系統分類を結び付ける新規微生物解析方法論実現の可能性を示すことができた。

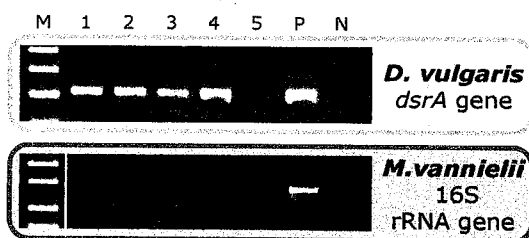


図3. PCR産物を用いたDNA回収条件の検討
M: DNA marker; lane 1-3: 混合DNA溶液からの回収DNA (lane1: *dsrAB*: *M. vanielii* = 1: 1, lane2: *dsrAB*: *M. vanielii* = 1: 9, lane3: *dsrAB*: *M. vanielii* = 1: 99), lane4: *dsrAB* 遺伝子 DNA溶液からの回収DNA, lane5: *M. vanielii* DNA溶液からの回収DNA, P: PCRポジティブコントロール, N: PCRネガティブコントロール

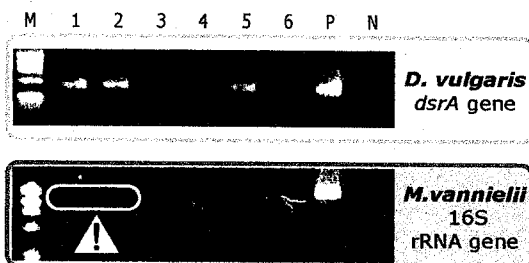


図4. *D. vulgaris* ゲノムDNAの回収1
M: DNA marker; lane 1-3: 混合DNA溶液からの回収DNA (lane1: *D. vulgaris*: *M. vanielii* = 1: 1, lane2: *D. vulgaris*: *M. vanielii* = 1: 9, lane3: *D. vulgaris*: *M. vanielii* = 1: 99), lane4: *D. vulgaris* DNA溶液からの回収DNA, lane5: *dsrAB* 遺伝子 DNA溶液からの回収DNA, lane6: *M. vanielii* DNA溶液からの回収DNA, P: PCRポジティブコントロール, N: PCRネガティブコントロール

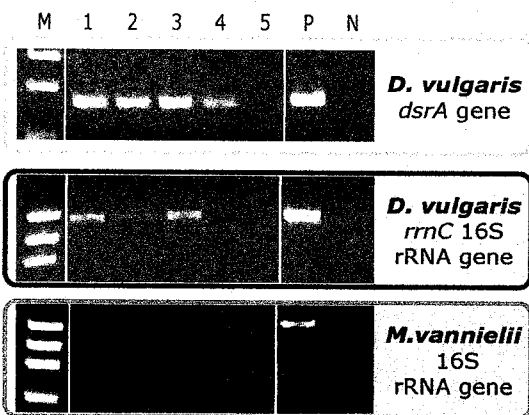


図5. *D. vulgaris* ゲノムDNAの回収2
M: DNA marker; lane 1-2: 混合DNA溶液からの回収DNA (lane1: *D. vulgaris*: *M. vanielii* = 1: 1, lane2: *D. vulgaris*: *M. vanielii* = 1: 9), lane3: *D. vulgaris* DNA溶液からの回収DNA, lane4: *dsrAB* 遺伝子 DNA溶液からの回収DNA, lane5: *M. vanielii* DNA溶液からの回収DNA, P: PCRポジティブコントロール, N: PCRネガティブコントロール