

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550061

研究課題名(和文) 遺伝子プローブと磁気ビーズを用いた環境中標的遺伝子の網羅的捕捉

研究課題名(英文) Capturing the diversity of a target gene in environments using gene probes and magnetic beads

研究代表者

飛野 智宏 (TOBINO, TOMOHIRO)

東京大学・環境安全研究センター・助教

研究者番号：90624916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子プローブと磁気ビーズを用いた反応により、環境中に存在する標的遺伝子を選択的に、かつその遺伝子内配列多様性を幅広く捕捉し、集積するための手法の開発を行った。種々の反応条件が集積度および回収後の標的遺伝子内の配列構成の変化(配列バイアス)に及ぼす影響について検討した。オリゴヌクレオチドプローブを用いた場合、いずれの条件においても集積度と配列バイアスには明確なトレードオフが存在した。一方、長鎖の本鎖DNAプローブを用いることで、配列バイアスを低く抑えつつ、1万倍以上の高い集積度を達成可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：A new method using DNA probes and magnetic beads has been developed to capture and enrich a target gene from environmental gene pools with covering a wide spectrum of the sequence diversity of the gene. Various conditions in the capture reaction were tested to see the effects on fold-enrichment and sequence-specific capturing bias. Trade-off always existed in any conditions between the fold-enrichment and sequence-specific capturing bias when an oligonucleotide probe was used, while the use of single stranded long DNA probe could achieve as high as >10,000 fold-enrichment without giving significant effects on sequence-specific capturing bias.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：遺伝子捕捉 環境遺伝子 ハイブリダイゼーション メタゲノム 磁気ビーズ

1. 研究開始当初の背景

排水処理における活性汚泥法に代表されるように、微生物群集機能を活用した工学的プロセスは環境低負荷な技術として広く用いられている。しかし、その制御はもっぱら経験的な知見に基づいて行われており、さらなる技術革新に向けて、系の中でどのような微生物がどのような機能を果たしているのかについて理解することが肝要である。

近年の次世代シーケンシング技術の進展により、環境中に存在する遺伝子情報を非選択的かつ網羅的に得ることが可能となった。いわゆるメタゲノム解析では、環境試料から得られた全ゲノム DNA の塩基配列を解読し、バイオインフォマティクスによる解析を通して、対象試料中の微生物構成や微生物機能に関する情報を得る。しかし、その高い多様性のため、存在する全ての遺伝子情報を網羅して解読することは確率的に難しい。さらに、特定の遺伝子を解析対象としている場合、非対象のものも含め全ての塩基配列を解読することは非効率である。そのような場合、PCR を用いて対象とする遺伝子のみを増幅・集積するのが一般的である。しかし、PCR は配列選択性が高く、環境中に存在する標的遺伝子の持つ配列多様性を広くカバーするには原理的に不向きである。

研究代表者は過去に、微生物のゲノム断片配列を DNA アレイのプロープとして使用し、その検出特異性に関する研究を行った。その際、相同遺伝子間ではクロスハイブリダイゼーションが生じ、偽陽性シグナルを発するが、異なる遺伝子間では非特異的シグナルがほとんど生じないことを確認した。そこで、このような核酸のハイブリダイゼーションが持つ緩やかな特異性を積極的に活用すれば、標的遺伝子を選択的に、かつその配列多様性を網羅的に捕捉・集積することが可能ではないかという着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、環境中試料から得られた遺伝子プールの中から、DNA プロープおよび磁気ビーズを用いたハイブリダイゼーションにより、標的遺伝子を選択的にかつその配列多様性を広く捕捉し、集積する手法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデルコミュニティの作成

基礎的条件検討のための試料(モデルコミュニティ)を以下の通り作成した。標的遺伝子として、アンモニア酸化細菌が有するアンモニア酸化酵素をコードする遺伝子 *ammonia monooxygenase subunit A (amoA)* を選んだ。複数の試料(活性汚泥、市販の硝化細菌植種源)から DNA を抽出し、*amoA* をターゲットとする 2 種類の PCR プライマーペアにて PCR を行い、*amoA* 遺伝子断片配列を得た。続いて TA クローニング

により数百個のクローン配列を獲得し、それらの塩基配列を解読した。遺伝子データベースより入手した単離株の *amoA* 配列と合わせて、遺伝子配列解析ソフトを用いて系統樹を作製し、系統樹全体に広くまたがるようなクローン配列 10 個を選別した。選別したクローンに対し、後の操作で必要となるアダプター領域を付加した *amoA* 標的プライマーを用いて PCR を行い、それぞれのクローン配列断片を調整後、等量混合した。またバックグラウンド DNA として、大腸菌から抽出したゲノム DNA を断片化後、ライブラリ調製キットを用いてアダプター領域の付加を行い、約 500 bp の長さを持つ大腸菌のゲノム断片混合配列を得た。これと、上述した *amoA* 混合配列とを任意の割合で混合したものをモデルコミュニティとした。

(2) 捕捉用 DNA プロープの作成

amoA 遺伝子捕捉用のプロープとして、21 nt のオリゴヌクレオチドプロープと長鎖(約 500 bp) の一本鎖 DNA プロープの 2 種類を用意した。オリゴヌクレオチドプロープの設計にあたっては、上記(1)で系統樹作成の際に使用したアラインメントのうち、全ての配列で保存されていた 7 残基のアミノ酸領域をターゲットとした。ターゲットとした領域のアミノ酸配列に対応する塩基配列全ての組み合わせ(4,096 通り)からなる縮重プロープを外部委託により合成した。なお、プロープの 5'末端には、ビオチン標識を施した。

一本鎖 DNA プロープは、モデルコミュニティを構成するクローン配列をテンプレートとし、一方の末端のプライマーのみを用いて PCR と同様の条件で合成した。なお、用いたプライマーの 5'末端にはビオチン標識を施した。合成した一本鎖 DNA の確認のため、蛍光標識したプライマーを用いて同様の合成反応を行い、キャピラリー電気泳動にて想定される長さの断片が合成されていることを確認した。また、合成した一本鎖 DNA は市販のキットを用いて蛍光法により定量した。

(3) モデルコミュニティを用いた基礎的条件検討

上記で用意したモデルコミュニティとプロープとを用いて、捕捉反応を行った。試料とプロープを混合してハイブリダイゼーション反応を行い、ストレプトアビジンコートされた磁気ビーズによりプロープと結合した二本鎖を選択的に回収した。バッファー組成、ハイブリダイゼーション温度、洗浄条件、ターゲット・バックグラウンド混合比、プロープ量等の条件を変え、標的遺伝子の集積率および標的遺伝子内の配列組成の変化に与える影響を観察した。集積率は、realtime-PCR 法により、標的遺伝子断片数とバックグラウンド断片数を反応前後で定量し、算出した。標的遺伝子配列組成の変化

については、Terminal restriction fragment length polymorphism(TRFLP)法を用いて、10 個の *amoA* 配列組成を反応前後で比較した。

(4) 実試料への適用

活性汚泥試料から抽出した DNA に対し、オリゴヌクレオチドプローブを用いた捕捉反応を行った。抽出した活性汚泥 DNA を断片化後、市販のライブラリ調製キットを用いてアダプターの付加を行った。基礎的条件検討の結果に基づいて反応条件を設定し、捕捉反応を行った。捕捉反応前後のライブラリの塩基配列は、Illumina MySeq により外部委託解析を行った。

4. 研究成果

図 1 にモデルコミュニティに使用した 10 個の *amoA* クローン配列を含む系統樹を示す。今回選んだ 10 個のクローン配列は、既知の *amoA* 遺伝子の多様性を広くカバーしている。Gammaproteobacteria に属する *amoA* 配列を得ることはできなかったものの、メタン酸化酵素をコードする遺伝子である particulate methane monooxygenase に近縁な配列が得られた。この配列を含むことで、塩基配列の相同性が最大 45% 程度異なる *amoA* 遺伝子セットを得ることができた。

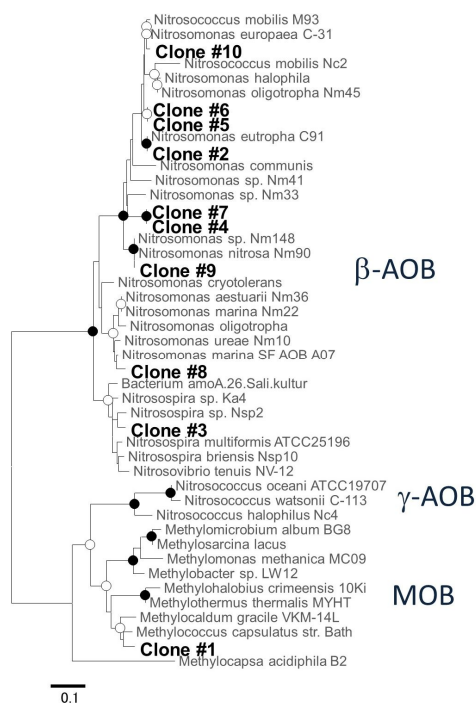


図 1 *amoA* クローン配列の系統関係

上記の *amoA* クローン配列および大腸菌のゲノム断片からなるモデルコミュニティに対し、オリゴヌクレオチドプローブを用いて捕捉反応を行い、種々の反応条件が集積度および捕捉反応前後における配列組成の変化(以後、配列バイアス)に及ぼす影響を検討

した。

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの調整方法として、バッファー中のホルムアミド濃度を変えた場合と、ハイブリダイゼーション温度を変えた場合で比較した。その結果、どちらを用いてストリンジェンシーを変えた場合も、集積度および配列バイアスに対して同様の影響を与えることが確認された。しかし、ホルムアミド濃度が高い領域においては、回収されるバックグラウンド DNA の量が大きくなる傾向が観察されたため、以後、ストリンジェンシーの調整はハイブリダイゼーション温度で行うこととした。

次に、磁気ビーズでのハイブリッド捕捉後の洗浄操作について検討を行った。洗浄回数を 1-4 回で比較したところ、洗浄回数が増えるにつれて集積度が上昇する傾向がみられたが、一方で配列バイアスも増大した。2 回目の洗浄以降は、集積度の大きな向上は観察されなかったため、手順の簡便性の点から洗浄回数は 2 回とした。

ハイブリダイゼーション時間の影響についても検討した。0.5-4 h で比較したところ、時間が長いほど配列バイアスは減少するが、集積度も低下することが確認された。配列バイアスを低く抑えるため、ハイブリダイゼーション時間は 4 h とした。

図 2 に異なるハイブリダイゼーション温度における集積度と回収した配列組成の内訳を示す。温度が上昇すると集積度が大きく向上している一方、配列バイアスも顕著になっていることが分かる。この結果から、配列バイアスを低く抑えた上で達成可能な集積度

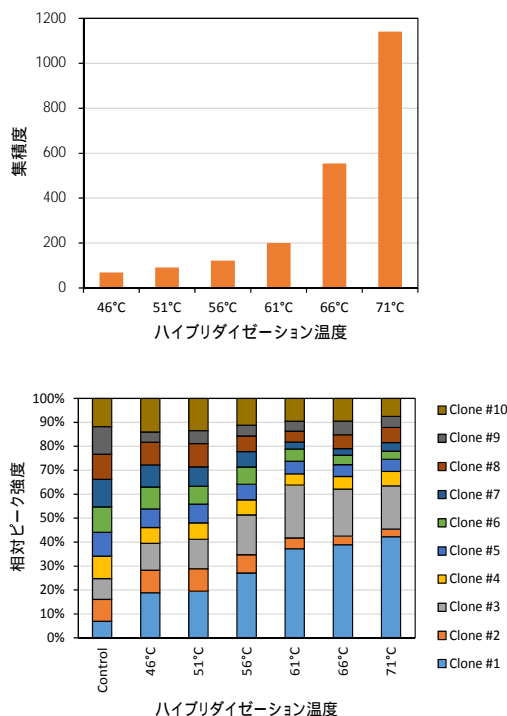


図 2 オリゴヌクレオチドプローブにおけるハイブリダイゼーション温度の影響

は 100 倍程度であると結論付けられた。

バックグラウンドに対する *amoA* 配列の存在比率を 50% から 0.1% に変えて捕捉反応を行ったところ、集積度の違いは観察されなかった。また、捕捉反応におけるプローブ濃度の影響についても検討した結果、プローブ濃度が高くなるにつれ集積度が向上および配列バイアスが低下する傾向が見られたが、プローブ濃度をさらに高めた場合、両者が悪化する傾向が観察された。

図 3 に一本鎖 DNA プローブを用いて行った捕捉反応の結果を示す。ハイブリダイゼーション温度の低い領域では、オリゴヌクレオチドプローブを用いた場合よりも集積度は低い、温度の上昇に伴い集積度が大きく向上し、71°C において 10,000 倍以上の集積度を達成した。また、配列バイアスは温度による影響は小さく、71°C においても回収後の配列組成に大きな変化は見られなかった。これらの結果から、一方鎖 DNA プローブはオリゴヌクレオチドプローブより優れた特性を有することが明らかとなった。

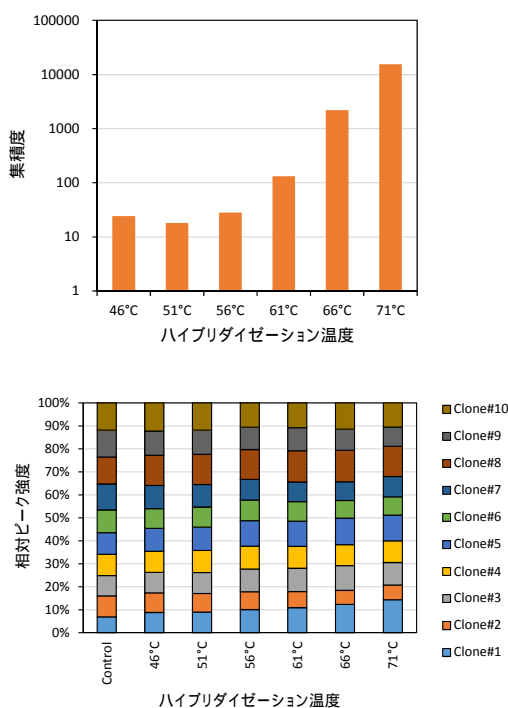


図 3 一本鎖 DNA プローブにおけるハイブリダイゼーション温度の影響

実試料への適用の試みとして、活性汚泥試料から抽出した DNA 中の *amoA* 遺伝子を標的とし、オリゴヌクレオチドプローブを用いて捕捉反応を行った。捕捉反応前後において、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解読を行い、含まれる標的遺伝子の存在割合を比較した。クオリティスクリーニング後、それぞれ約 70 万リードの配列が得られ、そのうち *amoA* 相同配列の存在割合を比較した結

果、反応前後での集積度は 3 倍程度であった。これは基礎的条件検討の結果から想定される値よりも低かった。要因として、捕捉反応後、シーケンシング反応のためのアダプター PCR において、非特異的な増幅産物が生成されたことが考えられる。その結果、捕捉反応においては実際にはより高い集積度が得られていたものの、続く PCR において生成された非特異的ノイズ配列により、標的遺伝子の存在割合が低下したことが想定される。この点については、今後、検討が必要である。

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)

取得状況(計 0 件)

[その他]

- ・ 飛野智宏 (2015) 複合微生物系を対象とした分子生物学的解析手法の開発 環境安全 (学内季刊誌) 144 号, pp.7-10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飛野 智宏 (TOBINO TOMOHIRO)

東京大学・環境安全研究センター・助教

研究者番号: 90624916

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: