微生物叢ゲノム断片をプローブとするアイソトープアレイ による基質特異的微生物検出手法の開発

飛 野 智 宏* 栗 栖 太**
春 日 郁 朗* 古 米 弘 明**

Isotope Array Using Random Genomic DNA Probes Derived from a Microbial Community for Substrate-Specific Detection of Microorganisms

Tomohiro TOBINO*, Futoshi KURISU**,
Ikuro KASUGA* and Hiroaki FURUMAI**

* Department of Urban Engineering, School of Engineering, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

** Research Center for Water Environment Technology, School of Engineering, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

Abstract

A method for the specific detection of microorganisms that assimilate radioactive substrates was combined with the use of membrane arrays consisting of random genomic DNA fragment probes prepared from the original microbial community. The feasibility of this combined method was investigated in terms of specificity, sensitivity and the applicability to the analysis of environmental samples. DNA fragment probes prepared from pure cultures exhibited specific signals to their cognate targets although one probe derived from the rRNA gene was found to be cross-hybridized. Strong correlations of signal intensity with both the amount of probe spotted and the concentration of ^{14}C -labeled DNA in the hybridization buffer were observed after hybridization with a membrane array using whole genomic DNA as probes. A membrane array was fabricated from an activated sludge sample and hybridized with ^{14}C -DNA extracted from the same sample grown on either ^{14}C -acetate or ^{14}C -methanol. One out of 48 spots was detected for each target and the positions of the two spots were found to be identical, thus indicating the specific detection of ^{14}C -assimilating microorganisms and a microorganism capable of assimilating both acetate and methanol.

Key words: isotope array, random genomic DNA probe, membrane array, substrate assimilation

1. はじめに

活性汚泥法やバイオレメディエーション技術のような微生物群集の機能を利用した技術において、処理対象物質の分解可能性の判断、さらには処理性能の予測やその効率化を行うためには、群集中のどの微生物が対象とする物質の分解に関与しているかを把握し、当該微生物を制御することが最も本質的なアプローチである。しかしながら、現状では非常に限られた処理対象と微生物との関係が明らかになっているにとどまっている。

Stable isotope probing (SIP) 法^{1,2)}やMicroautoradiography-fluorescence in situ hybridization (MAR-FISH) 法^{3,4)}は、微生物群集の機能により着目した解析手法として、近年、広く用いられるようになってきた。これらの手法は、同位体で置換された化合物を投与し、核酸を対象とした分子生物学的手法によりその物質を資化もしくは摂取した微生物を検出・同定することができる優れた手法である。また、2003年に発表されたIsotope array法⁵⁾は、 ^{14}C 標識基質の投与によって、標識基質を資化した微生物のrRNAを ^{14}C で標識

し、それをrRNA標的マイクロアレイで検出する技術である。蛍光標識と放射性標識による16S rRNAの二重標識を行うことにより、蛍光検出にて群集中の系統情報を、放射性検出にて基質の資化という機能に関する情報を同時に得ることができるハイスループットな技術である。

しかしながら、これらの手法にはいくつかの短所が存在する。SIP法は遠心分離による標識核酸の分離が不明瞭であり^{6,7)}、MAR-FISH法は分析に長時間を要し⁸⁾、土壌サンプルに対しては土壌粒子の排除が困難なため適用が困難である⁹⁾。また、プローブやPolymerase Chain Reaction (PCR) プライマーを用いる手法は、塩基配列情報を入手可能な微生物しか検出できないという欠点を持ち、このことはMAR-FISH法およびIsotope array法にも当てはまる。

そこで、本研究では、これらの限界を補完・克服しながら、群集中で特定の基質の資化に関与した微生物を検出するための手法として、「微生物叢ゲノム断片をプローブとして用いたアイソトープアレイ法」を提案する。本手法の概念図をFig. 1に示す。対象となるサンプルからDNAを抽出し、制限酵素により断片化後、クローニングおよびPCR

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

** 東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

Fig.1 Schematic diagram of isotope array using random genomic DNA probes

によってそれぞれのDNA断片を分離・増幅したものをプローブとしてメンブレンにスポットし、アレイを作製する。一方、同一のサンプルに ^{14}C 標識基質を投与して培養を行い、DNAを抽出し、 ^{14}C によって標識されたDNAを得る。得られた ^{14}C 標識DNAと作製したメンブレンアレイとでハイブリダイゼーションを行い、メンブレンの放射線画像を撮影し、シグナル解析を行う。陽性と判断されたプローブは、対象サンプル中で投与基質を資化した微生物に由来すると考えられる。従って、陽性プローブの塩基配列を解釈すれば、その由来となった微生物の遺伝情報を得ることができる。

本手法の特徴として、 ^{14}C で標識されたDNAをメンブレンアレイとのhybridizationによって直接検出すること、また、そこで用いるメンブレンアレイのプローブとして、対象とする微生物叢より作製したランダムなゲノム断片配列を用いることの2点が挙げられる。これらの特徴から、 ^{14}C で標識されたDNAをハイブリダイゼーションにより明瞭に分離して検出できること、事前に塩基配列情報を必要とせず、もとの群集組成を反映したプローブ群によって対象を広く捉えられることが期待される。また、DNAアレイ技術を用いることで一度の試験で多くの情報を得ることが可能となる。本手法のようにアレイのプローブとしてランダムに断片化されたDNA断片配列を用いる手法に関しては、純菌のゲノムDNA断片配列をプローブとするマイクロアレイによって、群集中に存在する特定の菌を検出可能であることが報告されている¹⁰⁾。

本研究では、微生物叢ゲノム断片をプローブとして用いたアイソトープアレイ法の開発を目的として、ゲノム断片プローブの特異性および ^{14}C 標識によるハイブリダイゼーションにおける検出感度について、純菌を用いて検討を行った。さらに、下水処理場より採取した活性汚泥を用いて、特定の基質を資化する微生物の検出を試みた。

2. 方 法

2.1 純菌と活性汚泥

Table 1 Summary of membrane arrays used in this study

Name	Origin of probes	Number of probes	Amount of each probe(ng/spot)
Aligned array	<i>B.licheniformis</i>	16	10
	<i>A.calcoaceticus</i>	16	10
	<i>M.organophilum</i>	16	10
Aca array*	Whole genomic DNA of <i>A.calcoaceticus</i>	6	1, 2, 5, 10, 20, 50
AS array	Activated sludge	48	50

* Whole genomic DNA extracted from *A.calcoaceticus* was directly spotted onto 6 spots ranging in the amount from 1ng/spot to 50ng/spot

Bacillus licheniformis (JCM 2505), *Acinetobacter calcoaceticus* (JCM 6842), *Methylobacterium organophilum* (NBRC 15689) の3種類の純菌を使用した。また、活性汚泥は、2008年1月に、国内の下水処理場（担体添加A2O法）第一好気タンクより採取し、実験に供した。

2.2 ゲノム断片プローブの作製

純菌、活性汚泥ともにDNA抽出キット（Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega）を用いて化学的溶菌法によりDNAを抽出した。3種類の純菌、活性汚泥の計4種類のDNAサンプルから、以下の手順でそれぞれのゲノム断片プローブを作製した。DNA抽出物を断片化するため、*EcoRI*と*HindIII*の2種類の制限酵素を用いて消化反応を行った。消化反応後、ゲノム断片の脱リン酸化反応を行った。これは、消化産物が様々な長さのDNA断片を含んでおり、ライゲーション反応の際、特に短い断片間での再結合が起こり、生成したキメラ配列がインサートとしてベクターに挿入されることが懸念されたためである。脱リン酸化後のDNA断片を、ライゲーション反応により*EcoRI*と*HindIII*で消化したプラスミドベクター（pUC19）へと挿入した。なお、今回は2種類の制限酵素を用いた二重消化であることからベクターの自己再結合の頻度は低いと考え、ベクター側の脱リン酸化は行っていない。ライゲーション産物をコンピテントセル（*E.coli* DH5α Competent Cells, タカラバイオ）に導入して形質転換し、アンピシリン、IPTG、X-galを含む寒天培地に塗布して37℃で一晩培養した。培養後、得られた白いコロニーを爪楊枝で採って25μlの純水に懸濁し、クローンライブラリを作製した。クローンライブラリを鋳型として、PCR反応（forward primer, 5'-ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'；reverse primer, 5'-CACACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'）によりインサート配列を含む領域の増幅を行った。得られたPCR産物の長さをアガロースゲル電気泳動によって確認し、鎖長がおおむね500bp以上であったものをプローブとして使用するためランダムに選んだ。選んだ増幅産物は、精製プレート（MultiScreen® PCRμ96 MultiScreen PCR96, Millipore）によって精製し、PCR産物の両端にあるベクター由来の部分を取り除くために*EcoRI*と*HindIII*にて消化反応（37℃, 4 h）を行った後、再度精製を行った。精製後のDNA溶液の濃度を吸光度測定（NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies）により測定し、260 nmと280 nmにおける吸光度比（ A_{260}/A_{280} ）および260 nmと230 nmにおける吸光度比（ A_{260}/A_{230} ）から著しい不純物の混入がないことを確認した。10 ng・μl⁻¹および50 ng・μl⁻¹となるようにTEバッファーで希釈後、プローブ溶液とした。なお、陽性を示したプローブについては、塩基配列を決定した（accession

no. AB510160-AB510161)。

2.3 メンブレンアレイの作製

作製した各サンプルのプローブ溶液をナイロンメンブレン (Nylon Membrane, Positively charged, Roche) に1 μg ずつスポットし、プローブの構成が異なる3種類のアレイを作製した。各アレイのプローブの構成をTable 1に示す。なお、Aca arrayは*A. calcoaceticus*から抽出したゲノムDNAを断片化せずに、1 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ から50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ まで6段階の濃度のDNA溶液を調製し、それぞれ1 μl ずつメンブレンにスポットし、アルカリ変性処理を行った。各メンブレンは、プローブのスポット後、120℃のオーブンで30分間インキュベートし、プローブの固定を行った。

2.4 ^{14}C 標識基質を用いた培養

使用した放射性同位体標識基質は $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ (American Radiolabeled Chemicals Inc.) および $[1-^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{COONa}$ (GE Healthcare UK Limited) の2種類である。

1) 純菌の培養: $[1-^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{COONa}$ を含み酢酸ナトリウムを唯一の炭素源とする培地 (660 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, 40 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$) 5 mlを35 mlバイアルに採り、一晩前培養を行った。*A. calcoaceticus*の懸濁液を3 μl 添加して37℃で振盪培養を行った。

2) 活性汚泥の培養: 予備試験において活性汚泥のメタノールの摂取が遅く今回の条件では検出が難しいと判断されたため、メタノールについては前培養を行い資化微生物の集積を行った。処理場より活性汚泥を採取後、100 mlを三角フラスコに採り分け、200 μl のメタノールを加えて25℃で1日間振盪培養した。残りの活性汚泥は、室温で1日間曝気を行った後、活性汚泥10 mlを100 mlバイアルに採り、 $[1-^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{COONa}$ 水溶液を2 ml添加して(終濃度275 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, 16.7 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$) 25℃で振盪培養を行った。また、メタノールによる前培養を行っていた活性汚泥サンプルから10 mlを100 mlバイアルに採り、 $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{OH}$ 水溶液を添加して(終濃度400 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, 20 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$) 25℃にて振盪培養を行った。培養開始後20 min, 9 h, 24 h, 48 hの時点でシリンジにて汚泥懸濁液を採取し、2.5に示した方法で放射能を測定した。純菌および活性汚泥は培養終了後、先述した方法にてDNA抽出を行った。抽出したDNAは、先述した方法でDNA濃度の測定および純度の確認を行い、2.5に示した方法で放射能を測定した。

2.5 液体シンチレーションカウント

サンプリングした活性汚泥の菌体画分と上清画分、および培養終了後に抽出したDNAの放射能を計数率(count per minute; cpm)として液体シンチレーションカウント法にて測定した。菌体画分は、採取したサンプルを吸引ろ過により0.20 μm のフィルター上に捕集し、0.2 N HClを加えて5分間静置することで炭酸塩を除去した後、もう一度吸引してHCl溶液を捨て、フィルターごと測定サンプルとした。上清成分は、0.20 μm のフィルターろ過後のろ液を測定サンプルとした。DNAは、抽出したDNA溶液をそのまま測定サンプルとした。各測定サンプルは、10 mlの液体シンチレーションカクテル(Ultima Gold, PerkinElmer)とよく混合した後、液体シンチレーションカウンタ(LSC-6100, ALOKA)にて計数率を測定した。DNA溶液に関しては、DNA濃度およびシンチレーションカウントの結果から、DNA 1 μg あたりのカウント数を標識率として計算した。

2.6 DNA断片のDIG標識

*EcoRI*と*HindIII*により消化したそれぞれの純菌のDNA断片を鋳型として、ランダムプライミング法によりDIG標識を行った(DIG DNA Labeling Kit, Roche)。

2.7 ハイブリダイゼーション

2.3で作製したメンブレンアレイをプラスチックバッグの中に入れ、ハイブリダイゼーションバッファー(DIG EasyHyb, Roche)にて55℃で1 h、プレハイブリダイゼーションを行った。標識DNAと100 μg のサケ精子を50 μl の水に入れ、沸騰したウォーターバスに5分間漬して変性させた後、氷上で急冷し、55℃に温めておいたハイブリダイゼーションバッファーと混合した。プレハイブリダイゼーションを行っていたバッグを開いて中のバッファーを捨て、すぐさま標識DNAとサケ精子を混合したハイブリダイゼーションバッファーを注入し、口を閉じて55℃、16時間穏やかに振盪しながらハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを取り出して低ストリンジェンシー洗浄(2×SSC, 0.1% SDS, 室温, 5分×2回)および高ストリンジェンシー洗浄(0.1×SSC, 0.1% SDS, 15分×2回)を行った。

2.8 アレイの検出

1) 化学発光検出: DIG Luminescence Detection Kit (Roche)を用いて、プロトコルにしたがって化学発光検出を行った。画像の撮影にはECL Mini-Camera (Amersham)およびビールアパートフィルム(タイプ667, Polaroid)を使用した。

2) 放射線検出: ハイブリダイゼーション後、風乾したメンブレンをラップで包み、イメージングプレート(BAS-2040またはBAS-2025, Fujifilm)と密着してカセット(Fujifilm)に入れ、室温で4~5日間露出した。露出後、イメージングプレートに記憶された画像をBAS-1500もしくはBAS-5000 (Fujifilm)にて読み取り、デジタル画像として保存した。

3. 結果と考察

3.1 メンブレンアレイの特異性

3種類の純菌株を用い、ゲノム断片プローブの特異性を検証する実験を行った。*B. licheniformis*, *A. calcoaceticus*および*M. organophilum*から作製したゲノム断片それぞれ16種、計48種をスポットしたメンブレンアレイ(Aligned array, Table 1)を作製し(Fig. 2A)、DIGにより標識されたそれぞれのゲノムDNAをターゲットとしてハイブリダイゼーションを行った(Fig. 2B-2D)。一般に、ハイブリダイゼーションの特異性はハイブリダイゼーションを行う温度に大きく影響される。しかしながら、複数のプローブを用いて同時にハイブリダイゼーションを行うアレイ技術の場合、それぞれ異なるDNAの融解曲線を持つ全てのプローブに対して最適なハイブリダイゼーション温度を適用することは不可能である¹¹⁾。今回は、50℃と55℃の2通りの条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、シグナルパターンに変化が見られなかったため(データ未掲載)、以後の全てのハイブリダイゼーションをより特異性が得られる55℃に設定して行った。

Aligned arrayの48個のプローブのうち、46個はそのプローブの由来である菌をターゲットとした場合のみシグナルを発した(Fig. 2B-2D)。残りの2個のプローブは、いずれのハイブリダイゼーションにおいてもシグナルを発し

Fig. 2 Probe map of Aligned array (A) and chemiluminescence image after hybridization with DIG-labeled DNA of *B.licheniformis* (B), *A.calcoaceticus* (C) and *M.organophilum* (D).

なかったプローブ (Ac 1) と、全てのハイブリダイゼーション後においてシグナルを発したプローブ (BI 13) であった。よって、これら2個を除き、本実験で使用したランダムに選んだゲノム断片プローブはそれぞれの菌に対して特異的であったといえる。

ターゲットとしてハイブリダイゼーションに用いたDIG標識DNAは、*EcoRI*と*HindIII*によって消化・断片化されたそれぞれの純菌のゲノムDNAである。*EcoRI*および*HindIII*は共に6塩基認識の制限酵素であり、その消化産物の平均長は理論的には4,096 bpとなり、二つを合わせて用いることで、平均断片長は約2,000 bpになると考えられる。本実験で用いた細菌のゲノムDNAの全長は明らかでないが、細菌のゲノム長は数Mbpのゲノム長を持つことが知られており¹²⁾、仮に*Escherichia coli*と同じ約5 Mbpだと仮定すると、その消化産物は約2,500種類の断片となる。よって、約2,500種類の標識DNA断片からなるターゲット3種類に対して、48個中46個のプローブが自身のターゲットに対してのみ特異的に結合したといえる。例えば、*M.organophilum*のゲノムDNAから作製した16個のプローブは、*M.organophilum*のゲノム断片とのハイブリダイゼーションではすべて検出されたのに対し、*B.licheniformis*および*A.calcoaceticus*をターゲットとしたハイブリダイゼーションにおいては、それぞれ約2,500種類のDNA断片のいずれに対しても非特異的な結合を起こさなかった (Fig. 2B, 2C)。このことは、ランダムに選んだ塩基配列未知のゲノム断片プローブが高い特異性を持つことを示している。

Kim *et al.*¹⁰⁾ は13種類の純菌のDNA断片配列約700個をプローブとして用いたマイクロアレイによって、標的とする菌を活性汚泥と混合した場合でも、その菌の存在を特異的に検出することが可能であるとしている。また、Wu *et al.*¹³⁾ が作製した純菌のゲノムDNA全長をプローブとするマイクロアレイ (Community Genome Array; CGA) では、ハイブリダイゼーションの条件を変化させることで、種レベルから株レベルまでの分解能を持つことが示されている。これらは、今回の実験の結果と同様、ゲノムDNA配列が高い特異性を持ち、DNAアレイのプローブとして用いた場合に特異的な検出が可能であることを示している。

本実験で用いたAligned arrayでは1つのプローブ (BI 13, Fig. 2) で非特異的な結合が見られた。このプローブの塩基配列 (AB510161) を解読した結果、*B.licheniformis*の23Sおよび5S rRNA遺伝子領域の配列 (accession no. CP000002) と99%の相同性 (1635/1647) を持つことが確認され、このプローブがrRNA遺伝子領域に由来したものであったことが判明した。一般にrRNA遺伝子は異なる微生物の間での相同性が高く、ゲノムレベルでの相同性とは必ずしも一致しないことが知られている¹⁴⁾。よって今回の結果からも、rRNA遺伝子のように異なる系統間で保存された領域に由来するゲノム断片がプローブとして含まれた場合、非特異的なシグナルとなる可能性が示された。機能遺伝子のPCR産物をプローブとしたFunctional gene arrayでは、厳しいハイブリダイゼーション条件の下では塩基配列の相同性が80%~85%以下の場合、クロスハイブリダイゼーションは起こらないという報告がある¹⁵⁾。今回非特異的シグナルの見たプローブ (BI 13) の配列は、*A.calcoaceticus*の23S rRNA遺伝子配列 (accession no. X87280) と81% (994/1227) の相同性があったことから、クロスハイブリダイゼーションを起こしてしまったと考えられる (Fig. 2C)。

今回使用した3種類の純菌は、系統学的に離れた位置関係にあり (*B.licheniformis*, *A.calcoaceticus*, *M.organophilum* はそれぞれ *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*に属する)、ゲノム上で80%~85%を超えるほどの相同性の高い領域はほぼrRNA遺伝子などに限られている。どの程度系統学的に近ければ、DNA断片同士が80%~85%を超える相同性を持つ部分が多くなり、非特異的結合が増えてくるのかは、今後検討が必要である。

3.2 ¹⁴C標識DNAの検出感度

[1-¹⁴C]CH₃COONaを含み酢酸ナトリウムを唯一の炭素源とする培地にて*A.calcoaceticus*の純粋培養を行い、DNAを抽出した。抽出したDNA 1 μgあたりの放射能を液体シンチレーションカウント法によって測定した結果、43,000 cpm・μg⁻¹であった。Adamczyk *et al.*⁵⁾が行った放射性同位体標識基質による純菌の培養では、19,000 cpm・μg⁻¹の¹⁴C標識RNAを用いてマイクロアレイでの検出に成功していることから、今回得られたDNAの放射能はそれよりも高く、検出に十分な標識率だと考えられた。

得られた¹⁴C標識DNAを用いて、本実験で使用した放射線検出系 (Imaging plateおよびBAS-5000, Fujifilm) の検出限界の検証を行った。¹⁴C標識DNAの希釈列をメンブレンにスポットし、5日間露出後放射線検出を行った (Fig. 3)。2.5 cpm相当のスポットまでが目視にて判別可能であったことから、スポットが視覚的に検出されるためには、1スポットあたり約2.5 cpm以上に相当する¹⁴C標識DNAが必要であることが分かった。Polz *et al.*¹⁶⁾ が用いたphosphor-imaging screenによる¹⁴Cの検出限界は、直径150 μmのスポットで0.1 disintegration per minute (dpm) であった。これを今回作製したメンブレンアレイのスポットの直径2 mmに換算すると、1スポットあたり約18 dpm、液体シンチレーションカウンターにおける計数効率を90%と仮定しても16 cpmとなるため、本実験で用いたバイオイメージングアナライザによる検出感度はPolz *et al.*のものとは比べて約6倍程度高いものであった。

次に、ハイブリダイゼーションに用いるターゲットDNA濃度およびスポットするプローブ量に対する検出シグナ

Fig. 3 DNA series of different radioactivity to determine detection limit. The values beside the spots show radioactivity on the spot in units of cpm.

Fig. 4 Map illustrating the amount of whole genomic DNA probe on Aca array (A) and autoradiographs after hybridizations with the ^{14}C -DNA concentrations of $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (B), $0.47 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (C) and $1.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (D) in hybridization buffer.

Fig. 5 Signal intensity against the amount of probe. Symbols indicate the concentration of ^{14}C -DNA in hybridization buffer. ●, $1.2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ▲, $0.47 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ■, $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

ルの関係を見るために、*A. calcoaceticus* のゲノムDNA全長をプローブとするAca arrayを作製した。ここで、ゲノムDNA全長をプローブとして用いたのは、少ないコピー数のDNAサンプルでも十分な感度を得ることを目的としたためである。作製したAca arrayは、1スポットあたりのプローブ量が1 ngから50 ngまで6段階に分かれた6個のスポットからなる。 ^{14}C 標識DNAとAca arrayとのハイブリダイゼーションの結果をFig. 4に示す。Aca arrayのハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションバッファー中の ^{14}C 標識DNA濃度を3段階に分けて行った。プローブのスポット量およびバッファー中の ^{14}C 標識DNAの濃度が高くなるにつれて、より明瞭に可視化されていることが分かる。

Fig. 5は、Fig. 4に示した放射線可視化後の画像から各スポットのシグナル強度 (Photo Stimulated Luminescence; PSL) を算出し、各スポットのプローブ量に対してシグナル強度をプロットしたものである。この図から、プローブ量とシグナル強度との間には、今回試験した1~50 ng·spot⁻¹の範囲において高い正の線形相関があることが分かる ($R^2 = 0.769 \sim 0.994$)。また、バッファー中の ^{14}C 標識DNA濃度とシグナル強度の間にも高い正の相関が見られた。

Bertucci *et al.*¹⁷⁾ により、メンブレンアレイにスポットされたプローブの量 (0.3~19 ng·spot⁻¹) とシグナル強度の間に高い正の線形相関があったことが報告されている。今回の試験では、最大50 ng·spot⁻¹までの範囲でシグナル強度が線形的に上昇することを確認できた。また、50 ng·spot⁻¹付近においてもシグナル強度の線形性が保たれていたことから、プローブのスポット量をさらに増加させることで、メンブレンアレイによる検出範囲の増大を図ることができると考えられる。同様に、バッファー中の標識DNAの濃度を増加させることも検出範囲の増大につながると考えられる。

3.3 活性汚泥への適用

本手法の環境サンプルへの適用可能性を探るために、国内の下水処理場から採取した活性汚泥試料を用いて実験を行った。採取後の試料からDNAを抽出し、制限酵素消化、クローニングおよびPCRの操作を経て48個のプローブを作成し、メンブレンにスポットしてAS arrayを作成した (Table 1)。

活性汚泥の基質利用特性を比較するために、 ^{14}C メタノールおよび ^{14}C 酢酸ナトリウムの2種類の基質をそれぞれ投与し、25℃で2日間、回分振盪培養を行った。培養中の各時点で試料を採取し、上清画分と菌体画分の放射能を測定した (Fig. 6)。上清画分と菌体画分の和が培養時間の経過に伴って減少しているのは、主として ^{14}C CO₂に分解され気化したためと考えられる。培養9時間後の時点で、酢酸ナトリウムを添加した系では8割以上の基質が消費されてその一部が菌体に取り込まれていたのに対し、メタノールを添加した系では24時間後においても半分程度しか消費されておらず、48時間後に到って約8割程度が消費されていた。このような活性汚泥における基質摂取傾向の違い、特に添加したメタノールの摂取が開始するまでに一定期間を要することはこれまでの報告と一致した^{18,19)}。48時間の培養後、回収した菌体よりDNAを抽出して放射能を測定したところ、酢酸添加系で11,200 cpm·µg⁻¹、メタノール添加系で17,000 cpm·µg⁻¹であった。各基質に対する資化微生物の存在量やDNAへの同化率の違いなどにより、活性汚泥DNAとしての放射能が決定されると考えられる。

得られた2種類の ^{14}C 標識DNAを用いてAS arrayとのハイブリダイゼーションを行った (Fig. 7)。両ハイブリダイゼーションにおいてそれぞれ同じ位置の1つのスポット (図中矢印) を検出することができた。したがって、複合微生物系である活性汚泥を対象とした場合においても、特定の基質を摂取したもののみを検出可能であることがわかった。また、検出されたスポットは同一のものであったことから、活性汚泥中で酢酸とメタノールの両方を資化した微生物が検出された可能性が考えられる。

陽性プローブの由来となった微生物を推定するために、その塩基配列を解読し (AB510160) 遺伝子データベースにて相同性検索を行った結果、*Candidatus Competibacter phosphatis* のクローンの16S rRNA遺伝子配列 (accession no. AY962319) と98%の相同性 (764/776) を持つことが判明した。*Candidatus Competibacter phosphatis* は、リン除去プロセスの活性汚泥中に広く存在するグリコーゲン蓄積細菌として知られていることから²⁰⁾、今回使用したA2O法の活性汚泥中にも存在し、メンブレンアレイに使用したプローブの中にその菌由来のDNA断片が含まれていたといえる。

Fig. 6 Radioactivity of supernatant (open bar) and suspended solid (closed bar) from 1 µl of mixed liquor during incubation with ^{14}C -acetate (A) and ^{14}C -methanol (B). Dashed lines indicate initial radioactivity in 1 µl of mixed liquor.

Fig. 7 Radioautographs of AS array after hybridization with ^{14}C -DNA extracted from the activated sludge sample fed with ^{14}C -acetate (A) and ^{14}C -methanol (B). Arrows indicate positive spots.

*Candidatus Competibacter phosphatis*は酢酸資化能を有するが²⁰⁾、メタノール資化能を有するかどうかに関しては知られていない。本結果は、*Candidatus Competibacter phosphatis*のメタノール資化能を示唆している。しかしながら、3.1での議論から、陽性プローブの塩基配列が複数のrRNA遺伝子配列と高い相同性を持っている可能性はあり、今回の結果が非特異的結合の影響を受けているのかどうか、更なる検討が必要である。

今回1つのスポットしか検出されなかったのは、アレイに載せられたプローブの由来となった微生物の中には他に酢酸やメタノールを摂取したものがいなかった可能性と、検出のための感度が十分でなかった可能性が考えられる。前者に関して、AS arrayは48個のゲノム断片プローブからなるものであった。活性汚泥中に存在する微生物の多様性を考慮すると、48個のプローブで微生物叢を十分に捉えられるとは考えにくい。活性汚泥中のある微生物由来のDNA断片がプローブとしてメンブレンアレイに含まれる

確率は、その微生物の存在割合やゲノム長に影響される。異なる微生物種間においてもゲノム長が一定であると仮定した場合、存在割合 x の微生物種をプローブ数 N で検出する確率 P は、 $P = 1 - (1 - x)^N$ となる。これより、全体の1%を占める微生物を95%の確率で検出するには、約300個のプローブが必要となる。このように、対象とする微生物に応じて、その微生物を捉えるのに十分なプローブ数を確保する必要がある。そのためには、スポッティングの自動化および小型化によって、多くのプローブからなるアレイを作製することで、より広く対象微生物叢を捉えることができると考えられる。感度が十分でなかった可能性に関しては、3.2で述べたように、1スポット当たりのプローブ量を増やすこと、ターゲットの ^{14}C 標識DNAの濃度を増加させることで検出範囲を増大させ、より多くの細菌を捉えることができるものと考えられる。

本手法では、シグナルの得られたプローブの塩基配列を解読することで、その由来となった微生物の遺伝情報を得ることができる。さらに、データベースでの相同性検索によりその微生物種の推定を行うためには、データベース上に当該配列もしくはそれと相同性の高い配列が登録されている必要がある。今回シグナルの得られたプローブは、現在データベースの中で最も情報が充実している16S rRNA遺伝子領域を含んでいたため、そのプローブの由来となった微生物 (*Candidatus Competibacter phosphatis*) を推定することができた。しかしながら、その他の遺伝子領域に関する情報は非常に限られており、ランダムに得られたDNA断片の塩基配列のみから微生物の同定を行うのは現時点では困難であると考えられる。現在、多くの微生物株の全ゲノム解析が行われているほか、メタゲノム解析^{21, 22)} などにより環境微生物の遺伝子配列も大量に蓄積されつつある。今後の塩基配列解読技術およびデータ解析技術の進展に伴って、登録数の増加とともに登録塩基配列の機能や系統に関する情報も増加することが予想される。このような情報の蓄積により、本手法で得られたDNA断片配列に基づいて、その微生物種を推定できる可能性自体が向上していくことが期待される。また、陽性プローブの塩基配列からプライマーやプローブを設計することは可能である。未同定の当該物質資化微生物として、その微生物の定量や追跡を行うことにより、複合微生物系における当該物質の挙動をモニタリングするツールとして用いることも考えられる。

4. まとめ

本研究では、微生物群集中で特定の基質資化に関与する微生物の検出のために、 ^{14}C 標識基質を用いたトレーサー標識および微生物叢ゲノム断片プローブを用いたメンブレンアレイによる検出法を組み合わせた手法の開発を試みた。その結果、以下の知見を得ることができた。

1) ゲノムDNA断片プローブはその由来となる菌に対して十分特異的であった。しかしながら、rRNA遺伝子のように異なる種間で相同性の高い配列を有するプローブは、非特異的結合を引き起こしうることが示された。

2) バイオイメージングアナライザによる検出限界は1スポットあたり2.5 cpm程度であった。シグナル強度は、プローブのスポット量 (1~50 ng/spot⁻¹) およびハイブリダイゼーションバッファー中の標識DNA濃度 (0.12~1.2 µg/ml⁻¹)

と高い正の相関がみられた。これらを増加させることにより、検出範囲の増大を図ることができる。

3) ^{14}C 酢酸ナトリウムおよび ^{14}C メタノールをトレーサーとして本手法を活性汚泥に適用した結果、*Candidatus Competibacter phosphatis*に由来したと推定されるプローブからシグナルを得ることができた。そのプローブは*rrn*オペロン領域を含んでいたため、偽陽性の可能性が残るものの、本手法により複合微生物系の中で特定の基質を摂取した微生物を検出可能であることが示された。

(原稿受付 2009年7月14日)

(原稿受理 2009年10月14日)

参 考 文 献

- 1) Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh and J. C. Murrell (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**, 646-649.
- 2) Dumont, M. G. and J. C. Murrell (2005) Stable isotope probing: Linking microbial identity to function. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 499-504.
- 3) Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K. H. Schleifer and M. Wagner (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1289-1297.
- 4) Nielsen, J. L., D. Christensen, M. Kloppenborg and P. H. Nielsen (2003) Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under in situ conditions by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Environ. Microbiol.* **5**, 202-211.
- 5) Adamczyk, J., M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P. H. Nielsen, M. Schlöter, P. Roslev and M. Wagner (2003) The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6875-6887.
- 6) Lueders, T., M. Manefield and M. W. Friedrich (2004) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* **6**, 73-78.
- 7) Kreuzer-Martin, H. W. (2007) Stable isotope probing: linking functional activity to specific members of microbial communities. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **71**, 611-619.
- 8) Okabe, S., T. Kindaichi and T. Ito (2004) MAR-FISH -An ecophysiological approach to link phylogenetic affiliation and in situ metabolic activity of microorganisms at a single-cell resolution. *Microbes. Environ.* **19**, 83-98.
- 9) Wagner, M., P. H. Nielsen, A. Loy, J. L. Nielsen and H. Daims (2006) Linking microbial community structure with function: fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 83-91.
- 10) Kim, B.C., J. H. Park and M. B. Gu (2005) Multiple and simultaneous detection of specific bacteria in enriched bacterial communities using a DNA microarray chip with randomly generated genomic DNA probes. *Anal. Chem.* **77**, 2311-2317.
- 11) Urakawa, H., S. El Fantroussi, H. Smidt, J. C. Smoot, E. H. Tribou, J. J. Kelly, P. A. Noble and D. A. Stahl (2003) Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2848-2856.
- 12) Goris, J., K. T. Konstantinidis, J. A. Klappenbach, T. Coenye, P. Vandamme and J. M. Tiedje (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 81-91.
- 13) Wu, L. Y., D. K. Thompson, X. D. Liu, M. W. Fields, C. E. Bagwell, J. M. Tiedje and J. Z. Zhou (2004) Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 6775-6782.
- 14) Rossello-Mora, R. and R. Amann (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 39-67.
- 15) Wu, L. Y., D. K. Thompson, G. S. Li, R. A. Hurt, J. M. Tiedje and J. Z. Zhou (2001) Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5780-5790.
- 16) Polz, M. F., S. Bertilsson, S. G. Acinas and D. Hunt (2003) A(r)Ray of hope in analysis of the function and diversity of microbial communities. *Biol. Bull.* **204**, 196-199.
- 17) Bertucci, F., K. Bernard, B. Loriod, Y. C. Chang, S. Granjeaud, D. Birnbaum, C. Nguyen, K. Peck and B. R. Jordan (1999) Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1715-1722.
- 18) Osaka, T., S. Yoshie, S. Tsuneda, A. Harata, N. Iwami and Y. Inamori. (2006) Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. *Microbiol. Ecology* **52**, 253-266.
- 19) Hagman, M., J. L. Nielsen, P. H. Nielsen and J. C. Jansen (2008) Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge -identification of bacteria and process activity studies. *Water Res.* **42**, 1539-1546.
- 20) Crocetti, G. R., J. F. Banfield, J. Keller, P. L. Bond and L. L. Blackall (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* **148**, 3353-3364.
- 21) Tringe, S. G., C. von Mering, A. Kobayashi, A. A. Salamov, K. Chen, H. W. Chang, M. Podar, J. M. Short, E. J. Mathur, J. C. Detter, P. Bork, P. Hugenholtz and E. M. Rubin (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* **308**, 554-557.
- 22) Neufeld, J. D., Y. Chen, M. G. Dumont and J. C. Murrell (2008) Marine methylophiles revealed by stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomics. *Environ. Microbiol.* **10**, 1526-1535.