

# 論文の内容の要旨

論文題目     **Development of a Novel Method for RNA Extraction  
from Soil and Its Application to the Study of Soil  
Microbiology**

(土壌から RNA を抽出する方法の開発および土壌微生物の研究への応用)

氏 名     王 勇

土壌中の細菌遺伝子発現の検出は、1990 年代初頭に登場し、土壌中に生きている細菌の応答に関する情報を提供してきた。検出において重要な手順として、土壌から細菌 RNA を抽出する方法が多くに関心を集めている。更に、過去 20 年間、様々な土壌 RNA の抽出方法が報告されてきた。RT-PCR に基づく様々な技術に加えて、マイクロアレイや次世代シーケンシング技術など遺伝子発現解析の新しい技術は、土壌中の細菌の遺伝子発現を検出するために使用されている。しかし、今まで、多様な土壌から RNA を抽出する方法は開発されていない。

## 1) *Rhodococcus* sp. RHA1 株を接種した滅菌土壌中の遺伝子発現の検出

このような状況下で、我々は多様な土壌から細菌 RNA を抽出するための方法の開発を試みた。最初に、我々はいくつかの市販のキットを組み合わせて、新しい方法を開発した。この方法を用いて、我々は  $\gamma$ -ヘキサクロロシクロヘキサンで汚染された

土壌から分離されたビフェニル分解菌 *Rhodococcus* sp. RHA1 株を接種した滅菌土壌から細菌 RNA を抽出した。抽出された RNA はアガロースゲル電気泳動によって、分析に十分な純度に精製されたことが示された。この新しい方法は、多量の RNA の調製に簡単に利用することができる。また TaqMan 法を用いたリアルタイム RT-PCR 実験により、ビフェニルの分解に関与している *bphAa* 遺伝子の発現が、ビフェニルを添加した土壌に誘導されたことが示唆された。

## 2) 土壌 RNA 試料中のフミン酸を測定する方法の評価

一方、少量の腐植物質でも、遺伝子発現の検出に影響を与える可能性があることが知られている。しかし、これまで土壌 RNA サンプル中に残っている腐植物質を評価する方法はなかった。そこで腐植物質を測定する方法を選択するために、様々なフミン酸の測定方法の感度と DNA、RNA およびタンパク質の影響を調べた。その結果、紫外/可視分光法と蛍光分光法は、RNA サンプル中の腐植物質の量を測定するために信頼性が高いことを示した。以上から、この方法を分子生物学実験に使用するサンプル中のフミン酸測定に使用することを提案した。

## 3) 土壌 RNA 試料から腐植物質を除去するための条件の最適化

次に、土壌から抽出した RNA サンプル中の腐植物質を除去するために、土壌中の微生物細胞破碎条件と精製カラムを最適化した。この改良した方法によってフミン酸とフルボ酸を効率的に除去できることを蛍光分光法で確認した。リアルタイム RT-PCR 法による検出感度は、以前の抽出方法を使用した場合と比較して 10 倍に増加した。この方法を用いて、3-クロロ安息香酸 (3CB) の存在下または非存在下で、3CB 分解プラスミドで形質転換された *Pseudomonas putida* KT2440 株を接種した滅菌畑土壌から RNA を抽出した。抽出した RNA を用いてリアルタイム RT-PCR を

行い、3CB を添加した土壌中の 3CB 分解遺伝子の発現が確認された。したがって、この改良された RNA 調製方法は、土壌中の遺伝子発現を検出するための高純度の RNA の調製に適している。

#### 4) 滅菌土壌における *Pseudomonas putida* KT2440 の遺伝子発現マイクロアレイ解析

さらに、この改良された方法で土壌から調製した RNA が、マイクロアレイ解析に利用することが可能かどうかを検討した。そこで、3CB の存在下または非存在下で *Pseudomonas putida* KT2440/pSL1 を接種した滅菌土壌から抽出した RNA を用いて、マイクロアレイ技術による遺伝子発現のゲノムワイドスキャンを行った。増幅されていない RNA を用いたシングルマイクロアレイ解析と増幅した RNA を用いた三重マイクロアレイ解析の両方で、発現に有意な変化を示す遺伝子を調べた。パスウェイ解析は、安息香酸分解経路が 3CB で処理した後の最も大きく変化したことを示した。3CB によって発現した遺伝子の解析結果から、土壌中における細菌の 3-CB に対する細胞応答に関する新たな知見を得ることができた。具体的には、K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター複合体、ストレスタンパク質、二つのシトクロム P450 タンパク質および排出系トランスポーターをコードする遺伝子がアップレギュレートされていた。いくつかの炭素代謝に関与する遺伝子とプロフェージ遺伝子の発現が 3CB 存在下にダウンレギュレートされていた。以上の結果から、我々が開発した土壌 RNA 抽出の方法は、土壌中の細菌の遺伝子発現のマイクロアレイ解析に適用できることが実証できた。

#### 5) 多様な土壌から RNA を抽出する方法の開発及び黒ボク土における *amoA* 遺伝子発現研究への応用

黒ボク土（火山灰土壌）は日本の農耕地における主要な土壌であり、RNA を強く

吸着する特性を持っており、これまで RNA を抽出する好適な方法はなかった。そこで黒ボク土から RNA を抽出する方法を検討した。滅菌済みカゼインを含有する抽出バッファーを用いることにより、高品質の RNA が 8 種類の農耕地土壌から抽出できることを示した。この開発した方法で細菌のアンモニア酸化酵素遺伝子 (*amoA*) 転写産物を検出するために、硫酸アンモニウムで処理した 2 つの黒ボク土から細菌の土壌 DNA と土壌 mRNA を抽出した。PCR-DGGE 分析によって、多様な *amoA* 遺伝子が土壌中に存在することを示された。しかし、*amoA* 遺伝子の mRNA の RT-PCR-DGGE 分析によって、*Nitrosospira multiformis* の *amoA* 遺伝子と高い相同性を持つ少数の *amoA* 遺伝子だけが発現していることを明らかにした。以上から、カゼイン利用した RNA 抽出法は黒ボク土壌だけでなく多様な土壌から細菌 RNA を抽出するの有効な方法であることを実証した。