

課題名	R F - 0 7 6 複合微生物解析による環境質評価のための迅速・網羅的微生物検出・定量技術の開発		
課題代表者名	関口勇地（独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・バイオメジャー研究グループ）		
研究期間	平成19-20年度	合計予算額	17,555千円（うち20年度 8,455千円） ※上記の合計予算額は、間接経費4,051千円を含む
研究体制	<p>研究体制</p> <p>（1）迅速・網羅的微生物検出のための基盤技術の開発に関する研究（独立行政法人産業技術総合研究所）</p> <p>（2）環境質評価のための微生物種検出DNAプローブの設計・評価と検出技術の環境への適用（独立行政法人産業技術総合研究所）</p>		
1. 序	<p>地球上の原核生物（バクテリアおよびアーキア）を主体とした微生物の総細胞数は10^{30}個と言われており、この総量は炭素ベースで地球上の植物の総量に匹敵すると言われてしている。それら微生物が地球環境中での物質循環において果たす役割は極めて大きいのは言うまでもなく、それらの微生物を正しく評価（定性・定量）するための技術と、その制御技術を含めた微生物利用技術の創成は環境保全において欠くことの出来ない技術の両輪である。しかしながら、環境微生物の遺伝的多様性は極めて高く、最近の研究では土壌10g中に10-100万種を超える微生物が生息している可能性が示唆されている。その上、そのほとんど（99%以上）は人為的な培養が不可能であり、“大腸菌群”に代表されるような従来の培養法を主体とした環境微生物計測指標や方法では、環境微生物の全容を正しく反映した情報を得られない。</p> <p>このような背景の中、近年、環境浄化のための遺伝子組換え微生物第一種利用時や、外来微生物を利用したバイオレメディエーションにおける環境動態解析や環境影響評価（微生物群集への評価）において、特定の微生物群とそれを取り巻く複合微生物群を定性・定量的に解析する緊急の必要性が生まれている。バイオレメディエーション指針（平成17年3月30日環境省・経済産業省告示）においては、培養した微生物を土壌等に導入する環境修復技術であるバイオオーグメンテーションの実施において人・動物等への安全性の評価や生態系への影響評価（すなわち環境質評価）を実施することを求めている。すなわち、生態系等への影響評価において、「当該土壌等の物質循環に深く関与している微生物のうち特定の種を選定して評価し、（中略）微生物の特定の種を選定して評価する場合は一般細菌、硝化菌、脱窒菌等を選定して当該菌数の増減を測定」することが求められており、好気性細菌、嫌気性細菌、メタン生成古細菌や硝化菌、脱窒菌等について、その変遷を評価する必要がある。また、環境浄化などの目的で各種微生物資材が活用されているが、その性状や有効性を微生物学的視点から正しく評価する手法と指針の整備が急務である。これらの分野において、複合微生物群を培養法に依存することなく迅速、簡便かつ網羅的に（遺伝的に多様な微生物群を同時並列的に）定性・定量するための技術は十分に確立されておらず、その基盤研究と技術の整備が急務となっている。また、それらの微生物群を分子生物学的に検出するにあたっては、その計測標準にあたる核酸標準物質が整備されている必要があるが、その整備はほとんど行われていないのが現状である。</p>		

2. 研究目的

本研究では、上記課題を克服するため、複合微生物生態系を培養法に依存することなく、迅速、簡便かつ網羅的に定性・定量を行うための基盤技術整備を行い、その技術を環境質評価（遺伝子組み換え微生物あるいは外来微生物導入後の環境試料、汚染水など）に活用することを目標とする。具体的には、(1)迅速・網羅的微生物検出のための基盤技術の開発、(2)環境質評価のための微生物種検出DNAプローブの設計・評価と検出技術の環境への適用の、二つのサブテーマを実施する。

(1)においては、迅速かつ網羅的な特定微生物・複合微生物群の検出、定量技術を開発するための基盤技術を開発し、その実施可能性を検討することを目的に研究を行う。本研究サブテーマでは、rRNA分子をバイオマーカーにした迅速かつ簡便な技術であるRNase H法に着目した。本技術は、我々が新しい原理に基づく定量技術として開発し、特許を申請(2003年)し、論文としても公表した(2004年、Applied and Environmental Microbiology誌)ものであり、現時点において最も簡便かつ迅速な微生物定量手法の一つと位置づけられるものである(図1)。この方法は、RNase HとDNAプローブを利用し、特定の配列を持つrRNAのみを切断後、ゲル電気泳動により切断および未切断rRNAを分画、検出することによって、標的rRNA分子量と全rRNA分子量の相対値を一回の酵素反応と電気泳動によって迅速に測定するものである。この技術をさらに高度化(迅速化、簡便化、高感度化)し、環境中の複合微生物群中の特定微生物の定量的検出をより容易にすることを旨とした研究を行った。

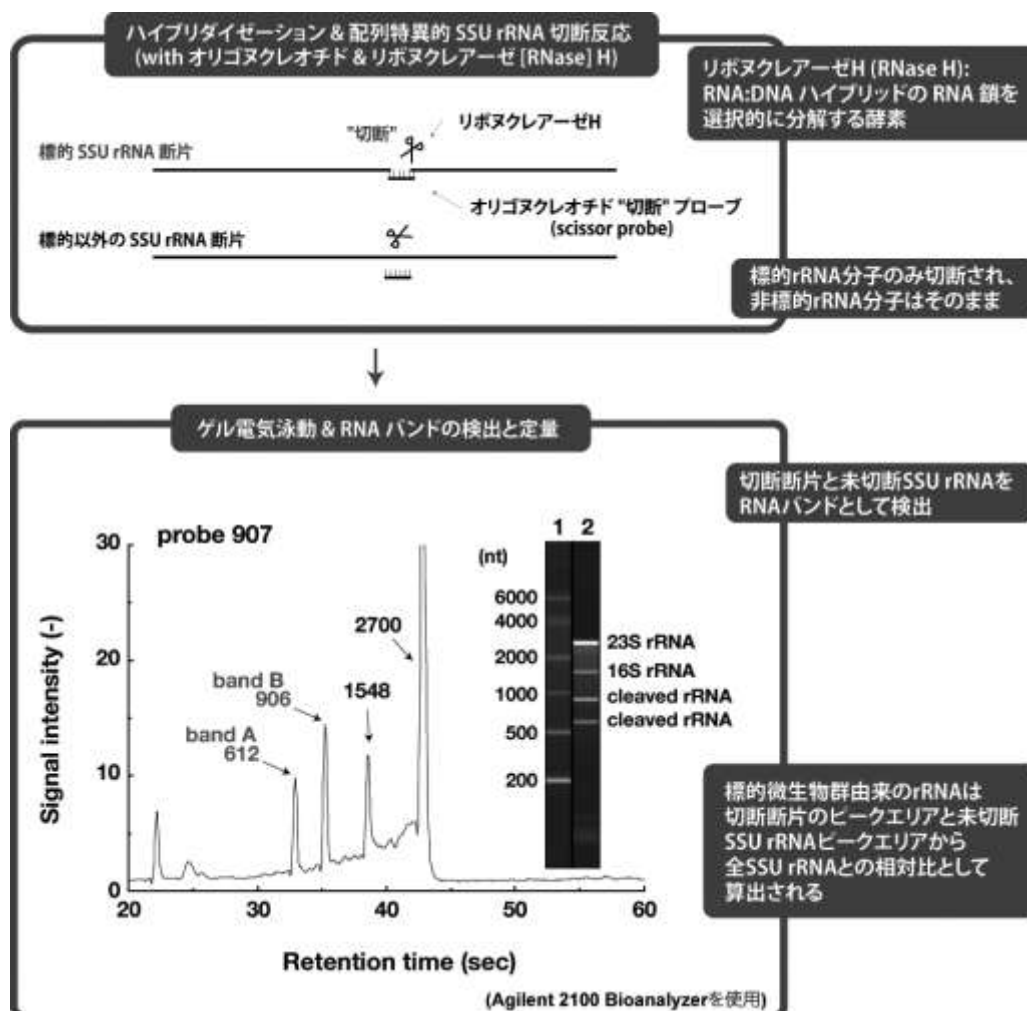


図1 rRNA配列特異的切断法 (RNase H法) の原理図

(2)においては、バイオレメディエーションや環境質評価に利用可能な微生物検出プローブ (16S rRNAを標的としたオリゴヌクレオチドプローブ) を整備し、様々な微生物分類群を検出するための

基盤を整備すると共に、その検出と定量のための標準核酸物質となるrRNAライブラリを整備した。また、(1)および(2)で整備した技術を実際の環境質評価に利用し、その有効性を確認することを目標に研究を行った。具体的には、16S (18S) rRNAを標的として、微生物の門から綱、目、科や種といった各種の分類階層に対応したプローブライブラリを構築し、その特性を評価することを目指した。ここでは、特にバクテリアおよびアーキアといった原核生物の門や綱レベル分類群を検出するためのプローブライブラリを構築し、その有効性を評価する。また、各門や綱を代表する微生物群や、環境指標として重要な微生物群（好気性細菌、嫌気性細菌、メタン生成古細菌や硝化菌、脱窒菌等）のrRNAをin vitroで合成するライブラリを構築し、その合成RNAを定量的測定における標準物質として利用するための環境を整備することを目指した。

3. 研究の方法及び結果

(1) 迅速・網羅的微生物検出のための基盤技術の開発に関する研究

はじめに、RNase H法の高度化を促進するための技術開発を行うことを目指した。具体的には、反応の迅速化、簡便化のため、RNAの抽出操作から電気泳動までの処理ステップを減少するための技術改良を行った。その結果、RNAの抽出から結果の取得まで約2時間程度で行うことが可能になった。

また、切断反応を高速化・安定化するため、*Thermus*属バクテリア由来の耐熱性RNase Hを利用した反応系の確立を行った。これまでは、*Escherichia coli*由来のRNase Hを利用していたが、RNase Hの反応自体は50℃で行っているため、その酵素としての安定性に問題があり、定量値が安定しないという問題があった。そこで、*Thermus thermophilus*由来のRNase H (Tth RNase H) を利用し、反応自体の安定化を行った。16S rRNAは、*E. coli* DH5 α の16S rRNA遺伝子をプラスミドにクローニングし、そのプラスミドを利用してin vitro合成を行ったものを使用した。切断効率と、一塩基の違いを識別する能力を調査するため、各種1塩基ミスマッチを含有した配列を含むDNAプローブを使用した。その結果、定量値の安定化が図れたと共に、一塩基の違いを識別する条件の設定が従来に比べ容易になったことが判明した。具体的には、Tth RNase H を利用した場合、同一条件下でのrRNAの切断率が大幅に向上したと共に、より高いホルムアミド条件下での切断が可能となった。このことは、新しい方法により、rRNAの高次構造によりDNAプローブが標的部位にアクセスできない、あるいはその結果切断が起こりにくいといった問題を回避できる可能性を示していた。また、Tth RNase H を利用した場合、*E. coli*由来RNase Hと同様に、ほとんどの一塩基の違いを識別することが可能であったと共に（ホルムアミド濃度を変化させることで、ほとんどの一塩基置換を検出しない反応条件を設定することが可能）、一塩基置換を識別するホルムアミド濃度の差異が広い（15%から20%に増加している）ことが判明した。

次に、RNase H法の高感度化に関する検討を行った。現在のRNase H法では、蛍光RNA染色剤を利用し、全てのRNA分子を電気泳動で検出しているが、このRNAには標的とする16S rRNA以外にも様々なRNA分子が混入しており、そのことが本手法の高感度化を妨げている。そこで、16S rRNA分子の3'側のみを特異的に蛍光ラベル化する技術を確立し、その方法とRNase H法を組み合わせることによって本手法を高感度化することを目指した。はじめに全原核生物に共通した配列を持つプローブによる切断条件と最適なプローブの選別を行った。その結果、1400座位付近の16S rRNAにハイブリッドを形成するプローブ (UNIV1392プローブ) の切断率が最も高いことが示された。また、バクテリア、アーキアに特異的なDNAプローブの切断条件を新たに検討し、特異的反応条件を見出した。

次に、0-methyl-RNA・DNA複合体を合成し、そのプローブと共にRNase HとKlenow fragmentをRNA試料に添加した蛍光ラベリング化を検討した。ここでは、0-methyl-RNA・DNA複合体と16S rRNAは特定の部位でハイブリッドを形成するが、0-methyl-RNA部位ではRNase Hによる切断反応が起こらない。一方、プローブのDNA部位では切断反応が起こるため、特定の部位でrRNA分子をトリミングすることが可能になる。その後、Klenow fragmentによりrRNAの3'末端部位で伸長反応が起こるが、ここで取り込まれるdCTPに蛍光物質をラベル化しておき、16S rRNAのみを蛍光標識化を試みた。UNIV1387プローブの5'末端側にTG or GGを付加した標識用プローブ、および一部を2'-O-Me化したUNIV1390キメラプローブを用いて、3'末端標識反応を行った結果、約305 ntのところに標識されたRNAフラグメントが確認された。また、UNIV1390プローブの一部を2'-O-Me化したキメラプローブでは、DNA部位が7-12ntのときに良好なラベリングが観察され、UNIV1390-2'OMe10で最も高い蛍光値が得られた。そのため、UNIV1390-2'OMe10プローブを利用して、*E. coli*、および*Methanosaeta concilii*由来の16S rRNAを人工的に所定量混合したものを作成し、その3'末端標識による測定を行った。その結果、混合した割合に応じて短いピークエリア（およびピーク高さ）が反応しており、

定量的な検出ができていたことが推察された。低濃度側の定量限界は0.5%程度であった。本技術は、SSU rRNAのみを配列特異的にラベリング化できるため、実際のRNA試料に対して適用した場合、有効性を発揮できることが示唆された。今後、本技術をlab-on-chip技術などを利用して小型化、微量化し、多数のサンプルを同時に解析できるようにするなどの工夫を行うことで、さらに簡便化、高速化することによって、網羅的な微生物定量が可能になると思われる。

(2) 環境質評価のための微生物種検出DNAプローブの設計・評価と検出技術の環境への適用

本課題では、各門や綱を代表する微生物群や、環境指標として重要な微生物群（好気性細菌、嫌気性細菌、メタン生成古細菌や硝化菌、脱窒菌等）のrRNAをin vitroで合成するライブラリを構築した。また原核微生物の門から綱、目、科や種といった各種の分類階層に対応したDNAプローブライブラリの構築を目指した。

rRNAを標的とする計測では、必ず外部標準として標的、あるいは非標的rRNAが必要となるが、そのrRNAを容易に作成するためのプラスミドライブラリの構築を進めた。バイオレメディエーション利用指針（平成17年3月30日に環境省と経済産業省が共同して告示）によると生態系等への影響評価において、「当該土壌等の物質循環に深く関与している微生物のうち特定の種を選定して評価し、・・・・（中略）・・・微生物の特定の種を選定して評価する場合は一般細菌、硝化菌、脱窒菌等を選定して当該菌数の増減を測定し、・・・・」とあり、炭素や窒素循環に寄与する好気性細菌、嫌気性細菌、メタン生成古細菌や硝化菌、脱窒菌等について、その変遷を評価する必要があることがわかる。このような観点から、各種嫌気性微生物群、好気性微生物群や硝化細菌等のゲノムDNAを調整し、そこから16S rRNA遺伝子を増幅、プラスミドの形で保持する系を構築した。それらのプラスミドは、in vitroでrRNAを転写、合成できるよう作成し、人工的に容易にrRNAを調整するためのライブラリを作成した（約170種類）。

また、本ライブラリを利用し、高効率にrRNAを調整する方法を確立した。RNAを合成する各種キットを比較し、高い効率と純度でRNAを合成できるキットを選別すると共に、合成されたRNAの安定性を評価した。

次に、既知の16S rRNA（18S rRNA）遺伝子配列をDDBJ等のデータベースより収集し、様々な微生物種由来rRNA配列を含むデータベースをARBプログラムにより構築した。このデータベースをもとに、様々な微生物グループに対して特異的なDNAプローブ配列の検索を行った。嫌気的環境下、あるいは脱塩素化に関係する微生物群（塩素化合物のバイオレメディエーションを想定）し、それらの微生物群に対して特異的なDNAプローブの設計を進めた。特に嫌気性微生物群を検出するDNAプローブ群を約70種類整備し、その特異的切断条件を評価した。その結果、いずれのDNAプローブとも、RNase Hによる反応において、標的微生物由来rRNAの切断が確認されたが、非標的rRNAでは切断が起こらないことが確認された。

次に、これらのDNAプローブを利用し、特定の微生物グループを環境試料中で検出することを試みた。はじめに、モデル検出対象として、嫌気生廃水処理汚泥を利用し、上記プローブが対象微生物群を検出できるかどうかを確かめた。本方法を活用し、下水消化汚泥を含む6種類の汚泥を利用し、メタン生成古細菌群、および嫌気性共生細菌群を定量的に検出した。これらの結果は、既報のメタン生成古細菌の16S rRNA遺伝子に基づく群集構造解析結果やその他既往の研究結果とも高い相関を示し、本手法がこれらの微生物群の簡便な定量的モニタリング手法として利用できることが示された。また、作成したプローブを土壌サンプルに適用する試みを行った。その一例として、標的DNAを*Dehalococcoides* 16S rRNA遺伝子として定量的PCRを行った。これらの結果から、本研究で整備したDNAプローブは、DNAを標的とした定量的PCRでのプローブとしても利用でき、RNAを標的としたRNase H法でも利用できることが示された。今後、これらのプローブのデータベースが蓄積されることによって、さらに詳細に環境微生物のモニタリングと、環境質の評価が可能になると思われる。

4. 考察

概ね予定通り研究開発を進めることができた。サブテーマ(1)においては、基礎的検討課題であるrRNAの3'末端蛍光標識化に成功した。まだ実用レベルに達しているとは言い難いが、今後更に詳細な検討を進め、その完成を目指したい。

サブテーマ(2)においては、概ね予定通りDNAプローブの設計とrRNAライブラリの構築が進行した。今後、DNAプローブとrRNAライブラリの充実を進める予定である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

現在、微生物群をrRNAやその遺伝子で検出する技術、あるいは定量PCRなどの技術によって定量

する方法は各種開発されているが、それらバイオマーカーを利用し、迅速（2時間程度）に微生物群の存在量を推定する技術はまだ開発の途上にある。その中で、我々の研究グループではrRNAを標的とした、原理的に新しく、迅速かつ簡便な手法を開発している。この手法は現在rRNAを標的とした定量法では最速であり、かつ最も簡便な技術である。この日本発の技術を基盤として、それをさらに発展させることで、より迅速かつ簡便な微生物定量技術とその基盤を提供できる。

また、作成した嫌気性微生物群用検出するプローブ群は、今後様々な対象（エネルギー回収型嫌気性消化法や微生物燃料電池等の嫌氣的バイオプロセスの評価、嫌氣的な生態系）に適用可能となり、その適用範囲と分野も広い。

（2）地球環境政策への貢献

環境改善、浄化やエネルギー生産などにおいて微生物の果たす役割は大きい。従って、本研究課題で構築を目指す複合微生物評価技術は、様々な微生物検出、評価につながる基盤技術の創成であるため、様々な地球環境研究（二酸化炭素削減のためのバイオマスエネルギーの利用の際のメタン発酵、あるいはバイオマスからの直接電気回収型バイオプロセス評価・診断や、各種の生物学的環境浄化プロセス評価、環境質そのものの評価）への重要な研究手段の提供につながる。

また、遺伝子組み換え微生物の第一種使用時において、カルタヘナ法に基づくバイオレメディエーション利用指針に関わる様々な微生物評価（組換え微生物の環境動態追跡、環境微生物群集への影響評価など）において有用な技術と基盤（計測標準）を提供し、その指針の具体化を進める上での支援技術となり得ると考えられる。

6. 研究者略歴

課題代表者：関口勇地

1971年生まれ、長岡技術科学大学大学院工学研究科修了、工学博士、現在独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門バイオメジャー研究グループ長

主要参画研究者

（1）：関口勇地（同上）

（2）：野田尚宏

1960生まれ、早稲田大学大学院理工学研究科博士後期課程修了、工学博士、現在独立行政法人産業技術総合研究所生物機能工学研究部門バイオメジャー研究グループ研究員

7. 成果発表状況（本研究課題に係る論文発表状況。）

(1) 査読付き論文

1) Narihiro, T., T. Terada, A. Ohashi, J.H. Wu, W.T. Liu, N. Araki, Y. Kamagata, K. Nakamura and Y. Sekiguchi. 2009. Quantitative detection of culturable methanogenic archaea abundance in anaerobic treatment systems using the sequence-specific rRNA cleavage method. ISME J. in-press.

(2) 査読付き論文に順ずる成果発表（社会科学系の課題のみ掲載可）

なし