

リン循環に関わる生物の機能に迫る分子生物学的手法

Molecular approaches to investigate the biological function on P cycling

和崎 淳^{1,2*}・丸山 隼人¹

Jun WASAKI^{1,2*} and Hayato MARUYAMA¹

¹ 広島大学大学院 生物圏科学研究科

² 広島大学 総合科学部

¹ Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

² Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

摘 要

リン循環には生物によるさまざまなプロセスが関与する。このプロセスに関わる環境微生物の多くは培養困難であり、その理解を妨げている。微生物のリン循環における役割を明らかにするためには、未培養のままでも解析を可能とする分子生物学的手法が有用である。これまでに、リボソーム RNA や機能遺伝子などの塩基配列の違いを利用した各種の分子生物学的手法が発達しており、環境微生物を群集レベルあるいは細胞レベルで解析するうえで力を発揮している。また、近年は次世代シーケンサーなどを活用した網羅的解析手法が強力なツールとして使われている。本稿では、環境中のリン循環を理解するうえで有用なこれらの分子生物学的手法について概説するとともに、主に土壌環境を例にとってこれまでの実例を紹介する。

キーワード：オミックス, 土壌環境, PCR, 分子生物学, リボソーム RNA (rRNA)

Key words: Omics, soil environments, PCR, molecular biology, Ribosomal RNA (rRNA)

1. はじめに

環境中のリン (P) 循環に関わる生物は極めて多様かつ複雑である。また、共生や競合といった生物間の相互作用も関わる。こうしたリン循環に関わる生物とその機能についてアプローチするためには、培養が困難な微生物についての理解が不可欠である。例えば、土壌微生物の 99% 以上は未培養であり¹⁾、その理解を図ることは大変重要である。培養できない微生物を対象にした研究は分子生物学的手法の発達とともに進展している²⁾。本稿では、複雑な生物間相互作用及び難培養性微生物を基盤としたリン循環を理解するために用いられる分子生物学的手法について、主に土壌環境を例にとってこれまでの解析の実例を紹介しつつ概説する。なお、本稿で概説する分子生物学的手法と得られる情報との関係について、図 1 にまとめた。

2. 共通遺伝子の塩基配列に基づいた解析

原核、真核に関わらず微生物を培養せずに解析する場合、塩基配列データベースに蓄積された情報量が多いことから、SSU (small subunit) rRNA 及び

ITS (internal transcribed spacer) 領域の塩基配列を対象とすることが多い。その配列は、容易に PCR (polymerase chain reaction) を行うことによって増幅することができる。増幅された PCR 産物は、クローニングすることによりその配列を同定することができる。これによってどのような生物が関与しているかを推定することができるが、塩基配列の同定を行わない場合でも増幅断片長、制限酵素断片パターンに基づいて試料に含まれる群集構造を比較できる。以下に、DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)、RFLP (制限酵素断片長多型) による方法について概説する。

2.1 PCR-DGGE

(denaturant gradient gel electrophoresis)

DGGE は試料間の微生物群集構造を比較するうえで簡便なことから、多用されている³⁾。その原理は、環境 DNA を試料として PCR を行って増幅された DNA 断片を変性剤濃度勾配ゲル中で電気泳動することにより、微生物の種類ごとに異なる塩基配列の違い (結合力の強い GC (グアニンとチロシン) と弱い AT (アデニンとチミン) の割合が違うことで変性しやすさに違いが生じる) によって異なるバンドとして分離するものである。この手法の長所は、配列を決定し

受付: 2014 年 12 月 30 日, 受理: 2015 年 3 月 27 日

* 〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1, e-mail: junw@hiroshima-u.ac.jp

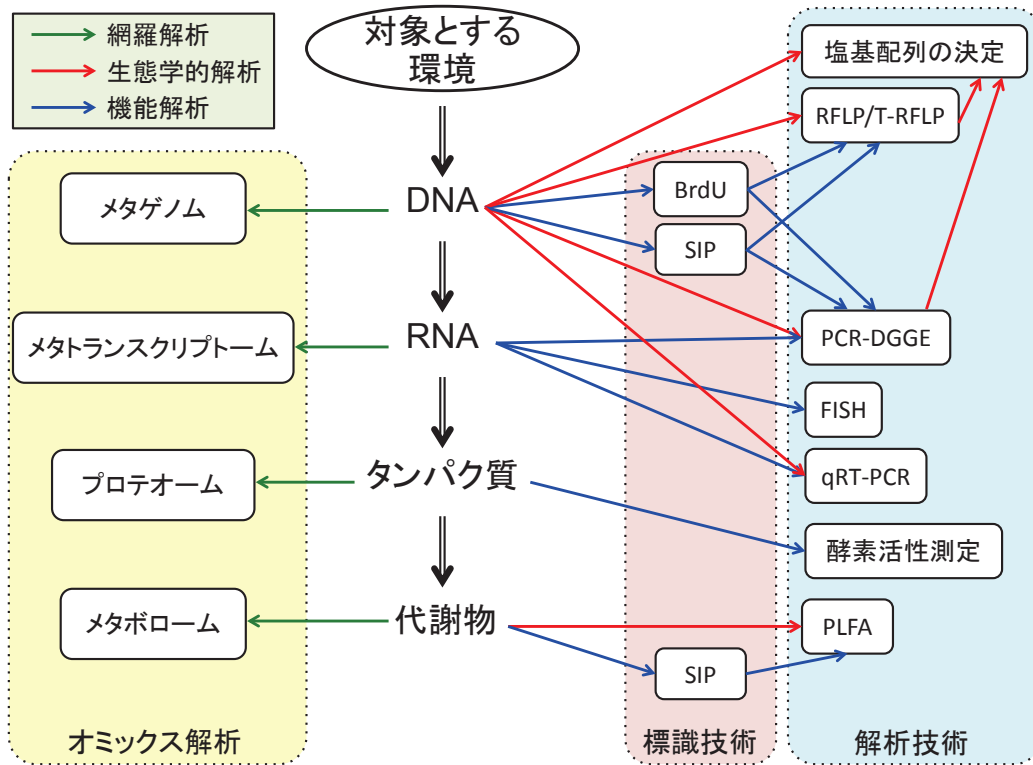


図1 本稿で概説する分子生物学的手法と得られる情報の関係。

なくても試料間の比較が比較的容易かつ安価に実施できることにある。原理的には1塩基の違いをも判別するので、種～株レベル程度の小さな違いまでを可視化することができる。得られた結果は、バンドの数による多様性の評価に加え、得られたバンドパターンについての主成分分析やクラスター解析といった統計学的手法により試料間の類似性が評価される。

本法の利用例として、Marschnerら⁴⁾は複数種の植物の根圏土壌における微生物群集構造に及ぼすリン施用の影響をSSU rRNA配列に基づくPCR-DGGEで調査している。また、リン欠乏のシロバナルーピン(*Lupinus albus*)の根圏における微生物群集構造と多様性に及ぼす根分泌物の影響を本法で調査し、その影響が大きいことを示した例もある^{5), 6)}。

2.2 RFLP

(restriction fragment length polymorphism)

RFLPは、DNAの制限断片長の違いを検出することで微生物群集構造の違いを示す手法である。多くの場合、PCRを行って増幅されたDNA断片に対して適用される。SSU rRNAを対象としたRFLPは生物肥料としての可能性のある分離培養株を比較する場合に使用された例がある⁷⁾。RFLPでは塩基配列の小さな違いは示されないが、属レベル以上の塩基配列に存在する違いを見るうえでは都合が良い。

RFLPの検出感度を向上するため、蛍光色素で修飾したプライマーを用いるT-RFLP(terminal RFLP)がある。Georgeら⁸⁾はT-RFLPを用いて根分泌性酵素(フィターゼ)が根圏における微生物群集構造に及

ぼす影響を調査し、その影響はあまり大きくないことを示している。

3. 活発な微生物あるいは機能遺伝子をターゲットにした手法

3.1 機能遺伝子を対象にしたDNAベースの手法の応用

機能遺伝子を対象にDGGEを行うことも可能である。筆者らは、土壌中の有機態リンの循環に関わる微生物群集を調査する手法として、細菌のアルカリ性ホスファターゼ(ALP; alkaline phosphatase)遺伝子を対象としたプライマーを設計し、DGGEを行った⁹⁾。ALP遺伝子をもつ細菌群集に及ぼす有機物及び化学肥料の施用の影響を圃場レベルで調査したところ、DGGEにより得られたバンドパターンは採取時期や肥料の施用などに関わらず多様であり、一部については配列を決定して*Mesorhizobium loti*及び*Pseudomonas fluorescens*に近縁であることを示した。しかしながら、機能遺伝子は概して相同性が低いことが多く、プライマーデザインを行ったときに含まなかった細菌の近縁種を見落とすこともありえる。上記の例では、機能遺伝子をもつ生物種を広くカバーするために2組のプライマーを設計してnested PCRを行っている。

3.2 定量的リアルタイムPCR(quantitative real time PCR; qRT-PCR): SSU rRNA及び機能遺伝子の転写産物の定量

発現量の定量は迅速かつ再現性の良い方法が確立

された PCR ベースによる方法が主流である。特に、リンの動態が劇的に変化する環境(例えば根圏土壌のような試料)を対象とする場合、qRT-PCRを行うことで、少ない核酸量に対して比較的正確なターゲット遺伝子の存在量が測定できるメリットは大きい。

qRT-PCRでは、総核酸量あたりの発現量やリファレンス遺伝子あたりの変動などを数値として定量することができる。環境 DNA を試料とする場合、ターゲット遺伝子を保有する微生物の量を定量できる。RNA を試料とする場合には、ターゲット遺伝子の発現量を定量することができる。特に機能遺伝子を対象とした場合に有用であり、特異的に重要な役割を果たす微生物の検出などに役立つ。植物にリンを供給することで土壌環境のリン循環に重要な役割を果たすアーバスキュラー菌根菌(AMF; arbuscular mycorrhizal fungi)の生態を評価するため、*Glomus mosseae* 及び *G. intraradices* の ITS 1 と rRNAs を対象にプライマーを設計し、qRT-PCRを行った例があり¹⁰⁾、本法は AMF の生態を調査する上で有用なツールであると結論づけられている。

3.3 FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

FISH は、蛍光標識プローブを使って微生物の存在位置を示す方法である。原理としては、SSU rRNA や機能遺伝子に特異的な短鎖プライマーを合成し、これに土壌や植物自身の自家蛍光による干渉を受けにくい蛍光色素を結合させておいて微生物の細胞内でハイブリダイゼーションを行なう。試料は蛍光顕微鏡を用いて観察する。この手法では、解析対象とする遺伝子あるいは微生物の環境内局在性を示すことができる点が非常に重要である。

SSU rRNA をターゲット遺伝子とする場合はコピー数が多いことから比較的容易に検出できるため、直接のハイブリダイゼーションで十分なデータが得られるが、機能遺伝子を対象とする場合にはシグナルを増幅する必要がある。本法を使用した例として、下水処理過程で生物的リン除去を行うポリリン酸集積細菌の検出に用いた報告がある¹¹⁾。

3.4 SIP (stable isotope probing)

SIP とは、解析対象とする環境中で活発な微生物を評価するために、その環境下で特異的に生育する微生物に安定同位体を含む基質を取り込ませ、解析対象とする分子の重さの違いでふるい分ける手法である。解析対象となる分子には核酸や脂肪酸がある。¹³C(炭素)、¹⁵N(窒素)がしばしば SIP に使われ、核酸の場合には DGGE 解析に応用されたり、脂肪酸の場合は PLFA 解析 (phospholipid fatty acid analysis) に応用されたりする。残念ながら、リンには利用可能な安定同位体が存在しないため、SIP をリン循環研究に活用することは困難なように思える。しかしながら、環境次第ではリンの動態と関係する安定同位体の活用は可能であり、Prosser ら¹²⁾は根分泌物に由来する炭素を集積した微生物を対象に、根圏で

リン循環に関わる微生物群集を解析している。

3.5 核酸アナログを取り込ませる方法

チミジン (dT) のアナログである BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine, ブロモデオキシウリジン) を用い、その環境で活性の高い微生物に標識し、これを調査する手法もある。BrdU 特異的抗体を用いることで、これを取り込んだ微生物を感度よく可視化することができることが利点である。Artursson ら¹³⁾は BrdU 特異的抗体による免疫検出と T-RFLP を組み合わせた方法によって、AMF である *Glomus mosseae* を接種したときに活発化する細菌群集の変化が AMF の接種、抗菌性化合物処理、植物の種と関係があり、*G. mosseae* 接種により優占する細菌はほとんどが未培養細菌と *Paenibacillus* 属細菌であることを明らかにしている。

3.6 RNA をターゲットとした手法

環境サンプルに DNA を用いた研究手法を適用することは比較的容易であるが、生物学的に活発なものもそうでないものも同時に解析することになってしまう。リン循環の主役を理解するためには、RNA を用いた分子的手法が求められる。しかしながら、RNA 分子は安定でなく、環境中からの RNA 抽出そのものが困難な場合が多いため、現在までにリン循環に関わる微生物の解析における RNA ベースでの研究例はあまり多くはない。

Weisskopf ら⁶⁾はリンが少ない条件下でクラスター根を形成するシロバナルーピンの根圏に現存する微生物を DNA で、活発な微生物を RNA でその微生物群集構造を PCR-DGGE によって調査した。その結果、現存する微生物と活発な微生物は、根の中では類似しているが、根圏と非根圏土壌において違いが認められることを示している。こうした違いが示されることから、RNA ベースで解析を行うことの重要性は高い。

4. オミックス (omics) 解析の適用

近年、生命現象を包括的に理解する目的で omics 解析(例えば、遺伝子 -gene- 対象なら genomics, 転写産物 -transcript- 対象なら transcriptomics)が盛んになされるようになってきた。当初は同一種の生物を対象にした研究が中心であり、環境全体を理解することは困難であったが、次世代シーケンサーの開発と普及に伴い、環境サンプルに対しての適用も可能となってきた。

メタゲノム (metagenome) とは、ある環境を生物圏と捉え、ここに存在する生物全ての塩基配列を対象とした考え方である。メタゲノム解析は、微生物群集構造の理解やそこで起きている機能の理解、未培養微生物由来の有用遺伝子の抽出などに適用されている。リン循環に関係する環境サンプルを対象にしたメタゲノム解析も行われている。Unno と Shinano¹⁴⁾

表1 本稿で概説した分子生物学的手法の長所と短所.

	長所	短所
(i) オミックス解析		
メタゲノム	未培養微生物を含めて膨大な塩基配列データが得られる	データ解析技術(インフォマティクス)が必要
メタトランスクリプトーム	未培養微生物を含めて活発な微生物の膨大な塩基配列データが得られる	データ解析技術(インフォマティクス)が必要
プロテオーム	環境中に比較的少量に存在するタンパク質を同定できる	未同定の生物の場合、タンパク質の同定も困難
メタボローム	環境中に存在する化合物の特徴を捉えることができる	物質と生物群とのデータを結びつけることが困難
(ii) 標識技術		
SIP	RNAを対象としなくても活発な微生物に由来する物質を濃縮できる	リンの安定同位体が存在しない
BrdU	特異的抗体を活用して感度よく検出することができる	利用例があまり多くない
(iii) 解析技術		
塩基配列の決定	古典的方法で手法的なハードルが低い	同時に得られるデータの量があまり多くない
RLFP/T-RFLP	比較的容易に行うことができ、比較的上位階層の違いを見分けることができる(科~属レベル)	塩基配列データの解析が別途必要だが、制限酵素で切断されるため短い配列の情報にとどまる
PCR-DGGE	専用の装置さえあれば安価に比較解析を行うことができ、小さな違いを見分けることができる(種~株レベル)	塩基配列データの解析が別途必要、機能遺伝子対象の場合実験条件の最適化が必要
FISH	目的遺伝子を保有する微生物の分布を可視化できたり、計数できたりする	機能遺伝子の検出には感度の向上が必要
qRT-PCR	遺伝子や特定の微生物の存在量を定量することができる	対照とするDNAがデータの信頼性の鍵となる
酵素活性測定	古典的方法で手法的なハードルが低く、機能が明示できる	機能と生物群のデータを結びつけるには他の解析技術が必要
PLFA	高い階層で生物群の組成を示すことができる(門レベル以上)	低い階層(科, 属, 種など)での生物群の比較はできない

は土壌中の有機態リンの主要な形態であるフィチン酸(phytate)の分解に関わる微生物群集の解析を行っている。下水中のリンの除去に関わるポリリン酸(polyphosphate)集積に関わる微生物の動態評価に用いた例もある¹⁵⁾。

次世代シーケンサーを活用すれば、環境RNAを対象にメタトランスクリプトーム(環境中に生息する生物における転写産物の包括的解析, metatranscriptome)も可能である。リン循環に関わる解析として、リンに乏しい湖水中のプランクトンの動態を把握するためにメタトランスクリプトーム解析を活用した例がある¹⁶⁾。

タンパク質を網羅解析するプロテオーム(proteome)はTOF-MS(Time of Flight Mass Spectrometry, 飛行時間型質量分析装置), 代謝産物を網羅解析するメタボローム(metabolome)はGC-MS/MS(Gas Chromatograph Mass Spectrometry, ガスクロマトグラフ-タンデム質量分析装置), LC-MS/MS(Liquid Chromatograph Mass Spectrometry, 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置)などの質量分析装置の開発に伴って発達した。これらの手法もリン循環の理解には貢献すると考えられる。特に、上記に

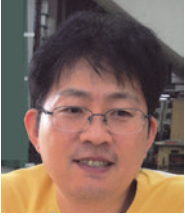
挙げた多様な物質の同定や変動の検出に威力を発揮するメタボロームは物質レベルでの現象を捉えることができるため、リン循環と関わる微生物群集構造の変化と対比することで重要な知見を得ることができる可能性を秘める。

5. 終わりに

リン循環には極めて多様な生物が関わっていることから、このプロセスを理解するうえで分子生物学的手法は大きな役割を果たす。表1に、本稿で解説した手法の長所と短所についてまとめた。これらの手法をうまく活用することで、知るべきリン循環に関わる現象の解明に近づけよう。特に、最後に触れたオミックス解析は強力なツールであり、得られる膨大なデータがいろいろな未知の事実を明らかにしてくれるだろう。その一方で、これまでの手法にも有用なものは多くある²⁾。それぞれの特徴を理解し、必要に応じて組み合わせることで、知るべきリン循環に関わる現象にアプローチしていくことが重要だろう。

引用文献

- 1) Torsvik, V. and L. Øvreås (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240-245.
- 2) Wasaki, J. and H. Maruyama (2011) Molecular approaches to study biological phosphorus cycling. In: E. K. Bünemann, A. Oberson and E. Frossard, eds., *Phosphorus in Action – Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*. 93-111. Springer-Verlag, Berlin.
- 3) Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla and E. M. H. Wellington (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3233-3241.
- 4) Marschner, P., D. Crowley and C. H. Yang (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261, 199-208.
- 5) Wasaki, J., A. Rothe, A. Kania, G. Neumann, V. Römhild, T. Shinano, M. Osaki and E. Kandeler (2005) Root exudation, phosphorus acquisition and microbial diversity in the rhizosphere of white lupine as affected by phosphorus supply and atmospheric carbon dioxide concentration. *Journal of Environmental Quality*, 34, 2157-2166.
- 6) Weisskopf, L., N. Fromin, N. Tomasi, M. Arango and E. Martinoia (2005) Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance, function and community structure. *Plant and Soil*, 268, 181-194.
- 7) Monteiro, J. M., R. E. Vollú, M. R. R. Coelho, C. S. Alciano, A. F. Blank and L. Seldin (2009) Comparison of the bacterial community and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from different genotypes of *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Vetiver) rhizospheres. *Journal of Microbiology*, 47, 363-370.
- 8) George, T. S., A. E. Richardson, S. S. Li, P. J. Gregory and T. J. Daniell (2009) Extracellular release of a heterologous phytase from roots of transgenic plants: does manipulation of rhizosphere biochemistry impact microbial community structure? *FEMS Microbiology Ecology*, 70, 433-445.
- 9) Sakurai, M., J. Wasaki, Y. Tomizawa, T. Shinano and M. Osaki (2008) Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54, 62-71.
- 10) Alkan, N., V. Gadkar, O. Yarden and Y. Kapulnik (2006) Analysis of quantitative interactions between two species of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4192-4199.
- 11) Kong, Y. H., J. L. Nielsen and P. H. Nielsen (2005) Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4076-4085.
- 12) Prosser, J. I., J. I. Rangel-Castro and K. Killham (2006) Studying plant-microbe interactions using stable isotope technologies. *Current Opinion of Biotechnology*, 17, 98-102.
- 13) Artursson, V., R. D. Finlay and J. K. Jansson (2005) Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal-restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environmental Microbiology*, 7, 1952-1966.
- 14) Unno, Y. and T. Shinano (2013) Metagenomic analysis of the rhizosphere soil microbiome with respect to phytic acid utilization. *Microbes and Environments*, 28, 120-127.
- 15) Tu, Y. J. and A. J. Schuler (2013) Low acetate concentrations favor polyphosphate-accumulating organisms over glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Environmental Science & Technology*, 47, 3816-3824.
- 16) Vila-Costa, M., S. Sharma, M. A. Moran and E. O. Casamayor (2013) Diel gene expression profiles of a phosphorus limited mountain lake using metatranscriptomics. *Environmental Microbiology*, 15, 1190-1203.



和崎 淳/Jun WASAKI

1972年千葉県生まれ。静岡大学農学部卒、北海道大学農学研究科博士前期課程・博士後期課程修了。博士(農学)。北海道大学創成科学共同研究機構特任准教授などを経て、2007年より広島大学大学院生物圏科学研究科准教授。専門は植物栄養学・土壌微生物学。リン資源の枯渇問題に対して農学的な解決を図ることを目標として、リン動態に関わる植物、微生物についての研究に取り組んでいる。特に根圏(根の影響が及ぶ周辺領域)におけるリン動態と生物間相互作用について分子生物学的解析を行っている。



丸山 隼人/Hayato MARUYAMA

1984年長崎県生まれ。北海道大学農学院修士課程修了後、広島大学生物圏科学研究科博士課程修了。博士(農学)。学部時代から博士課程まで一貫して植物のもつ低リン耐性のメカニズムについて植物栄養学、分子生物学的な観点から研究を続ける。現在は広島大学生物圏科学研究科博士研究員として、リン資源の有効利用による持続可能な農業を目指した研究に取り組んでいる。