

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656309

研究課題名(和文)迅速・簡便な生体高分子定量技術の開発とそれを用いた環境微生物生態の解明

研究課題名(英文) Development of a novel RNA detection method for understanding environmental microbial ecology

研究代表者

原田 秀樹 (Harada, Hideki)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70134971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：環境バイオテクノロジーのキープレイヤーである微生物の動態を解明するためのブレイクスルー技術として、分子量分画膜を用いた生体高分子であるRNAの新規定量法を開発を行った。提案技術のコンセプトの証明から、実験プロトコルの確立、交雑ストリンジェンシーの制御による特異的検出条件の最適化などを検討することにより、廃水処理システム中に存在する特定微生物群の定量を行うことが出来た。実験に要する時間は、RNA抽出を入れても、最短で3時間程度であり、迅速で簡便な技術を開発することが出来た。

研究成果の概要(英文)：A novel RNA detection and quantification method using molecular weight cut-off membrane was developed for deciphering microbial population dynamics in environmental biotechnologies. After demonstrating the proof-of-concept of the method, an experimental protocol and an optimization method of hybridization stringency for specific detection were established. Eventually, some members involved in anaerobic wastewater treatment processes were detected and quantified by the originally developed method.

研究分野：環境衛生工学

キーワード：核酸定量

1. 研究開始当初の背景

排水処理や廃棄物処理、土壌浄化等の環境バイオテクノロジーは、微生物の働きに委ねられていると言っても過言ではない。これらの技術をより改善・発展していくためには、処理メカニズムの究明が必要不可欠であるが、化学的あるいは経験的知識だけでこれを解き明かすのは限界であり、分子レベルでの知見が要求される。分子生物学的手法は、微生物の動態・機能を分子レベルで理解する上で極めて重要なツールである。

2011年10月の時点において約190万もの16S rRNA 遺伝子配列が Ribosomal Database Project に登録されていた。しかしながらそのほとんどが、未だ環境中での動態・機能の特定には至っておらず、特に、どこにどれくらい存在しているかという最も基礎的な知見が不足しているのが現状である。この原因として、rRNA を定量する技術として現在主流となっているドットプロットハイブリダイゼーション法や定量的 real-time PCR 法が、前者では定量までに1~2日かかり骨の折れる作業工程を要すること、後者では、迅速で高感度である一方、PCRのバイアス問題など克服し難い問題があることが挙げられる。したがって、PCRを介さずにより迅速・簡便かつ高感度な定量技術が切望されている。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明する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。

2. 研究の目的

環境バイオテクノロジーのキープレーヤーである微生物の動態・機能は未開な点が多く、ブラックボックスに包まれているのが現状である。微生物の動態・機能を解き明かすことができれば、廃水処理や廃棄物処理、土壌浄化等の様々な技術の更なる向上・応用に大きく貢献するものと期待できる。本研究の目的は、環境微生物生態を解明するためのブレークスルー技術を開発し、適用することである。本研究で開発しようとしている技術は、今までにない全く新しい方法により、核酸を定量しようとするものであり、既存技術に比べ格段に迅速・簡便であることが期待できる。さらに、開発した技術を様々な環境サンプルに適用し、微生物の動態・機能に関する有益な情報を世界に発信する。

3. 研究の方法

本研究で開発する技術は、逆転写反応やPCRを行わず、直接 rRNA を定量するものである。蛍光標識プローブを標的とする rRNA に交雑させ、交雑したプローブの分子量を見

かけ上、大きくする。一方、交雑しなかったプローブの分子量は変化しない。交雑したプローブとしなかったプローブを分子量分画膜を用いて分画することで、rRNA に交雑したプローブ由来の蛍光強度を測定することで、検出・定量する技術である。

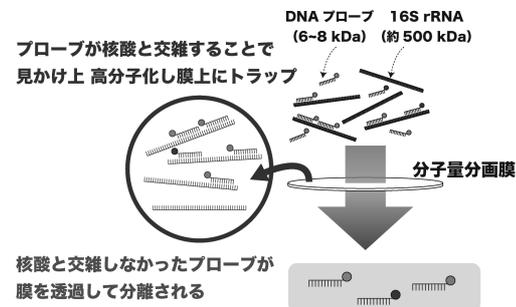


図1 新規定量法の概要

4. 研究成果

(1) 分画膜の選定

本手法では、標的核酸に特異的に交雑した蛍光標識プローブが、交雑しなかった蛍光標識プローブと分画できることが必要である。すなわち、蛍光標識プローブの通過率がほぼ100%に近く、それに加えて高分子の核酸の回収率は高い程良い。本研究では幾つかの分子量分画膜を試したところ、M社のYMシリーズに着目した。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/μL の Cy-3 標識のプローブ (10~50 塩基) 100 μL を YM シリーズでろ過した後、超純水 500 μL で洗浄ろ過し、YM シリーズを反転させ、超純水を 10 μL 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 μL) が逆遠心後に回収した溶液 (10 μL) 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/μL の PCR 産物あるいは 0.5 ng/μL の人工合成 RNA, 100 μL を YM-100 でろ過し、超純水 500 μL で洗浄ろ過し、逆遠心により超純水 10 μL 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 μL) が逆遠心後に回収液 (10 μL) に

10 倍濃縮されると仮定し算出した。

蛍光標識プローブの YM シリーズの通過率は、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。すなわち 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%以上の高い通過性能を示した（より長いプローブでは低下）。また、YM-100 の標的核酸回収効率は、約 180~1,500 塩基長の PCR 産物あるいは人工合成 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わかった。

(2) 配列特異的 rRNA の検出

EUB338 (*Bacteria* を標的) と UNI519 (*Bacteria* と *Archaea* を標的) を用いて、*Escherichia coli* (*Bacteria*) と *Methanosarcina mazei* (*Archaea*) の 16S rRNA 遺伝子由来のほぼ全長の人工合成 RNA の検出を試みた結果、UNI519 の蛍光は *E. coli* と *M. mazei* の両方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 rRNA の検出が可能であることが明らかとなった。

(3) 配列特異的 rRNA の検出実験工程の構築

実験工程の構築には、まず、ろ過方法、交雑時間、プローブ/RNA 比等の最適化を行った。定量を行う際、プローブの量に起因するバイアスを防ぐためには、プローブ量は多いほど良い。しかしながら本手法では、滴下するプローブ量が多すぎると膜の目詰りが起こるため、プローブは適切な量が望ましい。そこで、*Dsv. vulgaris* の RNA を 50 ng とし、プローブ (SRB385 と EUB338) の滴下量を変え、プローブ/RNA 比 (mol/mol) の影響を見た。プローブ/RNA 比が 25 未満の場合、SRB385 のシグナルの低下に起因するシグナル比

(SRB385/EUB338) の減少が見られたが、プローブ/RNA 比が 50 以上では、シグナル比にほとんど差異がなかった。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。

次に、*Dsv. vulgaris* の RNA 500 ng に対して、SRB385 と EUB338 を用いて、交雑時間の影響を調べた。その結果、交雑時間 15 分以上ではシグナル比に大きな差異は見られなかったが、交雑時間が 5 分しかないとき、SRB385 の

値が著しく高い値を示し、シグナル比が高くなった。このことは、交雑時間が短すぎると反応が安定しないことを示唆しており、以降、交雑時間は 15 分で行うこととした。

(4) 本手法の特異性

まず 2 塩基ミスマッチの識別を行うため、温度による交雑ストリンジエンシーの制御をするための最適化を行った。硫酸還元菌を標的としたプローブ (SRB385) と全ドメインを標的としたプローブ (UNI519) による *Dsv. vulgaris* (SRB385 に完全に相補的) と *Deinococcus radiodurans* (SRB385 に 2 塩基ミスマッチ) の人工合成 RNA (500 ng) を用いた。交雑溶液中の NaCl 濃度、プローブ濃度や交雑温度等の影響を評価したところ、NaCl 濃度を 200 mM、プローブ濃度を各 250 nM にすることで、温度によるストリンジエンシーの制御が可能になることがわかった。また、交雑温度 70°C 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。

1 塩基ミスマッチが識別可能かどうかを検討するため、*E. coli* と *Comamonas testosteroni* の 23S rRNA 遺伝子由来の人工合成 RNA を用い、*E. coli* の 23S rRNA に特異的なプローブ GAM42a (Beckman Dye3 標識) を用いて、*E. coli* の 23S rRNA の検出を試みた。また、コンペティターとして *C. testosteroni* の 23S rRNA に特異的なプローブ BET42a (標識なし) を用いた。また、コントロールとして *Desulfovibrio vulgaris* の RNA も添加し、*C. testosteroni* 由来のシグナルを *Dsv. vulgaris* と同程度にする事を成否の指標とした。

標的核酸の検出実験は、人工合成 RNA 約 1,300 ng とプローブ (1.5 pmol) をバッファ中で 46°C で反応させ (交雑反応)、次に YM-100 に反応溶液を滴下し、500×g で遠心ろ過した後、バッファで洗浄を行い、逆遠心により約 10 μL 中に YM-100 にトラップされたものを回収した。回収溶液を、シーケンサー (CEQ8000, Beckman Coulter) でキャピラリー電気泳動させ、CEQ8000 システムのフラグメント解析ソフトウェアにより、Eco327-18 由来の蛍光を測定した。CEQ8000 は、蛍光スペクトロメーターと同様に蛍光シグナルによる定量が可能であり、NanoDrop 3300 より、およそ 3 オーダー検出感度が高い。

その結果、1 塩基ミスマッチに相補的なコンペティタープローブを用いることで *C. testosteroni* のシグナルを低減でき、さらに温度や NaCl 濃度で交雑反応のストリンジエンシーを高めると、*E. coli* のシグナルも減少したが、*C. testosteroni* のシグナルを *Dsv. vulgaris* と同等 (非検出レベル) にすることができた

(図2). すなわち本手法は、コンペティタープローブを用い、ストリンジエンシーを制御することで1塩基ミスマッチも識別可能であることが明らかとなった。

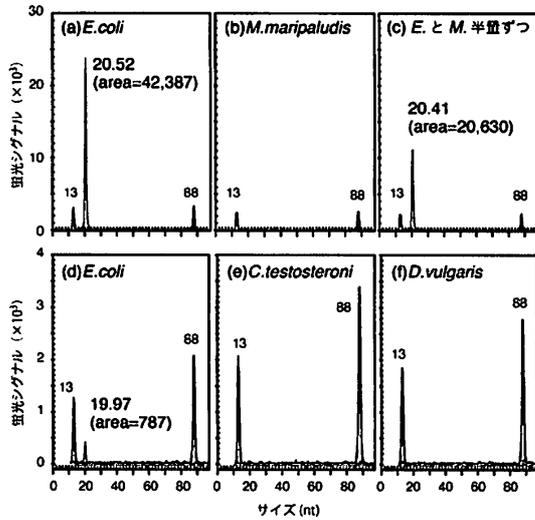


図2 配列特異的検出結果

(5) 定量性の評価

Dsv. vulgaris と *M. mazei* の 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* の割合を 0.0, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, ...100% と変化させ定量した結果、既知の割合と定量結果に高い相関 ($R^2=0.99$) が示された。また、rRNA の定量限界値は 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。

(6) 環境試料への適用

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、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。嫌気性消化槽の汚泥では $25.9 \pm 1.7\%$ 、UASB グラニュール汚泥では $10.0 \pm 0.6\%$ (いずれも $n=3$) と、再現性の高い定量結果が得られた。

(7) より特異的かつ簡便な実験行程の構築次に、*Bacteria* と *Archaea* をそれぞれ定量するための実験条件の検討を行った。*Archaea* を標的とした ARC915m プローブにより *M. mazei* (標的) と *E. coli* (非標的) の RNA の識別するため、交雑温度調節によりストリンジエンシーの制御を試みたところ、温度の上昇に伴って両系ともに蛍光強度が低下する傾向を示した。また、70°C では *E. coli* からのシグナルがノイズレベルになり、*M. mazei* の特異的検出に成功した。次に、EUB338 プロ

ーブ (*Bacteria* 標的) により *E. coli* (標的) と *M. mazei* (非標的) の識別を上記同様に試みたが、温度調節のみでは特異的な検出ができなかった。そこで、有機溶媒を反応溶液に加えることでストリンジエンシーの制御を試みたところ、尿素の濃度によりストリンジエンシーの制御に成功し、尿素 2 M で *M. mazei* からのシグナルがノイズレベルになり *E. coli* の特異的検出に成功した。このように、反応液の温度または尿素濃度を制御することで実験条件を確立できることがわかった (図3)。

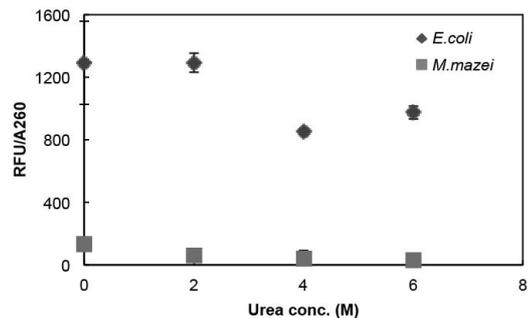


図3 尿素濃度による交雑ストリンジエンシーの制御

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計4件)

- ① Takemura, Y., Y. Sekiguchi, H. Harada, and K. Kubota. Multiplex quantification of methanogens in anaerobic bioreactors by a novel direct rRNA quantification method. 15th International Symposium on Microbial Ecology. 2014.8.24-29. Seoul (Korea).
- ② 竹村泰幸, 久保田健吾, 関口勇地, 原田秀樹. 分子量分画膜を用いた迅速・簡便な rRNA 直接定量法による廃水処理微生物群の定量. 第48回日本水環境学会年会. 2014.3.19. 東北大学 (仙台, 宮城)
- ③ Takemura, Y., Y. Sekiguchi, H. Harada, and K. Kubota. A direct rRNA quantification method using molecular weight cut-off membrane. 1st International Forum on Asian Water Environment Technology. 2013.12.19. New Delhi (India).
- ④ Takemura, Y., Y. Sekiguchi, H. Harada, and K. Kubota. Development of a novel RNA quantification method using molecular weight cut-off membrane. 5th Congress of Europran Microbiologists FEMS2013. 2013.7.23. Leipzig (Germany).

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 秀樹 (HARADA, Hideki)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70134971