

B-11 RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)法 による活性汚泥微生物群の遺伝子発現解析の試み

○高橋 仁^{1*}・栗栖 太²・春日 郁朗¹・古米 弘明²

¹東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1)

²東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター (同上)

* E-mail: j_takahashi@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

生物学的廃水処理プロセスにおいて効率的な運転を図るためには、処理系全体に対する流入・流出の水質等の測定にとまらず、活性汚泥中に存在している微生物群の構造や機能を把握することが必要である。しかし微生物群構造を分離培養に頼らない分子生物学的分類・同定手法により解析し、さらに特定の現象に結びついた生理活性をもつ微生物の探索をするだけでは、現象を明確に把握することはできない。実際に微生物が「いつ、どのくらい」活性を示しているのかといった mRNA レベルによる解析手法が求められる。

環境変化に対する微生物群の応答を調べるためには、実験系の設定とサンプルの遺伝子発現の比較を行い、対象サンプルの機能特性に関する情報を得ることが必要である。本研究で用いた RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) 法は、選択性の低いプライマー及び PCR 条件により、mRNA を増幅して mRNA のフィンガープリントを取得し、ゲル上の断片から mRNA 遺伝子の情報を得る手法である¹⁾。この手法はこれまでは主に純粋培養系において、ある現象で特異的に発現している新規遺伝子を発見する研究²⁾で使われてきたが、複合微生物系の環境サンプルへ適用し網羅的な解析を行った報告は少ない。

そこで本研究では、活性汚泥中の微生物群における遺伝子発現を解析し、機能の発現と結び付けることを目的としてこの手法を活性汚泥サンプルへ適用するための検討を行った。まず *Pseudomonas putida* と *Bacillus subtilis* の純菌株を用い、RAP-PCR の実験条件の差異が結果に与える影響を考察した。次いで、活性汚泥サンプルに大量の基質を加えた後の遺伝子発現の経時変化について、RAP-PCR 法による解析を試みた。

2. 実験方法

(1) 試料からの RNA 抽出、rRNA の除去

a) 純菌株

Pseudomonas putida, *Bacillus subtilis* 菌株をそれぞれ、peptone 0.5g, tryptone 0.3g で1晩振とう培養し、培養液 1ml から total RNA を、RiboPure™-bacteria kit(Ambion)を用いて抽出した。さらに DNase I (Ambion)で DNA の除去を行った。また、MICROB Express kit(Ambion)を用いて、オリゴ DNA と磁気ビーズによる rRNA の特異的除去を行った。

b) 活性汚泥

水再生センターから採取した返送汚泥30ml の活性汚泥サンプルに対して1.0g のペプトンを加え、投入直前、30秒後、1分後、2分後、3分後、5分後、10分後に1ml を取り、採取直後に1ml の RNA later (SIGMA)を加えて RNA を安定化させた。同様の実験をほぼ同時刻に同じ活性汚泥サンプルを用いて再度行った。

RNeasy mini Kit(Qiagen)のプロトコルに従って Total RNA を抽出した。ただし破碎処理では、Lysing matrix E(Qbiogene)を用いて Fast prep で破碎した。また、DNase I (Ambion)で DNA を除去を行い、その後 MICROB Express kit(Ambion)を用いて rRNA の除去を行った。

(2) RT 反応、PCR 反応

Total RNA サンプルもしくは MICROB Express で rRNA を除去したサンプルに対して、First-Strand cDNA Synthesis Kit(GE Healthcare)を用いて逆転写反応を行った。キットの指示に従い、65℃でサンプルを変性させ、その後、random hexamer を用いて 37℃で逆転写反応を行った。

逆転写した cDNA サンプル鋳型として、PCR 反応を行った。10×PCR buffer (15mM MgCl₂): 5μl, 2mM dNTP mix: 5μl, DNA Taq polymerase: 0.25μl (以上、Applied Biosystems)、

10 μ M PCRprimer:5 μ l,滅菌水:34.75 μ l,cDNA:1 μ lを混合し、T3 thermocycler(biometra)で94℃ 9分の熱変性後、94℃ 1分間、40℃ 1分間、72℃ 2分間のサイクルを40回繰り返し、72℃ 1分間の伸長反応を行った。以上のPCR反応では、Fislage ら(1997)³⁾が細菌の mRNA を高頻度に増幅する目的で設計したプライマーを用いた。ただし、純菌に対する実験では Es5 プライマー、活性汚泥サンプルに対しては表 1 に示したすべてのプライマーで10通りの実験を行った。

表 1 使用したPCRプライマー

名前	塩基配列(5'→3')
Es1	GCTGGA AAAA
Es2	GCTGCTGGCG
Es3	GAAGTGCTGG
Es5	TGGCGGCGGC
Es6	AACTGGCGAA
Es7	ATGCGCTGGC
Es8	TGCCGATGAA
Es10	CTGGAAGAAG
Es11	ATGGCGCTGG
Es13	ATGGCGATGA

(3) 電気泳動、染色

10%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を DCode system(BioRad)を用いて行い PCR 産物を分離した。泳動終了後、ポリアクリルアミドゲルを Vistra green (Amersham-Pharmashia) で 15 分間染色し、蛍光イメージスキャナ FlorescenceImager595 (Molecular Dynamics) で画像を取り込んだ。

4. 実験結果と考察

(1) rRNA除去工程の影響

2つの純菌株に対する実験の結果を図 1 に示す。rRNA 除去工程なしでは *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* 共に100から800bp程度のPCR増幅産物が観測された。また、rRNA除去プロセスを加えることにより、バンドの消失や濃度の増加が見られた。Ambion社によると MICROB Express kit は微生物のRNAのうち大きな割合を占める16S, 23S rRNA を95%程度除去できるとされている。ここではこの工程の有無により、鋳型の構成に変化が生じ、PCR産物の種類・濃度に影響を与えたものと推察される。

図 2 に活性汚泥サンプルの30秒後、1分後、2分後の Es2 プライマーでのPCR産物を示す。純菌に対する実験と同様に、rRNA除去によるPCR反応の鋳型の処理による、増幅産物の違いが観測され、その傾向は基質投入から30秒後と1分後のサンプルで顕著であった。

(2) 基質添加に対する遺伝子発現の再現性

まず、同一の鋳型に対して複数回行った RAP-PCR 産物に明確な差異は見られなかった。(データ示さず)。図 3 に1回目と2回目の実験における基質投入から3分、5分、10分経過後のサンプルの RAP-PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した結果を示す。Es8 プライマーによる増幅では多数のバンドが観測され、同じ時刻におけるパターンはほぼ同一であることから、実験系の再現性が認められた。また3分後と5分後、5分後と10分後に若干似かよったパターンも見られた(レーン4と5)。これは、実験では同一の汚泥を用いているものの、実験開始時刻の違いが影響している可能性もある。

(3) PCRプライマーによる違い

表 1 に示した10本のプライマーを用いて PCR 反応を行った結果、Es1, Es6, Es10 プライマーでは PCR 産物は観測されず、他の7つのプライマーでの増幅では多数のバンドが得られた。プライマーの GC 含量が高く ATG 開始コドンが含まれると微生物の RNA が効率的に増幅されるとの知見があり³⁾、本研究の活性汚泥サンプルに対する実験でもそれが影響したと考えられる。

図 5 に Es8 と Es7 プライマーによる増幅産物の時間経過に伴う変化を示す。Es8 プライマーによる増幅産物では、時間が経つに従ってバンドの濃度の変化が見られ、特定の時間にだけ観測されたバンドも多数存在した。一方、Es7 プライマーによる増幅産物のパターンは、10分の間にそれほど変化がなかった。

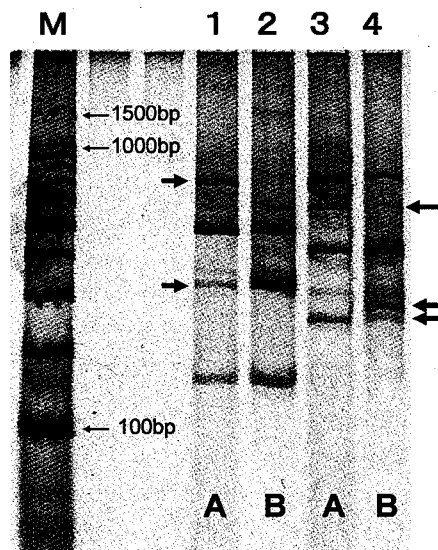


図 1 2 つの純菌株由来の Es5 プライマーによる RAP-PCR 産物

M: 100bp ladder (TOYOBO), Lane1, 2: *P. putida*, Lane3, 4: *B. subtilis*

A: rRNA 除去なし、B: rRNA 除去あり。矢印は rRNA 除去プロセスの付加により濃さに変化のあったバンドを示す。

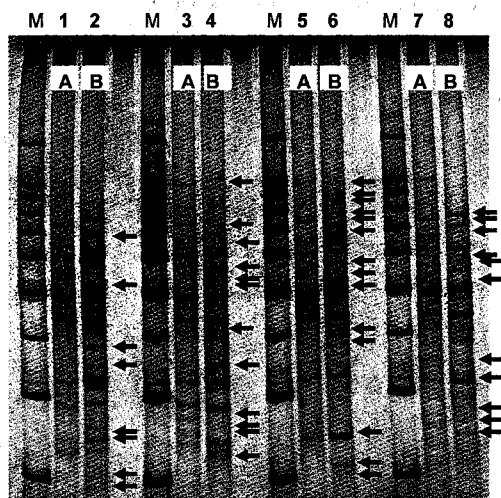


図2 rRNA 除去プロセスの有無による増幅産物の違い

M:100bp ladder (TOYOBO), Lane1, 2: 基質投入直前, Lane3, 4: 30秒後, Lane5, 6: 1分後, Lane7, 8: 2分後における活性汚泥サンプルのEs2プライマーによる増幅産物。A: rRNA 除去プロセスなし, B: rRNA 除去プロセスあり。矢印はrRNA 除去プロセスにより濃さに変化のあったバンドを示す。

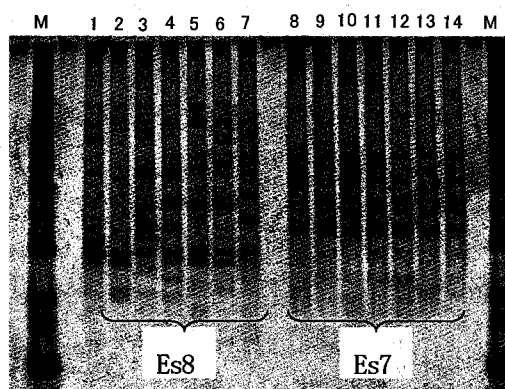


図4 用いたプライマーによる経時変化の違い

M:100bp ladder (TOYOBO), Lane1~7: 順に基質投入直前、30秒後、1分後、2分後、3分後、5分後、10分後の活性汚泥サンプルのEs8プライマーによる増幅産物, Lane8~14: 順に基質投入直前、30秒後、1分後、2分後、3分後、5分後、10分後の活性汚泥サンプルのEs7プライマーによる増幅産物。(ともにrRNA 除去プロセスあり)。

5. まとめ

本研究では、微生物群集における遺伝子発現を非特異的に解析するためのツールとして、RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) 法の活性汚泥サンプルへの適用を検討した。活性汚泥サンプルに対して基質を投入した直後の遺伝子発現を RAP-PCR 法により解析し、遺伝子発現の時間的変動を観測することができた。複合微生物系の遺伝子解析を行う必要のある様々な状況に対して適用をすることで、微生物群の解析を mRNA レベルで行うことが可能になると考えられる。

6. 参考文献

1. Fleming JT, Yao WH, Sayler GS: Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. Appl Environ Microbiol 64:3698-3706, 1999
2. Li SK, Xiao X, Li JY, Luo JX, Wang FP: Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *Shewanella* sp WP3 using RNA arbitrarily primed PCR. EXTREMOPHILES 10:97-104, 2006
3. Fislage R, Berceanu M, Humboldt Y, Wendt M, Oberender H: Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. Nucleic Acids Res 25:1830-1835, 1997

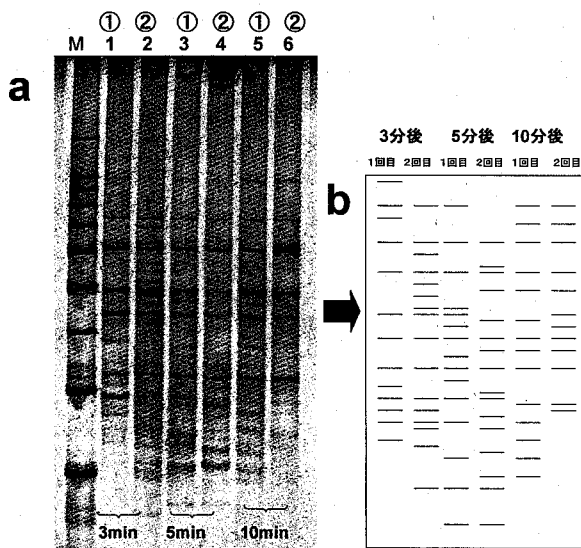


図3 フィンガープリンティングの再現性(a:電気泳動画像, b:簡略図)

M:100bp ladder (TOYOBO), Lane1, 2: 3分後, Lane3, 4: 5分後, Lane5, 6: 10分後の活性汚泥サンプルのEs2プライマーによる増幅産物。(rRNA 除去プロセスなし)。①: 1回目の実験、②: 2回目の実験。