

■ はじめに

人類はこれまでに微生物から多くの有用物質を取得して食品や医薬品に応用するなど、微生物を利用して絶えず生活の質を改善してきた。将来にわたって新たな産業創出につながるイノベーションを起こすには、新たな遺伝資源を探索する努力が欠かせない。一方、これまでの探索対象は、全体の1%程度と試算される培養可能な微生物に限られてきたため、残り99%の培養できない微生物に注目が集まっている。

近年、次世代シーケンサーの開発によって、環境サンプルから直接回収したDNAを解析するメタゲノム解析が可能となった。しかし、得られる配列データには様々な微生物に由来する短いゲノム断片が多く含まれるため、有用な遺伝資源の単離は思ったほど進んでいない。そこで、この問題を解決する方法の1つとして、微生物1細胞に由来するゲノムDNAを増やしてから様々な解析を行う、1細胞ゲノミクスという考え方が提唱されている。

■ 活動内容

1. phi29 DNA合成酵素の高純度精製法の確立

1細胞ゲノミクスの基幹技術である全ゲノム増幅法に用いられるphi29 DNA合成酵素は、長鎖DNAを合成できる(>70 kb)、DNA合成速度が速い、強い鎖置換活性を持つなどの特徴がある。そのため、ランダムプライマーを共存させて等温反応させると、わずかな量の試料DNAであっても大量に増幅できるが、試料DNAを含まない陰性対照区でも何らかのDNAが増幅されるといった問題があった(図1左)。

phi29 DNA合成酵素は遺伝子組換え大腸菌で生産されるため、精製後の酵素標品に大腸菌のゲノムDNAが残存し、非特異的増幅の一因となる可能性があった。そこで、精製工程においてゲノムDNAを除去、不活化するための方法を検討した結果、全ゲノム増幅反応において非特異的増幅を大幅に低減できる、高純度の酵素標品を生産することに成功した(図1右)。

2. 微量DNA増幅のための卓上型クリーンルームの開発

高純度のphi29 DNA合成酵素を用いても、全ゲノム増幅反応において非特異的増幅が散見されたが、これは、空气中に浮遊する微生物や細胞に由来する外来DNAが反応溶液に混入することが一因であることを示唆していた。そこで、実験環境が全ゲノム増幅反応に及ぼす影響を

検討した結果、外来DNAの混入を防ぐためには、反応溶液をISO-1の清浄環境(0.1 μm以上の粒子数が10個/m³以下)で調製することに加えて、作業空間を除電することが効果的であることを明らかにした。そこで、新コンセプトのクリーンシステムをベースとして、外来DNAの混入をほぼ完全に防止してDNA増幅に利用できる卓上型クリーンルームを開発した(図2)。

以上、全ゲノム増幅法に影響する内因性及び外因性のDNA混入を防ぐための要素技術の開発に成功し、今後、培養できない微生物からの有用遺伝子探索等の効率化に貢献できると考えられる。

■ 関連情報等(特許関係、施設)

1. 原著論文

Takahashi H et al, *PLoS One*, **9**, e82624, 2014.

Takahashi H et al, *Biotechniques*, **61**, 42-46, 2016.

2. プレス発表

「微生物1個のDNAでも解析可能に」

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nfri/050357.html

「外来DNAの混入を防ぎ、信頼性の高いDNA解析を可能にする卓上型クリーンルームを開発」

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160713-2/>

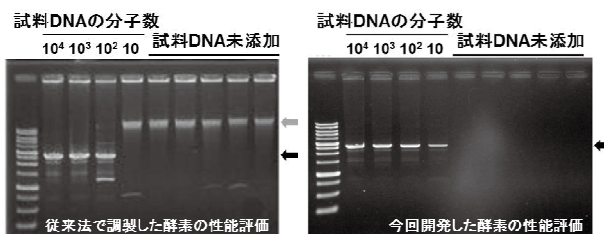


図1 従来のDNA合成酵素では試料DNA(黒矢印)と無関係のDNA(灰矢印)も増幅されるが、新製法によるDNA合成酵素は試料DNA(黒矢印)のみを増幅する。

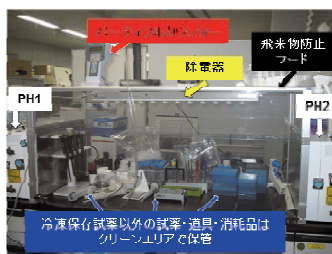


図2 2つのプッシュフード(PH1, 2)に挟まれ、飛来物防止フードに囲まれた空間はISO-1の清浄度となる。使用時は除電しつつ、微粒子数を計測しながら、反応溶液を調製する。実験器具などは、汚染を避けるためにクリーンエリア内で保管する。

代表発表者 小堀 俊郎 (こぼり としろう)

所属 農研機構

食品研究部門

食品生物機能開発研究領域

問合せ先 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

TEL: 029-838-8059 FAX: 029-838-7996

tkobo@affrc.go.jp

■キーワード: (1)全ゲノム増幅法
(2)高純度 phi29 DNA 合成酵素
(3)卓上型クリーンルーム

■共同研究者: 高橋 宏和(広島大学)
岡村 好子(広島大学)
山崎 裕之(関東化学株式会社)
小林 崇良(関東化学株式会社)
佐藤 卓広(興研株式会社)
鈴木 剛人(興研株式会社)