

## 分子量分画膜を用いた迅速・簡便な配列特異的核酸定量法の開発

東北大(学) ○竹村 泰幸, (正) 久保田 健吾, 産総研(非) 関口 勇地, 東北大(正) 原田 秀樹

## 1. はじめに

環境中の微生物群集構造を解析する手段として、核酸を標的とした分子生物学的手法は強力なツールである。例えば、現在広く用いられている(逆転写)定量PCR法は、高感度かつ迅速であり、またrRNAを標的としたFISH法は、同時に複数種の定量が可能である。しかしながら、定量PCR法はPCRバイアス等の問題、FISH法は多検体の迅速な定量が困難である等の問題がある。

そこで近年、上記の問題を解決するため、微生物由来のrRNAを逆転写やPCRを介さず直接定量する新たな手法の開発が行われている。DNAプローブとRNase Hを用いてrRNAの配列特異的切断により定量するRNase H法は、迅速・簡便かつ高感度ではあるが、複数種の同時解析が原理上出来ない等の欠点もある<sup>1)</sup>。

本研究の目的は、上記の問題点を鑑み、同時に複数種のrRNAを直接標的にでき、迅速・簡便な定量法を開発することである。本研究では、分子量分画膜を用いることにより核酸と交雑したプローブと他のプローブを分画することを特徴とした核酸(rRNA等)定量法を開発している。すなわち本手法は、蛍光修飾オリゴヌクレオチドプローブ(6~8千Da)が、標的核酸(16S rRNAでは約50万Da)との交雑により、見かけ上高分子化することで、分子量分画膜上にトラップされる。これにより交雑物のみを回収し、プローブ由来の蛍光値を測定し定量を行う方法である。本手法は、①RNA抽出から解析までを約3時間で行える、②プローブを同時に複数種用いられる、③ハイスループット化が容易である等の特長を持ち、迅速・簡便な核酸定量法としての確立が期待できる(図1)。

## 2. 実験方法

## 2.1 分子量分画膜によるプローブ・標的核酸の分画

本研究では、Milliporeの分子量分画膜YMシリーズを用いた。YMシリーズは、膜上にトラップされた分画分子量以上の高分子を、逆遠心により濃縮回収できる。

プローブの透過性能は、YMシリーズでろ過を行う前のプローブ溶液の蛍光強度と、YMシリーズでろ過・回収した溶

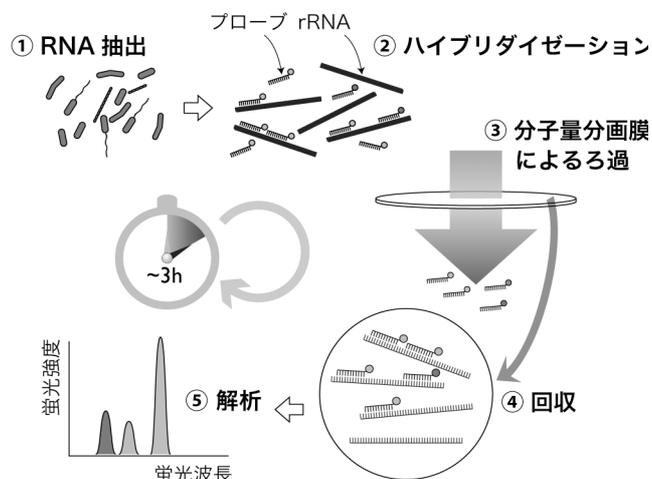


図1 分子量分画膜を用いたrRNA定量法の概要図

液の蛍光強度より、プローブ透過率を算出し評価した。1 pmol/ $\mu$ LのCy-3標識のプローブ(10~50塩基)100  $\mu$ LをYMシリーズでろ過した後、超純水500  $\mu$ Lで洗浄ろ過し、YMシリーズを反転させ、超純水を10  $\mu$ Lを滴下し、逆遠心により回収し、回収した溶液の蛍光強度をNano Drop 3300で測定し評価した。プローブの透過率は、最初に滴下したプローブ溶液(100  $\mu$ L)が逆遠心後に回収した溶液(10  $\mu$ L)に回収されて10倍濃縮されると仮定し算出した。

標的核酸回収能は、PCR産物および人工合成RNA(約180~1500塩基)を用いて、核酸回収率を算出し評価した。0.15 ng/ $\mu$ LのPCR産物あるいは0.5 ng/ $\mu$ Lの人工合成RNA、100  $\mu$ LをYM-100でろ過し、超純水500  $\mu$ Lで洗浄ろ過し、逆遠心により超純水10  $\mu$ L中に回収した。PCR産物およびRNA量の測定には、SYBR Green IおよびRiboGreen染色により得られた蛍光値を用いた。核酸回収率は、プローブ透過率の算出時と同様、ろ過前の溶液(100  $\mu$ L)が逆遠心後に回収液(10  $\mu$ L)に10倍濃縮されると仮定し算出した。

## 2.2 配列特異的rRNAの検出および定量

検出および定量の実証モデルとして、*Escherichia coli*, *Methanosarcina mazei*の16S rRNA遺伝子由来のほぼ全長の人工合成RNAを用いた。プローブは、真正細菌を標的としたEUB338(Alexa Fluor 647標識)、原核生物を標的

キーワード 微生物叢解析, 分子量分画膜, rRNA, 定量

連絡先

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 TEL

とした UNI519 (Alexa Fluor 555 標識) を用いた。RNA (500 ng) とプローブ (各 50 pmol) の交雑反応は、PCR チューブ内でサーマルサイクラーを用いて行い、反応溶液を YM-100 で吸引した後、洗浄を行い、逆遠心により回収した溶液の蛍光強度を測定した。

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 分子量分画膜によるプローブ・核酸分画能の評価

本手法では、標的核酸に特異的に交雑したプローブが、完全に他のプローブと分画できることが望ましい。すなわち、プローブ単体での透過率がほぼ 100% に近く、核酸の回収率は高い程良い。

YM シリーズのプローブ透過率は、公称分画分子量が大きい膜程高く、またプローブの塩基長が長い程低くなる傾向が得られた。YM-3, 10, 30, 50 は塩基長別全てのプローブにおいて透過率が 99.5% 未満であったが、YM-100 は、10~25 塩基のプローブにおいて 99.5% 以上の高い透過性能を示した。また、YM-100 の標的核酸回収効率は、PCR 産物、RNA 共に全ての塩基長において 50% 以上であった。すなわち、YM-100 を用いることで、プローブと標的核酸の分画が可能であることが明らかとなった。

#### 3.2 配列特異的 rRNA の検出

EUB338 と UNI519 を用いて、*E. coli* と *M. mazei* の 16S rRNA の検出を試みた結果、UNI519 の蛍光は *E. coli*, *M. mazei* の両系からほぼ等量得られたが、EUB338 の蛍光は *E. coli* の系だけで得られた。従って、本手法の原理である、プローブが標的核酸に配列特異的に交雑することで見掛け上高分子化して分子量分画膜上にトラップされることが証明された。すなわち、本手法による配列特異的な rRNA の検出が可能であることが明らかとなった。

#### 3.3 rRNA 定量性能の評価

次に、*E. coli* と *M. mazei* の 16S rRNA を様々な割合で混合した系を用いて、本手法の定量性能の評価を行った。

3.2 の *E. coli* の純粋系で得られた EUB338 と UNI519 の蛍光強度からファクターを算出し (式 1)、様々な割合で混合した系から得られたシグナル比にファクターを乗じて、混合系中の *E. coli* の存在率を算出した (式 2)。すなわち、原核生物に対して真正細菌を内部標準で定量可能である<sup>2)</sup>。

$$C_{UNI/EUB} = \frac{RFU_{UNI-E.}}{RFU_{EUB-E.}} \quad (式 1)$$

$$A (\%) = C_{UNI/EUB} \times \frac{RFU_{EUB}}{RFU_{UNI}} \times 100 \quad (式 2)$$

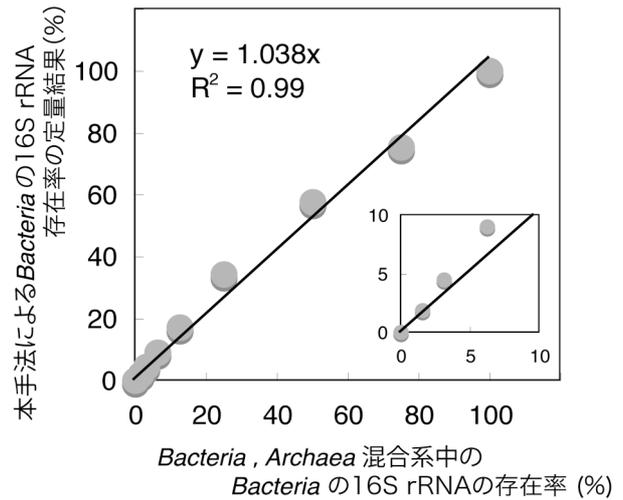


図 2 *E. coli* 16S rRNA の存在率と定量結果の関係

ここに、 $C_{UNI/EUB}$  : EUB338 と UNI519 のファクター、 $RFU_{EUB-E.}$  : *E. coli* 純粋系の EUB338, UNI519 のシグナル、 $A$  : *E. coli* の存在率 (%),  $RFU_{EUB,UNI}$  : 混合系の EUB338, UNI519 のシグナルとした。

その結果、既知の割合と測定結果の間に高い相関が示され ( $R^2=0.99$ )、核酸定量法としての確立が期待できた (図 2)。

### 4. まとめ

分子量分画膜による標的核酸とプローブの分画が可能であることが明らかとなった。また、標的核酸との交雑により見かけ上高分子化して分子量分画膜上に捕捉されたプローブを検出することができた。すなわち、新規核酸定量法の原理を証明することに成功した。

分子量分画膜を用いた新たなアプローチによって、逆転写や PCR を介さず、RNA を直接標的にできる配列特異的定量法の確率が期待できた。本手法は、従来法に比べ迅速かつ簡便で、また、複数種の同時定量が可能である等の優れたポテンシャルを持つことがわかった。

現在、環境試料より抽出した RNA を標的として定量を試みている。

### 参考文献

- 1) Uyeno, Y. *et al.* (2004) *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3650-3663.
- 2) Wu, J.-H. *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res.*, 35, e82.

### 謝辞

本研究は、環境省の環境研究総合推進費(S2-03)の支援を受けた。