

微生物の群集構造解析とは？ ～ 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) ～

はじめに

近年、微生物の分野で“群集構造解析”という言葉をよく耳にします。群集構造解析とは複合微生物系を形成している試料中の微生物の種類や特定の機能を有している微生物群の構成を明らかにすることです。環境微生物をはじめ、様々な分野で微生物の分離培養を行わずに各試料中の微生物種を比較検討する群集構造解析が、いま注目を浴びています。従来、微生物の種類やその機能(性質)を調べるためには培養操作が必須でした。しかし、分子生物学的技術の進歩により、培養を行わずに微生物の DNA 等を直接解析することでその種類を検索することが可能になってきました。培養を必要としない微生物の検出法は、

時間や手間の短縮

培養の技術や知識が不要

培養できない微生物もターゲットとして扱える

などの利点が挙げられます。例えば の“培養できない微生物”については、環境中の細菌は培養が困難なものが多く、集落(コロニー)を形成させることができる細菌は限られていると言われています。しかし、群集構造解析はこれら難培養微生物群集の解析手法として期待されています。その他、培養を行わずに微生物の DNA 等を直接解析する方法としてクローン解析が行われてきましたが、クローン解析には多大な時間・労働力・費用が必要とされます。そのため、培養やクローン解析を行わずに簡便に群集構造解析ができる手法の開発が求められていました。

微生物群集解析としては、化学的バイオマーカーを利用したキノプロファイル法(微生物の呼吸鎖における電子伝達物質の一つであるユビキノン、メナキノン等の各キノ分子種の存在比を測定する方法)などがありますが、ここでは分子生物学的な群集構造解析の手法として近年多用されている変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE)について紹介します。DGGE は、DNA 分子の安定性が塩基配列に依存しており、1 塩基の配列の違いが電気泳動の移動度に反映されることを利用した点変異検出法として元来用いられた手法です。長さの同じ 2 本鎖 DNA を塩基配列の違い、つまりは微生物の種類の違いにより分離できることを利用し、微生物の分野においても急速に普及が進んでいます。

DGGE の原理

2 本鎖 DNA は温度の上昇に伴い水素結合が切断されて 1 本鎖へと変性(解離)します(図-1)。2 本鎖 DNA が 1 本鎖へ変性する温度は、その塩基配列によって異なります。温度上昇効果と変性剤効果は同等で、DNA 変性剤(尿素とホルムアミド)に濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で DNA の電気泳動を行うことで、同じ長さの 2 本鎖 DNA(PCR で得られた混合配列)を塩基配列の違いにより分けることができます。

目的の DNA 配列を GC に富んだ配列(GC クランプ)付きプライマー(化学的に合成された短い DNA 断片)セットを用いて PCR で増幅し、増幅した 2 本鎖 DNA を、上方(陰極)から下方(陽極)へ向かって DNA 変性剤濃度が高くなるように勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、DNA 変性剤の

濃度上昇に伴い2本鎖DNAの水素結合が切断され、結合力の強いGCクランプ部分を残して2本鎖から1本鎖DNAに変性します。このように、一部では2本鎖を維持し一部では1本鎖へと解離しているDNAがゲルを移動する速度は、完全な2本鎖や1本鎖DNAに比べて極めて遅くなるため、GCクランプ部以外が完全に1本鎖に解離した時点で移動がほぼ止まります。塩基配列の異なる同じ長さのDNAが混在していても、配列の違いにより(安定性の違いにより)個々のDNAが解離する変性剤濃度が異なるため、ゲル上の異なる位置にバンドが形成されることになります。DGGEの試験の流れを図-2に示します。

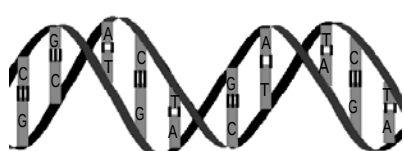


図-1 解離する2本鎖DNA

2本鎖DNAはアデニン(A)とチミン(T)、グアニン(G)とシトシン(C)が対になっており、AとTは水素結合を2つ持ち、GとCは水素結合を3つ持ちます。しかし、その水素結合は温度上昇により結合力が弱まってDNAは1本鎖へと変性(解離)し、温度を下げると再結合します。GとCの結合はAとTの結合より強いいため、その結合を断つにはより高い温度(又は変性剤濃度)が必要となります。

試料中のDNAを抽出



複数種の細菌DNAを無作為に抽出します。

〔ここでは3菌種(A, B, C)が存在していると仮定しています〕

PCRによるDNAの増幅



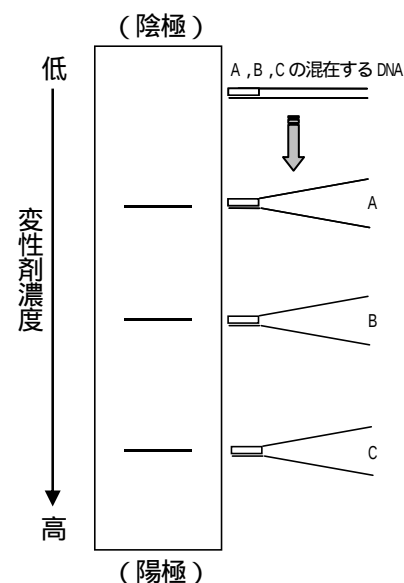
GCクランプ付きプライマーセットを用い

てPCRを行います。

□ ; GCクランプ部位

■▶, ◀■ ; プライマー

電気泳動



PCRで増幅したDNAを、変性剤に濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行います。DNAは負荷電のため、陽極に向かって移動します。GCクランプを除いた部位が解離したところで移動が止まり、バンドを形成します。そして、配列の異なるA, B, Cを分けることができます。

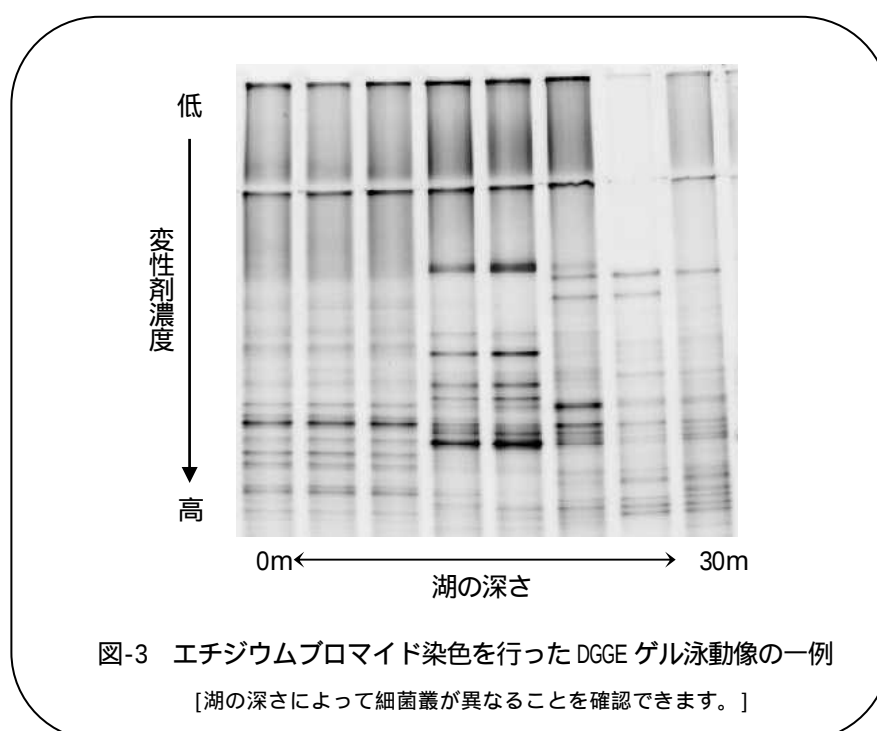
図-2 DGGEの試験の流れ

DGGE の応用

医学系文献検索サイトで知られる Enterz-PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)で“ DGGE ”と検索をかけると、2006 年 8 月現在 1541 件のヒットがあり、DGGE が大変普及している手法であることが伺い知れます。DGGE ではバーコードのように微生物構造を可視化することができ、ゲル上のバンドの位置や本数の比較により、場所間や、経時的な変化等、サンプル間の比較が可能となります(図-3)。そのような“ 比較 ”を目的として、16S rRNA 遺伝子を利用した細菌の群集構造解析が多く行われています。16S rRNA 遺伝子は微生物の類縁関係を知ることができる分子マーカーであり、細菌の属レベル以上の系統的位置を決定する目的で用いられています。

DGGE を使った具体的な例として、生ゴミのコンポスト化の各過程における細菌叢の比較、化学物質が与える環境微生物への影響、活性汚泥中の細菌叢の把握などがあり、様々な分野への利用が期待されています。

食品分野では発酵食品中の微生物面からの品質管理としての利用が期待できます。発酵食品では菌叢の変化が風味を左右します。DGGE では風味のよいものと風味の悪いものを比較し、細菌叢の違いを可視化できる可能性を秘めています。なお、電気泳動後はバンドを切り出してその配列を決定し、菌の種類を特定することが可能です。つまり、風味に影響を及ぼした菌種の特定が可能となります。発酵食品の風味に対する科学的な数値化は難しい問題の一つではあるものの、DGGE がその一つになり得ると考えており、弊財団でもその取り組みに着手したところです。



参考資料

・石井浩介，中川達功，福井学：「微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用」，日本微生物生態学会誌，15，59-73（2000）