

論文の内容の要旨

論文題目

複合微生物系に対する基質特異的な微生物探索手法としての
ショットガンアイソトープアレイ法の開発

氏名 飛野智宏

微生物群集機能は、都市活動を支えていく上で重要な役割を担っている。活性汚泥法に代表される廃水処理プロセスや微生物機能を活用した環境修復技術（バイオレメディエーション技術）は、微生物群集の機能を上手く活用することで、様々な組成の汚濁・汚染物質の分解・除去を可能としている。一方で、管路の腐食劣化や水処理膜の目詰まりなど、微生物活動に由来する弊害も存在する。いずれにおいても、今後のプロセスの向上に向けて、微生物群集中に存在する有用／有害な微生物を直接的に制御することのできる技術が求められる。そのためには、これまで主にブラックボックスとして扱われてきた微生物群集中において、個々の微生物の持つ機能を把握することが必要である。しかしながら、従来の単離培養法では環境中のほとんどの微生物が培養困難であること、また 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析は試料中に存在する微生物構成の把握には非常に強力な方法であるものの、機能に関する情報を提供することができないといった限界がある。また、特定の機能遺伝子を対象とした解析は、対象とする物質の分解遺伝子が既知の場合のみ有効であり、またその遺伝子の存在のみでは必ずしも実際の環境中での機能の発現と一致しないという限界がある。

近年の微生物解析手法の発展の中においても、stable isotope probing (SIP) 法や microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization (MAR-FISH) 法に代表される同位体トレーサー法と分子生物学的手法を組み合わせた手法は、実際の環境条件に近い条件にて、微生物群集中の個々の微生物の機能とその系統を結び付けることが可能な技術として、現在広く用いられるようになった。さらに、isotope array 法として、16S rRNA を標的とするマイクロアレイと放射性同位体トレーサー法を組み合わせることで、微生物群集構造と機能をよりハイスループットに解析することが可能な手法も報告されている。これらの手法は、従来の分子生物学的手法を用いて得られる系統的情報に加えて、同位体標識の有無、すなわち対象物質の資化という評価軸を加えることのできる非常に優れた手法である。しかしながら、MAR-FISH 法および isotope array 法は塩基配列情報が入手可能な微生物しか検出できず未知の微生物は解析対象から除外されてしまうこと、また SIP 法は超遠心分離による標識核酸の分離が不明瞭であり、多数の試料に適用する場合には多くの労力を要するといった、それぞれの手法における欠点がある。

そこで本論文では、同位体トレーサー法と分子生物学的手法を組み合わせた手法の中でも、既知の塩基配列情報に依存することなく、かつハイスループットな検出を可能とする手法として、ショットガンアイソトープアレイ法の開発を行った。ショットガンアイソトープアレイ法では、対象試料中の微生物群集全体に由来する DNA 断片配列をプローブとするメンブレンアレイにより、放射性同位体トレーサーを資化した微生物に由来する ^{14}C -DNA を検出する。この手法の特徴として、解析対象の微生物構成や遺伝子配列などの知識を必要とせず、様々な試料に対して全く同一の手順で解析を行うことが可能であるという利点を持つ。また、複数の培養条件で得られるハイブリダイゼーション後のシグナルプロファイルを比較することにより、異なる環境条件において特異的／普遍的に基質の資化に関与する微生物種のスクリーニングに活用することが可能である。さらに、検出されたプローブの塩基配列情報に基づき、当該微生物を特異的に検出するためのプローブや PCR プライマーを設計することが可能であり、当該微生物の挙動を追跡するためのツールを提供することができる。ショットガンアイソトープアレイ法の開発にあたって、特異性、検出感度、環境試料への適用可能性の 3 点を検討することを主な目的とした。

特異性の検討では、*Pseudomonas* 属の純菌株から作製したランダムなゲノム断片プローブからなるメ

ンブレンアレイを作製し、各純菌株の DIG 標識 DNA とのハイブリダイゼーションを行った。プローブ長とシグナル強度には正の相関が観察されたが、プローブ長と特異性には有意な相関は観察されなかった。そのため、比較的長いゲノム断片プローブを使用することで、特異性を損なうことなく感度を向上させることが可能であることが示された。ランダムに選んだ 2,000 bp 程度のゲノム断片をプローブとして用いた場合、厳しい条件 (75°C) でのハイブリダイゼーションを行うことで、ほとんどの非特異的シグナルを排除することが可能であった。また、使用した純菌株の全ゲノム配列を用いた解析の結果、検討に使用した同属異種の株間では 90% を超えるような相同性を配列はほとんど存在せず、特異的シグナルと非特異的シグナルの強度には明確な差があることが明らかとなった。プローブ-ターゲット間の配列相同性とシグナル強度の関係から、ランダムに選んだ 2,000 bp 程度のゲノム断片プローブを用いた場合でも、ロングオリゴヌクレオチドプローブを使用したマイクロアレイと同程度の特異性を達成可能であることが示された。以上の結果から、ショットガンアイソトープアレイ法を用いた検出において、同属異種の微生物のような近縁な株間であっても非特異的シグナルの影響を低く抑えて検出を行うことが可能であると結論付けられた。

検出感度の検討では、[1-¹⁴C]酢酸ナトリウムを用いた純菌のトレーサー培養により得られた ¹⁴C-DNA を使用し、同一株から作製したゲノム断片プローブとのハイブリダイゼーションを行った。超音波を用いてターゲット DNA を約 400 bp 程度に断片化することで、制限酵素による断片化と比べて感度が 2 倍程度向上することが明らかとなり、その結果、検出に必要となるターゲット ¹⁴C 標識 DNA の量は 400,000 dpm/ml buffer であることを見積もられた。この結果と合わせて、トレーサー培養中の ¹⁴C の収支を見積もることにより、複合微生物系に適用する際に、検出対象とする微生物のトレーサー基質資化への寄与度を仮定することで、必要となるトレーサー基質の量を推定可能であることが示された。

環境試料への適用として、¹⁴C 酢酸ナトリウムおよび ¹⁴C メタノールをトレーサーとして活性汚泥にショットガンアイソトープアレイ法を適用した。その結果、有意に陽性であるシグナルを得ることに成功し、環境試料に適用可能であることが示された。また、基質資化微生物相の違いをシグナルパターンの相違として検出することができた。SIP 法と real-time PCR を用いた検証実験の結果、一部の例外を除き、ショットガンアイソトープアレイ法で検出されたプローブ配列は、投与した基質を資化した微生物由来であることが確認された。陽性であったプローブの塩基配列に基づいた遺伝子データベース検索による微生物種の特定は困難であったものの、得られた塩基配列に基づいて設計した PCR プライマーにて当該微生物を追跡可能であることが示された。

ショットガンアイソトープアレイ法で検出される放射線シグナルの信頼性を評価可能な方法として 2-ray hybridization を提案し、その有効性に関して理論的考察および実験的検討を行った。理論的考察では、必ずしも擬陽性シグナルを判別することできないという限界とともに、信頼性が低く擬陽性シグナルの可能性が高いシグナルを判別可能であるという利点を持つことが示された。また、純菌株を用いた基礎的検討の結果、検出系に起因する検出効率および GC 含量に応じた標識効率の差をそれぞれ補正することにより、放射線シグナルと化学発光シグナルの比 (2-ray シグナル比) はある程度一定の範囲の値をとることが示された。また、純菌を使用した 2-ray hybridization の模擬試験では、非特異的シグナルの 2-ray シグナル比は特異的シグナルと比べて概して低い値となり、非特異的シグナルの大部分を判別可能であることが示された。また、活性汚泥へのショットガンアイソトープアレイ法の適用結果に 2-ray hybridization を用いた結果、2-ray シグナル比のみでなく放射線シグナル強度も考慮することで、擬陽性の可能性が高く信頼性が低いシグナルを判別可能であることが示された。

以上の結果から、ショットガンアイソトープアレイ法は、複合微生物系内の未知の微生物も対象とし、網羅的かつハイスループットに特定化合物の資化を行う微生物を探索可能な手法として、その有効性が示された。