

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14799

研究課題名(和文) 未培養微生物群の生理学的機能と系統分類を網羅的に結ぶ新規技術の創成

研究課題名(英文) Development of microbial detection tool for link between phylogeny and function.

研究代表者

松浦 哲久 (Matsuura, Norihisa)

金沢大学・環境デザイン学系・助教

研究者番号：90771585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未培養微生物群の16S rRNA遺伝子と機能遺伝子を簡便かつハイスループッドに両者をリンクつけて解析する技術を創成することを目的とした。まず、純粋細菌のゲノムDNAを用いて、申請者の研究アイデアの実証を行なった。その結果、微生物ゲノムから2種類の遺伝子を結合することが可能であった。次に、純粋細菌の細胞を用いて実施したところ、ゲノムを用いた時と実験条件は異なるものの、2種類の遺伝子結合が可能であった。シーケンス解析の結果からも、2種類の遺伝子配列が結合していることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the idea for link between 16S rRNA gene and functional gene. The two genes were combined from the microbial genome/cell by fusion PCR. However we found that PCR condition is little bit different with the microbial genome and the cell. Sequencing result showed that two genes were combined correctly.

研究分野：環境微生物

キーワード：16S rRNA遺伝子 機能遺伝子 遺伝子結合PCR

1. 研究開始当初の背景

微生物の分子系統分類には 16S rRNA 遺伝子が広く利用されているが、16S rRNA 遺伝子による系統推定だけではその生理学的機能の推定は困難である。特定の生理学的機能を有する微生物群の遺伝的多様性を評価するため、これまでその機能に関連する遺伝子(機能遺伝子)に着目した解析が実施されてきた。しかしながら、検出される機能遺伝子を持つ微生物群(特に未培養微生物)の系統分類学的位置の推定が難しい場合が多く、16S rRNA 遺伝子とそれらの機能遺伝子を関連付ける技術の開発が求められている。

現在、未培養細菌の 16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子を関連付ける技術に、メタゲノム解析がある¹⁾。この技術は、環境サンプルや培養サンプルからゲノム DNA を抽出し、抽出 DNA を断片化したのち、シーケンサーで解析する。コンピューターを用いて配列アセンブルを行い、ゲノムの再構築を行う。ゲノムを再構築できれば、目的微生物の 16S rRNA 遺伝子とそれらの機能遺伝子を関連付けることが可能である。しかし、存在割合が低い細菌のゲノム配列が回収されにくい、大容量のコンピューターが必要である、ハイスループット化のためにはコストがかかるなどの欠点を有する。また、デジタル PCR を用いたシングルセル微小流路技術は、それぞれ 2 種類のプライマーセットを用いて、16S rRNA 遺伝子と目的の機能遺伝子を同時に増幅することが可能である。目的のウェルから遺伝子断片を回収し、シーケンサーで解析することで、16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子を関連付けることが可能である。しかし、解析は微小流路チップに依存するためハイスループット化のためにはコストがかかる、ウェルからの DNA 断片の回収が困難などの欠点を有する。

そこで、よりハイスループットかつ容易に 16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子を関連付けることを目的として、申請者の研究アイデアを実施する。

2. 研究の目的

本研究では、エマルジョン内に微生物細胞を包埋し、未培養微生物群の 16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子を簡便かつハイスループットに両者をリンクづけて解析する技術を創成することを目的とした。その第一ステップとして、ゲノムおよび微生物細胞から遺伝子結合 PCR が可能かどうか検証を行った。

3. 研究の方法

1) PCR テンプレートの準備

モデル微生物を培養し、培養物を PBS にて 2 回洗浄を行なった。これを微生物細胞からの実験に用いた。培養物からゲノムを抽出するためにフェノール・クロロホルム法を使用した。抽出によって約 1,000ng のゲノムが得られた。これをゲノムからの実験に用いた。

2) PCR 条件

16S rRNA 遺伝子のプライマーおよび機能遺伝子のプライマーを用いて、抽出ゲノムから PCR を行った^{3,4)}。PCR 酵素は、AmpliTaq GOLD DNA polymerase (Thermo Fisher Science) を用いた。PCR 条件は、95°C で 5 分間熱変性を行なった後、94°C : 30 秒、55°C : 30 秒、72°C : 60 秒を 35-50 サイクル実施し、最後に 72°C で 5 分間伸長反応を実施した。

3) 電気泳動

PCR 産物のサイズ確認のために、アガロース電気泳動を実施した。2-3%アガロースを 1xTAE に溶解し加熱・冷却によって固化した。電気泳動は、1xTAE バッファーを用い、135V、20 分間行なった。

4) クローニング

回収 DNA バンドを精製し、TA クローニングを実施した。pT7 Blue Vector を用いて、回収バンドのインサートを行いプラスミドの作成を行なった。ECOS Competent E.coli DH5a にプラスミドを導入させ形質転換を行なった。LB プレートで培養を行なった後、コロニーをピックアップし、インサートチェックを実施した。

5) シーケンス解析

配列の全長を解読するために、サンガー法にて解析を実施した。サイクルシーケンスには BigDye Terminator Ready Reaction Mix を用いた (Thermo Fisher Scientific)。精製を行なった後、ABI 3500 シーケンサー (Thermo Fisher Scientific) を用いて、塩基配列の解読を行なった。

4. 研究成果

1) ゲノムを用いた実験

培養した純粋微生物の鋳型 DNA を元に 16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子をターゲットにそれぞれの PCR を実施したところ、それぞれの PCR が検出された。そこで、2 種類のターゲット遺伝子のプライマーを入れてマルチプレックス PCR の実施を試みたところ、片方の遺伝子断片しか検出されなかった。すなわち、双方の遺伝子で増幅効率が異なることが分かった。

そこで、双方の遺伝子の PCR 増幅効率を高め、同程度の増幅効率を得るために、いくつかのプライマーを設計し、マルチプレックス PCR を実施した。その結果、双方の遺伝子が同程度の効率で増幅できるプライマーセットを見出した。そして、マルチプレックス PCR の結果を元に、16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子の結合 PCR を実施した。その結果、双方の遺伝子が結合したと思われるサイズの DNA が生成されていることを電気泳動から確認した。電気泳動の結果から目的のサイズの DNA バンドを回収し、塩基配列を解読したところ、16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子が結合した配

列であることを確認した。

遺伝子結合 PCR の効率を比較するために、4 プライマーと 3 プライマーの双方の実験を実施したが、3 プライマーでは、目的バンドが検出されず、うまく出来なかった。この原因に関しては今の所不明であるが、恐らく遺伝子結合領域の配列が、ゲノム上の全く異なる領域にマッチし、増幅したのではないかと考えられる。

2) 微生物細胞を用いた実験

純粋微生物の細胞を DNA テンプレートとしてダイレクト PCR が可能かどうか確認を行ったところ、純粋細菌からのダイレクト PCR が可能であった。しかしながら、DNA テンプレートと比較すると PCR 効率が低下することが分かった。そのため、PCR のサイクル数を増やすことで、対策を行った。

次に、純粋微生物を用いて、マルチプレックス PCR を実施したところ、DNA テンプレートと同様の条件では 16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子のマルチプレックス PCR が行えなかった。しかし、プライマー濃度をコントロールすることで、純粋微生物細胞から 2 種類の遺伝子のマルチプレックス PCR が実施できることが判明した。したがって、微生物からのダイレクト PCR では、プライマーの濃度設定が非常に重要なファクターであることが分かった。

そして、純粋微生物細胞を用いて、16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子の結合 PCR を実施した。その結果、双方の遺伝子が結合したと思われるサイズの DNA が生成されていることを電気泳動から確認した (図 1)。また、DNA 断片を回収し、シークエンス解析を行ったところ、16S rRNA 遺伝子と機能遺伝子が

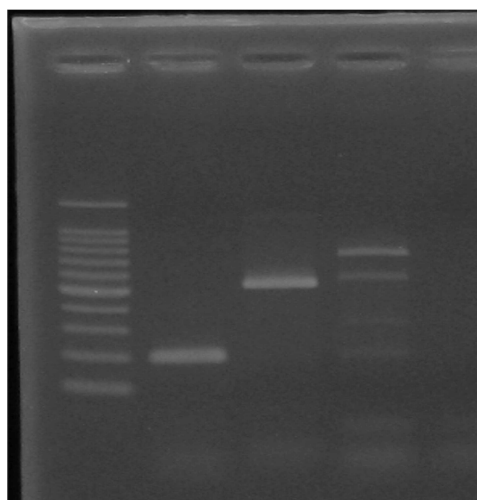


図 1：遺伝子結合 PCR の実験結果
(レーン 1：マーカー、レーン 2：
16S rRNA 遺伝子アンプリコン
PCR、レーン 3：機能遺伝子アンプ
リコン PCR、レーン 4：遺伝子結合
PCR)

結合した塩基配列であることも確認できた。

今後は、エマルジョン内での PCR の実施、シングルセル環境での実施、環境サンプルを用いた未培養微生物への適用などが必要である。

参考文献

- 1) Mads Albertsen, Philip Hugenholtz, Adam Skarshewski, Kåre L Nielsen, Gene W Tyson, Per H Nielsen (2013), Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes, Nature Biotechnology 31, 533-538
- 2) Elizabeth A. Ottesen, Jong Wook Hong, Stephen R. Quake, Jared R. Leadbetter (2006), Microfluidic Digital PCR Enables Multigene Analysis of Individual Environmental Bacteria, Science 314(5804), 1464-1467
- 3) Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD (1999), Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis., J Eukaryot Microbiol. 46(4), 327-338
- 4) Holmes AJ, Costello AM, Lidstrom ME, Murrell JC (1995), Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related., FEMS Microbiol Lett 132, 203-208

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦哲久 (Matsuura Norihisa)
金沢大学・大学院理工研究域・助教
研究者番号：90771585