

土壌抽出 RNA を用いた土壌微生物の遺伝子発現解析

農業環境技術研究所 藤井 毅・宮坂 知芳・王 勇・
森本 晶・小川 直人*

はじめに

肥料や農薬をふんだんに使う資材投入型の農業生産から、環境に優しい低投入・持続的農業生産への移行が叫ばれるようになり、土壌の硝化・脱窒活性や土壌病害抑制活性など土壌の微生物活性を正確に把握するための技術開発が以前よりも増して望まれるようになった。土壌に生息している微生物の数パーセントしか対象にできないと言われている培養法に頼って土壌微生物を解析していた時代では、土壌の微生物活性全体を把握することは、実質的に不可能であった。しかしながら、近年、難培養微生物にアクセスする手段の一つとして、土壌から直接 DNA を抽出する手法が開発され、環境中に存在する DNA 配列を一つのゲノム（メタゲノム）としてとらえ、メタゲノムの構成遺伝子や DNA 配列から土壌の微生物相を解析しようとする新しい試みが行われるようになってきた。PCR で増幅したりボソームの部分配列を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）で解析する手法の普及も相まって、土壌をはじめ様々な環境サンプルから抽出した DNA を用いて、その土壌に生息する微生物相や特定の機能にかかわる遺伝子の消長をモニターすることにより、土壌の微生物活性にかかわる遺伝子を直接解析できるようになった。近年の大量シーケンシング技術の目覚ましい進歩により土壌のメタゲノム解析は今後ますます盛んになることが予想される。

ただ、このように土壌から直接抽出した DNA には、実際に生育して活動している菌以外に、静菌や死菌由来の DNA が含まれる可能性も捨て去ることができない。また、DNA を用いて解析する場合、特定の機能遺伝子が土壌中に存在していることはわかっても、実際にその遺伝子が発現し機能しているのかどうかを見分けることはできない。土壌に生息する微生物の生理活性を正確に把握、あるいは評価するためには、そうした生理活性に

関連した機能遺伝子が発現した結果生じる RNA を直接解析することが最も望ましい。

近年、自然環境に生息する微生物群集の構造や機能を解析するために RNA を用いることが脚光を浴びてきている。環境中から抽出した RNA の解析は、土壌や水系試料中の特定の微生物の分布や相対活性を研究するうえで、威力を発揮することが証明されている（BÜRGMANN et al., 2003; CHEN et al., 2007; PICHARD et al., 1991）。また、土壌からの RNA 抽出法が種々検討され、市販の土壌 RNA 抽出キットが販売されるようになり、様々な自然環境条件下における遺伝子の活性を生態学的、環境科学的観点から解析するために、mRNA を現場から抽出し解析できるようになった。本稿では、我々がこれまで得てきたデータも織り交ぜ、土壌中から RNA を抽出する技術および土壌中での微生物遺伝子の発現検出に関する研究動向やそれらの成果について紹介する。

I 土壌からの RNA 抽出法

土壌から RNA を抽出する方法を大きく分けると、直接抽出法と間接抽出法に分けられる。直接抽出法では、土壌から直接核酸を抽出するのに対し、間接抽出法では、土壌からいったん微生物を分離し、そこから核酸を抽出する。間接抽出法の場合、腐植物質の混入の少ない比較的きれいな核酸を容易に抽出することができるが、直接法に比べて回収される RNA 量は著しく少なくなることが報告されている（HAHN et al., 1990）。また、間接抽出法の場合、細胞を溶菌するまでに、土壌からの微生物の遊離と遠心分離の操作が入ることから、RNA を用いて土壌中の微生物の生理活性を解析しようとする、目的とする遺伝子の発現量とその間に变化してしまうことが懸念される。このような理由から、土壌からの RNA を抽出する場合は、直接抽出法を用いるのが一般的である。

直接抽出法で、核酸の収率を大きく左右するのは、細胞の破碎方法である。1990 年代のはじめころ、土壌からの RNA 抽出には、主にカオトロピックイオンや界面活性剤とともにフェノールを土壌サンプルに加えて攪拌する直接フェノール抽出法が用いられていた（HAHN et al., 1990; TSAI et al., 1991）、この方法は、確かに μg レベ

Gene Expression Analysis of Soil Microorganisms using RNA Extracted from Soil. By Takeshi FUJII, Tomomichi MIYASAKA, Yong WANG, Sho MORIMOTO and Naoto OGAWA

(キーワード: 土壌微生物, 土壌抽出 RNA, 遺伝子発現, RT-PCR)

* 現所属: 静岡大学農学部

ルの RNA 画分を数 g の土壌から抽出することができるが、腐植物質や土壌粒子などの夾雑物の混入が著しい。その後、微生物細胞壁や細胞膜を分解する酵素を用いる方法や、液体窒素で凍らせた土壌を粉碎する方法、あるいは電子線を使う方法など、これまでに多くの破碎方法が報告されてきた。その中でも、ビーズを土壌サンプルに添加し、激しく攪拌するいわゆるビーズ破碎法は、様々な抽出法の中で最も効率よく土壌から核酸を遊離させる方法として認められている (Moré et al., 1994)。今日では、ビーズ破碎専用の攪拌機とともに土壌核酸抽出キットが市販され、広く用いられている。

ただ、ビーズ破碎で効率よく細胞の破碎が行われても、RNA が抽出されてこない場合がある。図-1 は、我々が4種類の土壌から DNA と RNA の精製を試みた際の最終精製画分のアガロースゲル電気泳動の様子を示しているが、多腐植質黒ボク土と淡色黒ボク土からは、DNA は相当量回収されたにもかかわらず、RNA は全く抽出されてこなかった。これら黒ボク土からの DNA の抽出の際には、星野らの方法 (HOSHINO and MATSUMOTO, 2004) に従って、スキムミルクを添加し、DNA の土壌への吸着を抑えている。スキムミルクを添加しないと全く DNA を得ることができないことから、おそらく、RNA も土壌への吸着が原因で抽出されないものと考えられる。ただ RNA の場合、スキムミルクを添加しても

抽出されてこないことから、このような、RNA を吸着しやすい土壌の場合は、例えば細断した DNA を添加するなど吸着を抑制する他の方策を検討する必要がある (HOSHINO and MATSUMOTO, 2007)。

II 土壌抽出 RNA の精製

土壌から抽出した RNA に含まれる特定の遺伝子の mRNA をリアルタイム RT-PCR で定量しようとする場合など、土壌抽出 RNA を酵素処理する必要があるときは、RNA への不純物の混入を最小限に抑える必要がある。RNA 画分への DNA の混入は、市販の RNA 精製キットと DNase 処理を組み合わせることにより、十分抑えられるようになった。これに対して、土壌から RNA を抽出しようとする場合、最も問題となるのが腐植物質等の酵素反応を阻害する不純物の混入である。我々は、土壌からの RNA 抽出法を検討する過程で、市販のビーズ破碎キットを使って、RNA の抽出効率の向上と RNA 抽出の際の不純物の混入を抑えるための条件を検討し、不純物の少ない新しい土壌 RNA 抽出法を開発して、PCB 分解菌の土壌中での PCB 分解遺伝子の誘導発現をリアルタイム RT-PCR で検出した (WANG et al., 2008)。図-2 は、ビーズ破碎の際の条件を検討したときの結果を示している。様々な量の供試菌株 (*Burkholderia multivorans*) を添加したオートクレーブ滅菌土壌 (砂礫畑土壌) に、核酸の抽出時に用いる Buffer とともに、土壌からの核酸抽出の際によく使われる物質を添加した。その結果、ビーズ破碎時にカオトロピックイオンの一種である Guanidine Thiocyanate (GTC) や、界面活性剤 SDS を添加することにより、核酸の回収率が上がり、得られる RNA 画分の色 (腐植物質などの土壌からの不純物を示す) が薄くなった。一方、フェノールを添加してビーズ破碎を行った場合は、核酸の抽出効率が下が

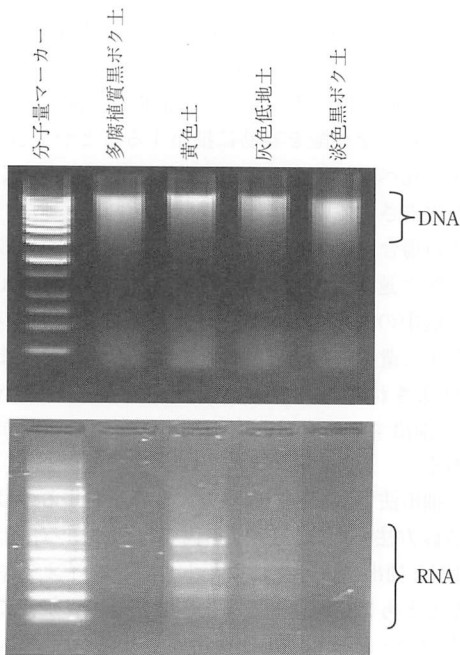


図-1 異なる4種類の土壌からの DNA と RNA の抽出

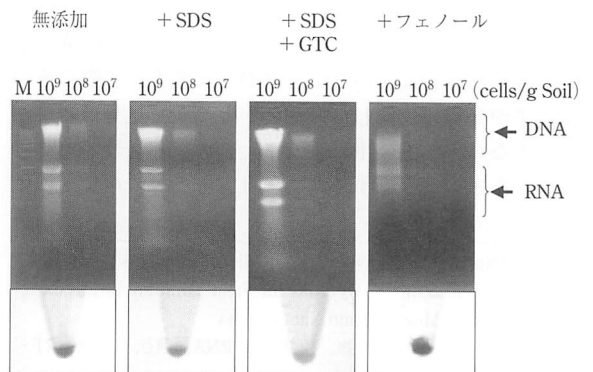


図-2 土壌からの RNA 抽出に及ぼす Buffer 添加物の影響

り、抽出液が濃い茶色を示したことから、多量の不純物の混入が認められた。このように、RNA サンプルへの不純物の混入には、ビーズ破碎時の Buffer 組成が大きく影響する。また、用いる Buffer の pH と温度が RNA 画分への不純物混入量に影響を及ぼすこともわかっている（投稿中）。しかし、抽出条件を検討して破碎時の不純物の混入を最小限にすることはできても完全に抑えることはできない。そのような破碎時に混入する腐植物質は、市販の RNA 精製用キットや分子ふるい用ゲルを充填したスピカラムを用いることにより、さらに除去することができる。

ただ、腐植物質の混入については、供試する土壌によって不純物の RNA 画分への混入量が大きく異なり、特に多くの有機物を含む土壌では、RNA サンプルへの不純物の混入は多くなる傾向にある。また、上述したように、RNA の吸着が激しい土壌サンプルも存在することから、残念ながら現時点では、どんな土壌からも高純度の RNA を効率よくとれる完全な抽出法は存在せず、供試する土壌ごとに抽出条件を慎重に選ぶ必要があるというのが現状である。

III 土壌中での土壌微生物の遺伝子発現解析

上述したように、どんな土壌からでも RNA を抽出できる完全無比の方法はまだないが、土壌から抽出した RNA を用いて、特定の微生物遺伝子の土壌中での発現を検出する試みは、1990 年ごろから数多く報告されている。発現を検出する標的遺伝子としては、難分解性化合物の生分解にかかわる遺伝子や金属耐性遺伝子などバイオレメディエーションにかかわる遺伝子、あるいは自然界の窒素循環に関連する硝化・脱窒関連遺伝子が多い。遺伝子の発現を検出する方法としては、初期のころは、抽出 RNA を固定化したナイロンメンブレンに放射性標識した標的遺伝子をハイブリダイゼーションさせる方法が用いられていた。例えば、TSAI らは、*Pseudomonas aeruginosa* を植菌したオートクレーブ滅菌土壌から RNA を抽出しナイロンメンブレンに固定して、基質添加によるナフタレン分解遺伝子の発現誘導を放射能ラベルしたプローブを用いて検出した (TSAI et al., 1991)。

RNA 抽出法が改良され、腐植物質の混入の少ない比較的精製度の高い RNA を得られるようになると、逆転写反応後 PCR 増幅 (RT-PCR) で得られた産物を用いて土壌中の遺伝子発現を検出したり、逆転写反応産物を競合 PCR やリアルタイム RT-PCR で定量したりできるようになった。1996 年、BOGAN らは、滅菌土に生育し

た多環芳香族化合物分解糸状菌の分解関連遺伝子の mRNA を競合 PCR で定量した (BOGAN et al., 1996)。この場合、ターゲットが糸状菌の遺伝子であることから、磁気ビーズに polyT を結合したアフィニティー精製で比較的簡単に必要な量の RNA を調製することができた。一方、MENDUM らは、高純度の RNA を土壌から抽出する方法を開発し、組換え微生物を散布した土壌から抽出した RNA を RT-PCR の鋳型として用いることにより、組み込んだ遺伝子の発現を、電気泳動とサザンハイブリダイゼーションで検出することに成功した (MENDUM et al., 1998)。我々もリアルタイム RT-PCR を用いることにより、土壌中で生育している PCB 分解菌の分解酵素遺伝子の発現量を定量し、分解遺伝子の発現と生育との関係を時間を追って解析することができた (WANG et al., 2008)。

リアルタイム RT-PCR は、サンプル中の標的遺伝子配列の存在量 (コピー数) を、ハイブリダイゼーションを基本とする方法よりも正確に定量できることから、特定の遺伝子の土壌中での発現を解析するためには、これから広く用いられるようになると思われる。

IV マイクロアレイによる土壌抽出 RNA の解析

リアルタイム RT-PCR は、土壌で発現している特定の遺伝子の発現量を正確に測定するために威力を発揮するが、土壌で生育する微生物の遺伝子をゲノムワイドに解析したり、土壌中の多数の機能遺伝子の発現量を比較解析するような場合には適さない。このような場合には、多数の遺伝子プローブを貼り付けたマイクロアレイを用いる解析法が望ましい。しかしながら、マイクロアレイ解析に必要な多量の RNA、特に mRNA を得ることは極めて困難で、これまで土壌から抽出した mRNA を標的としたマイクロアレイ解析の報告は、比較的増幅しやすい polyA を有する Eukaryote の mRNA に限られていた。ところが、昨年、環境サンプルからマイクロアレイ解析に必要な十分量の微生物 mRNA を得るための mRNA 増幅法が開発された (GAO et al., 2007)。

GAO らは、polyA を持たない微生物の mRNA を増幅するために、全微生物群集 RNA 増幅法 (whole-community RNA amplification: WCRA) という新しい手法を開発した。単なるランダム PCR では、増幅の際のバイアスがかかりそのため質的情報の喪失の原因となるが、この方法では、Eukaryote の研究で広く使われていて、様々な mRNA 種の質的情報をくまなく転写することができる T7 ポリメラーゼを利用することにより、PCR 増幅の際のバイアスを回避している。図-3 に WCRA の概

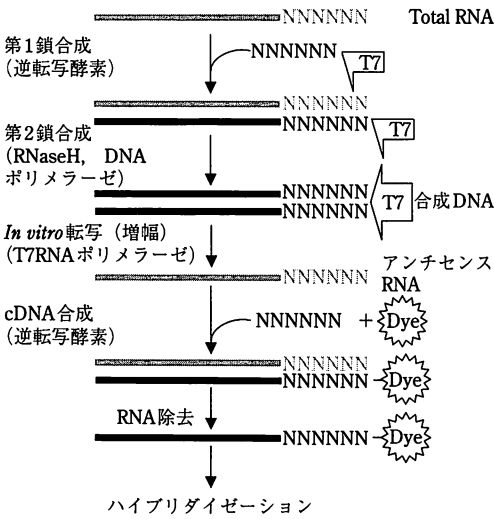


図-3 全微生物群集 RNA 増幅法 (WCRA)

要を示す。Eukaryote の研究では、polyA に T7RNA プロモーターシーケンスを連結したプライマーを用いて最初の逆転写反応を行うが、WCRA では 6～9 個のランダムプライマーに T7 プロモーター配列を連結し、1 回目の cDNA 合成を行った。続いて得られた cDNA を鋳型にして 2 本鎖 DNA を合成し、さらにそれを鋳型に T7RNA ポリメラーゼを用いて mRNA を増幅する。すなわち、逆転写で得られた cDNA それぞれを T7 プロモーターを有する人工的な遺伝子とすることで、T7RNA ポリメラーゼの酵素反応による cDNA を増幅することになる。この方法を用いると、1 回の増幅で約 1,000 倍の増幅が可能となり、PCR による増幅の際のバイアスを回避し、むらのない mRNA の増幅ができる。GAO らは、6～9 個のランダムプライマーに T7 プロモーター配列を連結しそれぞれで RNA 増幅を行いその結果を比較した。その結果、最も短い 6 残基のランダムプライマーを用いた場合に最も高い増幅率 (1,200～1,800 倍) と、最も増幅しそこないの少ない、すなわち、最も信頼性の高い増幅産物を得ることができた。培養した細菌から抽出した RNA を WCRA で増幅した場合としない場合で発現パターンをその細菌のゲノム遺伝子を貼り付けたマイクロアレイで解析したところ、その発現パターンは増幅前の発現パターンとよく一致し、増幅によるバイアスが極めて少ないことが示された。さらに GAO らは、環境中サンプルから RNA を抽出し WCRA で増幅することにより、実際にその環境中で発現していると考えられる多くの遺伝子の発現の検出に成功している。この WCRA とマイクロアレイ解析を活用することにより、様々な環

境条件下で発現している遺伝子群の解析や土壌の生物活性評価、あるいは特定の細菌の土壌中での網羅的な遺伝子発現解析が可能となることから、この技術のインパクトは極めて大きいと考えられる。

おわりに

WCRA で増幅した mRNA をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する技術の飛躍的な普及が予想される一方で、もう一つの技術革新が、自然環境下における微生物の遺伝子発現解析を促進させる可能性がある。それは、大量の塩基配列情報を解読できる次世代シーケンサーの開発である。日本でも 1 回の運転で数ギガ (10⁹ = 十億) 塩基の配列を解読することができる数種類のシーケンサーが 1 昨年くらい前から販売されるようになった。開発企業は、さらにもう 1 桁上の塩基配列情報を解読できる機械の開発にしのぎを削っている。1991 年から十年の歳月と数十億ドルの費用を要したヒトゲノム解析も、2007 年に Nature 誌に載った WATSON 博士のゲノム解析では、次世代シーケンサーのおかげで百万ドル以下の費用でたった 2 か月で解析が終わった。また、2010 年までには個人のゲノムを千ドルで解析することを目標にしたプロジェクトが進行している。これらの次世代シーケンサーの登場は、生物学に新しい時代の幕開けをもたらすものとして注目されているが、次世代シーケンサーを用いれば、マイクロアレイでは検出不可能な未知の遺伝子の産物の配列を網羅的に検出し、そのリード数で発現量を評価できる可能性がある。土壌から抽出した RNA を逆転写し得られた cDNA の配列を網羅的に解析することにより、その土壌中で活発に発現している遺伝子配列を検出したり、ある特定の機能を担う機能遺伝子の発現状態をより正確に把握することが可能になる時代が到来するものと期待している。

引用文献

- 1) BOGAN, B. W. et al. (1996): Appl. Environ. Microbiol. 62: 2381～2386.
- 2) BÜRGMANN, H. et al. (2003): ibid. 69: 1928～1935.
- 3) CHEN, Y. et al. (2007): Environ. Microbiol. 9: 2855～2869.
- 4) GAO, H. et al. (2007): Appl. Environ. Microbiol. 73: 563～571.
- 5) HAHN, D. et al. (1990): Arch. Microbiol. 154: 329～333.
- 6) HOSHINO, Y. T. and N. MATSUMOTO (2004): Microb. Environ. 19: 13～19.
- 7) ——— (2007): Soil Biol. Biochem. 39: 434～444.
- 8) MENDUM, T. A. et al. (1998): FEMS Microbiol. Lett. 164: 369～373.
- 9) MORE, M. I. et al. (1994): Appl. Environ. Microbiol. 60: 1572～1580.
- 10) PICHARD, S. L. et al. (1991): ibid. 57: 1721～1727.
- 11) TSAI, Y.-L. et al. (1991): ibid. 57: 765～768.