

B-69 ランダムゲノムライブラリを用いた アイソトープアレイによる基質特異的な細菌の検出

○飛野 智宏^{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: tobino@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

微生物群集中に存在する個々の微生物の機能と系統を結びつけて知ることは、微生物群集機能を活用した排水処理やバイオレメディエーション技術の発展のための重要な知見となる。近年、SIP 法や MAR-FISH 法に見られるように、同位体元素をトレーサーとして微生物の基質利用特性を活用することにより、微生物群集中において特定の機能に関わる細菌を検出するための研究が盛んに行われている。また Adamczyk (2003) ¹⁾ らは、放射性同位体標識された基質により試料を培養後、標識された 16S rRNA をマイクロアレイ法により検出可能であることを示し Isotope array と名付けた。

本研究では、群集中で特定の物質の代謝に関わる細菌を検出するための新しい手法として、以下のような手法を提案する。まず、対象サンプルから抽出したゲノム DNA を断片化した後、クローニングによりゲノムライブラリを作製 (ランダムゲノムライブラリ) し、それらのゲノム断片をプローブとしたメンブレンアレイ (①) を作製する。一方、同一のサンプルに対し、放射性同位体元素により標識された基質を与えて培養後、ゲノム DNA を抽出・断片化し、ターゲット (②) とする。①と②で Hybridization を行い、放射線によるイメージングの後、

シグナルの得られたスポットに対応するゲノム断片の塩基配列情報を解読し、データベースとの比較からそのゲノム断片の同定を行う。本手法は、MAR-FISH 法や Isotope array と比べて前もった塩基配列情報を必要としないことが利点であり、また放射線検出により SIP 法と比べて標識 DNA を明瞭に検出できることが期待される。この手法の概念図を図 1 に示した。今回はこの手法の特異性と感度を検証するために、3 種類の純菌を対象とし、DIG 標識による化学発光検出と放射線による検出を合わせた実験を行った。

2. 実験方法

(1) メンブレンアレイの作製

Zoogloea ramigera (IAM 12136)、*Acinetobacter calcoaceticus* (IAM 12087)、*Methylobacterium organophilum* (NBRC 15689) を液体培地で 1~2 日間培養し、回収した菌体からゲノム DNA をそれぞれ抽出し、精製した。精製した DNA を *Eco*R I と *Hind* III の 2 種類の制限酵素をあわせて用いて消化 (37℃, 16 時間) した後、脱リン酸化反応を行い、pUC19 プラスミドと *E. coli* DH5α competent cell を用いてクローニングを行って各菌 16 個のクローンからなるランダムゲノムライブラリを作製した。ランダムゲノムライブラリから各 1μl をテンプレートとして PCR 反応 (プライマー: 5'-ACGACGTTGTAAACGACGGCCAGT-3' および 5'-CACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3') を行い、増幅産物を精製した後、*Eco*R I と *Hind* III にて消化・精製を行ってプローブを作製した。各プローブの断片長をアガロースゲル電気泳動により確認し、各プローブ (10 ng/μl) をポジティブチャージナイロンメンブレン (Roche) に 1μl ずつスポットした (アレイ 1)。また 3 種類の純菌のゲノム DNA を等量混合したのものに対してもアレイ 1 と同様の操作を行い、48 個のクローンからな

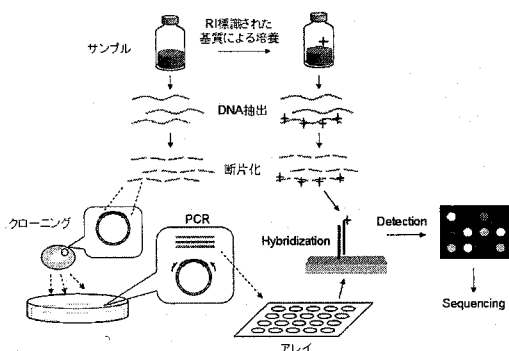


図1 ランダムゲノムライブラリを用いたアイソトープアレイの概念図

るランダムゲノムライブラリおよびメンブレンアレイを作製した (アレイ 2)。化学発光検出の際のシグナル強度のコントロールとして、DIG 標識された pBR328 DNA の希釈列を作製し、各メンブレンの上端と左端にそれぞれ 1 μ l ずつスポットした。

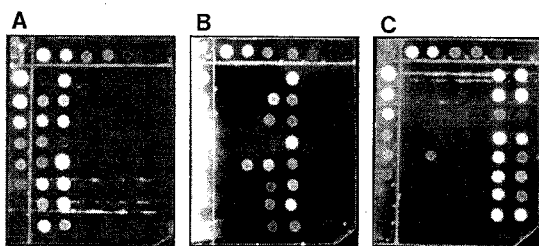
(2) 放射性同位体標識基質による培養

[1- 14 C]CH $_3$ COONa と [14 C]CH $_3$ OH の 2 種類の放射性同位体標識基質を用いて培養を行った。酢酸資化能を有する *A. calcoaceticus* を [1- 14 C]CH $_3$ COONa を含み酢酸ナトリウムを唯一の炭素源とする培地 5ml (100 μ Ci/ml, 8.8mM) にて 37°C で培養した。またメタノール資化能を有する *M. organophilum* を [14 C]CH $_3$ OH を含みメタノールを唯一の炭素源とする培地 5ml (2 μ Ci/ml, 50mM) にて 30°C で培養した。さらに酢酸ナトリウムとメタノールを炭素源とし、[1- 14 C]CH $_3$ COONa と [14 C]CH $_3$ OH のどちらか一方を含む培地をそれぞれ作製し、3 種類の純菌を 30°C で混合培養した。また各サンプルから回収した菌体および培養後の各サンプルから抽出した DNA の液体シンチレーションカウントを測定した。

(3) メンブレンアレイとの Hybridization と検出

a) DIG 標識による化学発光検出

*Eco*R I と *Hind* III により消化した各純菌のゲノム DNA をランダムプライム法により DIG 標識した。反応後の産物全量を 3ml の Hybridization buffer に加えてメンブレンアレイとの Hybridization を行った (55°C, 16 時間)。洗浄後、化学発光反応を行いフィルムに 10~20 分露光した。



	cont 10pc	cont 3pc	cont 1pc	cont 1pc	cont 0.3pc	cont 0.1pc
cont 30pc	Z-9	A-9	A-9	M-9	M-9	M-9
cont 10pc	Z-10	A-10	A-10	M-10	M-10	M-10
cont 3pc	Z-11	A-11	A-11	M-11	M-11	M-11
cont 1pc	Z-12	A-12	A-12	M-12	M-12	M-12
cont 0.3pc	Z-13	A-13	A-13	M-13	M-13	M-13
cont 0.1pc	Z-14	A-14	A-14	M-14	M-14	M-14
cont 0.03pc	Z-15	A-15	A-15	M-15	M-15	M-15
cont 0.01pc	Z-16	A-16	A-16	M-16	M-16	M-16
cont 0.00pc	Z-17	A-17	A-17	M-17	M-17	M-17

マス中において、
cont: DIG 標識されたコントロール DNA およびそのスポット量
Z-1~Z-16: *Z. ramigera*
A-1~A-16: *A. calcoaceticus*
M-1~M-16: *M. organophilum*
■ <500bp
□ <500~1500bp
□ >1500bp
マス中下段の Z, A, M はそれぞれ *Z. ramigera*, *A. calcoaceticus*, *M. organophilum* をターゲットとした際にシグナルの得られたスポットを意味する。

図2 アレイ1の Hybridization 結果およびプローブ配置図

上段) A, B, C はそれぞれ *Z. ramigera*, *A. calcoaceticus*, *M. organophilum* をターゲットとした結果。下段) プローブ配置図。

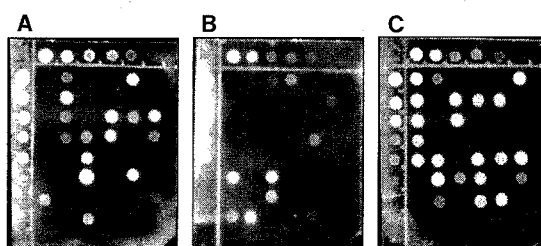
b) 放射線検出

放射性同位体標識されたゲノム DNA を *Eco*R I と *Hind* III により消化後 (37°C, 16 時間)、カラム精製により酵素を除去した。精製 DNA 1~1.5 μ g を 1ml の Hybridization buffer に加えてメンブレンアレイとの Hybridization を行った (55°C, 20 時間)。洗浄・風乾後、イメージングプレート (Fujifilm) に 3~4 日間露光し、BAS1500 (Fujifilm) にて放射線検出を行い可視化した。また放射線検出の感度を検証するため、放射性同位体で標識された *A. calcoaceticus* の DNA (25000cpm/ μ g DNA) の希釈列を作製し、メンブレンにスポットして 7 日間露光後、放射線検出および可視化を行った。

3. 結果・考察

(1) ランダムゲノムライブラリを用いたメンブレンアレイの特異性の検証

ランダムゲノムライブラリを用いたメンブレンアレイによる検出の特異性を検証するために、3 種類の純菌からそれぞれ 16 個のゲノム断片をプローブとして作製したアレイ 1 に対し、DIG 標識された各菌のゲノム断片との Hybridization を行った (図 2)。48 個のスポットのうち 1 箇所の cross-hybridization がみられるが (Z-13)、それ以外はほぼ全て菌に特異的なシグナルが得られた。また、シグナル強度とプローブ断片長には高い正の相関が同われた。次に、混合系のモデルとして 3 種類の純菌のゲノム DNA を混合して作製したアレイ 2 に対しても同様の Hybridization を行った (図 3)。Cross-hybridization は 2 箇所のスポット (Mix-9, Mix-22) で見られたが、それ以外のスポットは 3 種類の



	cont 10pc	cont 3pc	cont 1pc	cont 1pc	cont 0.3pc	cont 0.1pc
cont 30pc	Mix-1	Mix-2	Mix-3	Mix-4	Mix-5	Mix-6
cont 10pc	Mix-7	Mix-8	Mix-9	Mix-10	Mix-11	Mix-12
cont 3pc	Mix-13	Mix-14	Mix-15	Mix-16	Mix-17	Mix-18
cont 1pc	Mix-19	Mix-20	Mix-21	Mix-22	Mix-23	Mix-24
cont 0.3pc	Mix-25	Mix-26	Mix-27	Mix-28	Mix-29	Mix-30
cont 0.1pc	Mix-31	Mix-32	Mix-33	Mix-34	Mix-35	Mix-36
cont 0.03pc	Mix-37	Mix-38	Mix-39	Mix-40	Mix-41	Mix-42
cont 0.01pc	Mix-43	Mix-44	Mix-45	Mix-46	Mix-47	Mix-48
cont 0.00pc	Mix-49	Mix-50	Mix-51	Mix-52	Mix-53	Mix-54

マス中において、
cont: DIG 標識されたコントロール DNA およびそのスポット量
Mix-1~Mix-48: DNA Mix を用いて作製したプローブ
Miss: 精製過程で失われたプローブ
■ <500bp
□ <500~1500bp
□ >1500bp
マス中下段の Z, A, M はそれぞれ *Z. ramigera*, *A. calcoaceticus*, *M. organophilum* をターゲットとした際にシグナルの得られたスポットを意味する。

図3 アレイ2の Hybridization 結果およびプローブ配置図

上段) A, B, C はそれぞれ *Z. ramigera*, *A. calcoaceticus*, *M. organophilum* をターゲットとした結果。下段) プローブ配置図。

表1 放射性同位体標識基質を用いた培養による放射性同位体の菌体および DNA への取り込み

sample	RI 基質	基質濃度 (mM)	放射線量 (μCi/ml)	培養時間 (h)	菌体への取り込み (%)	cpm/μgDNA
<i>A. calcoaceticus</i>	[1- ¹⁴ C]CH ₃ COONa	8.8	100	44	14	20,000
<i>M. organophilum</i>	[¹⁴ C]CH ₃ OH	50	2	44	35	2,100
Mix culture (<i>Z. ramigera</i> , <i>A. calcoaceticus</i> , <i>M. organophilum</i>)	[1- ¹⁴ C]CH ₃ COONa	8.8 (CH ₃ COONa) + 50 (CH ₃ OH)	100	68	28	14,000
	[¹⁴ C]CH ₃ OH	8.5 (CH ₃ COONa) + 50 (CH ₃ OH)	2	68	24	1,000

純菌のいずれか1つに対応してシグナルを発した。Cross-hybridization を示したスポットのプロープは、属レベルを超えて相同性が高いゲノム断片であった可能性が考えられる。以上のように、若干の cross-hybridization の可能性は残るものの、今回のように数百から数千塩基対のゲノム DNA 断片をプローブとしたメンブレンアレイによって少なくとも属レベルでの特異的な検出を行うことが可能であるといえる。

(2) 放射性同位体標識基質の取り込みによる DNA の標識

¹⁴C 酢酸および ¹⁴C メタノールを炭素源とした培養実験を行った。純粋培養と混合培養における放射性同位体の菌体への取り込みおよび DNA の液体シンチレーションカウント数を表1に示した。培養後回収した菌体のカウント数を培養前の培地のカウント数で除したものを菌体への取り込みとした。培養後の DNA 1μg 当たりのカウント数は、¹⁴C 酢酸を用いた場合純粋培養で 20000cpm、混合培養で 14000cpm となったのに対し、¹⁴C メタノールを用いた場合純粋培養で 2000cpm、混合培養で 1000cpm となり 10 倍程度の差が見られた。これは用いた基質の比放射能の差に主に由来すると思われる。また混合培養では、放射性同位体基質を取り込まなかった菌の DNA が混在するため、純粋培養と比べて単位 DNA 量当たりのカウント数が低くなったと考えられる。rRNA 標的 Isotope array¹⁾では 19000cpm/μg RNA の rRNA を用いて検出を行っており、今回の培養で DNA についても ¹⁴C 酢酸塩を炭素源とした場合においては同程度の標識率を得ることができた。

(3) アレイにおける放射線検出の感度について

放射性同位体標識基質を用いた培養により放射性同位体標識されたゲノム DNA を用い、作製したメンブレンアレイとの Hybridization を行った。しかし、今回の条件ではシグナルを得ることができなかった。Hybridization に用いた全ゲノムのうち作製したプローブがターゲットとするゲノム断片の割合は 1/1000 程度であることが予想される (プローブ断片長を数千塩基対、ゲノム全長を数メガ塩基対と仮定した場合)。このことが、Isotope array と同程度の標識率でありながら今回検出で

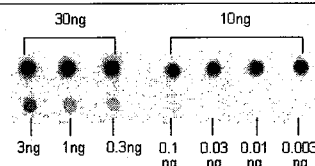


図4 ¹⁴C で放射性同位体標識された *A. calcoaceticus* (25000cpm/μgDNA) の DNA の希釈列の検出 0.1ng までが可視化されている。

きなかった要因の一つと推察される。放射性同位体標識されたゲノム DNA の希釈列の検出結果 (図4) から、今回用いた検出系での検出限界は 0.1 ngDNA=2.5 cpm 程度であった。これは Polz ら²⁾の報告と比較して検出限界が1桁高く、用いた機器の性能や実験系の相違によるものだと考えられる。しかしながら、図2に示した化学発光検出の DNA 希釈列と各スポットのシグナル強度の比較から、1スポットに最大数十 pg のターゲットがハイブリダイズしていることが示唆され、放射線検出に必要な量 0.1ng との差は1オーダー程度であり、感度を上げるための工夫により検出が可能となることが十分期待できる。また、図2の DNA 希釈列において 0.3pg までの標識 DNA が可視化されており、化学発光検出は放射線検出より3オーダー高い感度を持つことが示された。このことが、化学発光検出においてシグナルを得ることができた要因だと考えられる。

4. まとめ

ランダムゲノムライブラリを用いたメンブレンアレイに対し、DIG 標識による化学発光検出および培養を介して放射性同位体標識された DNA による放射線検出を行った結果、以下の結論を得た。

- (1) 3種類の純菌のゲノム断片を用いて作製した 48 個のプローブからなるメンブレンアレイにより、若干の cross-hybridization が観察されたものの特異的な検出が可能であった。
- (2) 今回用いた Hybridization 条件では放射線による十分な検出感度を得ることができなかったものの、約 10 倍程度の増感により検出できる可能性が示された。

参考文献

- 1) Adamczyk et al. Appl. Environ. Microbiol. Nov. 2003, p.6875-6887
- 2) Polz et al. Biol. Bull. 204: 196-199. (April 2003)