

環境微生物の機能と系統分類を結び付けるための新規 DNA 回収技術の開発

水圏土壌環境制御研究室 関谷努力

指導教官 原田秀樹 大橋晶良 井町寛之

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の分類系統的な多様性を、また微生物の機能を司る機能遺伝子を対象とした解析を行うことで、その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、系統分類と機能遺伝子それぞれの解析結果を結び付けて理解することは難しく、解析を行った機能を持っている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もつものを特異的に回収する (Fig. 1)。そして回収した DNA の機能遺伝子と 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 4.6 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。また、存在率の低い微生物にも適用するために、1%程度の低存在率の DNA の回収を行えることが重要である。

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)¹ を応用し、新規 DNA 回収手法の開発を行った。

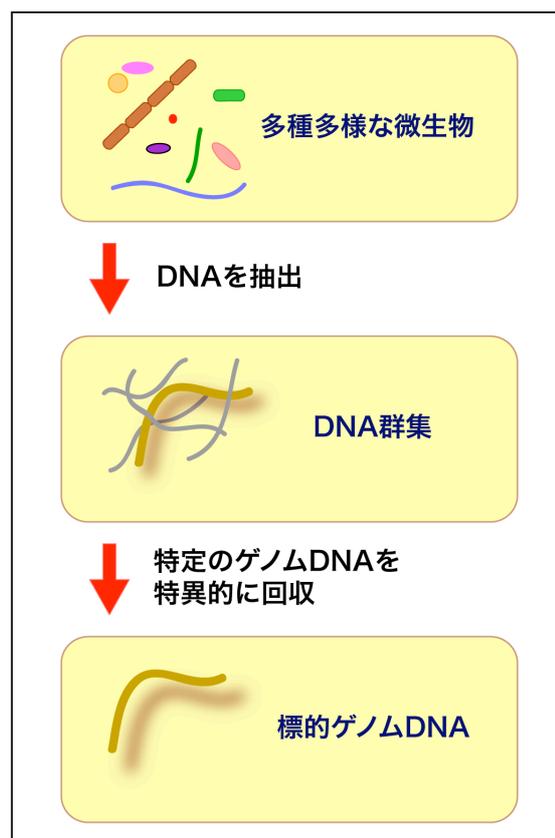


Fig. 1 Schematic illustration of the concept of novel DNA capturing method.

2. 実験方法

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* strain Hildenborough を用いることとした。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 プローブの設計には分子系統解析ソフト ARB を使い、*D. vulgaris* の *dsrA* 遺伝子に特異的なプローブ Dvu1438 を作

成した。PNA プロープにはN 末端にビオチンを標識した。

2.1 ストレプトアビジン被膜磁性ビーズを用いた DNA 回収手法の検討

ゲノム DNA を回収するためにストレプトアビジンが被膜してある磁性ビーズを用いた。PNA プロープは磁性ビーズと結合させた後、標的DNA との交雑を行った。

70°C もしくは 95°C で2本鎖であるゲノム DNA を乖離させた後、45-55°C で1晩交雑反応を行った。その後、磁石を用いて磁性ビーズを洗浄して非標的 DNA を除去し、PNA プロープと交雑した標的 DNA の回収を行った (Fig.2)。

2.2 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被膜チューブ (S.A.-coated tube) 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S.A.-coated tube に添加し、PNA プロープと交雑した DNA をチューブに結合させた。その後、S.A.-coated tube 内を洗浄して非標的 DNA を除去した (Fig. 3)。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。

2.3 回収した DNA の評価

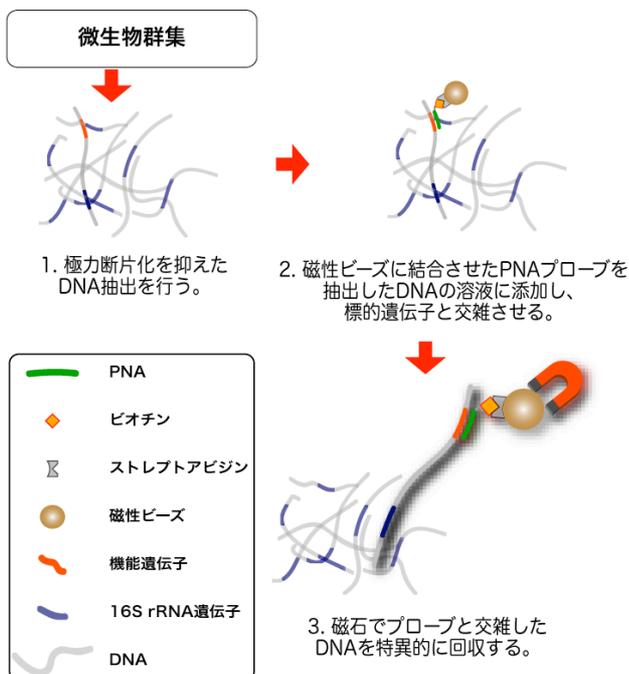


Fig. 2 Schematic illustration of DNA capturing method using streptavidine-coated magnetic beads.

回収した DNA の評価は PCR 法を用いて行った。PCR 増幅には、おおよそ全ての硫酸還元原核生物の *dsrA* 遺伝子に特異的なプライマーセット (DSR1F & DSR6R-m)²、おおよそ全ての硫酸還元原核生物の *dsrAB* 遺伝子に特異的なプライマーセット (DSR1F & DSR4R)²、おおよそ全ての古細菌 (*Archaea*) の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット (Ar109f³ & UNIV1490R⁴)、おおよそ全ての細菌 (*Bacteria*) および古細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーセット (UNIV907F & UNIV1490R)⁴ を用いた。また、*D. vulgaris* *rmC* 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。

3. 実験結果及び考察

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

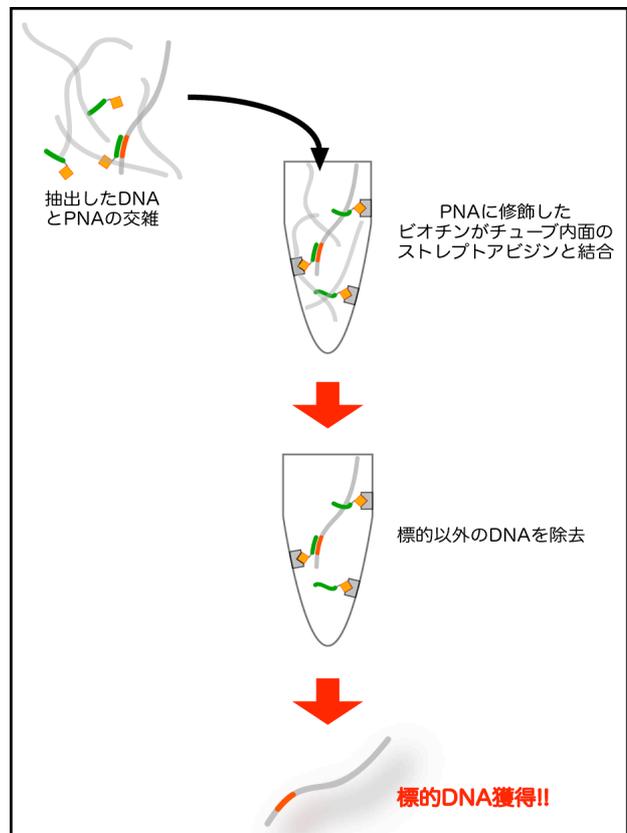


Fig. 3 Schematic illustration of DNA capturing method using S.A.-coated tube.

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 *rm* オペロン (*rmA* から *rmE*) を持っており、その中で最も *dsrA* 遺伝子から離れているのは *rmC* で約 1.5 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 *rmC* と *dsrA* 遺伝子に特異的な PCR 増幅を行えば、少なくとも 1.5 Mbp のゲノム DNA を得られていることが証明できる。

3.1 ストレプトアビジン被膜磁性ビーズを用いた DNA 回収手法の検討

D. vulgaris と嫌気性汚泥からそれぞれ抽出した DNA を 1:1 の比率で混合し、その混合 DNA 溶液からの磁性ビーズを用いた方法で DNA 回収実験を行った。その結果、標的である *D. vulgaris* に由来する *dsrA* 遺伝子と *rmC* 16S rRNA 遺伝子の回収は確認できた (Fig. 4, lane 1-3)。しかしながら、若干ではあるが、PNA プローブを添加しなかったネガティブコントロールにおいても DNA が回収され (Fig. 4, lane 4-6)、非特異的な DNA の回収の発生が確認された。また、この標的以外の DNA の混入は、PNA プローブに依らないものであることが示唆された。

3.2 S.A.-coated tube を用いた DNA 回収手法の検討

磁性ビーズを用いた検討での非特異的な DNA 回収の原因は、ビーズによる DNA の巻き込みであると考え、

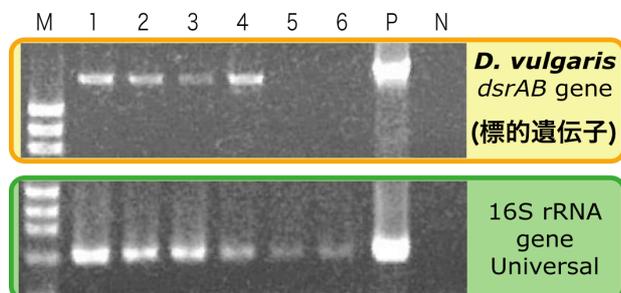


Fig. 4 PCR amplification of *dsrAB* gene and 16S rRNA gene for the DNA captured. M: DNA marker 4; 1-6: PCR fragment obtained from DNA captured from mixed DNA solution of *D. vulgaris* DNA gene and *M. vannielii* DNA; 1 & 4: DNA mixing ratio of *D. vulgaris*: *M. vannielii* = 1: 1; 2 & 5: *D. vulgaris*: *M. vannielii* = 1: 9; 3 & 6: *D. vulgaris*: *M. vannielii* = 1: 99; P: positive control for PCR, N: negative control for PCR

巻き込みが起こる可能性が低いと考えられる S.A.-coated tube を用いた方法を検討することとした。

3.2.1 PCR 産物を用いた最適条件の決定

ここまでの Mp レベルのゲノム DNA を標的とした実験では、非標的 DNA が問題となっていた。そこでまず、1.9 kb の短い PCR 産物を標的とした DNA 回収実験を行い条件の最適化を試みた。PCR 産物は、*D. vulgaris* の DNA の PNA 認識領域を含む領域を鋳型として作成し、*M. vannielii* から抽出した DNA と 3段階の比率 (*D. vulgaris*: *M. vannielii* = 1: 1, 1: 9, 1: 99) で混合した。そこから回収した DNA は、*dsrA* 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. vannielii* は検出されず、*dsrA* 遺伝子の特異的な回収が確認された (Fig. 5)。

3.2.2 *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* のゲノム DNA を標的とした DNA 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、*rmC* 16S rRNA 遺伝子だけでなく、わずかながら *M. vannielii* 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。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. vannielii* 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. vannielii* の DNA が交雑しないことは明らかで

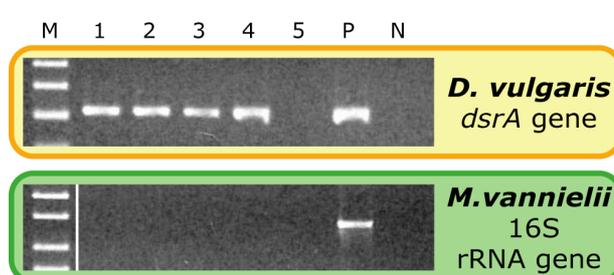


Fig. 5 PCR amplification of *dsrA* gene and archaeal 16S rRNA gene for the DNA captured. M: DNA marker 4; lane 1-5: PCR fragment obtained from DNA captured from mixed DNA solution of *dsrAB* gene and *M. vannielii* DNA; 1: DNA mixing ratio of *dsrAB*: *M. vannielii* = 1: 1; lane 2: *dsrAB*: *M. vannielii* = 1: 9; lane 3: *dsrAB*: *M. vannielii* = 1: 99; lane 4: PCR fragment obtained from DNA captured from *dsrAB* gene; lane 5: PCR fragment obtained from DNA captured from *M. vannielii* DNA; P: positive control for PCR; N: negative control for PCR

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. vannielii* の DNA と非特異的に交雑していたことが考えられた。

そこで、PNA プローブと DNA は交雑するが DNA 同士の交雑は困難な条件で交雑反応を行えば、この問題を解決できると考えた。PNA/DNA ハイブリッドと DNA/DNA ハイブリッドそれぞれの熱安定性が NaCl 濃度により受ける影響は大きく異なり、DNA/DNA ハイブリッドの熱安定性が低下する低 NaCl 濃度条件において、PNA/DNA ハイブリッドの熱安定性は増加する⁵⁶。そこで、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 *rrnC* 16S rRNA 遺伝子の回収が確認され、非標的微生物である *M. vannielii* 由来の 16S rRNA 遺伝子は検出されなかった (Fig. 6)。一方で、標的 DNA の存在率 5% 以下の DNA サンプルからは、安定して DNA を回収することはできなかった。

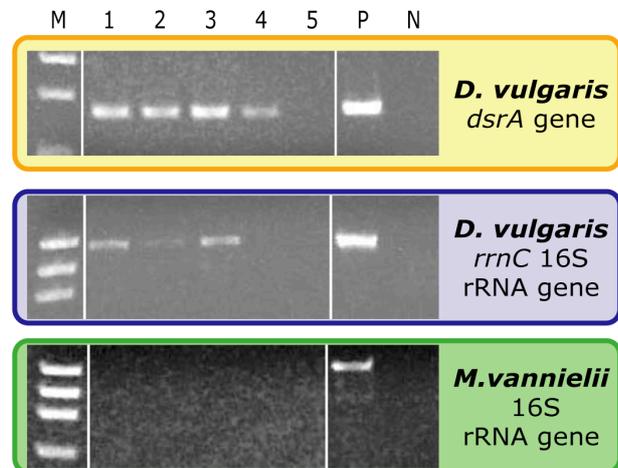


Fig.6 PCR amplification of *dsrAB* gene and 16S rRNA gene for the DNA captured. M: DNA marker 4; lane 1-5: PCR fragment obtained from DNA captured from mixed DNA solution of *D. vulgaris* DNA gene and *M. vannielii* DNA; lane 1: DNA mixing ratio of *D. vulgaris*: *M. vannielii* = 1: 1; lane 2: *D. vulgaris*: *M. vannielii* = 1: 9; lane 3: PCR fragment obtained from DNA captured from *D. vulgaris* DNA gene; lane 4: PCR fragment obtained from DNA captured from *dsrAB* gene; lane 5: PCR fragment obtained from DNA captured from *M. vannielii* DNA; P: positive control for PCR, N: negative control for PCR

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。

参考文献

1. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. & Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**, 1497-500 (1991).
2. Friedrich, M. W. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J Bacteriol* **184**, 278-89 (2002).
3. Lueders, T. & Friedrich, M. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2732-42 (2000).
4. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**, 697-703 (1991).
5. Tomac, S. et al. Ionic Effect on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5544-5552 (1996).
6. Egholm, M. et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365**, 566-8 (1993).