

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月30日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658107

研究課題名（和文）ポストメタゲノムに向けた RNA 安定同位体解析技術の確立

研究課題名（英文）Development of analytical methods of carbon and nitrogen stable isotope ratio in nucleic acids.

研究代表者

布浦 拓郎（NUNOURA TAKURO）

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：60359164

研究成果の概要（和文）：リボソーム RNA(rRNA)を対象とする新しい安定同位体化学による新たな『環境オミクス』方法論の確立を目的とし、微量な試料を用いた安定同位体解析システムを構築する為、高速液体クロマトグラフを用いた手法により、デオキシリボヌクレオチドのソフトイオン化および分離検出の最適化を行なった。その一方、安定同位体解析へ導入する以前の核酸精製法における技術的問題が解決に至らず、期間内に解析手法全体を構築することは出来なかった。

研究成果の概要（英文）：The objective of this project was to organize a novel stable isotope technology for nucleotide especially rRNA in order to develop a novel methodology in environmental omics. In this study, we optimized the online separation and detection for deoxyribonucleotide by using high performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry (unpublished). However, we could not construct a new methods for purification of nucleotides to use stable isotopic analysis due to several technical difficulties.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：生物環境・安定同位体

1. 研究開始当初の背景

近年、メタゲノム解析が盛んに行われ、更に微生物群集に対する『オミクス解析』の試みも進められている。しかし、遺伝子情報を始めとする膨大なデータの由来微生物への帰結や、環境の化学データと個々の微生物（代謝）の関連付けることは容易では

ない。そこで、個々のオミクスデータを統合し、由来微生物へ帰結させる手段として、安定同位体化学の rRNA への適応を提案した。

この研究提案の背景として、アミノ酸や脂質の安定同位体解析の生態研究における有効性が確立したことと、また、そのアミ

ノ酸による解析手法の限界も明らかになっていることがある。微生物代謝の情報は、生物の物質の取り込み時に生じる反応特異的な安定同位体分配により、安定同位体組成として生体高分子中に保存される。そして、実際に、アミノ酸の炭素・窒素安定同位体測定技術が確立したことにより、確実な栄養段階の評価が可能になった。その一方、アミノ酸自体は生物に普遍的な物質であるため、混合生物群集からは個体あるいは細胞単位での分画が必要であり、混合微生物群集から、特定の微生物系統群を選択し、その安定同位体比を測定することは技術的に極めて困難である。脂質においては、そもそも窒素についての情報は保持されておらず、また、大まかな生物系統群の由来までは可能であるが、アミノ酸と同様、複雑な微生物群集から特定の系統群由来の脂質を集めることは、多くの場合困難である。その一方、rRNA はその配列自体が微生物の分類指標であり、明確に由来微生物を示すだけでなく、炭素、窒素双方について、代謝経路に関する情報を保持している。

2. 研究の目的

rRNA 安定同位体化学により、微生物個々の代謝を示すことで、環境オミクスデータ（ゲノム、RNA、蛋白質、代謝物）、あるいは現場環境の化学と個々の微生物の関係を明確に示すことが可能になる。本研究は、核酸の同位体化学を確立することにより、『オミクス研究』の拡散したデータを個々の微生物に繋ぎ合わせ、解析データを遺伝子（代謝物）ネットワークではなく、微生物ネットワークとして再構築し、現場環境と個々の微生物の役割を、明確に示すことを最終目標として設定した（図1）。

3. 研究の方法

(1) 当初研究計画

研究開始当初において、以下の4項目について研究計画を策定した。本研究の基礎となる技術開発として、①（rRNA における炭素・窒素安定同位体分別効果の検証）②（オンラインおよびオフライン法による RNA 分子レベル安定同位体比の測定法確立）の項目を

初年度に行うこととした。そして、2年目には、実用化、あるいは技術の用途を拡大するための基礎研究として、③（アミノ酸代謝経路と RNA 核酸塩基代謝経路の関連解明）④（環境試料の測定）を計画した。

① rRNA における炭素・窒素安定同位体分別効果の検証

安定同位体解析に用いる核酸の精製技術を確立すると共に、各種炭素固定系及び窒素固定系を有する独立栄養増殖が可能な系統群からゲノム情報が明らかな種を培養し、RNA の窒素及び炭素の安定同位体分別を測定する。

② オンラインおよびオフライン法による RNA 分子レベル安定同位体比の測定法確立 炭素および窒素の RNA 分子レベル安定同位体比の測定法確立に向けて、オンライン法

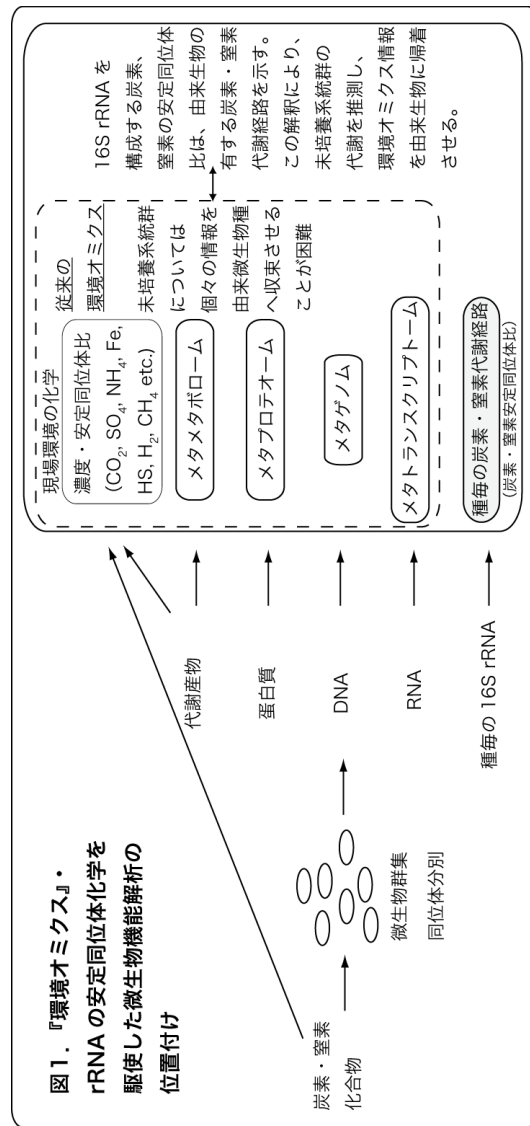


図1. 『環境オミクス』・rRNA の安定同位体化学を駆使した微生物機能解析の位置付け

(GC/C/IRMS 法) とオフライン法 (HPLC/MS-EA/IRMS 法) での検出限界値の下限域を確定する。

③ アミノ酸代謝経路と RNA 核酸塩基代謝経路の関連解明

DNA や RNA を構成する核酸塩基の炭素・窒素は、アミノ酸代謝に由来する。しかし、原核生物における RNA 合成経路での同位体効果に関しては、全くデータが無いため、アミノ酸代謝経路と RNA 核酸塩基代謝経路の同位体効果への寄与を解明することは、世界発のデータセットになる。また、核酸をマーカーとして微生物代謝を議論するには必須である。アミノ酸分子レベル安定同位体比の解析方法は、窒素について同グループによって既に確立しているため、アミノ酸の安定同位体解析技術として開発中であった、分子レベル水素同位体比の解析法を核酸解析においても応用することを計画した。

④ 環境試料の測定

確立した技術を用い、核酸抽出が比較的容易で、かつ栄養段階の明確な現場環境試料を対象として、実際の解析を試みる計画を策定し、実際の試料を確保していた。代表的な例としては、深海底熱水活動域等に棲息する二枚貝、巻き貝、チューブワーム等の化学合成生物と、その共生細菌の間における栄養のやりとりを明らかにすることである。これまで宿主生物と共生細菌の関係は、両者を化学組成から識別できる脂質等の安定同位体解析により、宿主による共生菌細胞の摂取が確認されてきた。しかし、窒素化合物に関する情報は得られておらず、宿主から共生菌への物質移動の可能性については十分に検討されてきたとは言えない。一方、rRNA を対象とすることで、共生菌と宿主由来の成分をそれぞれ分画することが出来、さらに窒素と炭素、両方の情報を合わせて解析することにより、宿主と共生菌の栄養授受における関係を明確に示すことを計画していたのである。

(2) 研究の実際

次項目「研究成果」に記載する通り、核酸精製と同位体解析を繋ぐ技術的な問題が発生

し、その技術的課題を期間内に克服することが出来なかった。また、微量試料からの高精度安定同位体測定システムの新規構築に遅れが生じたことにより、実際の研究は① (rRNA における炭素・窒素安定同位体分別効果の検証) における安定同位体測定に用いる試料の精製法の再検討及び② (オンラインおよびオフライン法による RNA 分子レベル安定同位体比の測定法確立) のオンラインおよびオフライン法による RNA 分子レベル安定同位体比の測定法確立に留まった。

4. 研究成果

(1) 安定同位体測定に用いる試料の精製法の再検討

本研究は、微生物生態学と安定同位体を用いた地球化学の相乗効果を狙った、境界領域研究である。技術的にも異なった背景・習慣が存在し、その間を埋める技術開発は時として容易ではない。本研究においては、開始初年度における実施・解決を想定していた、核酸の精製手法及びその純度の検証、そして、その試料の安定同位体システムへの導入過程の構築が、下記に示すとおり、事前に想定以上に困難であることが明らかになった。そして、最終的には、その課題を研究期間内に解消することが出来なかった。

本研究では、当初、各微生物系統群における核酸の安定同位体分別を調べる研究と、安定同位体システムへ導入する際の微量試料精製手法の検討・開発について、それぞれ個別に進めることを想定していた。前者においては、培養により十分な核酸量を得ることが出来、生物研究における定法である塩化セシウム密度勾配遠心による精製で十分な試料を確保出来ると考えていた。また、後者では、HPLC を用いたシステムの新規構築を検討することにしていて、塩化セシウム密度勾配遠心単独では同位体化学における核酸の純度を保証できないものの、精製後の試料について、HPLC 等による従来法の核酸分析を利用することで、純度を検証する計画であった。ところが、研究の開始直後、非モデル微生物を用いた場合の核酸の収量が想定以上に少なく、塩化セシウム密度勾配遠心による精製法では、十分な核酸試料を確保できないことが

明らかになった。そこで、当初とは異なり、微量試料精製手法の検討・開発を先行させ、各微生物系統群における核酸の安定同位体分別を調べる際にも、微量試料での解析が可能な HPLC を用いる手法を適用する方針に研究計画を変更したのである。

さらに、本研究においても一つの課題の解決を期間内に終わることが出来なかった。それは、この HPLC による新たな核酸分画条件の確立である。従来、微生物研究において、核酸中のヌクレオチド種毎の組成を検証する際、アセトニトリルを含むリン酸アンモニウム緩衝液を用いた HPLC システムが用いられてきた。ところが、緩衝液に窒素・炭素が含まれることから、この解析系を応用して得た核酸試料を、安定同位体測定システムに導入することは出来ない。そこで、本研究においては、非揮発性の炭素あるいは窒素化合物を含まない緩衝液を用いた、新たな HPLC 精製システムの構築が必要とされ、その解析条件の検討を行った。しかし、研究期間内においては、十分に実用に耐えうる実験系の構築には至らなかった。

(2) オンラインおよびオフライン法による RNA 分子レベル安定同位体比の測定法確立

本研究で使用を予定していた同位体マスにおいて、本研究開始時期に合わせて高感度化を予定していた。しかし、その高感度化へ向けた新たな機器が納期の遅れたこと、また導入した機器を組み込んだ分析ラインの最適化及びブランクデータの検定に数ヶ月以上所要したことから、平成 22 年度における試料の安定同位体比測定を行うことはできなかった。そのため、解析システムの構築は、同位体マスの高感度化が完了した平成 23 年度に行うこととなった。そして、平成 23 年度において高速液体クロマトグラフ/電子スプレーイオン化法(ポジティブイオンモード)により、デオキシリボヌクレオチドのソフトイオン化および分離検出の最適化を行ない、微量な試料を用いた安定同位体解析システムの構築を行った。これにより、今後、環境試料由来の微量核酸を対象としたアプリケーション研究の可能性を開くことが出来た。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布浦 拓郎 (NUNOURA TAKURO)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員
研究者番号：60359164

(2) 研究分担者

高野 淑識 (TAKANO YOSHINORI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員
研究者番号：80399815

(3) 連携研究者

なし