

RNA の配列選択的切断法を利用した低頻度及び新規系統微生物の探索と実体化

水圏土壌環境制御研究室 吉田 広輝

指導教官 大橋 晶良, 原田 秀樹

1. はじめに

本研究では、複合微生物試料由来の 16S rRNA をユニバーサル切断プローブと RNase H を用いて切断し、切断されなかった 16S rRNA 断片の配列の解析を行い、未知の微生物群が存在する可能性を探ることを目的とした。

近年、16S rRNA 遺伝子を指標とした微生物群集構造解析により自然環境中には多様な微生物が存在していることが明らかになってきた。微生物の群集構造解析では環境試料から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的としたユニバーサルプライマー（全細菌・古細菌を網羅するプライマー）を用いて PCR 増幅を行い、クローンライブラリを構築する手法が広く用いられている。本手法において、特定の微生物群以外の 16S rRNA 遺伝子を解析するための手法として、PNA(peptide nucleic acid)を利用した PCR クランピング法による微生物多様性解析手法が提案されている(von Wintzingerode et al., 2000)。しかしながら、この手法は厳密な PCR 条件の制御が困難であることが知られている。本研究では、特定の微生物群以外の微生物由来 16S rRNA 遺伝子を選択的に解析するため、リボヌクレアゼ H (RNaseH) とオリゴヌクレオチドを用いた 16SrRNA の配列選択的切断手法に注目した(Uyeno et al., 2004)(Fig-1)。本手法では、特定の微生物群由来 rRNA に特異的な切断プローブを利用し、環境試料等から抽出した RNA 中の特定 16S rRNA を RNaseH により切断する。次に、切断反応後未切断の 16SrRNA 断片を逆転写し PCR 反応を行う。その後 PCR 産物をクローン化することによって、特定の微生物群以外の 16SrRNA 配列を回収することが可能となる。従

って、本手法では実際の環境中では存在量が比較的低い微生物グループ等の 16S rRNA 配列を選択的に回収することができると考えられる。また、現在まで広く使用されている 16S rRNA 用のユニバーサルプライマーを切断プローブとして利用し、複合微生物試料からの 16S rRNA を切断すれば、その結果切れ残る RNA 断片は、現在まで配列上認識できない種類の微生物からのものであることが考えられる。

本研究では、まず、本研究では、嫌気性排水・廃棄物処理汚泥をモデル複合微生物群集として利用し、その中で最も高頻度で検出されるメタン生成古細菌(*Methanosaeta* 属古細菌)の 16S rRNA を選択的に切断し、未切断の古細菌由来 16SrRNA を RT-PCR 法とクローンライブラリ法で解析することにより本手法の有効性の確認

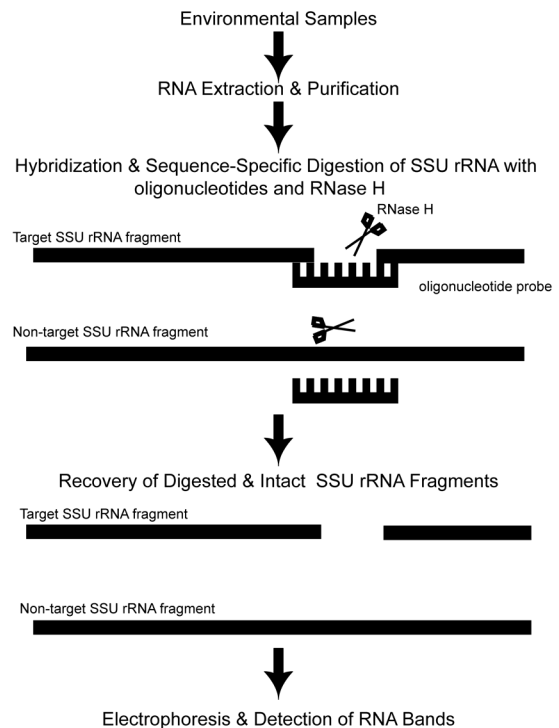


Fig.1 Flow diagram showing the the concept of sequence-specific deigestion of SSU rRNA with oligonucleotides and RNase H.

を行った後に、各種複合微生物試料に適用し、低頻度および新規系統微生物群の検出、およびその実体化を行うことを目的とした。

2. 実験方法

2-1 本手法の有効性の確認

モデル複合微生物試料として、異性化糖廃水処理嫌気汚泥および、都市下水処理 UASB 汚泥を使用した。試料からの RNA の抽出は酸性フェノール法を使用した。RNA の選択的切断反応は、抽出した RNA と切断プローブを含むバッファーに添加し、95°C で 1 分間熱変性させた。その後ハイブリダイゼーション温度まで冷却し、直ちにリボヌクレアーゼ H を含むバッファーを添加、15 分間の反応を行った。切断プローブには、*Methanosaeta* 属古細菌の 16S rRNA を標的とした MX825m(5'-TggCCgACACCTAgCgAg-3', (Uyeno et al., 2004)) を使用した。切断後の RNA サンプルを回収し、逆転写反応キットとして、ReverTraAce-a- (TOYOBO) を使用し、逆転写反応を行った。逆転写プライマーには、UNIV1389r (5'-ACgggCggTgTgTRCAA -3', (Liu et al., 2001)) を使用した。逆転写反応後の PCR 増幅には、古細菌に特異的な A109f(5'-ACKgCTCAgTAACACgT-3', (Grobkopf et al., 1998)) と逆転写の際に使用した逆転写プライマー UNIV1389r (Liu et al., 2001)) のプライマーセットを用いた。クローンライブラリを作成した後、無作為にクローンを選択し、その塩基配列を決定した。

2-2 低頻度および新規系統微生物群の検出・実体化

複合微生物試料として活性汚泥、消化汚泥、および人工排水を処理している UASB 反応器内のグラニュール汚泥を収集し、酸性フェノール法を用いて RNA を抽出した。UNIV530r 切断プローブで分解可能な微生物の 16S rRNA 量を定

量した。UASB グラニュール汚泥由来の 16S rRNA を UNIV530r 切断プローブと RNase H を用いて切断した。この反応液をアガロースゲルで電気泳動を行った後、切断されなかった断片をゲルから切り出し cDNA 合成キット (UniversalRiboClone、Promega) を用いて cDNA 化した。cDNA 産物は、プラスミドベクターに組み込み大腸菌を用いてクローンライブラリを作成した後、無作為にクローンを選択しその塩基配列を決定した。

3. 実験結果および考察

3-1 本手法の有効性の確認

RNaseH による切断反応を行わずに、16S rRNA の RT-PCR を行いクローン化した場合には、全古細菌のクローン中に占める *Methanosaeta* 属古細菌の割合は、異性化糖廃水処理嫌気汚泥において、7 割程度(11/15 クローン)、都市下水処理 UASB 汚泥において 8 割程度(12/14 クローン)であった。一方、RNase H により *Methanosaeta* 属古細菌の RNA 配列を切断した後に、この RNA サンプルを元に古細菌由来の 16S rRNA の RT-PCR を行いクローン化した場合には全古細菌のクローン中に占める *Methanosaeta* 属古細菌の割合は、異性化糖廃水処理嫌気汚泥において 6 割程度(11/18 クローン)、都市下水処理 UASB 汚泥において 6 割程度(11/16 クローン)であった。したがって、異性化糖廃水処理嫌気汚泥および都市下水処理 UASB 汚泥の両方において RNase H により *Methanosaeta* 属古細菌の RNA 配列を切断した後に、16S rRNA の RT-PCR を行いクローン化した場合の *Methanosaeta* 属古細菌由来割合を、RNase H による切断反応を行わずに 16SrRNA の RT-PCR を行いクローン化した場合と、比較して、1 割程度減少させることができた。

また、RNase H による切断を行った試料の

Methanosaeta 属古細菌の 16S rRNA 遺伝子配列には、切断プローブ(MX825-m)と相同な配列は存在しなかった。

以上の結果より RNase H とオリゴヌクレオチドを利用した配列選択的切断法を利用すれば、対象とする微生物以外の(例えば比較的低頻度の)微生物由来 16SrRNA を検出、解析することが可能となることが示唆された。また本手法は、既存のユニバーサルな 16S rRNA プローブと相補的な配列を持たないような新しい微生物の探索にも使用できる可能性が示唆された。

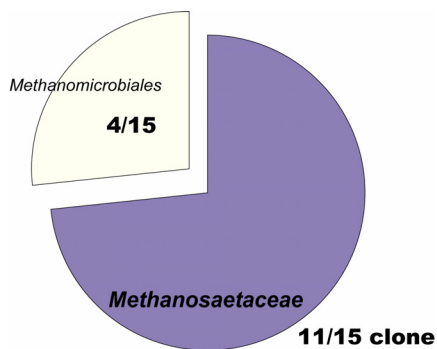


Fig 2 配列選択的切断法を適用しない場合

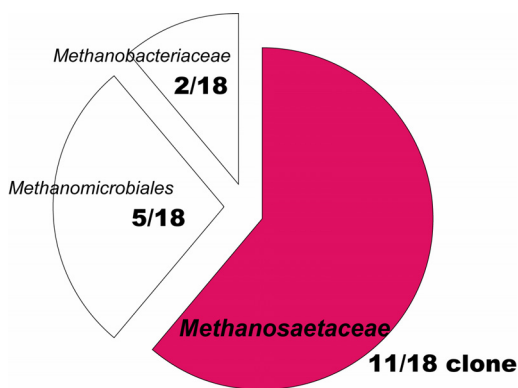


Fig 3 配列選択的切断法を適用した場合

3-2 低頻度および新規系統微生物の探索・実体

Fig-4 に、複合微生物試料由来の rRNA を RNase H と UNIV530 切断プローブ及を用いて定量した結果を示した。この結果より、活性汚泥中には 3%程度、消化汚泥中には 31%程度、UASB グラニュール汚泥の 16S rRNA には、UNIV530r 切断プローブを用いた場合切断されない配列が全 16S rRNA 中に 38%存在していた。

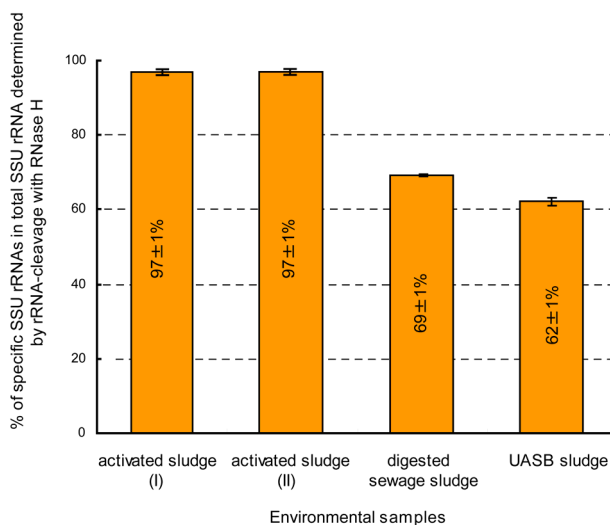


Fig 4 各種複合微生物試料の定量

この際、UASB グラニュール汚泥の 16S rRNA には、UNIV530r 切断プローブを用いた場合切断されない配列が全 16S rRNA 中に 38%存在していた。ここで切断されなかった 16S rRNA を cDNA 化した後、クローン化しこのクローンの配列を解析した。この結果得られたクローンの大多数は、塩基配列情報上において UNIV530r 切断プローブと完全に結合するクローンであった。

4. まとめ

Methanosaeta 属古細菌を対象とした本手法の有効性の確認を行った結果から、RNase H とオリゴヌクレオチドを利用した配列選択的切断法を利用すれば、対象とする微生物以外の(例

えば比較的low頻度の) 微生物由来 16S rRNA を検出、解析することが可能となることが示唆された。また、また本手法は、既存のユニバーサルな 16S rRNA プローブと相補的な配列を持たないような新しい微生物の探索にも使用できる可能性が示唆された。

複合微生物試料由来の 16S rRNA を RNase H と UNIV530 切断プローブを用いて定量した結果を示した。UASB グラニュール汚泥の 16S rRNA には、UNIV530r 切断プローブを用いた場合切断されない配列が全 16S rRNA 中に 38% 存在していた。ここで切断されなかった 16S rRNA を cDNA 化した後、クローン化しこのクローンの配列を解析した。この結果得られたクローンの大多数は、塩基配列情報上において UNIV530r 切断プローブと完全に結合するクローンであった。このように切断プローブと標的 RNA が塩基配列情報上では完全に結合するにもかかわらず、RNase H を用いた切断反応においては UNIV530r 切断プローブのように切断できない場合が存在する。なぜ、このように塩基配列情報上は切断プローブと標的 RNA とが完全に結合するにもかかわらず、RNase H 酵素反応系では切断できないのかは謎である。今後、これを解明する予定である。

今回は、未知の微生物群の探索およびその実体化をおこなうことができなかった。しかしながら、切断反応に更なる改良を加えれば、系統学上、非常に新規な微生物群の検出・実体化を行うことができるはずである。

参考文献

Grobkopf, R., Janssen, P.H., and Liesack, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 960-969.

Liu, W.T., Mirzabekov, A.D., and Stahl, D.A. (2001) Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. *Environ. Microbiol.* **3**: 619-629.

Uyeno, Y., Sekiguchi, Y., Sunaga, A., Yoshida, H., and Kamagata, Y. (2004) Sequence-Specific Cleavage of Small-Subunit (SSU) rRNA with Oligonucleotides and RNase H: a Rapid and Simple Approach to SSU rRNA-Based Quantitative Detection of Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3650-3663.

von Wintzingerode, F., Landt, O., Ehrlich, A., and Gobel, U.B. (2000) Peptide Nucleic Acid-Mediated PCR Clamping as a Useful Supplement in the Determination of Microbial Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 549-557.