

新しいIDNAマイクロアレイテクノロジー フローラ分析用アレイの開発

A New DNA Microarray Technology

加来 佳子 Yoshiko Kaku

横井 崇秀 Takahide Yokoi

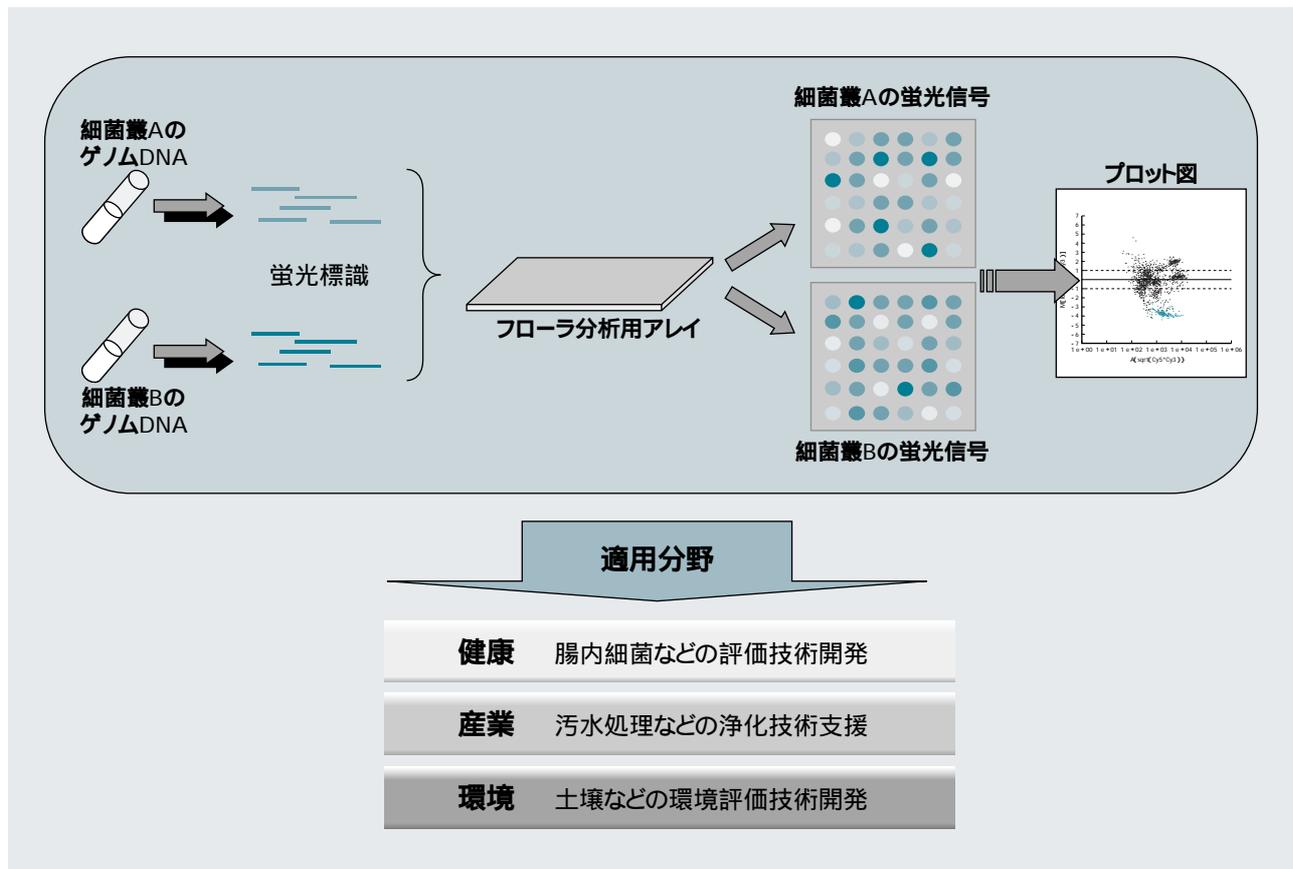


図1 「フローラ分析用アレイ」を用いた細菌叢(そう)分析方法の概要と適用分野

細菌叢の分析は、まず、細菌叢から調製したゲノムDNAの蛍光標識により、分析対象試料を調製する。分析対象試料はフローラ分析用アレイ上の識別プローブに、遺伝子配列の相同性に従って結合する。そして、蛍光信号として検出された各細菌遺伝子量から細菌叢を比較分析する。「フローラ分析用アレイ」を用いた細菌叢分析方法は、食品・医療・環境分野への展開を目指している。

1.はじめに

1990年にヒトゲノム解読15か年計画が開始され、大腸菌、酵母およびマウスのゲノム解読に次いで、2003年にはヒトゲノムの塩基配列情報が解読された。その結果、得られた大量の遺伝子情報を利用した遺伝子機能解析技術として、DNA (Deoxyribonucleic Acid) マイクロアレイ(別名:DNAチップ)が開発された。DNAマイクロアレイとは、解析対象種の遺伝子情報からプローブDNAを設計、合成し、スライドガラスなどの基板の上に高密度に固定した遺伝子機能解析ツールである。網羅的に遺伝子情報発現様式を解析できるDNAマイクロ

アレイは、ポストゲノム時代の強力な解析手法として広く利用されるようになった。

ところが、これまでのDNAマイクロアレイの作製には遺伝子配列情報に基づくDNA合成が必要であることから、その利用はゲノム解析が終了している生物種に限定されていた。しかし、日立グループは、生物が保有するゲノムDNAを断片化してスライドガラス上に固定する技術を用い、アレイ製造工程から塩基配列情報に基づくプローブDNA合成過程を省略した「ショットガンゲノムアレイ技術」を開発した。これにより、膨大な費用が掛かるゲノム解析を実施せずに、遺伝子配列情報に

自然界には100万種を超える細菌が存在すると言われ、古来から発酵培養により、食品や医薬品の製造に用いられてきた。近年は、汚水や土壌の浄化に活用されるなど、細菌の産業的利用価値が高まっている。しかし、細菌のほとんどは培養困難であるという理由で、産業利用や研究の対象となっている細菌種は1%にも満たず、医療分野や食品産業が研究対象とするヒト腸内に常在する細菌群も細菌の種類や存在量は解明されていない。日立グループは、培養せず細菌を検出できるツールとしてDNAマイクロアレイの応用を試みた。ここで開発した「フローラ分析用アレイ」は、細菌群を構成する複数の細菌(フローラ)を個別に検出すると同時に、細菌群の量的変化を計測可能とするものである。

乏しい種々の微生物のDNAマイクロアレイ解析を可能としている¹⁾(図1参照)。

ここでは、ショットガンゲノムアレイ技術を応用し、食品・医療・環境分野への展開を図るために「フローラ分析用アレイ」による新しい細菌叢(フローラ)評価方法の開発と、細菌叢を構成する複数の細菌の検出と量的変化の計測に関する検討、およびその結果について述べる。

2. 細菌叢の従来の評価技術

細菌叢とは、ある環境中に形成される数十～数百種類の微生物から成る微生物の群集・共存状態を指し、「ヒト腸内細菌叢」、「土壌細菌叢」といった使われ方をしている。ヒトの場合、「過敏性腸症候群」、「大腸がん」、「うつ病」などの患者は健常者と比較すると腸内細菌叢が異なっていることが報告されており、腸内細菌叢の状態の詳細解明は有用な疾患診断マーカーの開発につながるものと考えられていることから、腸内細菌にかかわる健康食品ブームと重なり、多くの機関で研究が進められている²⁾。

現在用いられている細菌叢評価技術には、培養法とPCR(Polymerase Chain Reaction)法がある。しかし、培養法は通常知られている培養方法によって培養可能な細菌だけが評価対象であり、難培養細菌は検出不可能である。自然界では培養方法の知られていない細菌が、知られている細菌の数十倍も存在すると推定されており、難培養細菌を検出できる技術開発が急務となっている。また、PCR法は同一増幅条件でも遺伝子の塩基配列によって測定対象の増幅効率に差があるため、存在量の変化を反映できないという課題がある。

日立グループが開発したフローラ分析用アレイは、培養、DNA増幅のいずれの工程も含まないため、培養法とPCR法の課題点を克服するものと期待されている。

3. フローラ分析用アレイ作製方法

フローラ分析用アレイの作製フローを図2に示す。従来のDNAマイクロアレイ作製技術では、搭載する識別プローブの設計に配列情報を必要とする性質上、遺伝情報だけでなく

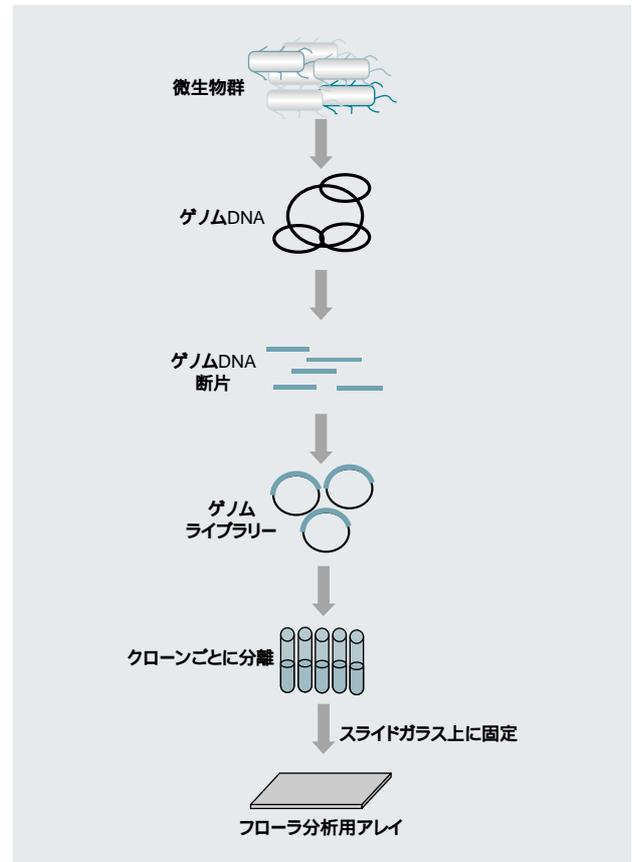


図2 「フローラ分析用アレイ」の作製フロー

細菌叢から抽出したゲノムDNAを断片化し、ゲノムライブラリーを作製した後、スライドガラス上にゲノムライブラリー由来の個々のクローンを識別用DNAプローブとして固定する。

細菌の種類も判明しない細菌叢を分析するのは不可能である。一方、フローラ分析用アレイは、細菌叢から抽出したゲノムDNAを断片化し、ゲノムライブラリーを作製した後、スライドガラス上にゲノムライブラリー由来の個々のクローンを識別プローブとして固定するため、事前に配列情報は一切必要としない。基本的には、どんな細菌叢でもゲノムDNAを抽出できれば、フローラ分析用アレイの作製が可能であることから、応用範囲は広い。

4. 菌種識別によるフローラ分析検証

まず、フローラ分析用アレイの菌種識別能力の検証を行っ

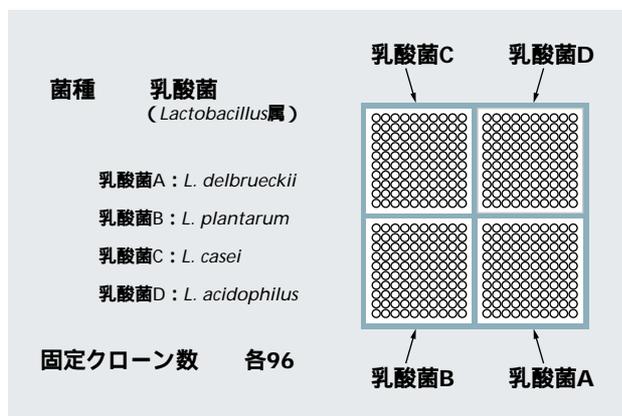


図3 乳酸菌フローラ分析用アレイのデザイン
4種の乳酸菌由来ゲノムライブラリーから、それぞれ任意の96クローンをスライドガラス上の4か所に固定した。

た。この試験では腸内の善玉菌としてヨーグルトや乳酸菌飲料などの健康食品に含有される乳酸菌4種 (*L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. casei* および *L. acidophilus*) を用いて、識別試験用のフローラ分析用アレイを作製した。作製したアレイのデザインを図3に示す。4種の乳酸菌より、それぞれゲノムライブラリーを作製した後、各ゲノムライブラリーから、それぞれ任意の96クローンをスライドガラス上の4か所に固定し、1枚のフローラ分析用アレイとして作製した。フローラ分析用アレイは分析対象試料より調製した蛍光標識ゲノムDNAがフローラ分析用アレイ上の識別プローブに遺伝子配列の相同性に従ってハイブリダイゼーション(結合)すると、蛍光信号として確認される。

4枚のフローラ分析用アレイに対して4菌種それぞれの標識ゲノムDNAを用いてハイブリダイゼーションを行った結果を図4

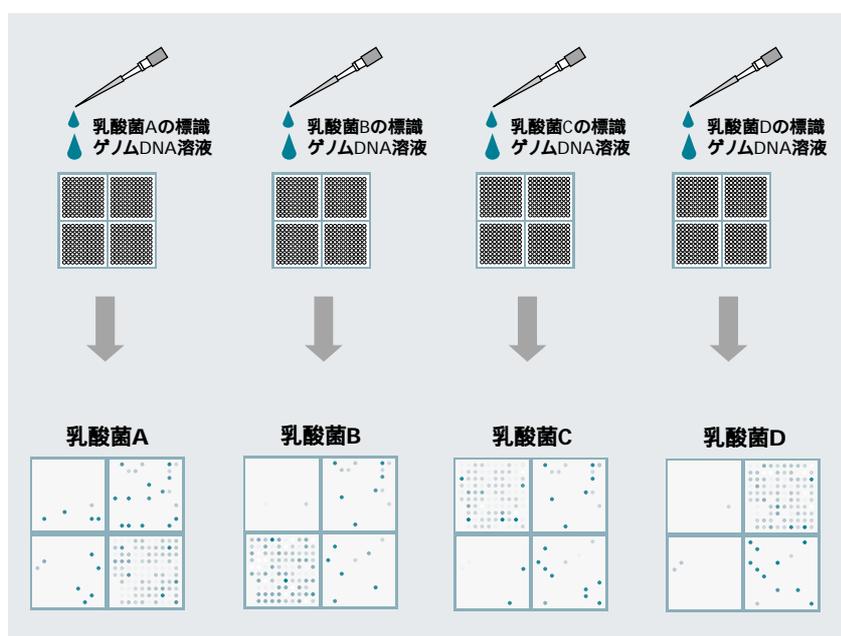


図4 乳酸菌4菌種の識別結果
乳酸菌群に共通して存在する遺伝子配列の検出に加えて、4菌種間ではおのおのの菌種に特徴的な信号パターンを示している。

に示す。フローラ分析用アレイ上に固定した4菌種間では、おのおのの菌種が特徴的な信号パターンを示しており、フローラ分析用アレイを用いて4菌種の識別が可能であることが明らかとなった。また、乳酸菌群に共通する遺伝子群についても同時に検出可能であることが確認された。フローラ分析用アレイには各菌種に特徴的なゲノムDNA断片を識別プローブとして用いているため、各菌種を明確に識別したと考えられる。

5. 混合細菌における遷移解析試験

細菌の存在比率変化の検出能についての試験では、分析対象の細菌叢モデルとして3種の細菌ゲノムDNA(1種のビフィズス菌, 2種の乳酸菌AおよびB)を混合した。比較を行った2種の混合ゲノムDNA試料の混合比を表1に示す。この試験のねらいは、用いたフローラ分析用アレイの検出対象外であるビフィズス菌ゲノムDNAが大量に存在する条件において、微量の乳酸菌B由来ゲノムDNAの増加の検出をすることである。

2種の混合ゲノムDNAをおのおのの標識し、ハイブリダイゼーション後、細菌叢AおよびBの識別マーカ群の信号強度比を信号パターン分布としてプロット図にして図5に示す。二つのプロット図を比較すると、乳酸菌Aの識別マーカ群は変化が見られないが、乳酸菌Bの識別マーカ群は上方に移動した。こ

表1 細菌叢モデルのゲノムDNA試料の混合比
混合ゲノムDNA試料の混合比を示す。

	ゲノムDNAの混合比(ビフィズス菌:乳酸菌A:乳酸菌B)
試料1	100:10:2
試料2	100:10:5

の結果は、2種の混合ゲノムDNAの比較において、乳酸菌B由来ゲノムDNAの存在量の増加をフローラ分析用アレイが検出したことを示している。善玉菌である乳酸菌や悪玉菌の代表であるウェルシュ菌などの腸内細菌叢の指標菌となる細菌群を用いた腸内細菌叢用のフローラ分析用アレイを作製することにより、これら指標菌の存在比を可視化でき、腸内環境健康状態の評価が可能になると考えられる。

6. 嫌気性アンモニア菌叢を用いた応用解析例

株式会社日立プラントテクノロジーの提供による嫌気性アンモニア菌叢を用いて、指標となる細菌群(指標菌)が明

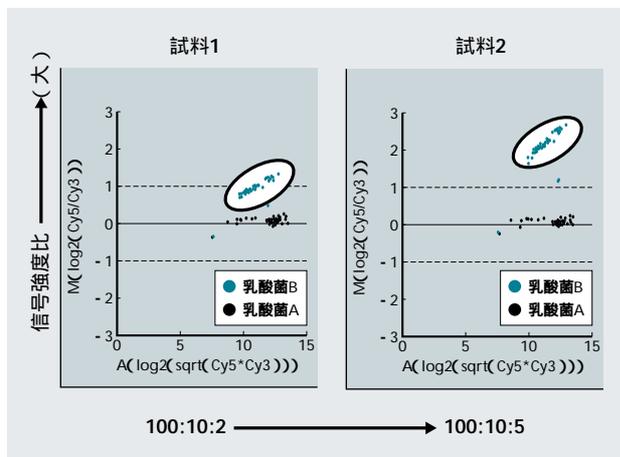


図5 細菌の存在量変化の検出試験結果

乳酸菌Aの識別マーカー群の位置において、試料1と試料2での変化は見られないが、乳酸菌Bの識別マーカー群の位置は試料2では上方に移動している。

らかでない細菌叢へのフローラ分析用アレイの適用可能性を検討した。嫌気性アンモニア菌叢は水処理において安価で効率よく窒素除去を行うことができ、半導体工場での廃水処理などへの適用が期待されている細菌叢である。しかし、この細菌叢の菌種ならびに働きは明らかとはされていない。

この試験のフローラ分析用アレイ作製においては、嫌気性アンモニア菌叢を構成するすべての細菌から抽出した混合ゲノムDNAを用いてライブラリーを作製後、約2,000個のクローンをスライドガラス上に固定してアレイを作製した。

細菌叢の試料として、窒素除去速度の遅い定常期、ならびに窒素除去速度の速い増殖期の嫌気性アンモニア菌叢由来の2サンプルを用意した。2サンプルからそれぞれ抽出したゲノムDNAをおおの標識し、上述のアレイ上で競合ハイブリダイゼーション後、アレイの信号強度比を信号パターン分布としてプロット図で可視化した結果を図6に示す。この図では中心を境界として定常期に多い遺伝子群が上方に、増殖期に多い遺伝子群が下方に表示されるよう作成した。したがって、円で示した遺伝子群は窒素除去速度が速い増殖期に多いことから、窒素除去速度に関連する遺伝子マーカーとして利用できると示唆された。

この試験の結果より、指標菌がない場合でもフローラ分析用アレイは細菌叢の変化を検出し、指標となる遺伝子マーカーを取得できることが明らかとなった。

7. おわりに

ここでは、日立グループが開発した「フローラ分析用アレイ」による、乳酸菌および嫌気性アンモニア菌叢を用いた解析例について述べた。

今回の検討試験の結果、乳酸菌を指標菌としたモデル的な細菌叢においても、指標菌のまったくない嫌気性アンモニア菌叢においても、フローラ分析用アレイを用いて、細菌叢の遷

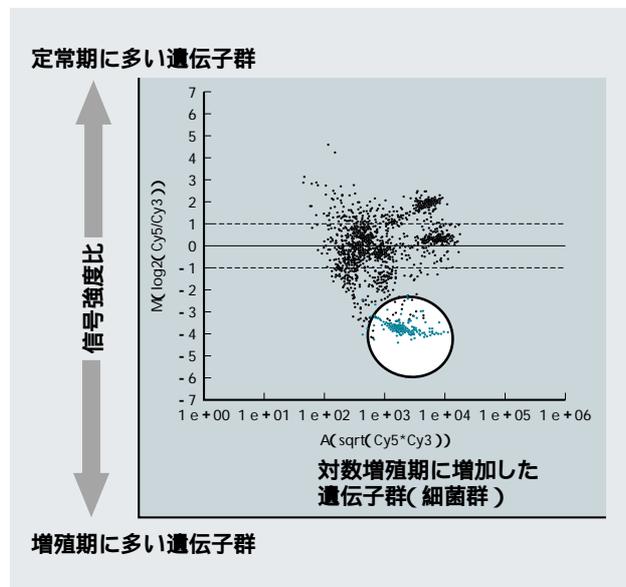


図6 増殖期と定常期の細菌叢比較

窒素除去速度が速い増殖期では、円内の遺伝子群が目立って、窒素除去速度に関連する遺伝子マーカーとして利用できると示唆される。

移(分布の経時的変化)を信号パターン分布として可視化できることが明らかとなった。

日立グループが開発したフローラ分析用アレイは、従来の培養法やPCR法の課題を改善した新しい細菌叢分析方法である。このアレイの利用方法としては、食品産業における健康食品開発、診断ツールとしての腸内細菌評価への適用が考えられる。今後は、実用化に向けて評価方法の確立を行い、食の安全、健康への貢献などを考慮し、健康食品開発や医療における診断ツール開発、環境浄化技術開発などの幅広い顧客への技術提供に向けて注力していく。

なお、嫌気性アンモニア菌叢を用いた解析試験は、株式会社日立プラントテクノロジーの角野立夫氏、井坂和一氏、生田創氏をはじめ、多くの方々にご協力をいただいた。関係各位に厚く御礼申し上げる次第である。

参考文献

- 1) 多様な微生物の遺伝子発現解析を可能とするショットガン ゲノム アレイ, 日立評論, 87, 1, 88(2005.1)
- 2) 伊藤, 外: プロバイオティクスとバイオジェニクス, NTS(2005.5)

執筆者紹介



加来 佳子

1999年日立製作所入社, ライフサイエンス推進事業部
バイオテクノロジーセンタ 所属
現在, 遺伝子解析サービスおよびその技術開発に従事
日本農芸化学会会員



横井 崇秀

2000年日立製作所入社, ライフサイエンス推進事業部
バイオテクノロジーセンタ 所属
現在, 遺伝子解析サービスおよびその技術開発に従事
理学博士
日本生物工学会会員