

# 植物根面・内生細菌の群集構造解析における Locked Nucleic Acid を用いた PCR クランプ技術の開発

池永 誠, 境 雅夫

鹿児島大学 農学部生物資源化学科 土壤科学研究室

〒890-0065 鹿児島県郡元 1-21-24 ☎099-285-8660

SSU rRNA 遺伝子を標的とした植物根面・内生細菌の群集構造解析においては、植物オルガネラ（ミトコンドリア・プラスチド）の DNA も抽出時に混入し、PCR 時に細菌プライマーで増幅する重大な問題が存在する。本研究ではプライマーのアニーリング部位と競合する位置に、ミトコンドリア及びプラスチドの SSU rRNA 遺伝子に特異的な LNA オリゴヌクレオチド（LNA）を設計し、細菌の SSU rRNA 遺伝子のみを選択的に増幅する技術の開発を試みた。水稻根の抽出 DNA を用いて、まず LNA の  $T_m$  値（アニーリング温度）を検討したところ、 $T_m$  値は 70°C が適当であると判断された。そこで、熱変性（94°C）とプライマーのアニーリング（54°C）の間に、70°C の LNA のアニーリングを加え、LNA の濃度を変えて PCR を行った。その結果、ミトコンドリアでは 3.0 μM 以上、プラスチドでは 0.5 μM 以上で PCR 増幅を抑制し、細菌の SSU rRNA 遺伝子を選択的に増幅することが可能となった。また、この産物を用いて DGGE 解析を行ったところ、LNA の添加によって、従来の手法では検出されなかった細菌の遺伝子も検出することが可能となった。以上より、LNA-PCR クランプ技術は、植物根面・内生細菌の群集構造解析において従来の問題を可決し得る有効な手法であると判断された。

## 1 緒言

植物根面や根内部に生息する細菌が、植物の生育に対して重要な働きをしていることは古くから知られている。近年の培養法に依存しない分子生物学的手法の発達により、環境中には門レベルで未分離の細菌が多数存在することが明らかにされ、難培養性細菌の機能を応用した展開が期待されている。しかし、Small Sub-Unit Ribosomal RNA (SSU rRNA) 遺伝子\*を標的とした分子生物学的手法による植物根面・根内部に生息する細菌の群集構造解析では、植物オルガネラ（ミトコンドリア及びプラスチド\*\*) の DNA も抽出時に混入し、PCR 反応時に細菌用プライマーで過剰に増幅される重大な問題が存在する<sup>1)</sup>。従って、植物根面・根内部に生息する細菌の SSU rRNA 遺伝子を選択的に増幅することができれば、従来の培養法で分離されなかった細菌も検出できるようになると推測され、その結果、植物生育に及ぼす細菌の機能に関する知見が飛躍的に進められ、食糧問題を解決する画期的な切り口となる。本研究では Locked Nucleic Acid (LNA) と呼ばれる人工核酸を含んだオリゴヌクレオチドを細菌用プライマーと競合する位置に設計し、ミトコンドリア及びプラスチドに特異的にアニーリングさせることで、細菌用プライマーがそれらの SSU rRNA 遺伝子に PCR 反応時にアニーリングするのを阻害し、細菌の SSU rRNA 遺伝子のみを選択的に増幅させる LNA-PCR クランプ技術の開発を試みた。

\*SSU rRNA 遺伝子：細菌タイプを決定する為のバーコード領域。リボソームを構成する SSU rRNA をコードする遺伝子で長さは約 1500bp。2013 年 3 月現在 230 万以上の細菌の配列が登録されている。分子進化時計と見なされ、長い生物進化の中で少しずつ変化しているため、配列の違いが大きければ大きいほど、生物は系統的に離れている。また、可変領域と保存領域が存在するため、保存領域の配列を用いてプライマーの設計が可能である。

\*\*ミトコンドリア・プラスチド：細胞小器官の一つであるが、ミトコンドリアは原始の好気性細菌、プラスチドは原始のシアノバクテリアが細胞内に共生したものであるため、細菌に似た独自の遺伝子を持つ。このため、細菌用プライマーで PCR 増幅される重大な問題が存在する。

## 2 理論

### 2.1 LNA の特性

LNA は Locked Nucleic Acid の略称で、核酸の糖分子内に架橋構造を持つ人工核酸である (Fig. 1)。通常の核酸は化学構造上の自由度が大きいため、DNA/DNA の二重鎖形成において熱力学的に不利になっている。一方、LNA は自由度を架橋で拘束しているため、LNA を含むオリゴは通常のオリゴに比べて、1) アニーリング時の温度 ( $T_m$  値) が上昇する、2) 相補的な塩基にシビアで、LNA 塩基にミスマッチが存在するとアニーリング時の温度 ( $T_m$  値) は大幅に低下する、特徴を示す。

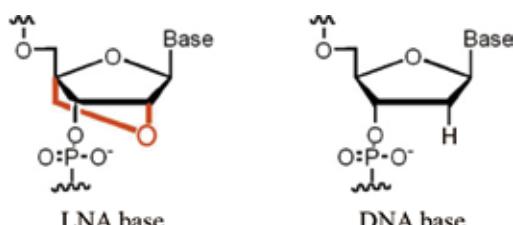


Fig. 1 Numerator structures of LNA base and DNA base

## 2.2 LNA-PCR クランプ技術

Fig. 2 に示すように、植物 SSU rRNA 遺伝子において、細菌用プライマーがアニーリングする位置と競合するように設計した LNA オリゴ（植物遺伝子に特異的で、細菌の遺伝子にはアニーリングしない）を PCR 反応液に加える。この LNA オリゴは、細菌プライマーよりも高温でアニーリングするため、PCRにおいて、①熱変性、②LNA オリゴのアニーリング、③糸状菌プライマーのアニーリング、④伸長、の反応を順に行うことによって、植物遺伝子の増幅を抑制することができる。他方、プライマーは、細菌の SSU rRNA 遺伝子のみにアニーリングするため（植物遺伝子は LNA オリゴによってブロックされている）、細菌の遺伝子の選択的な PCR 増幅が可能となる。

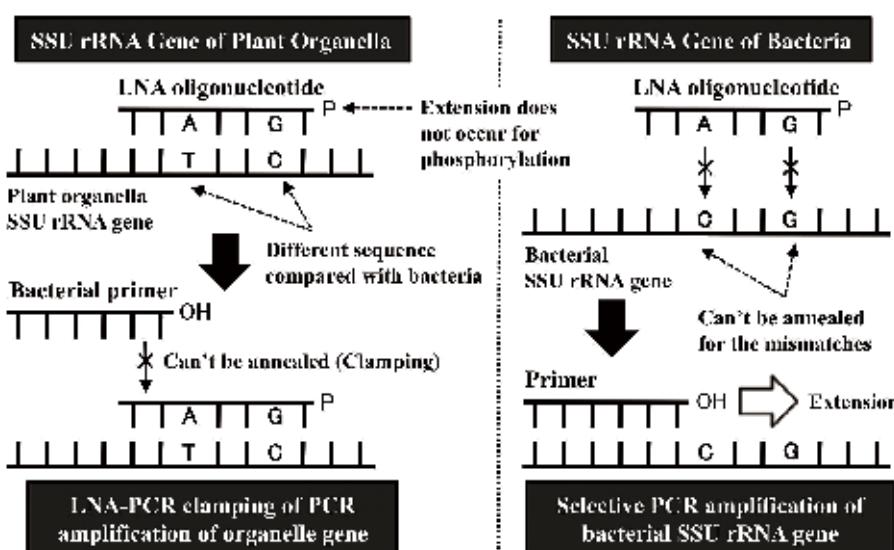


Fig. 2 Principle of LNA-PCR clamping of plant organella SSU rRNA gene and selective PCR amplification of bacterial SSU rRNA gene.

## 3 実験

### 3.1 供試試料の調製およびDNA抽出

本研究では水稻（コシヒカリ）を畑状態で 3 週間栽培し、実験に供試した。水稻体 30 本から根を採取し、根表面を 0.05%-SDS 及び滅菌水で洗浄後、磨り潰して DNA を抽出した。抽出には FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon OH, USA) を用い、付属のプロトコルに従って DNA 抽出を行った。小麦およびトウモロコシも供試を予定していたが、今回は水稻試料のみとした。

### 3.2 LNA オリゴヌクレオチドの $T_m$ 値（アニーリング温度）の検討

LNA-PCR クランプを効率良く行うためには、94°Cで熱変性後、細菌プライマーがアニーリングできない温度で LNA オリゴヌクレオチドを、ミトコンドリア及びプラスチドの SSU rRNA 遺伝子にアニーリングさせ、次の細菌プライマーのアニーリングで、細菌プライマーがそれら SSU rRNA 遺伝子にアニーリングするのを阻害すれば良い。その結果、細菌プライマーは細菌の SSU rRNA 遺伝子のみにアニーリングし、選択的な細菌遺伝子の PCR 増幅が可能となる。

事前 LNA オリゴヌクレオチドの設計できる領域をアライメントによって調べた結果、63f フォワードプライマー (5'-YRKGCYTWAYACATGCAAGTC-3') と 1492r リバースプライマー

(5'-GGYTACCTTGTACGACTT-3') がアニーリングする位置で設計可能であることが判明した。そこでアニーリング温度を 60°C～72°C (2°Cきざみ) の範囲に設定して PCR 増幅を行い、LNA オリゴヌクレオチドの  $T_m$  値 (アニーリング温度) を検討した。

### 3.3 LNA オリゴヌクレオチドの設計

LNA オリゴヌクレオチドは、細菌の群集構造解析に用いられているプライマーの配列をもとに、DNA Data Bank of Japan の DNA データベース (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) に登録されている細菌および植物の SSU rRNA 遺伝子配列を用い、アライメントして設計した。細菌の SSU rRNA 遺伝子は、系統学的な遺伝子の多様性を考慮して DNA データベースから収集した。なお、63f フォワードプライマーと 1492r リバースプライマーをクランピングするため、それぞれのプライマーと競合する位置に、ミトコンドリア及びプラスチドに特異的な LNA オリゴヌクレオチドを設計した。またこの際、前述の LNA オリゴヌクレオチドの  $T_m$  値 (アニーリング温度) の検討結果を考慮しつつ、ミトコンドリア及びプラスチドに特異的な DNA 塩基を LNA 塩基に置換した。LNA オリゴヌクレオチドの 3'末端はリン酸化し、PCR 反応サイクルで LNA オリゴヌクレオチドから伸長反応が生じないようにした。

### 3.4 LNA オリゴヌクレオチドの濃度検討

LNA-PCR クランピングに効果的な LNA オリゴヌクレオチドの濃度を検討した。検討は、PCR 反応液に最終濃度が 0μM、0.5μM、1.0μM、2.0μM、3.0μM、4.0μM になるように LNA オリゴヌクレオチドを加えて行った。PCR 反応液には LNA オリゴヌクレオチドの他、63f フォワードプライマーと 1492r リバースプライマーを加え (それぞれ 0.8μM)、Ex Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa, Otsu, Japan) を用いて PCR 増幅を行った。コントロールには無菌的に栽培した水稻根および大腸菌から抽出した DNA を用い、併せて PCR 増幅を行った。

### 3.5 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 解析

選択的に細菌の SSU rRNA 遺伝子を PCR 増幅した PCR 産物を鋳型に、DGGE 用プライマーとして細菌の群集構造解析に一般的に使用されている 341f-GC および 907r を用いて nested PCR を行った。前述と同様に、プライマーはそれぞれ最終濃度が 0.8μM になるように添加し、Ex Taq DNA ポリメラーゼを用いて PCR 増幅を行った。

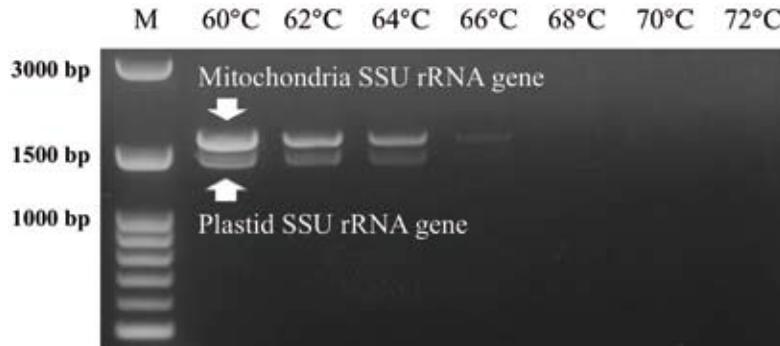
PCR 増幅後、約 600ng の PCR 産物を、上から下に向けて 27.5%～57.5% の変性剤濃度勾配を付けたアクリルアミドゲルに電気泳動 (100V, 14 時間) し、サイバーグリーンで染色後、UV 照射下で DGGE パターンを得た。なお、100% の変性剤とは 7M の尿素と 40% のホルムアミドを含む溶液と定義されており<sup>2)</sup>、DGGE 操作は池永らの論文<sup>3)</sup> を参考に行った。

## 4 結果及び考察

### 4.1 LNA オリゴヌクレオチドの $T_m$ 値 (アニーリング温度) の検討

Fig. 3 にアニーリング温度を変えて水稻根から抽出した DNA を PCR 増幅した時の結果を示す。その結果、60°Cではミトコンドリアおよびプラスチドの SSU rRNA 遺伝子の顕著な増幅が確認され

たのに対し、62°Cおよび64°Cでは増幅量は減少し、66°Cにおいてはごく僅かであった。また、68°C以上ではPCR産物は検出されなかった。従って、LNAオリゴヌクレオチドのアニーリング温度は68°Cが適当と考えられたが、68°Cでは電気泳動で検出されない程度で細菌プライマーがアニーリングし、ミトコンドリアおよびプラスチドのSSU rRNA遺伝子が増幅している可能性が否めなかった。LNAオリゴヌクレオチドのアニーリング温度は、細菌プライマーがアニーリングできない温度で、なおかつできるだけ低い温度が良いことから、本研究ではLNAオリゴヌクレオチドのTm値は70°Cになるように設計した。

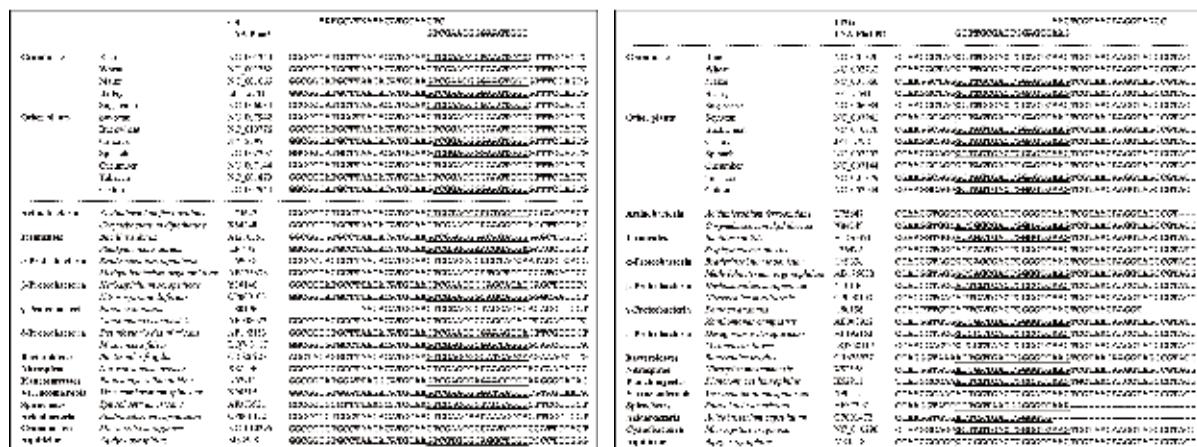


**Fig. 3** PCR products of extracted DNA from rice roots amplified with the PCR primer set 63f and 1492r. The annealing temperatures ranged from 60 °C to 72 °C in 2 °C increments.

#### 4.2 LNAオリゴヌクレオチドの設計

細菌用プライマー、植物および細菌のSSU rRNA遺伝子をアライメントした結果をFig. 4に示す。設計したLNAオリゴヌクレオチドも併せて示した。太文字はLNAに置換した塩基である。ミトコンドリアのSSU rRNA遺伝子において63fプライマーと競合するLNAオリゴヌクレオチドをLNA-Mit63、1492rプライマーと競合するそれをLNA-Mit1492と命名した。他方、プラスチドにおいてはイネ科植物と他の植物で、LNAオリゴヌクレオチド設計領域の配列が異なっていたため、本研究ではイネ科植物に特異的なLNAオリゴヌクレオチドを設計した。63fプライマーと競合するLNAオリゴヌクレオチドをLNA-Pla63、1492rプライマーと競合するそれをLNA-Pla1492と命名した。Table 1に設計したLNAオリゴヌクレオチドの配列を示した。

	63f LNA-Mit63	YRKGCYTWAYACATCGAAGTC GTCGAACCTGTCTTTCCG	1492r LNA-Pla1492	YRKGCYTCTTAAACATCGAAGTC GTCGAACCTGTCTTTCCG	
Plant					
Rice Japonica	NC_01033	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	NC_01033	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Rice Indica	NC_00766	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	NC_00766	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Wheat	GU985444	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	GU985444	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Maize	AY506529	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	AY506529	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Rye	ZJ4095	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	ZJ4095	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Soybean	M18839	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	M18839	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Lotus	AF19983	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	AF19983	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Watermelon	NC_014043	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	NC_014043	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Melon	JF412792	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	JF412792	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Tobacco	BA000942	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	BA000942	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Sugar beet	NC_002519	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	NC_002519	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Cucumber	NC_016009	AGCTTATAYGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	NC_016009	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	
Actinobacteria	<i>Acidimicrobium ferrovirens</i>	U75647	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>A. ferrovirens</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
Firmicutes	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	X84248	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>C. diphtheriae</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
	<i>Bacillus subtilis</i>	AJ276331	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>B. subtilis</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	L36472	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>S. aureus</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	U69639	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>B. japonicum</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
	<i>Heribacter spississimus</i>	V1146	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>H. spississimus</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Nutritorpha multiplex</i>	CP000103	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>N. multiplex</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
	<i>Pantoea ananatis</i>	U30196	-----AACATACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>P. ananatis</i>	-----AACATACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	AE098922	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>X. campestris</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
	<i>Dessiporellus desulfuricans</i>	AF192153	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>D. desulfuricans</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Myxococcus fulvus</i>	DQ768117	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>M. fulvus</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
	<i>Bacteroides fragilis</i>	CR620927	AGCTTACAGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>B. fragilis</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Chlorobi</i>	<i>Spriococcus spinosus</i>	X90515	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>S. spinosus</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomyces linnemannii</i>	X82911	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>P. linnemannii</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	AF373921	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>V. spinosum</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaeta americana</i>	CP001472	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>S. americana</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Archaea</i>	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	NC_010296	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>A. capsulatum</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Microcoleus aeruginosa</i>	MR3548	GGCGGGCGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG	<i>M. aeruginosa</i>	CGAAAGGCTTAAACATCGAAGTCGCAAGGCTGTCGCGGGAGCTGGG
<i>Aquificae</i>	<i>Aquifex pyrophilus</i>				



**Fig. 4** Alignment of bacterial primer and LNA oligonucleotide sequences with the corresponding region of the SSU rRNA genes of the plant organella (either mitochondria or plastid) and bacteria. Underlined sequences were corresponded to the LNA oligonucleotide. Bold letters were LNA bases replaced from DNA bases.

**Table 1.** Sequences of designed LNA oligonucleotides specific for the SSU rRNA genes of plant mitochondria and plastid.

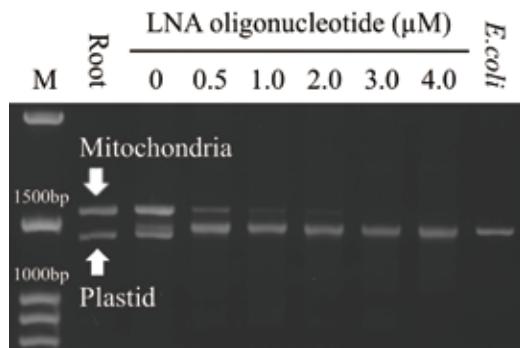
Name of LNA oligonucleotide	Sequence	Length (bases)	Tm (°C)
LNA-Mit63	5'- <b>GTCGAACGTTGTTTCGGp</b> -3'	18	70
LNA-Mit1492	5'- <u>CTTCACCCCCAGTCGAAGAp</u> -3'	18	70
LNA-Pla63	5'- <b>GTCGAACGGGAAGTGGTp</b> -3'	17	70
LNA-Pla1492	5'- <u>CTTCACTCCAGTCGCAAGCp</u> -3'	19	70

LNA base was indicated with bold letter. Underlined DNA bases were the overlapped sequences with bacterial primer. The 3' end of all LNA oligonucleotides were phosphorylated not to occur extension in PCR reaction cycles. It was indicated with small letter "p".

#### 4.3 LNA オリゴヌクレオチドの濃度検討

次に、設計した LNA オリゴヌクレオチドを用いて細菌 SSU rRNA 遺伝子の選択的 PCR 増幅を試みた。上述の結果より、LNA オリゴヌクレオチドの Tm 値は 70°C になるように設計したことから、PCR 増幅には次の条件を用いた；94°C3 分（プレラン）→ 94°C1 分（熱変性）、70°C1 分（LNA オリゴヌクレオチドのアニーリング）、54°C1 分（プライマーのアニーリング）、72°C2 分（伸長反応）を 30 サイクル → 72°C10 分（ポストラン）。6 段階の濃度（0 μM、0.5 μM、1.0 μM、2.0 μM、3.0 μM、4.0 μM）で PCR 増幅した時の結果を Fig.5 に示す。その結果、0 μM ではミトコンドリア及びプラスチドの SSU rRNA 遺伝子の顕著な増幅が確認されたが、LNA オリゴヌクレオチドの添加によって細菌の SSU rRNA 遺伝子が選択的に増幅されているのが分かる。他方、ミトコンドリアについては、LNA オリゴヌクレオチド濃度の増加に伴って増幅量は減少し、3.0 μM 以上では PCR 産物は認められなかった。また、プラスチドについては、0.5 μM 以上でその SSU rRNA 遺伝子の PCR 增幅を抑

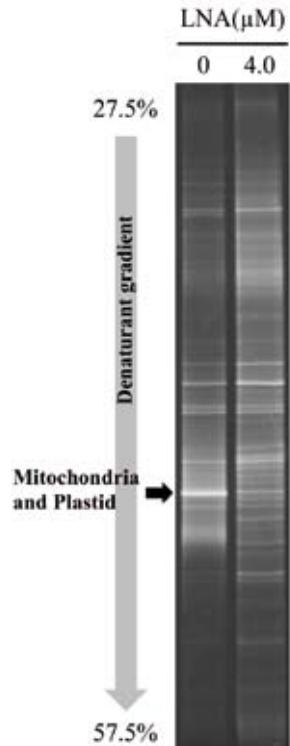
制することができた。以上の結果より、本研究で開発した LNA-PCR クランプ技術は、ミトコンドリア及びプラスチド遺伝子の增幅抑制、及び細菌遺伝子の選択的增幅に有効であると判断された。



**Fig. 5** PCR products of extracted DNA from rice roots amplified by using different concentrations of LNA oligonucleotides that ranged from 0  $\mu\text{M}$  to 4.0  $\mu\text{M}$ . PCR products of Root (aseptic rice root) and *E. coli* were used as controls to investigate the efficacy of LNA-PCR clamping technique.

#### 4.4 DGGE 法による群集構造解析

Fig.3 の 4.0  $\mu\text{M}$  で増幅した PCR 産物を鋳型に、DGGE 用プライマーとして細菌の群集構造解析に一般的に使用されている 341f-GC および 907r を用いて nested PCR を行った。約 600ng の PCR 産物を、変性剤濃度勾配を付けたアクリルアミドゲルに泳動し、DGGE パターンを得た。比較対象として



て 0  $\mu\text{M}$  で増幅した PCR 産物も DGGE 用プライマーで nested PCR を行った。Fig. 6 に示したように、0  $\mu\text{M}$  と 4.0  $\mu\text{M}$  の DGGE パターンを比較すると、0  $\mu\text{M}$  ではミトコンドリア及びプラスチドに由来する DGGE バンドが最も主要なバンドとして検出されたのに対し、4.0  $\mu\text{M}$  ではそれらに由来するバンドは検出されなかった。他方、ミトコンドリア及びプラスチド以外の細菌に由来するバンドについては、0  $\mu\text{M}$  に比べ 4.0  $\mu\text{M}$  で数多く検出された。4.0  $\mu\text{M}$  で新たに検出されたバンドは、従来の分子生物学的手法では検出されなかった細菌の SSU rRNA 遺伝子であり、本研究で開発した LNA-PCR クランプ技術は、新たな細菌の検出にも有効な手法であることが示唆された。

以上の結果は、従来の手法は植物体に生息する細菌の群集構造解析において、その群集構造を過小評価していたことを意味している。従って、今後 LNA-PCR クランプ技術を活用することにより、植物の生育に有益な細菌や新種の細菌が見出されることが予想されるとともに、培養法を組み合わせてその細菌を分離することで、微生物資材として農業利用していくことも可能になると予想される。

**Fig. 6** DGGE patterns of community structures of bacteria associated with rice roots, which amplification products were prepared without LNA oligonucleotide (0  $\mu\text{M}$ ) and with LNA oligonucleotide (4.0  $\mu\text{M}$ ).

## 5 結論

SSU rRNA 遺伝子を標的とした植物根面・内生細菌の群集構造解析においては、植物オルガネラ（ミトコンドリア・プラスチド）の DNA も抽出時に混入し、PCR 時に細菌プライマーで増幅する重大な問題が存在する。従って、細菌の SSU rRNA 遺伝子を選択的に増幅することができれば、群集構造解析法における大きなブレイクスルーになり得る。本研究では、植物のミトコンドリア及びプラスチドに特異的な LNA オリゴヌクレオチドを細菌プライマーと競合する位置に設計し、水稻根から抽出した DNA を用いて LNA クランプ技術の開発を試みた。その結果、ミトコンドリア及びプラスチドに特異的な LNA オリゴヌクレオチドを加えることによって、これら SSU rRNA 遺伝子の PCR 増幅を抑制することができた他、選択的に細菌遺伝子を増幅することが可能となった。また、DGGE 解析を行ったところ、LNA オリゴヌクレオチドの添加によって、従来の LNA オリゴヌクレオチドを加えていない手法では検出されなかった細菌の遺伝子も検出することが可能となった。以上より、本研究で開発された LNA-PCR クランプ技術は、植物根面・内生細菌の群集構造解析において従来の問題を可決し得る有効な手法であると判断された。

## 6 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究費を支援して頂いたサンケイ科学振興財団および代表理事福谷明氏に深く感謝の意を表します。

## 7 引用文献

- 1) M. Sakai and M Ikenaga (2013) Application of peptide nucleic acid (PNA)-PCR clamping technique to investigate the community structures of rhizobacteria associated with plant roots. *Journal of Microbiological Methods.*
- 2) G. Muyzer, E. C. De Waal and A. G Uitierlinden (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- 3) M. Ikenaga, R. Guevara, A. Dean, C. Pisani and J. Boyer (2010) Change in community structure of sediment bacteria along the Florida coastal Everglades marsh-mangrove-seagrass salinity gradient. *Microbial Ecology*, 59, 254-295.

# Development of Locked Nucleic Acid - PCR Clamping Technique to Investigate the Community Structures of Bacteria Associated with Plant Root Surface and Inside

Makoto Ikenaga and Masao Sakai

Laboratory of Soil Science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

Tel: +81-99-285-8660, E-mail: ikenaga@agri.kagoshima-u.ac.jp

The simultaneous extraction of plant organelle (mitochondria and plastid) genes in the DNA extraction step becomes a major drawback to investigate the community structures of bacteria associated with plant root surface and inside. This is because the organelle SSU rRNA genes are easily amplified by PCR with a set of universal primers for bacteria. To suppress the PCR amplification of the organelle SSU rRNA genes, locked nucleic acid (LNA) - PCR clamping technique was applied for selective amplification of bacterial SSU rRNA genes. The LNA oligonucleotides, which sequences were complementary to either mitochondria or plastid SSU rRNA genes, were designed by overlapping a few bases with annealing position of bacterial primer and by converting DNA bases, specific to either mitochondria or plastid, to LNA bases at the shifted region from 3' end of primer-binding position.

PCR reaction with LNA oligonucleotides significantly suppressed the amplification of the organelle SSU rRNA genes from rice roots. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis showed that the conventional amplification without LNA oligonucleotides generated the predominant DGGE band derived from organelle SSU rRNA genes while the little detection of bacterial bands. In contrast, additional DGGE bands derived from bacteria were detected in DGGE patterns, which amplicons were prepared using the LNA oligonucleotides, indicating the detection of the SSU rRNA genes derived from minority bacteria associated with rice roots. Thus application of LNA-PCR clamping technique was considered to be effective and useful technique for selective amplification of bacterial SSU rRNA genes from extracted DNA containing plant mitochondria and plastid genes.

