

(10) 分子量分画膜を用いた迅速・簡便な配列特異的 rRNA定量法の開発

竹村 泰幸¹・関口 勇地²・原田 秀樹¹・久保田 健吾^{1*}

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

²独立産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門 (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1)

* E-mail: kengok@ep11.civil.tohoku.ac.jp

本研究では、分子量分画膜を用いた配列特異的新規rRNA定量法を開発した。本手法では、標的核酸と交雑した蛍光標識プローブと交雑しなかった余剰プローブを分子量分画膜により分画し、交雑したプローブ由来の蛍光強度から定量を行う。使用する分子量分画膜、プローブ/RNA比、交雑時間、交雑温度などについて検討・最適化を行い、人工合成RNAの検出を試みたところ、標的RNAの配列特異的検出に成功した。また、定量については既知量と高い相関を示し、定量下限値も5 ng程度と高感度検出が可能であった。嫌気性汚泥中に存在する硫酸還元菌の定量を試みたところ、高い再現性で定量することができた。本研究により、温度制御装置と蛍光分光光度計のみを用いる極めて簡便なrRNA定量法が確立できた。

Key Words : molecular weight cut-off, nucleic acid quantification, rRNA

1. はじめに

微生物が保持する核酸を標的とした検出・同定・定量・モニタリング技術は、生物学的廃水処理や土壌浄化といった微生物を利用した環境バイオ技術の理解には不可欠な技術になっている。今日までに、多くの研究者によって様々な技術が報告されており、目的に応じて技術を使い分けている。広く用いられている技術の1つである定量PCR法は、標的核酸を増幅させて定量を行うため、わずか数コピーでも定量可能な高い感度を持ち、かつ迅速である。しかしながら、PCRバイアス¹⁾に加え、RNAを定量しようとした場合は逆転写反応時のバイアスも考慮する必要がある²⁾。また、細胞内のrRNAを直接標的としているFISH法は、視覚的に微生物生態を解き明かすツールとなっているが、定量しようとした場合、他の定量法に比べ、骨の折れる作業が必要である³⁾。

近年、微生物由来のrRNAを逆転写やPCRを介さずに直接定量する新たな手法の開発が行われている。Uyenoら⁴⁾が開発したRNase H法は、DNAプローブとRNase Hを用いて、rRNAを配列特異的切断により定量する方法であり、迅速かつ簡便で高感度である。DNAzyme法も

rRNAの配列特異的切断により定量する方法であるが、酵素反応を利用しないことを特徴としている⁵⁾。Adachiら⁶⁾が開発したMB-ACE法は、rRNAを結合した磁気ビーズをキャピラリー中に保持し、蛍光標識プローブの交雑・解離により定量する方法であり、1回の実験で複数種の定量が可能である。しかしながら、RNase H法は、酵素反応を利用しなければならないこと、DNAzyme法は、酵素反応を利用しない一方、DNAzymeの設計に制約があること、MB-ACE法は、rRNAを磁気ビーズと結合する手間がかかり、かつ感度が比較的低いこと等が問題として挙げられ、それぞれの技術は一長一短である。

本研究の目的は、上記の問題点を鑑み、迅速・簡便なrRNA検出・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て標的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、新しいアプローチによる核酸定量法を開発した。まず、蛍光標識DNAオリゴヌクレオチドプローブ (6-8 kDa) と rRNA (16Sの場合は約500 kDa) を分画可能な膜を用意する。プローブはrRNAとの交雑により見かけ上高分子化し分画膜上にトラップされるため、これを回収し、プローブ由来の蛍光値を測定して定量を行う (図-1)。

本論文では、本手法が原理上うまくいくことを証明するために、人工合成RNAを用いて技術を確認した。また、実際に環境サンプルから抽出したRNAの定量を行い、本手法の適用性について検討を行った。

2. 実験方法

(1) 試料及びプローブ

a) 人工合成核酸 (PCR産物・RNA) の作製

PCR産物の作製には、Bacteriaドメインに属する *Escherichia coli*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Deinococcus radiodurans*, Archaeaドメインに属する *Methanosarcina mazei* から抽出したゲノムをテンプレートとして用いた。16S rRNA遺伝子を標的として、そのほぼ全長が得られるように設計したプライマーセットを用いてPCR産物を作製した。塩基長の異なるPCR産物を作製する際は、*E. coli* の16S rRNA遺伝子を標的にし、塩基長が1504, 911, 400, 194塩基となるように設計したプライマーセットを用いた。PCR産物はMinElute PCR Purification Kit (Qiagen) により精製した。

人工合成RNAは、先のプライマーセットのうち、フォワードプライマーにT7プロモーターを付加したプライマーを用いて得られたPCR産物を鋳型に、T7 RNAポリメラーゼにより合成し (RiboMAX™ T7 Express System, Promega), DNA-Free RNA Kit (Zymo Research) により精製した。PCR産物は電気泳動、人工合成RNAはBioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) のRNA 6000 nano LabChip® kitによりシングルピークバンドであることを確認した。PCR産物、人工合成RNAの濃度は、吸光度により測定した (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific)。

b) 環境サンプルからのRNA抽出・精製

環境サンプルとして、余剰汚泥を処理する嫌気性消化槽より採取した汚泥と、硫酸根を含む人工廃水を処理するUASBリアクターから採取したグラニュール汚泥を用いた。採取した汚泥は、pH5.1バッファー (10 mM EDTA, 50 mM CH₃COONa) で洗浄した後、2 mlスクリーキャップ内に10 mg-wet程度入れ、0.1 mmガラスビーズ0.4 g, 20% SDS 80 µl, 酸性フェノール溶液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 50:49:1) 500 µlと混合し、ビーズビーダー (Micro Smash, TOMY) により破碎し (4,500 rpm, 120秒), 遠心分離した後 (10,000×g, 10分), 水層に溶出された全RNAを回収した。回収したRNAは、RNeasy Mini Kit (Qiagen) の精製工程に従って精製した。精製後のRNAは、RNA 6000

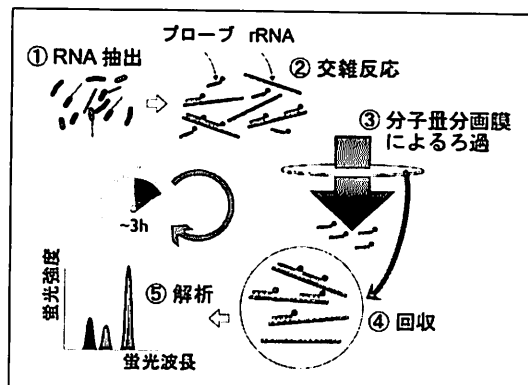


図-1 分画膜法による rRNA 定量の概要図

nano LabChip® kitにより16S rRNA, 23S rRNAによるピークがあることを確認し、吸光度により濃度を測定した。

c) プローブ

プローブは、硫酸還元菌群を標的としたSRB385 (5'-[Alexa Fluor 488] CGG CGT CGC TGC GTC AGG -3')⁷⁾, Bacteriaを標的としたEUB338 (5'-[Alexa Fluor 647] GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3')⁷⁾, 全ドメインを標的としたUNI519 (5'-[Alexa Fluor 555] GWV TTA CCG CGG CKG CTG -3') (Giovannoni *et al.*⁸⁾ より一部改変)を用いた。プローブは、10 mM Tris-HCl溶液で溶解した後、吸光度により濃度を測定し、50 pmol/µlになるよう調整した。

(2) オリゴヌクレオチドの分画膜通過性能の評価

Millipore社の分子量分画膜YMシリーズ (YM-3, -5, -10, -50, -100)があり、公称分画分子量はそれぞれ、3, 5, 10, 50, 100 kDa)についてオリゴヌクレオチドの通過性能を調べた。通過性能評価は、分子量分画膜でろ過を行う前のオリゴヌクレオチド溶液の蛍光強度と、分子量分画膜でろ過・回収を行った溶液の蛍光強度よりオリゴヌクレオチド通過率を算出して行った。オリゴヌクレオチドの長さが通過率に与える影響を調べるため、塩基長がそれぞれ10, 18, 25, 35, 50塩基のオリゴヌクレオチドを用いた。まず、1 pmol/µlのCy3標識オリゴヌクレオチド 100 µlを分子量分画膜に滴下し、10,000×gで遠心ろ過した後、洗浄として超純水500 µlの遠心ろ過を行った。反転させた分子量分画膜に超純水を10 µl滴下して逆遠心 (1,000×g) することで膜上にトラップされたオリゴヌクレオチドを回収した。最初に滴下したオリゴヌクレオチド溶液と回収した溶液の蛍光強度を蛍光スペクトルメーター (NanoDrop 3300, Thermo Scientific) で測定した。最初に滴下したオリゴヌクレオチド溶液 (100 µL) が逆遠心後に回収した溶液 (約10 µL) に回収されて10倍濃縮されると仮定し、オリゴヌクレオチドの通過率を式(1)で算出した。

表-1 本手法の実験工程

$$P = \left(1 - \frac{RFU_R \times \frac{1}{10}}{RFU_I} \right) \times 100 \quad (1)$$

ここに、 P ：オリゴヌクレオチド通過率（%）， RFU_I ：ろ過前のオリゴヌクレオチド溶液の蛍光強度， RFU_R ：ろ過後に回収した溶液の蛍光強度とした。

(3) 分画膜による核酸回収性能の評価

分子量分画膜による核酸の回収性能は、塩基長の異なるPCR産物あるいは人工合成RNAを用いて、ろ過前の溶液とYM-100でろ過・回収した後の溶液をSYBR Green IあるいはRiboGreenで染色し、得られた蛍光強度より核酸回収率を算出することで評価した。

分子量分画膜によるろ過および回収は、オリゴヌクレオチド通過率算出時の実験と同様に、まず0.15 ng/μlのPCR産物あるいは0.5 ng/μlの人工合成RNAを100 μl滴下して遠心ろ過し（500×g），500 μlの超純水で洗浄ろ過し（500×g），逆遠心により超純水10 μl中に回収した。SYBR Green IあるいはRiboGreenによる染色・測定にはNanoDrop 3300を用いた。PCR産物あるいは人工合成RNA溶液の回収率は、オリゴヌクレオチド通過率の算出時と同様、ろ過前の溶液（100 μL）が逆遠心後に回収した液（約10 μL）に10倍濃縮されると仮定し、PCR産物あるいは人工合成RNAの回収率を式（2）で算出した。

$$N = \frac{RFU_R \times \frac{1}{10}}{RFU_I} \times 100 \quad (2)$$

ここに、 N ：核酸回収率（%）， RFU_I ：ろ過前のPCR産物あるいは人工合成RNA溶液からの蛍光強度， RFU_R ：ろ過後に回収した溶液からの蛍光強度とした。

(4) 配列特異的rRNA定量法の実験工程

本手法は、大きく5つの工程、RNA抽出・交雑反応・分子量分画膜によるろ過・回収・解析からなる（表-1）。

まず、抽出・精製したRNAと蛍光標識プローブを交雑バッファー（20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH8.0）に入れた反応溶液（20 μl）を、PCRチューブ内に作製した。交雑反応は95℃で1分間RNAを変性させた後に、交雑温度まで冷却した。次に、反応溶液を交雑バッファー180 μlに加え、交雑反応を15分間行った。RNAと交雑したプローブと余剰プローブの分画は、YM-100を用い

RNA抽出

1. 酸性フェノール法によりRNAを抽出
2. RNeasy Mini Kitによる精製（約2時間）

交雑反応

3. PCRチューブに、プローブを各50 pmol，RNAを1.5 μgを混合した20 μLの反応溶液を作製する
4. 反応溶液をサーマルサイクラーで温度を制御する（95℃・1分，その後交雑温度まで冷却）
5. バッファー 180 μLと混ぜ反応させる（希釈）（交雑温度・15分）

分子量分画膜によるろ過

6. YM-100をマニフォールドに設置し吸引（-0.015 MPa）
7. 反応溶液をろ過（約10分）
8. 200 μLのバッファーをろ過（交雑温度・約10分）
9. 8.をもう1回
10. 膜の裏面に付着した水滴を落とす（数秒）

回収

11. YM-100を反転させ、専用チューブにセットする
12. 膜の裏面に50%ホルムアミド溶液を滴下し1分待つ
13. 逆遠心により交雑物を回収（1000×g・6分）

解析

14. NanoDrop 3300により蛍光シグナルを測定（数秒）

で行った。まず、反応溶液（200 μl）を、YM-100の表面に滴下して、吸引ろ過した（約-0.015 MPa，10分）。その後、余剰プローブを十分洗浄するため、交雑バッファー（計400 μL）をろ過した。ろ過後、膜の裏面に付着した水滴をふり落とし、膜の裏面に10 μLの50%ホルムアミド溶液を滴下して1分程待ち、逆遠心（1,000×g，6分）によりrRNAと交雑したプローブを回収した。回収した溶液の蛍光強度はNanoDrop 3300により測定した。なお、交雑反応から解析までに要する時間は1時間程度であった。

本手法では、あるグループ（例：全ドメイン）に特異的なプローブに対して、そのグループに属するグループ（例：*Bacteria*）に特異的なプローブの割合を定量する。このような内部標準による定量は他の定量法でも採用されている⁹⁾。例として、全ドメインのrRNAに占める*Bacteria*の存在割合を定量する方法を示す（全ドメインを標的としたUNI519と*Bacteria*を標的としたEUB338を用いる場合）。まず、*Bacteria*の存在割合が全ドメインに対して100%の場合（例えば*E. coli*の人工合成RNAのみの検出を行う）に得られるUNI519とEUB338の蛍光強度比（ファクター， $C_{UNI/EUB}$ ）を算出する（式（3））。次に、サンプルから得られた蛍光強度比にこのファクターを乗じて、EUB338の存在率を算出する（式（4））。

$$C_{UNI/EUB} = \frac{RFU_{UNI-E.coli}}{RFU_{EUB-E.coli}} \quad (3)$$

$$A(\%) = C_{UNI/EUB} \times \frac{RFU_{EUB}}{RFU_{UNI}} \times 100 \quad (4)$$

ここに、 $C_{UNI/EUB}$: EUB338とUNI519のファクター、 $RFU_{EUB-E.coli}$ 、 $RFU_{UNI-E.coli}$: *E. coli*からのEUB338、UNI519の蛍光強度、 A : 全ドメインのrRNAに占める*Bacteria*のrRNA存在率(%), RFU_{EUB} 、 RFU_{UNI} : サンプルからのEUB338、UNI519の蛍光強度とした。

3. 実験結果及び考察

(1) 分子量分画膜のプロープ・標的核酸分画能の評価

本研究で用いたYMシリーズは、膜の両面に溶液を滴下してろ過を行うことができる。膜の表面上にトラップされた分画分子量以上の高分子は、反転させた膜の裏面に溶液を滴下し、YMシリーズ専用のチューブに固定して遠心操作を施すこと（逆遠心）で濃縮回収できる。したがって、YMシリーズは、RNAに交雑したプロープを回収することが必要な本手法には適している。

本手法では、標的核酸に特異的に交雑したプロープが完全に余剰プロープと分画できることが望ましい。すなわち、プロープ単体での通過率がほぼ100%に近く、核酸の回収率は高い程良い。

YMシリーズのオリゴヌクレオチド通過率は、公称分画分子量が大きい膜ほど高く、またオリゴヌクレオチドの塩基長が長いほど低くなる傾向が得られた（表-2）。YM-3、-10、-30、-50のオリゴヌクレオチド通過率は、塩基長別全てのオリゴヌクレオチドで99.5%未満であったが、YM-100のオリゴヌクレオチド通過率は、25塩基未満のオリゴヌクレオチドで99.5%以上であり、YM-100が高いオリゴヌクレオチド通過能をもつことがわかった。FISH法等で用いられ、既にデータベースに登録されているプロープの多くは25塩基未満であるため¹⁰⁾、YM-100を用いれば、これらのプロープを使用することができる。

核酸回収率を評価する際は、菌体から抽出したRNAに比べて調製しやすいPCR産物及び人工合成RNAを用いた。YM-100の標的核酸回収率は、PCR産物、人工合成RNA共に塩基長の違いによる差は見られず、いずれの塩基長においても50%以上であった（表-3）。以上の結果から、YM-100は、プロープとrRNAが分画可能であると判断し、本手法ではYM-100を用いることとした。

表-2 YMシリーズのプロープ通過能の評価

名称	塩基数	YM-3	-10	-30	-50	-100
Eco327-10	10	×	×	△	△	○
Eco327-18	18	×	×	×	△	○
Eco327-25	25	×	×	×	△	○
Eco327-35	35	×	×	×	×	△
Eco327-50	50	×	×	×	×	△

○: P(プロープ通過率)>99.5%, △: P<99.5%, ×: P<90%

表-3 YM-100の核酸回収能の評価

(上: PCR 産物, 下: 人工合成 RNA)

PCR 産物	1504塩基	911塩基	400塩基	194塩基
回収の評価	○	○	○	○
人工合成RNA	1504塩基	911塩基	400塩基	194塩基
回収の評価	○	○	○	○

○: N (標的核酸回収率) > 50%

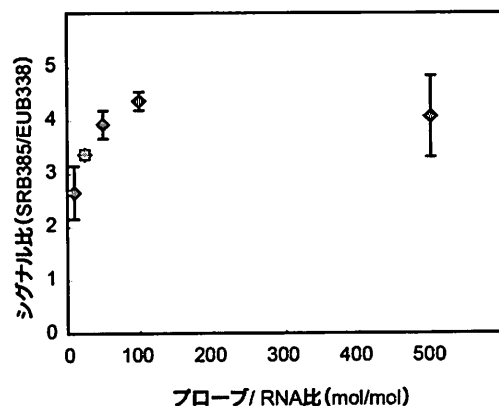


図-2 プロープ/RNA 比の影響

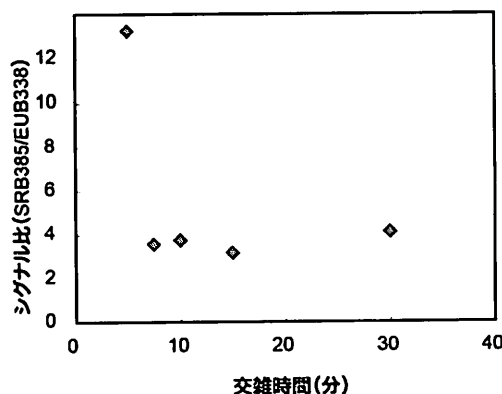


図-3 交雑時間の影響

(2) 配列特異的RNA検出実験工程の構築

プローブとRNAの反応溶液は、交雑反応を行う前に、RNAの高次構造を解離させるため、95℃で1分間加熱することとした。また、交雑温度までの冷却をスムーズに行うため、反応溶液量は、極力少なく扱いやすい容量として20 μ lとした。

配列特異的検出のモデルとして、EUB338を用いて、*Dsv. vulgaris* (標的) と *M. maezi* (非標的) の人工合成RNAの検出実験を行った。EUB338の蛍光シグナルが *Dsv. vulgaris* のみから得られるような実験条件を構築しようと試みたが、*M. maezi* からのシグナルがなかなか除去できなかった。この原因として、遠心ろ過の場合、膜上の液面に偏りが生じることが挙げられたため、YM-100をマニフォールド (AxyVac, Axygen) に固定して吸引ろ過に切り替えた。吸引圧が高すぎると、回収液からの蛍光強度が減少する傾向が見られたため、適切な吸引圧 (約0.015 MPa) に設定した。

膜上にトラップされた交雑物の回収には、超純水よりも50%ホルムアミド溶液を用いた方が比較的高い蛍光強度が得られたため、後者を用いることとした。

プローブとRNAの交雑反応は、RNAの検出において特異性を左右する重要な工程であるため、以下に、詳細な検討を行った。

a) プローブ/RNA比の影響

本手法では、プローブと標的RNAの交雑効率がプローブ量の不足によって低下しないようにするため、交雑反応時に用いるプローブ量は標的RNAに比べより多く用いる必要がある。しかしながら、膜に滴下するプローブ量が多すぎると、膜の目詰りが起こることが確認されたため、標的RNAに対するプローブの適切な量を求める必要があった。そこで、*Dsv. vulgaris* の人工合成RNAを (50 ng $\approx$ 0.1 pmol) を用いて、プローブ (SRB385 と EUB338) の滴下量を変え、プローブ/RNA比 (mol/mol) の影響を調べた。プローブ/RNA比が25未満の場合、SRB385の蛍光強度が低下したことによる蛍光強度比 (SRB385/EUB338) の減少傾向が見られたが、プローブ/RNA比が50以上では、蛍光強度比にほとんど差はなかった (図-2)。したがって、プローブ/RNA比は50以上が望ましいことがわかった。

b) 交雑時間の影響

次に、同じく *Dsv. vulgaris* のRNA (500 ng) と SRB385、EUB338を用いて交雑時間の影響を調べた。交雑時間7.5分以上では蛍光強度比 (SRB385/EUB338) に大きな差は見られなかったが、交雑時間が5分だと、SRB385の値が著しく高い値を示し、蛍光強度比が高くなった (図-3)。

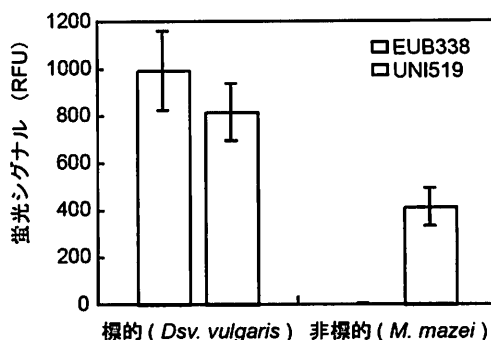


図4 標的核酸の配列特異的検出実験の結果

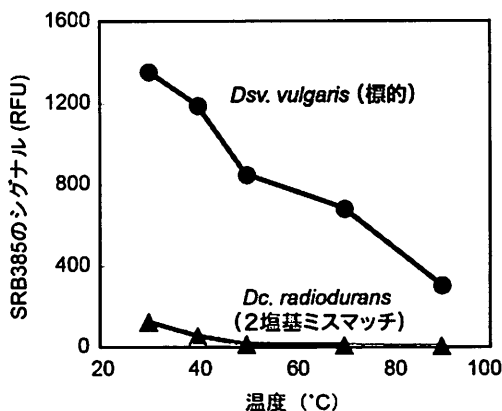


図5 交雑温度の影響

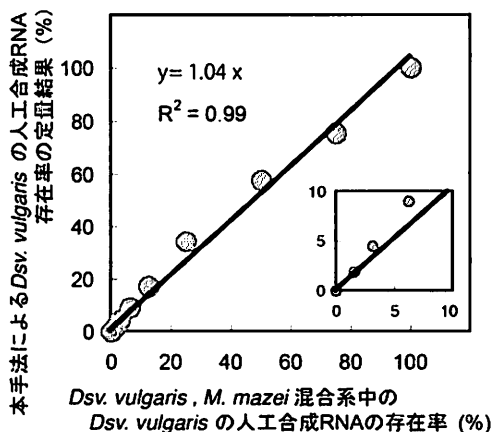


図6 本手法による RNA の定量性の評価

このことから交雑を安定させるためにはある程度の時間が必要であることが示唆されたため、交雑時間は15分で行うことにした。

c) 配列特異的rRNAの検出

EUB338とUNI519を用いて、*Dsv. vulgaris*と*M. maei*の人工合成RNA（各500 ng）の検出を試みた。その結果、UNI519の蛍光シグナルは、*Dsv. vulgaris*、*M. maei*の両方から得られた。一方、EUB338の蛍光シグナルは、*Dsv. vulgaris*からは高い値が得られたが、*M. maei*からはほとんど得られなかった（図-4）。*M. maei*から得られたEUB338の蛍光シグナルはノイズレベルであり、特異的な検出が行われたと言える。以上の結果から、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。そして、本手法による配列特異的なRNAの検出が可能であることが明らかとなった。

一方、図-4ではUNI519による検出で*Dsv. vulgaris*、*M. maei*から得られるシグナル強度が異なっている。これは、rRNA塩基配列の違いによる高次構造の違いから交雑効率が異なることが考えられる他¹²、今回の検討で用いた分子量分画膜（YM-100）を用いると、膜上に補足されたプローブ-RNA交雑物を回収した際に得られる溶出量が個々の膜によって異なるため、溶出濃度が異なることが挙げられる。そのため本開発技術は内部標準を用いた定量法（例えばUNI519に対する特定のグループの割合）として用いる必要がある。

d) 特異性の向上

SRB385とUNI519による*Dsv. vulgaris*（SRB385に完全に相補的）と*Dc. radiodurans*（SRB385と2塩基ミスマッチ）のRNA（500 ng）の検出実験を行い、NaCl濃度とプローブ濃度の影響を調べた。

反応溶液中のNaCl濃度を20-900 mMにしたところ、いずれの濃度においてもSRB385の蛍光シグナルは*Dc. radiodurans*からも得られた。また、NaCl濃度200 mM以上ではNaCl濃度の違いによるSRB385、UNI519の蛍光強度への影響は確認されなかった。一方、NaCl濃度100 mM以下では、UNI519の蛍光強度が著しく低下する傾向が得られた。したがって、十分なシグナルが得られ、かつ他の因子（例えばホルムアミドや温度）によって特異性をコントロールできる濃度として、NaCl濃度を200 mMに固定することとした。

次に反応溶液中のプローブ濃度の特異性に与える影響を調べた。プローブ濃度を、プローブとRNAの絶対量を変えずに反応溶液の容量を増やすことで50、250、2,500 nMにして影響を評価した。この時、変性温度（95℃）から交雑温度への冷却をスムーズに行うため、変性と冷却は20 μlのバッファー中で行い、そこにバッファーに加えることで濃度を調整した。その結果、プ

ローブ濃度が低い程、*Dsv. vulgaris*、*Dc. radiodurans*ともに蛍光強度が低くなる傾向が得られた。これは、 T_m が濃度に依存するためであり¹¹、プローブ濃度と温度を適切にコントロールすれば、特異的な検出が可能であることを示唆している。本研究では、プローブ濃度を250 nMにすることで*Dsv. vulgaris*と*Dc. radiodurans*のSRB385の蛍光強度の比が最も顕著となったため、この濃度に固定した。

最後に、交雑温度を変化させることで、特異的な検出を行うこととした。NaCl濃度は200 mM、プローブ濃度は各250 nMに固定し、SRB385を用いて*Dsv. vulgaris*と*Dc. radiodurans*のRNA（500 ng）の識別を試みた。その結果、交雑温度70℃で*Dc. radiodurans*のSRB385由来のシグナルがノイズレベルとなったことから、*Dsv. vulgaris*と*Dc. radiodurans*を識別することに成功した（図-5）。これにより、本手法は2塩基ミスマッチの識別が可能であることが示された。以上により、交雑温度によって交雑のストリンジェンシーが制御可能な実験工程が確立できた（表-1）。

(4) 定量性の評価

*Dsv. vulgaris*と*M. maei*をRNAを様々な割合で混合した系について、それぞれをEUB338とUNI519を用いて検出し、本手法の定量性能の評価を行った。*Dsv. vulgaris*の人工合成RNAのみを用いた実験から得られたEUB338とUNI519のファクターは、 $C_{UNI/EUB} = 0.845$ であった（式(3)）。次に、*Dsv. vulgaris*の割合を0.0、1.6、3.2、6.3、12.5、…100%と変化させ、その時に得られた蛍光強度比に、ファクターを乗じて、混合系中の*Dsv. vulgaris*の存在率を算出した（式(4)）。その結果、既知の割合と測定結果の間に高い相関（ $R^2=0.99$ ）が示された（図-6）。

本手法では、検出機器にNanoDrop 3300を用いた場合、1~2%程度の定量が可能であった。また、rRNAの定量下限値は5 ng程度であると推察され、本手法は、他のrRNAを直接標的とした定量法と同等以上の優れた感度を持つことがわかった^{4,6)}。

(5) 環境サンプルへの適用

本手法が環境サンプルから抽出したRNAの定量に適応し得るか検討した。(3)で構築した実験工程に基づき、SRB385とUNI519のプローブセットを用いて、前述した2つの環境サンプルより抽出した1.5 μgの全RNAを標的に、全ドメインの16S rRNAに占める硫酸還元菌群の16S rRNA存在割合を定量した。このプローブセットのファクターは、*Dsv. vulgaris*の16S rRNA遺伝子由来の人工合成RNAから得られた値より、 $C_{UNI/SRB} = 0.236$ と算出された（交雑温度：70℃）。このファクターを用いて、サ

ンプルの全ドメインに占める、硫酸還元菌群の割合を算出したところ(式(4)),嫌気性消化槽の汚泥では $25.9 \pm 1.7\%$ 、UASBグラニューール汚泥では $10.0 \pm 0.6\%$ (いずれも $n=3$)と、再現性の高い定量結果が得られた。

同じサンプルについて、FISH法による定量を行ったところ、UASBグラニューール汚泥は、DAPI染色細胞に占めるSRB385染色細胞の割合は3.1%で、開発手法とFISH法では定量結果に差が生じた。一方、嫌気性消化槽汚泥はFISH法で細胞から得られるシグナルが弱く、定量が難しかった。RNAベースの定量法同士(RNase H法とメンブレンハイブリダイゼーション法)を比較したところ、両者は同等の値を示したとの報告⁴⁾がある一方で、RNAベースの定量法(RNase H法、DNAマイクロアレイ法、メンブレンハイブリダイゼーション法)とFISH法を比較した場合には定量結果に差が生じている¹³⁻¹⁵⁾。このようにFISH法とRNAベースの定量法で定量結果に差が生じる理由として、FISH法は細胞中のrRNA含量を考慮していないことや連鎖球菌のような形状をどのように計測するかといった問題があることなどが挙げられる³⁾。そのため今後、RNAベースの定量法と本開発手法を比較する必要があると考えられるが、FISH法で得られた存在率と本開発手法で得られた存在率に大きな乖離はなく、RNAベースの定量値として妥当な値を示していると考えられる。

4. まとめ

本研究では分子量分画膜を用いた迅速・簡便な新規rRNA定量法を開発した。分子量分画膜による標的核酸とプローブの分画能を評価し、十分な分画能力を持っていたYM-100を本手法に適用することにした。配列特異的rRNAの検出・定量を行うため、プローブ/RNA比や交雑時間等の交雑条件の最適化を行った。構築した実験工程により、rRNA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由来の蛍光シグナルを検出することができた。既知量の人工合成RNAを定量した実験により、定量結果が既知量と高い相関をもつこと、高感度検出が可能であることを明らかにした。また、嫌気性消化槽及びUASBリアクターの汚泥から抽出したRNAにおける硫酸還元菌群の定量に本手法を適用したところ、高い再現性をもって定量することに成功した。

本手法は、①RNAの抽出から定量までを約3時間で行え、②温度制御装置と蛍光分光光度計しか必要とせず、③プローブを複数種用いるマルチプレックス解析やハイスループットへの応用が期待できる等の利点を持つ。

今後、従来技術に比べ格段に迅速かつ簡便な生物学的廃水処理システム等の微生物モニタリングや、海水や河川といった微生物量が比較的希薄なサンプルの微生物生態調査等への利用が期待できる。

謝辞：本研究は、環境省 環境研究総合推進費(S2-03)、科学技術振興機構 戦略的国際科学技術協力推進事業およびJST-JICA国際科学技術共同研究推進事業から支援を受けた。竹村は日本学術振興会の支援を受けた。

参考文献

- 1) Suzuki M. T. and Giovannoni S. J.: Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, pp. 625-630, 1996.
- 2) Bustin S. A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay, *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 25, pp. 169-193, 2000.
- 3) Daims H. and Wagner M.: Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, pp. 237-248, 2007.
- 4) Uyeno Y., Sekiguchi Y., Sunaga A., Yoshida H. and Kanagata Y.: Sequence-specific cleavage of small-subunit (SSU) rRNA with oligonucleotides and RNase H: A rapid and simple approach to SSU rRNA-based quantitative detection of microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, pp. 3650-3663, 2004.
- 5) Suenaga H., Liu R., Shiramasa Y. and Kanagawa T.: Novel approach to quantitative detection of specific rRNA in a microbial community, using catalytic DNA, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, pp. 4879-4884, 2005.
- 6) Adachi K., Yamaguchi M., Nakashige M., Kanagawa T., Torimura M., Tsuneda S., Sekiguchi Y. and Noda N.: Affinity capillary electrophoresis with magnetic beads for multiplex quantitative analysis of bacterial 16S rRNA, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 107, pp. 662-667, 2009.
- 7) Amann R. L., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. and Stahl D. A.: Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, pp. 1919-1925, 1990.
- 8) Giovannoni S. J., DeLong E. F., Olsen G. J. and Pace N. R.: Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells, *Journal of Bacteriology*, Vol. 170, pp. 720-726, 1988.
- 9) Wu J.-H. and Liu W.-T.: Quantitative multiplexing analysis of PCR-amplified ribosomal RNA genes by hierarchical oligonucleotide primer extension reaction, *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, e82, 2007.
- 10) Loy A., Maixner F., Wagner M. and Horn M.: probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007, *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, Database issue D800-D804, 2007.

- 11) Tijssen P.: Hybridization with Nucleic Acid Probes. Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, 1993.
- 12) Behrens S., Rühland C., Inácio, J., Huber H., Fonseca Á., Spencer-Martins L., Fuchs B. M. and Amann R.: In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domain *Bacteria*, *Archaea*, and *Eucarya* to Cy3-labeled oligonucleotide probes, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, pp. 1748-1758, 2003.
- 13) Noda S., Iida T., Kitade O., Nakajima H., Kudo T. and Ohkuma M.: Endosymbiotic *Bacteroidales* bacteria of the flagellated protist *Pseudotrichonympha grossii* in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, pp. 8811-8817, 2005.
- 14) Peplies J., S. C. K. Lau, J. Penzthaler, R. Amann, and F. O. Glöckner: Application and validation of DNA microarrays for the 16S rRNA-based analysis of marine bacterioplankton, *Environmental Microbiology*, Vol. 6, pp. 638-645, 2004.
- 15) Liao J., Lou I. and de los Reyes F. L.: Relationship of species-specific filament levels to filamentous bulking in activated sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, pp. 2420-2428, 2004.

(2011.5.30 受付)

Development of a novel quick and simple method for quantitative detection of sequence-specific rRNA using molecular weight cut-off membrane

Yasuyuki TAKEMURA¹, Yuji SEKIGUCHI², Hideki HARADA¹
and Kengo KUBOTA¹

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

²Biomedical Research Institute, AIST

We developed a quick and simple method for quantitative detection of sequence-specific rRNA using molecular weight cut-off membrane. After selecting appropriate membrane, fluorescent oligonucleotide probes hybridized with rRNA and non-hybridized probes were successfully separated. Detection and quantification of sequence-specific RNA were carried out by optimizing several hybridization parameters such as salt and probe concentrations, and hybridization temperature. Furthermore, it was demonstrated that this method can be used for quantification of rRNA extracted from environmental samples with high reproducibility.