

サブテーマ名：3 環境浄化能等のある微生物・植物の分子育種

小テーマ名：3-2-d ゲノム変化簡易解析システムの開発

フェーズ I のみ

[概要]

生物進化とはゲノムの進化のことであり、集団中のゲノム変化を DNA シーケンシングよりも簡易な方法で測定する技術は高速分子進化技術にとって重要である。その方法の一つに、プライマーを低温で準特異的にアニーリングさせるランダム PCR と、その増幅 DNA 産物を、温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) 法で分離分析することに基づくゲノムプロファイリング (GP) 法がある。GP 法はゲノムの全体的な特徴を簡便に捉えるゲノム解析法である。この方法を軸にして、分子育種 (微生物群集も含む) に伴うゲノム変化を簡便にモニタリング可能なシステムを、測定面および知識面にわたって開発を行った。

測定面に関しては、GP に使用するダブル内部標準試料およびプレキャストゲルの試作製造を行った。また、GP データを解析するためのソフトウェアにおける Spiddos 自動抽出機能の完成を目指した。

知識面に関しては、GP データの作成を産業的・医療的利用価値のある微生物を対象に行った。

また、微生物の群集構造を解析する手法は DGGE 法が広く利用されているが、得られる情報量が少ないことや再現性の問題が残っている。そこで、GP 法の微生物群集構造解析への応用を、浄化槽を対象に試み、その有効性を探った。

[フェーズ I の研究成果]:

(1) GP法の標準規格化精度向上のためのダブル内部標準試料の作製

次に塩基配列を示す pBR322 由来の2種類のDNA断片のTGGEパターンは離れた場所に安定した特徴点を与えるので、同時に用いれば内部標準試料として最適であることがわかった。

○ r e f 5 塩基配列:

5 ' -AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG
GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGC GC AACGTTGTTG
CCATTGCTGC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA
TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCATGTT-3'

○ r e f 6 塩基配列:

5 ' -GCCGGCATCA CCGGCGCCAC AGGTGCGGTT GCTGGCGCCT ATATCGCCGA
CATCACCGAT GGGGAAGATC GGGCTCGCCA CTTCGGGCTC ATGAGCGCTT
GTTTCGGCGT GGGTATGGTG GCAGGCCCGG TGGCCGGGGG ACTGTTGGGC
GCCATCTCCT TGCATGCACC ATTCCTTGCG GCGGCGGTGC TCAACGGCCT
CAACCTACTA CTGGGCTGCT TCCTAATGCA GGAGTCGCAT AAGGGAGAGC
GTCGACCGAT GCCCTTGAGA GCCTTCAACC CAGTCAGCTC CTTCGGGTGG
GCGCGGGGCA TGA CTATCGT CGCCGCACTT ATGACTGTCT TCTTTATCAT
GCAACTCGTA GGACAGGTGC CGGCAGCGCT CTGGGTCATT TTCGGCGAGG
ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG ACGATGATCG GCCTGTCGCT TGCGGTATTC
GGAATCTTGC ACGCCCTCGC TCAAGCCTTC GTC ACTGGTC CCGCACCAA
ACGTTTCGGC GAGAAGCAGG CCATTATCGC CGGCATGGCG GCCGACGCGC
TGGGCTACGT CTTGCTGGCG TTCGCGACGC GAGGCTGGAT GGCCTTCCCC
ATTATGATTC TTCTCGCTTC CGGCGGCATC GGGATGCCCG CGTTGCAGGC
CATGCTGTCC AGGCAGGTAG ATGACGACCA TCAGGGACAG CTCAAGGAT
CGCTCGCGGC TCTTACCAGC CTA ACTTCGA TCACTGGACC GCTGATCGTC
ACGGCGATTT ATGCCGCCTC GGCGAGCACA TGGAACGGGT TGGCATGGAT
TG TAGGCGCC GCCCTATACC TTGTCTGCCT CCCC CGTTG CGTCGCGGTG
CATGGAGCCG GGCCACCTCG ACCTGAATGG AAGCCGGCGG CACCTCGCTA-3'

従来のGP用内部標準試料は M13 フェージDNAから作製した1種類のDNA断片を使用し、2 本鎖DNAが融解を開始する第一特徴点と完全に 1 本鎖に変性した第二特徴点を利用していましたが、第二特徴点が不安定なことからGPの標準化の精度向上が課題であった。今回の 2 種類のDNA断片のそれぞれの安定した第一特徴点を利用することでGPの標準化精度が向上した。この成果を特許出願した(名称: G P 等 2 次元ゲル電気泳動における規格化のための標準DNAセット 特願 2004-350694)。

(2) 産業的に有用な微生物種を系統的に用いたGPデータの構築

- a. 病原性酵母としての *Candida* 属 8 種 31 株、*Debaryomyces* 属 7 種 19 株から、それぞれ計145ファイル、72ファイルのGPデータを作成した。また、*Candida*12 株と *tropicalis*9 株を 5 種類のプライマーを単独に使用したGPを行い、算出された PaSS 平均値を基に UPGMA 法によりクラスター解析を行ったところ、*candida* と *tropicalis* ははっきりと 2 つのクラスターに分かれた。また、JCM5941 は *tropicalis* とされていたが、JCM5941 と JCM1785 の *Candida parapsilosis* との間の PaSS 値が 0.986 と高いスコアとなり同種である疑いが出た。この JCM5941 の 26SrDNA 解析を行ったところ、*parapsilosis* のシーケンスと一致し、JCM5941 株は *tropicalis* から *parapsilosis* に再同定された。
- b. 乳酸菌 *Lactobacillus* 属 1 種 19 株から、計 95 ファイルのGPデータを作成した。
これらの 16SrDNA 解析のデータに基づくクラスター解析と、今回の PaSS 値に基づいたクラスター解析との間に有意な相関関係が認められた。
- c. アルコール発酵酵母として *Saccharomyces cerevisiae* 13 株から、計 65 ファイルを作成した。

(3) GP法を用いたメタゲノムレベルにおける微生物群集経時変化モニタリング(D2の報告参照)

低曝気浄化槽試料に対し、ランダムPCRに 9 種類のプライマーを個々に用いて行ったところ、GPのパターンとして明瞭なバンドが見られたのは3種類であった。残りの6種類はパターンがスメアになった。明瞭なバンドパターンとなったものに関して、各槽(流入槽、流入調整槽、曝気槽、消化槽)ごとにみていくと、曝気槽と消化槽は類似したパターンとなって微生物群集変化が小さく、流入槽と流入調整槽はそれぞれ異なるパターンとなり二槽間の微生物群集に変化が見られた。次に浄化槽の運転条件の変化(大量曝気→低曝気)についてみていくと、低曝気条件以降のパターンの変化として、新たに出現するバンドや消滅していくバンドが認められる他、パターン全体の様相が変化していることが経時的に捉えられた。

(4) 解析ソフトの Spiddos 自動抽出機能と一括 PaSS 計算機能の開発

Spiddos の自動抽出機能について、実際のGPファイルを充てて行ったところ、バンドの交差点であって Spiddo ではない点を拾ったりする一方、実際の Spiddo を拾い損ねている状況である。

一括 PaSS 計算機能について、ターゲットGPファイルに対してデータベース内のすべてのGPファイルとの PaSS 計算を行い、結果を PaSS 値の高い順に表示する機能を完成させた。

また、Spiddos を使用せず、バンドパターンそれ自体を認識して類似度を比較するプログラムを試験的に作成したが、まだ実用レベルの域には達していない。

(5) プレキャストゲルの試験製造

外注によりプレキャストゲルの試作をし、その性能確認を行ったが、標準組成の手作りゲルと同等の泳動パターンにならなかった。適正な価格にするには在庫管理コストを下げるためにプレキャストゲルを長期保存可能にしなければならない。標準組成のゲルは長期保存ができないため、組成を長期保存仕様にする、泳動パターンが変わってしまった。種々試行したが成功しなかった。

[今後の展開] :

微生物群集試料のGPパターンからその群集の構成微生物種を判別できるようなレベルにもっていきたい。そのためには、種に特異的なバンドの探索を行い、その中から種同定バンド決定する必要がある。Spiddos の自動抽出機能はまだ誤認識が多く、現在も人の手による抽出操作に頼っている。自動化しないとGPの普及は望めないと考えられたため、この Spiddos 自動抽出機能は完成させたい。