

令和元年6月6日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18896

研究課題名（和文）環境微生物群集構造解析のための迅速・簡便な新規rRNA定量法の開発と適用

研究課題名（英文）Development of a novel simple and quick rRNA quantification method for analyzing environmental microbial community structure

研究代表者

原田 秀樹（Harada, Hideki）

東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授

研究者番号：70134971

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で開発したrRNA定量法は、迅速・簡便でありながら、逆転写やPCRといった酵素反応由来のバイアスが生じないため、微生物動態解明のためのブレイクスルー技術となり得る。定量法を相対定量法から絶対定量法へと改良することで、プローブの設計がより簡易になり、マルチプレックス定量への応用できるなど、ユーザビリティを向上させることができた。また、環境試料から抽出したRNAについてRT-qPCR法と本手法によるマルチプレックス定量を比較したところ、本手法ではRT-qPCR法で生じたバイアスは確認されず、良好な定量結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物学的廃水・廃棄物処理技術、バイオレメディエーションなどの環境バイオテクノロジーにおいて、その主役である微生物の動態を理解することは極めて重要である。本研究では、微生物の活性に依存すると考えられるrRNA量を迅速・簡便に定量可能な手法を新規に開発した。新規rRNA定量法は、他の手法でRNA定量の際によく用いられる逆転写反応やPCRといった酵素反応を一切必要としないため酵素反応に由来するバイアスを回避できる他、複数種の微生物グループをマルチプレックスに定量でき、操作もハイスループットに行える。したがって、微生物動態をモニタリングのブレイクスルー技術になり得るポテンシャルを持つ。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel simple and quick rRNA quantification method which is not required enzymatic reaction such as reverse-transcription or polymerase chain reaction. This method can avoid biases caused by enzymatic reactions, resulting in more accurate results. In this study, the novel method was reformed from relative quantification to absolute quantification for improvement of the usability, which can simplify the oligonucleotide probe designing and be applied for multiplex quantification by using multiple probes. The novel method and RT-qPCR method were compared for microbial community structure analysis by targeting multiple groups. The novel method successfully obtained results without biases.

研究分野：土木環境工学

キーワード：rRNA定量

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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られている。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もつ。しかしながら、PCRバイアスに加え、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。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。このような問題を解決すべく、迅速・簡便な検出技術の開発を行ってきたが、内部標準による定量法であったため絶対定量ができない問題があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の問題点を鑑み、迅速・簡便なrRNA検出・絶対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。逆遠心により、膜状にトラップされたプローブ-rRNA交雑物を濃縮回収し、回収した溶液について、蛍光強度と吸光度を測定する。予め、プローブが標的のrRNAに交雑する割合(交雑効率)求めておくことで、蛍光強度から求めたプローブ濃度より標的のrRNA濃度(copies/ μ l)が算出できる。また、吸光度から全RNA濃度(ng/ μ l)を算出し、全RNA量(ng)のうちの標的rRNAコピー数(copies)として絶対量の定量が可能となる(図-1)。

3. 研究の方法

(1) 本手法は、大きく5つの工程(1. RNA抽出, 2. 交雑反応, 3. 分子量分画膜によるろ過, 4. 回収, 5. 解析)からなる。まず、抽出・精製したRNA(人工合成RNAの場合500 ng、試料から抽出した全RNAの場合2 μ g)と蛍光標識プローブ(各50 pmol)を交雑バッファー(20 mM Tris-HCl [pH8.0], 400 mM NaCl, 適量の尿素)に入れた反応溶液(200 μ l)を、0.5 mlチューブ内に作製した。簡易的な例として、6 M尿素の反応液の場合は、1M Tris-HCl: 1 ml、5 M NaCl: 4 ml、8 M尿素: 37.5 ml、水: 7.5 ml(計: 50 ml)の濃縮液を作製しておき、この濃縮液を1チューブあたり170 μ l添加し、25 pmol/ μ lに調整したプローブを各2 μ l、RNAを適量(上記)、水を計200 μ lになるように加えて調整する。この200 μ lの反応溶液の入った0.5 mlチューブを95°Cのヒートブロック上で2分間静置してRNAを変性させた後、60°Cのヒートブロック上に移し15分間静置して交雑反応させた。次に、反応溶液を分画膜ユニット(Microcon YM-100 membraneあるいはMicrocon Ultracel DNA Fast Flow Membrane)に滴下して、吸引ろ過した(約

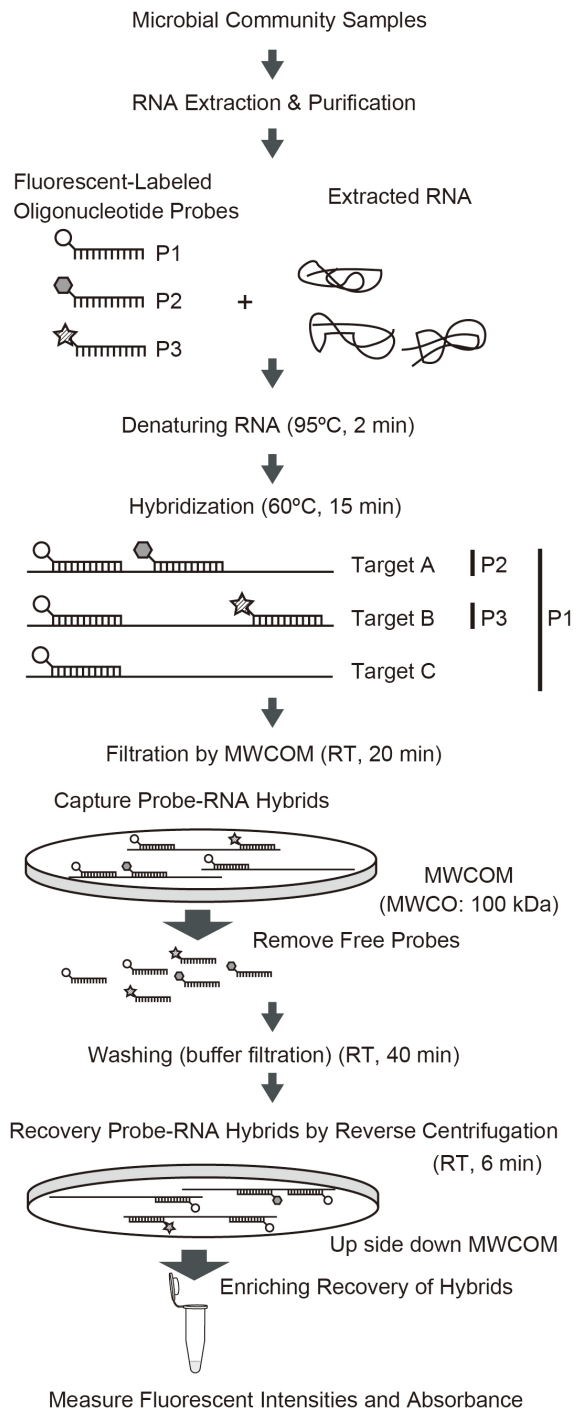


図-1 新規 rRNA 定量法の概念図

-15 kPa、約 10 分)。反応溶液がほぼ完全にろ過されたのを確認した後、余剰プローブを十分洗浄するため、洗浄溶液 200 μ l を 2 回 (計 400 μ L、上記の濃縮液 340 μ l に水 60 μ l を加えたもの) ろ過した。ろ過後、分画膜ユニットを付属のチューブに移し、卓上遠心器にて 2~3 秒遠心することで膜の裏面に付着した水滴をふるい落とす。その後、分画膜ユニットを反転させ、付属の新しいチューブに移し、膜の裏面に 15 μ L の TE 溶液を滴下して 1 分程待ち、遠心操作 (1,000 \times g、2 分を 3 回) により rRNA と交雑したプローブを回収した。回収した溶液は、NanoDrop 3300 により蛍光強度を、NanoDrop2000 により吸光度を測定するか、もしくは Aurora Microplate (黒、384 ウェル) に回収液 10 μ l を移して TECAN M1000PRO により蛍光強度と吸光度を測定した。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。

(2) 本研究では、生物学的処理法の中でもとりわけ嫌気性消化に着目し、嫌気性消化においてキープレーヤーと考えられる微生物グループである *Bacteria*、*Archaea* 及び *Archaea* に属する *Methanosaetaceae*、*Methanomicrobiales*、*Methanobacteriaceae* の定量を試みた。本手法に用いたプローブ (プローブ名-蛍光標識 Alexa Fluor の略称) は、それぞれ *Bacteria*、*Archaea*、*Methanosaetaceae*、*Methanomicrobiales*、*Methanobacteriaceae* を標的とした、EUB338-AF555、ARC915m-AF647、MX825m-AF488、MG1200m-AF488、MB1175m-AF488 とした。その他、硫酸還元菌を標的とした SRB385-AF488、*Gammaproteobacteria* を標的とした GAM42a-AF488、*Betaproteobacteria* を標的とした BET42a-AF546 についても本手法への適用性を評価した。

(3) プローブの交雑効率を求めめるために人工合成 rRNA を作製した。純菌株 (*Escherichia coli*、*Methanosaeta concilii*) 及び、研究室で保有する *Methanolinea* 属と *Methanobacterium* 属に属する 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長が組み込まれたクローンをテンプレートとして用い、フォワード側に T7 プロモーターを付加したプライマーセット (*Bacteria*: T7-8f/1500r、*Archaea*: T7-109f/1500r) 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た。

(4) 嫌気性消化の汚泥サンプルとして、廃水を処理する UASB グラニューール汚泥 (I) 及び (II)、余剰汚泥を処理する嫌気性消化汚泥 (I) 及び (II) の 4 サンプルから抽出した RNA を本手法による定量の対象とした。RNA はフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール法により抽出し、RNeasy mini kit により精製したものをを用いた。

(5) 本手法の適用性を他の手法と比較するため、rRNA の定量広く用いられる RT-qPCR 法と比較した。RT-qPCR 法 (TaqMan 法) で用いたプライマー・プローブセットはそれぞれ *Bacteria*、*Archaea*、*Methanosaetaceae*、*Methanomicrobiales*、*Methanobacteriaceae* を標的とした、Bac338f/Bac805r/Bac516fp、Arc787f/Arc1059r/Arc915fp、Mst702f/Mst862r/Mst753fp、Mmb282f/Mmb832r/Mmb749fp、Mbt857f/Mbt1196r/Mbt929fp を用いた。qPCR の反応液には PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 を用い、LightCycler2.0 により逆転写 qPCR により定量した。逆転写反応 (50 $^{\circ}$ C : 30 分間)、熱変性 (94 $^{\circ}$ C 120 秒) の後、94 $^{\circ}$ C : 10 秒、60 $^{\circ}$ C : 20 秒、72 $^{\circ}$ C 15 秒の PCR サイクルとした。

4. 研究成果

(1) 交雑反応溶液中の変性剤としてはホルムアミドや尿素が一般的に用いられている。ホルムアミドは紫外線領域の吸光度測定に影響を及ぼすことが確認され、RNA の吸光度測定時に影響を及ぼすことが懸念されたため使用しないことにした。尿素については吸光度への影響が確認されなかったため、本手法には尿素を用いることにした。

(2) EUB338 (Alexa Fluor 546 標識、標的: *E. coli*、非標的: *Ms. mazei*)、ARC915s (Alexa Fluor 488 標識、標的: *Ms. mazei*、非標的: *E. coli*)、MX825m (Alexa Fluor 488 標識、標的: *Mst. concilii*、非標的: *Ms. mazei*)、MG1200m (Alexa Fluor 488 標識、標的: *Methanolinea*、非標的: *Mst. concilii*)、4 種のプローブについて、尿素濃度 0~6 M の影響を調べた (交雑温度 60 $^{\circ}$ C、NaCl 濃度 400 mM)。その結果、いずれのプローブにおいても尿素濃度の増加に伴い、非標的の蛍光強度/吸光度の減少傾向が見られ、尿素濃度の増加によって特異性が向上することがわかった。標的と非標的の蛍光強度/吸光度の比をシグナル/ノイズ比とした場合、実際の定量の際には、シグナル/ノイズ比が高く、交雑効率が高い条件で行うことが望ましい。今回使用したプローブでは尿素濃度 3~6 M の範囲の中に適切な条件があることが確認され、その時の交雑効率は 40%~100% 程であった。また、本研究で用いたプローブの ΔG_1° は EUB338、ARC915m、MX825m、MG1200m、MB1175m、SRB385、GAM42a、BET42a でそれぞれ、-17.6、-17.9、-13.2、-14.5、-19.0、-15.9、-13.8、-14.3 kcal/mol であり、概ね -13~-19 kcal/mol のプローブであれば、交雑溶液の尿素濃度を 0~6 M に調整することで特異的な検出・定量 (ただし 1 塩基ミスマッチについてはコンペティタープローブが必要 [下記]) が可能であることが示唆された。

(3) また、1 塩基ミスマッチの識別が可能かどうかを GAM42a (Alexa Fluor 488 標識、標的: *E. coli* 23S、非標的: *C. testosteroni* 23S) で評価したところ、尿素濃度を 6 M まで上げると標的と非標的で若干の差が出るものの、しっかりとした識別はできなかった。そこで、コンペティタープローブ (BET42a、蛍光標識無し) を GAM42a と同量アプライしたところ、標的からのシグナルはほとんど変わらずに非標的からのシグナルをほぼなくすることができた。したがって、本手法は適切なコンペティタープローブをアプライすることにより 1 塩基ミスマッチでも識別が可能な方法であることが確認された。

(4) UASB グラニューール汚泥 (2 サンプル)、嫌気性消化汚泥 (2 サンプル) について、本手法と RT-qPCR 法で定量を行った。本手法では *Bacteria*、*Archaea* 及び *Methanosaetaceae* か

Methanomicrobiales か *Methanobacteriaceae* の 3 プレックスの定量を実施し交雑反応溶液の尿素濃度は全て 6 M とした。この時、プローブ交雑効率は EUB338、ARC915m、MX825m、MG1200m、MB1175m でそれぞれ、0.81、0.72、0.42、0.73、0.76 であった。本手法とそれぞれの定量結果を表-1 に示す。標的とした *Methanosaetaceae* の存在割合が多い試料については、RT-qPCR 法では *Methanosaetaceae* の存在割合が *Archaea* の存在割合を上回ってしまうようなケースが見られたが、本手法ではそのようなバイアスは見られず、良好な定量結果が得られた。

表-1 本手法と RT-qPCR 法の定量結果

Target group	Granule sludge (I)		Granule sludge (II)		Digester sludge (I)		Digester sludge (II)	
	Novel method	RT-qPCR	Novel method	RT-qPCR	Novel method	RT-qPCR	Novel method	RT-qPCR
<i>Bacteria</i>	50.9 ± 8.3	83.1 ± 12.9	59.1 ± 4.8	95.8 ± 17.1	94.7 ± 4.0	99.0 ± 3.1	94.8 ± 8.1	98.9 ± 1.7
<i>Archaea</i>	49.1 ± 12.1	16.9 ± 1.3	40.9 ± 4.2	4.2 ± 0.8	5.3 ± 0.8	1.0 ± 0.0	5.2 ± 3.0	1.1 ± 0.2
<i>Methanosaetaceae</i>	4.1 ± 1.4	24.2 ± 9.6	22.2 ± 4.8	17.6 ± 5.8	2.7 ± 0.3	1.7 ± 0.3	5.3 ± 1.6	1.6 ± 0.1
<i>Methanomicrobiales</i>	7.3 ± 0.7	0.5 ± 0.0	11.3 ± 0.8	2.0 ± 0.1	2.5 ± 0.8	0.7 ± 0.0	2.1 ± 0.2	0.6 ± 0.0
<i>Methanobacteriaceae</i>	27.1 ± 6.1	19.3 ± 2.1	18.2 ± 0.9	5.4 ± 0.6	—	—	—	—

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ① 竹村泰幸、李玉友、原田秀樹、関口勇地、久保田健吾、分子量分画膜を用いた迅速・簡便な新規 rRNA 直接定量法による環境微生物群のマルチプレックス定量、第 52 回日本水環境学会、2018 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：久保田 健吾

ローマ字氏名：(KUBOTA, Kengo)

研究協力者氏名：竹村 泰幸

ローマ字氏名：(TAKEMURA, Yasuyuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。