

論文の内容の要旨

論文題目

オリゴヌクレオチドマイクロアレイによるベンゼン酸化分解遺伝子の網羅的解析と
土壌浄化力評価手法としての有効性

氏名 岩井 祥子

近年各地で問題となっている土壌汚染に対し有効な浄化手法が模索される中、従来の物理化学的手法に比べ低コストであり、低濃度広範囲に渡る浄化に適したバイオレメディエーションが注目されている。しかし、微生物による浄化のメカニズムには未知の部分が多く、その浄化力の評価、予測は困難であり、土壌の浄化力の評価手法の開発が求められている。汚染物質の微生物による分解に関する研究は、これまで主に培養法により単離された菌株を用いて進められてきた。しかし単離株は実際の環境中のほんの一部であることが指摘されており、また複合微生物系における分解は個々の菌株の結果から推測するのは極めて困難であるため、従来の方法では実際の土壌の浄化力の評価は難しい。そこで、微生物の浄化力を担う遺伝情報に着目した。分子生物学的手法の発展により、様々な遺伝情報が調べられるようになり、それに伴って配列データベースへの登録数も爆発的に増加している。そこで、今後さらに情報の蓄積が進むことも踏まえ、これらの遺伝情報を利用した浄化力評価手法の開発が有効である。近年環境中の汚染物質分解遺伝子が非常に多様であることが明らかになり、多くの未知遺伝子が環境中に存在することが知られるようになった。また、分解遺伝子の僅かな配列の違いがその基質特異性、活性に影響を及ぼすことも知られている。よって、分解遺伝子情報を用いた土壌中の分解能力の評価には、実際の環境中の多様な遺伝子配列を網羅的に解析することが必要であると考えられる。数百から数万もの多くの遺伝子配列を同時に検出可能な手法として、マイクロアレイ法が注目されている。しかし、従来の PCR 法や FISH 法による特定の遺伝子配列の検出に比べ、マイクロアレイ法による遺伝子検出は感度が低く、特異性の評価が難しいことから、複雑な混合微生物系である環境サンプルへの適用は難しいと考えられてきた。本研究では、感度が比較的高く、自由に設計が可能なロングオリゴヌクレオチドプローブを用いることで、土壌中の分解遺伝子の多様性を捉えるのに十分な感度、特異性をもつマイクロアレイの開発を試みた。さらに、作製したマイクロアレイを用いて土壌中の汚染物質分解遺伝子の網羅解析を行い、土壌の汚染浄化力評価への有効性を検証した。

対象物質として石油汚染における主要な汚染物質であるベンゼンを用いた。一般に芳香族の好気分解において重要なのは初発酸化と環開裂である。本研究ではベンゼンの初発酸化分解遺伝子であるモノオキシゲナーゼとジオキシゲナーゼに着目した。ベンゼンはモノオキシゲナーゼによりフェノールに、ジオキシゲナーゼによりカテコールに分解されることが知られている。しかし、その遺伝情報については数種類の単離菌株の報告のみであり、環境中の遺伝子の多様性についてはほとんど知見がない。そこで、まず環境中のベンゼンオキシゲナーゼ遺伝子の配列を幅広く得るために、既報のベンゼンオキシゲナーゼ配列をもとに新規の PCR 用のプライマー設計を行った。ベンゼンモノオキシゲナーゼ遺伝子として 2 種類の配列が、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子として 4 種類の配列が報告されている。ベンゼンモノオキシゲナーゼの 2 種類はコンポーネント構成の異なる系統的にも離れた遺伝子であったため、それぞれの近縁配列を捉えることのできる BO11, BO12 プライマーセットを設計した。ジオキシゲナーゼの 4 種類は系統的に近縁であったため、これらの近縁配列を捉えることのできる、同一のフォワードプライマーを使用する 2 種類のプライマーセット、BEDe および BEDm を設計した。

次に、蓮田土壌 (土壌 I) および畑地土壌 (土壌 II) にベンゼンを添加し、分解試験を行った。その結果、添加ベンゼンは速やかに分解された。このベンゼン分解土壌より抽出した DNA に対し、設計したプライマーセットおよびトルエンモノオキシゲナーゼをターゲットとする既報の RDEG プライマーセットを用いてクローンライブラリーを作成し、その配列の多様性を解析した。その結果、BO11, BO12, RDEG, BED (BEDe および BEDm) それぞれのプライマーセットに対し、27, 22, 48, 46 種類の多様なアミノ酸配列が得られた。これらの中には、既報のベンゼ

ンオキシゲナーゼ遺伝子に近縁な配列も存在したが、一方で新規のクラスターを形成する配列も得られ、土壌中のベンゼンオキシゲナーゼの多様性が示された。また、土壌 I と II より得られたクローンには配列が一致するものは観察されなかった。また、ベンゼン分解によりクローンライブラリー中の割合が相対的に増加した配列が観察され、ベンゼン分解に関与しているのではないかと考えられた。

続いて、得られた多様性解析結果をもとに、土壌中のベンゼン酸化分解遺伝子を網羅的に解析可能なツールとしてマイクロアレイの設計を行った。マイクロアレイのプロープとして、高感度に配列を検出可能な 60mer のオリゴヌクレオチドプロープを用いた。まず、マイクロアレイのプロープ設計条件の検討および遺伝子検出能力を検証するためにモノオキシゲナーゼ配列の解析結果よりマイクロアレイ A を試作した。特異的なプロープ設計のために、ターゲットに対し相同塩基数が 58/60bp 以上、ノンターゲットに対する相同塩基数が 54/60bp 以下かつストレッチ長（完全に一致する一続きの配列のうち最長のものの塩基長）が 20bp 以下という条件を設定した。その結果、BO11, BO12, RDEG プライマーセットを用いて行った多様性解析結果に対し、それぞれ 12, 32, 55 種類のプロープが設計できた。しかし、一部の配列に対しては条件に合うプロープが設計できなかった。設計したプロープをスライド上に固定し、マイクロアレイ A を作製した。マイクロアレイ A を用いて、プロープのターゲットとする配列を有する純菌株の DNA を用いたハイブリダイゼーション試験を行った。その結果、SNR（シグナルノイズ比） ≥ 3 を陽性とする一般的な判定法では、サンプル中に含まれる配列をターゲットとするプロープは全て陽性を示し、偽陰性は観察されなかった。しかし、シグナル強度は低いものの、偽陽性を示したプロープが約 2.7% と僅かながら観察された。これらの偽陽性の理由として、サンプルとプロープ配列の結合自由エネルギーが低いことが考えられた。しかし、結合自由エネルギーの条件を設定すると、多くの正常に機能するプロープをも排除することになり、網羅的解析が困難になる。これらの偽陽性配列の多くのシグナル強度は、 $3 < \text{SNR} \leq 20$ の範囲であった。そこで、この範囲のシグナル強度を陽性の中でも亜陽性と定義し、判定の信頼性を表すこととした。次に、土壌 I, II の DNA を用いたハイブリダイゼーション試験を行った。その結果、各土壌より得られたクローンをターゲットとしたプロープは全て検出され、偽陰性は観察されなかった。また、土壌 I と II のクローンライブラリー解析においては共通のクローン配列が見られなかったが、マイクロアレイ A による検出では、同一のプロープが陽性を示したものが観察された。このことから、クローンライブラリー法による解析よりマイクロアレイ法は網羅的に解析可能であることが分かった。マイクロアレイ A に用いたプロープ設計条件では一部の解析配列に対しプロープが設計できなかった。そこで、網羅的解析を行うために、これらの配列に対し最も特異性が高くなるようなプロープを合計 8 種類設計した。またジオキシゲナーゼ配列の解析結果に対しても同様に 53 種類のプロープを設計し、合計 148 種類のプロープを用いてベンゼンオキシゲナーゼ配列全体を網羅するマイクロアレイ B を作製した。

マイクロアレイ B を用いて 3 種類のベンゼン添加土壌、5 種類の石油汚染土壌中のベンゼンオキシゲナーゼ遺伝子の網羅的検出を試みた。BO11, BO12, RDEG, BEDe, BEDm の 5 種類のプライマーセットで PCR を行い、増幅の見られた 5 サンプルに対し、マイクロアレイ B を用いたハイブリダイゼーション試験を行った。その結果、ベンゼン分解試験においてクローンライブラリー中の割合が相対的に増加した配列が、マイクロアレイを用いた解析により、土壌 I および II 以外の土壌にも存在することが分かった。これらの配列はベンゼン分解に関与していることが推定された。また、各プロープのシグナル検出パターンを用いたクラスター解析を行い、土壌サンプルがベンゼンオキシゲナーゼ配列の構成により分類可能であることを示した。

マイクロアレイ B は土壌 I および II の 2 種類の土壌中のベンゼンオキシゲナーゼを元に作製しているため、実際のような土壌を解析するのに十分とは言えない。今後、様々な土壌中のベンゼンオキシゲナーゼ配列の解析を進めるとともに、データベースに登録されていく新規配列の情報も加えてマイクロアレイを改良する必要があると考えられた。さらに、改良したマイクロアレイを用いて、ベンゼン分解関与遺伝子の推定を行い、さらに定量手法や mRNA を対象とした活性を解析する手法などと組み合わせることによって、汚染土壌の浄化力をより詳細に評価することが可能になると考えられた。また、様々なベンゼン分解特性を有する土壌の検出パターンを蓄積し、クラスター解析による分類を行うことで、新規の汚染土壌に対してもそのマイクロアレイ検出パターンから浄化力を評価することができると考えられた。以上より、マイクロアレイ法による汚染土壌中の遺伝子多様性の検出法および評価法としての有効性が示された。