

RF-076 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

(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

生物機能工学研究部門 バイオメジャー研究グループ 関口勇地

平成19～20年度合計予算額 8,805千円

(うち、平成20年度予算額 4,255千円)

※ 上記の合計予算額は、間接経費2,032千円を含む

[要旨] 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。しかしながら、そのような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。本研究課題では、日本発の分子生物学的微生物定量技術であるRNase H法を発展、応用し、環境動態解析や環境影響評価のための複合微生物解析技術を開発することを目的とした。平成19年度はRNase H法の高度化を促進するための技術開発を行った。具体的には、反応の迅速化と簡便化、および耐熱性RNase Hの使用による切断条件や性能の評価を行い、より簡便で高効率な技術に改変した。また、生物由来SSU (small-subunit) rRNA全てを切断するユニバーサルプローブ、およびバクテリア、アーキアの16S rRNAを切断する条件をプローブの選択と切断条件を決定した。また、それらのプローブを利用したrRNAの3'末端蛍光標識化技術の検討を開始した。これらの結果は2009年4月発行の論文に掲載された。また、O-メチル化DNAプローブを利用してrRNAの切断効率を高められることが実験的に証明され、RNase H法をさらに高度化できることが示された。RNase HとO-メチル化DNAプローブを利用した配列特異的3'末端蛍光ラベル化法を確立し、RNase H法と配列特異的蛍光ラベル化法を組み合わせる方法で特定rRNA量の定量を行った。その結果、0.5-100%の混合率と定量値との間に高い定量性（直線性）が見られた。本手法においては、特定のRNA配列のみを蛍光標識化しているため、他のRNAが大量に混入するような試料での定量において有効であることが示された。これらの結果は、従来のRNase H法をより高度化した結果であると共に、今後の複合微生物由来RNA定量技術の高感度化の基盤情報を提供するものである。

[キーワード] 複合微生物、微生物定量技術、16S rRNA、DNAプローブ、RNase H

1. はじめに

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(Whitman et al., 1998)、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いている。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、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(Sekiguchi, 2006)。

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。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必要である。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。

このような、環境中での多様な複合微生物群の中から特定の微生物群のみを迅速かつ簡便に定量する技術は、様々な環境質評価や生物学的プロセス(廃水処理や環境浄化プロセスなど)の診断において不可欠な技術であるが、遺伝学的情報を利用した分子生物学的技術を利用したとしても、その技術はまだリアルタイム、元位置でのモニタリングに利用できるほど進展しているとは言いがたいのが現状である。また、遺伝的に多様な複合微生物群そのものを総合的に解析(個々の微生物群の網羅的な定性・定量)は、同じく分子生物学的手法であるDNAマイクロアレイを利用した方法が有力であるが、まだ克服すべき様々な課題が山積しており、まだ実用レベルの技術には至っていないのが現状である。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)において必要とされる、特定の微生物群とそれを取り巻く複合微生物群を定性・定量的に解析するためには、今後より迅速かつ簡便に特定の微生物群のみを定量する技術を整備する必要がある。

2. 研究目的

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(Uyeno et al., 2004)、特許を申請(2003年)し、論文としても公表したものであり、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)(Uyeno et al., 2008; Uyeno et al., 2007)。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。本サブテーマでは、RNase H法を発展、応用し、環境動態解析や環境影響評価のための複合微生物解析技術を開発することを目指した。この技術をさらに高度化(迅速化、簡便化、高感度化)を行い、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目指した研究を行う。また、網羅的な複合微生物検出技術の開発のため、RNase H法を迅速化、高度化し、多種の微生物群を同時、並列的に検出、定量を行うための基盤技術を創成することを目指す。

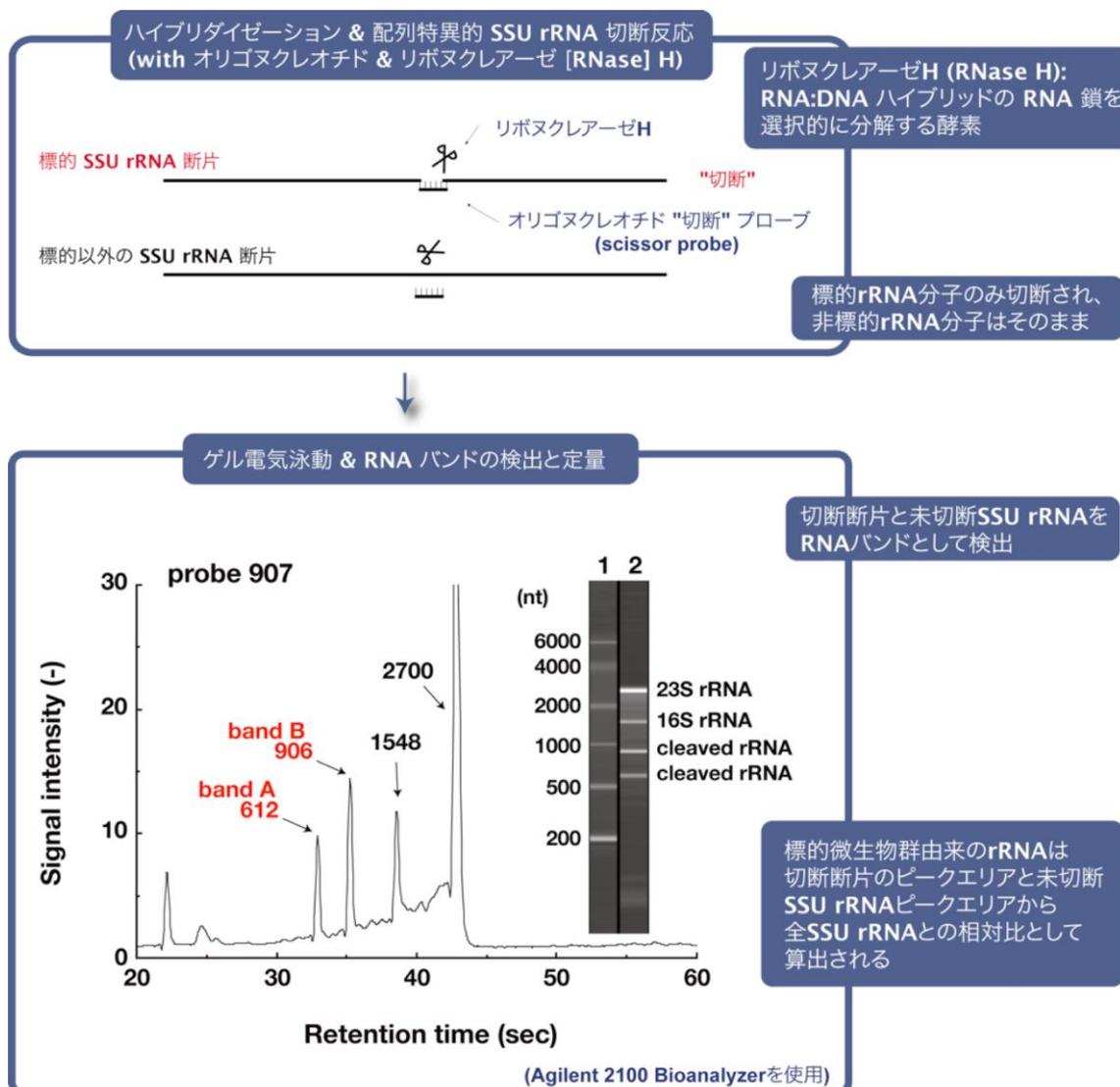


図1 RNase H法（配列特異的rRNA切断法）の原理

3. 研究方法

はじめに、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。その方法は、4. 結果・考察に詳細と共に記載した。

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。

次に、RNase H法の高感度化に関する検討を行った。ここでは、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。

次に、O-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。これらの方法は、方法そのものの確立を含んでいると共に、結果と考察に密接に関係しているため、詳細は全て4. 結果・考察に詳細と共に記載した。

4. 結果・考察

本研究課題においては、はじめに反応の迅速化、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プロトコルの最適化、および技術改良を行った。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。反応プロトコルの概要を図2に示す。RNase Hとオリゴヌクレオチドプローブを用いた16S rRNAの配列特異的切断は、既報に基づく方法を基にした(Uyeno et al., 2004)。

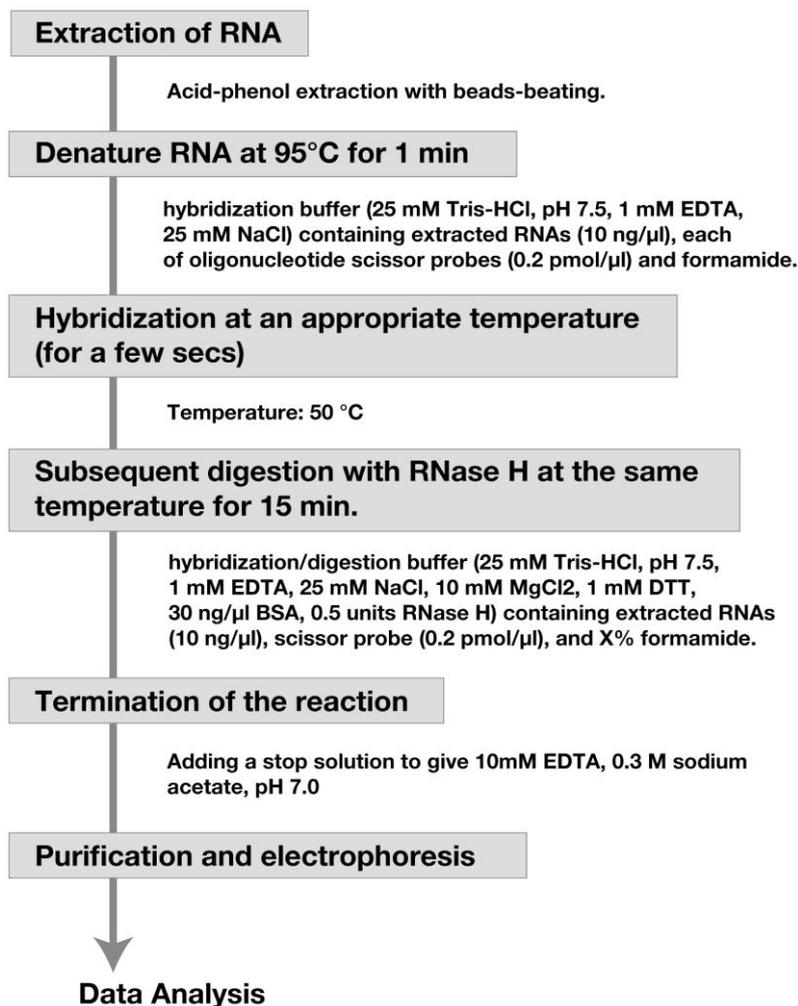


図2 RNase H法の実験フロー図

次に、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を利用していましたが、RNase Hの反応自体は50 °C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。また、実験の実施者間で得られるデータにばらつきが見られると共に、古いRNase H試薬を利用した場合、顕著に切断効率が低下する現象も見られていた。そこで、*Thermus thermophilus*由来のRNase H (TOYOBO社製) を利用し、反応自体の安定化を行った。*T. thermophilus*由来RNase H (Tth RNase H、 TOYOBO) を利用したrRNAの配列特異的切断は、上記方法において使用していた*E. coli*由来RNase H濃度と等量のTth RNase Hを*E. coli*由来RNase Hと置換して添加することによって行った。切断反応のストリンジェンシーの調整は、反応時のホルムアミド濃度を変化させることで調整した。切断後のRNAは、Agilent 2100 BioanalyzerとRNA Nano Kit (Agilent) を利用した。確立したプロトコールの詳細を以下に示す。

・使用する試薬

(i) 10x Hybridization buffer	1.0 mL:	
250 mM Tris(pH 7.5)	250 μ L	1M Tris (pH 7.5)
10 mM EDTA	20 μ L	0.5M EDTA(*)
250 mM NaCl	50 μ L	5M NaCl
	680 μ L	RNase-free H ₂ O

本試薬は-20 °Cで保存する(1ヶ月まで保存可能)。ここで使用するEDTA solutionは、pH 7.5のものをを用いるのが望ましいが、一般的なpH 8.0のものを使用しても差し支えない (以下も同じ)。

(ii) 10x Enzyme buffer	1.0 mL	
200 mM Tris (pH 7.5)	200 μ L	1M Tris(pH7.5)
100 mM MgCl ₂	100 μ L	1M MgCl ₂
125 mM NaCl	25 μ L	5M NaCl
10 mM DTT	20 μ L	0.5M DTT
300 μ g/mL BSA	12 μ L	BSA(25mg/mL)
	643 μ L	RNase-free H ₂ O

本試薬も-20°Cで保存する(1ヶ月まで保存可能)。MgCl₂とBSAは反応に必須なものである。また、DTTを添加することでRNase HのSH-基が保護されて、反応が促進されると思われる。DTTを添加した方が安定性がよいことが判明している。また、DTT (-30°Cで保存) は、0.078g/1.0mL 0.01M NaOAc(pH 5.2)となるように溶解後、0.22 μ mのフィルターでろ過除菌し(オートクレーブ不可)、小分けして-20°Cで保存する (未解凍で4ヶ月間保存可能であることが判明した)。

(iii) 3x Stop buffer	1.0 mL:	
30mM EDTA	60 μ L	0.5M EDTA
0.9M NaOAc (pH 7.0)	300 μ L	3M NaOAc (pH 7.0)
	640 μ L	RNase-free H ₂ O

本試薬は、EDTAが析出するので、調製当日のみ使用可能。EDTAはRNase Hの反応を停止させるために使用している。NaOAcは、後工程であるエタノール沈殿でのRNA沈殿生成のために添加し

ている。エタノール沈殿の間にEDTAが沈殿することを防ぐため、NaOAcは必ずpH 7.0のものを用いた方が良かったことが判明した。

(iv) *Thermus thermophilus* Ribonuclease H (Tth RNase H) <TOYOBO, 1000 units, code; RNH-201>

Dilution buffer;	1.0 mL:	
20 mM NaOAc (pH 5.5)	6.7 μ L	3 M NaOAc (pH 5.5)
1 mM DTT	2 μ L	0.5 M DTT
50 % Glycerol	500 μ L	Glycerol
	491 μ L	RNase-free H ₂ O

供給される酵素を、上記dilution bufferで5 units/ μ Lとなるように希釈し、working solutionを作成、-20 °Cで保存する。working solutionは1週間程度使用可能であることが判明した。Dilution buffer自体は、-20 °Cで6ヶ月間程度保存可能である。

ここで、代替酵素として、Hybridase™ Thermostable RNase H <EPICENTRE, 5 U/ μ L, 100 U, H39100>を利用したが、反応時の酵素濃度を0.1Uとしても、*E. coli* 16S rRNA（調整方法は下記参照）でEUB338プローブ（バクテリア由来16S rRNA特異的プローブ）{Amann et al., 1990 #529}を利用し切断した場合、58 %程度しか切断されず、本酵素は利用できないことが判明した。本酵素の活性が低い理由は不明である。同様に、*Thermococcus* 由来 RNase Hが添付されているキット（CycleavePCR® Core Kit <TaKaRa CY501に含まれる>）を最終濃度4Uで使用し、*E. coli*由来16S rRNAを切断した場合、Tth RNase H と同等に切断されることが分かった。

(v) RNA solution (約1 μ g/ μ L)

(vi) Oligomer DNA (1 pmol/ μ L)

(vii) フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール[PCI](25:24:1)(RNA抽出用 ; pH 5.1)

(viii) 100%エタノール、70%エタノール

・ 操作手順

1. あらかじめ、サンプル数 \times 5 \times 1.2 μ Lとなるように、10x Enzyme buffer 99 %、RNase H working solution 1 %の割合で混合後、冷蔵しておき、手順4.で使用する10分前に、このRNase H solutionを50 °Cに加温しておく。
2. Hybridize solutionとして、RNA solution 1 μ L, 10x Hybridization buffer 2.5 μ L, Oligomer DNA 1 μ L, (Formamide + RNase-free H₂O) 40.5 μ Lを、0.2 mLチューブ内で混合する。
3. サーマルサイクラーに反応チューブをセットし、95 °Cで1分間加熱後、50 °Cまで冷却する。
4. 50 °Cに到達してから1分後に、1.で調製したRNase H solutionを5 μ L添加し、15分間反応させる。
5. 3x Stop buffer を25 μ L添加して、サーマルサイクラーからチューブを取り出す。軽くスピ

ダウンする。

6. RNase-free H₂O を25 μL, PCIを100 μL添加し、軽く攪拌後、デスクトップ遠心機で3分間遠心する。
7. 遠心後の上清を1.5 mLチューブに移し、x2.5 volの100 %エタノールを加え、軽く攪拌して-80 °Cで15分間静置する。ここで、沈殿させるときに凍結させると、EDTAが沈殿し、後のRNA電気泳動に影響するので注意する。
8. 4 °C, 15000 rpm, 15分間遠心後、上清を吸い出して、500 μLの70 %エタノールを加え、軽く攪拌する。遠心分離後に、RNAの沈殿は通常見えないので、上清を吸い出すときは注意する。
9. 4 °C, 15000 rpm, 5分間遠心後、上清を吸い出して、アスピレーターで減圧しながらデシケーター内で5分間乾かす。
10. RNase-free H₂O 4 μLに溶解し、ドライブロックバスで70°C、3分間インキュベートする。
11. 溶解したサンプル3 μLを用いて、Agilent 2100 bioanalyzerを用いて解析する。

表 1. *E. coli* 16S rRNA の切断に使用した DNA 切断プローブ

Name	Sequence (5'-3') ^a	Target position	PM or MM ^b	Probe length (mer)	G+C content (%)
327 probes (around 50 % G+C content)					
327-18	TGTCTCAGTTCCAGTGTG	312-329	PM	18	50
327-18M9a	TGTCTCAGT <u>A</u> CCAGTGTG	312-329	MM	18	50
327-18M9c	TGTCTCAGT <u>C</u> CCAGTGTG	312-329	MM	18	56
327-18M13	TGTCTCAGTTCC <u>G</u> CTGTG	312-329	MM	18	56
327-18M14	TGTCTCAGTTCC <u>A</u> CTGTG	312-329	MM	18	50
327-18M6	TGTCTG <u>A</u> GTTCCAGTGTG	312-329	MM	18	50
327-18M1	<u>A</u> GTCTCAGTTCCAGTGTG	312-329	MM	18	50
327-18M18	TGTCTCAGTTCCAGTGT <u>C</u>	312-329	MM	18	50
327-20	GTGTCTCAGTTCCAGTGTGG	311-330	PM	20	55

^a Bases with underline represent mismatch sites with targeted rRNA sequences.

^b PM represents perfect-match probes, and MM indicates probes containing single-base mismatches with the targeted rRNA.

上記のようなプロトコルを確立し、rRNAの切断実験を行った。16S rRNAは、*E. coli* DH5α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、*E. coli*由来rRNAの切断には既報(Uyeno et al., 2004)で使用したDNAプローブ(各種1塩基ミスマッチを含有した配列を含む)を使用した(表1)。

その結果の一例を図3に示す。この結果から、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（図3）。

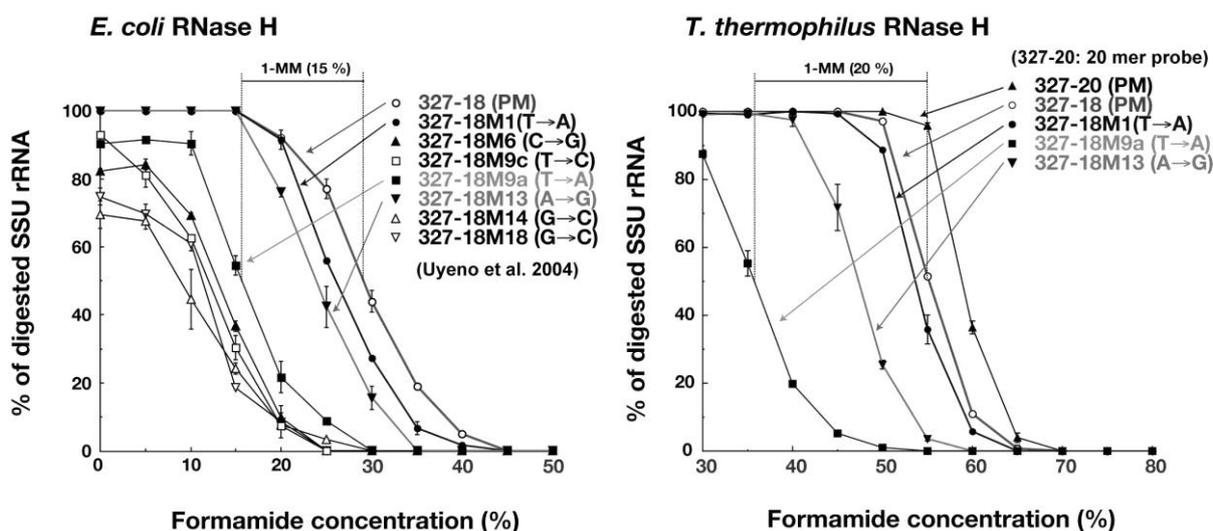
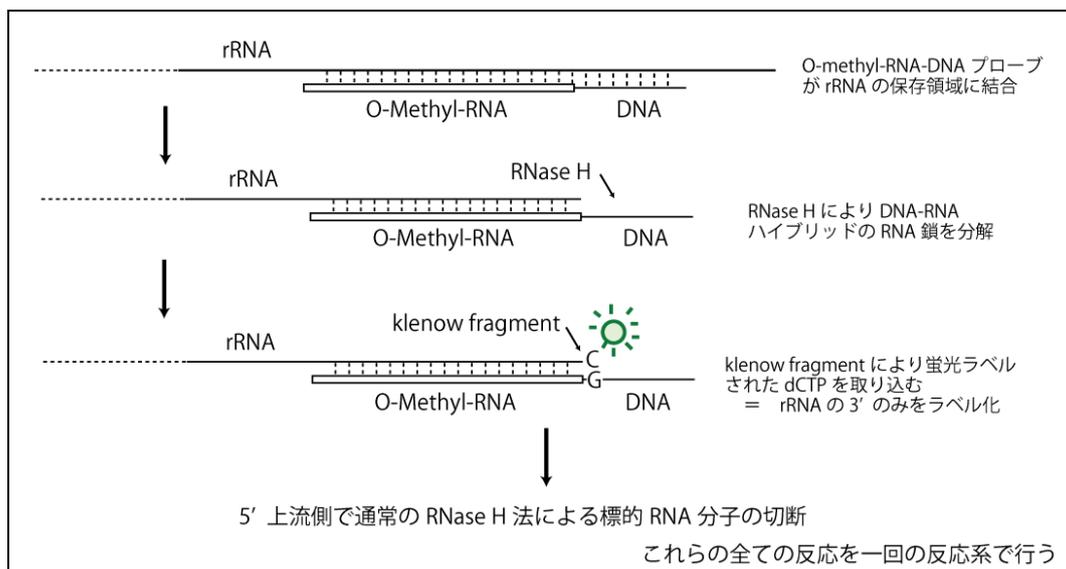


図3 大腸菌由来RNase Hを使用した切断パターン（左図）と*T. thermophilus*由来耐熱性RNase Hを利用した切断パターン（右図）。それぞれ、異なるホルムアミド条件下で327プローブ（大腸菌rRNAに特異的）を利用し大腸菌由来16S rRNAを切断した際の切断率を示している。PMとラベルされたプローブ（327-18など）は大腸菌16S rRNAに完全に一致する配列を有するが、他のプローブ（327-18M1など）はプローブ内部に1塩基置換を有している。

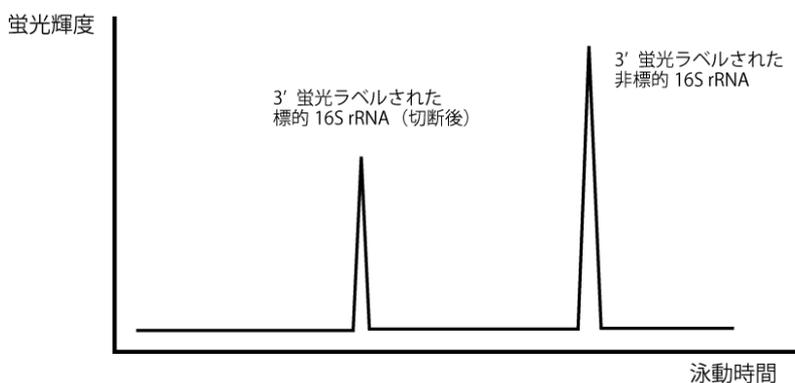
次に、切断に要する反応時間を検討したところ、Tth RNase H を利用した場合、*E. coli*由来RNase Hと比較して速やかに反応が進行しており、15分間の反応時間で十分に反応が終了していることが判明した。また、定量的な結果はないが、Tth RNase H を利用した場合、定量値が安定し、実験の実施者間で得られるデータにばらつきが解消された。また、比較的古いRNase H試薬を利用した場合、切断効率が低下する現象も解消されていた。これらの結果は、Tth RNase Hを利用することによって、本手法の高感度化、安定性の向上を達成できたことを示していた。

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、通常抽出されるRNAには標的とする16S rRNA以外にも様々なRNA分子（例えば、23S rRNAやmRNA、tRNAやそれらの分解後RNAなど）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認し、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（図4）。



核酸染色を行わない電気泳動による electropherogram



→ 両ピークから全 16S rRNA 中の標的微生物由来 16S rRNA 量を推定

図4 O-methyl-RNA・DNA複合体によるrRNAの3'蛍光ラベリング化の原理とそれを利用したRNase H法の高感度イメージ図。

本手法では、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認し、その方法とRNase H法を組み合わせることによってRNase Hによる微生物定量手法を高感度化する。ここでは、全原核生物に共通した配列を持つ1400座位付近の16S rRNAにハイブリッドを形成する

O-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試料に添加する（図5）（Huang et al., 1996; Huang et al., 2003; Huang et al., 2003）。その結果、O-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、O-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のみを蛍光標識化する。ここでのRNase Hによる切断反応時に、特定の微生物由来rRNA分子と結合するDNAプローブを混ぜておくことによって、標的微生物由来RNA蛍光ラベル化と同時に切断処理することも可能であり、この一回の反応により、RNAのラベル化と切断反応を達成することを目指した。

本手法では、全16S rRNAを切断し、蛍光ラベリングするための、全原核生物に共通した配列を持つプローブ（ユニバーサルプローブ）が必要である。そのため、ユニバーサル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。使用した切断プローブのリストを表2に示す。対象のrRNAは、各ドメイン（バクテリア、アーキア、ユーカリア）を代表するものとして、*Escherichia coli* (DSM5717)、*Methanosaeta concilii* (DSM3671)、*Saccharomyces cerevisiae*の16S rRNAもしくは18S rRNAをin vitro合成し、使用した。それぞれのプローブを利用して、上記のRNase H切断プロトコールを利用し、それぞれの切断効率を評価した結果、1400座位付近の16S rRNAにハイブリッドを形成するプローブ（UNI1390プローブ）の切断率が最も高いことが示された（図5）。本プローブを利用した場合、*Escherichia coli* (DSM5717)、および*Saccharomyces cerevisiae*のSSU rRNAは完全に切断することが可能であった。一方、*Methanosaeta concilii* (DSM3671)の16S rRNAは、同一条件下（ホルムアミド濃度45%）で90%未満の切断率を示し、全てのrRNA分子を切断するには至らなかったが、高い切断率を示していた。一方、それ以外のプローブを利用した場合（図4、UNIV530プローブ）、*Escherichia coli* (DSM5717)、および*Saccharomyces cerevisiae*のSSU rRNAは完全に切断することが可能であったが、*Methanosaeta concilii* (DSM3671)の16S rRNAは低い切断率に留まっている。配列上、これらのユニバーサルプローブは完全に標的分子とハイブリッドを形成し、ミスマッチなどは無いことは確認しているが、このような切断効率の違いが見られたことは、それぞれのrRNAのば高次構造上の問題で、プローブが標的部位に近接するのを妨げている可能性が考えられた。他のユニバーサルプローブでも同様の結果が得られたため、本研究ではUNI1390プローブをユニバーサルプローブとして利用することとした。

また、同様に、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（図4）。それぞれのプローブにおいて、標的とするrRNA分子のみを高効率で切断する条件が見出された。標的rRNA分子を100%切断し、非標的分子は切断しないホルムアミド条件を、それぞれのプローブでの最適条件とし、以後の実験に利用した。

表2 使用したユニバーサルプローブの特性

Probe name	<i>E. coli</i> position	Target organisms	Probe sequence (5-3)	mer	GC (%)	Year	Authors	Refs
<i>Bacteria</i>								
EUB338	338-355	<i>Bacteria</i>	GCTGCTCCCGTAGGAGT	18	66.6	1990	Amann et al.	Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919-1925
EUB338I	338-355	I	GCAGCTCCCGTAGGAGT	18	66.6	1999	Dairm et al.	Syst. Appl. Microbiol. 22, 434-444
EUB338II	338-355	II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	18	66.6	1999	Dairm et al.	Syst. Appl. Microbiol. 22, 434-444
EUB338III	338-355	III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	18	66.6	1999	Dairm et al.	Syst. Appl. Microbiol. 22, 434-444
<i>Archaea</i>								
ARC915	915-934	All Archaea	GTGCTCCCGCCCAATTCCT	20	65	1988	Stahl et al.	Appl. Environ. Microbiol. 54, 1079-1084
<i>Universal</i>								
UNI530	515-530	All organisms	CCGCGGCKGTGGCAC	16	-	1991	Lane, D.J.	Nucleic Acid Tech. in Bac. Syst.
UNI519	519-536	All organisms (universal)	GWATTACCGGCKGCTG	18	-	1985	Lane, D.L. et al.	PNAS 82, 6955-6959
UNI907r	907 - 928	All organisms (Bacteria)	CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT	22	45.5	1992	Amann et al.	Appl. Env. Microbiol. 58:614-23
UNI907f2	907-928	Archaea	CCCCGCCAATTCCTTTAAGTTT	22	45.5	2007	Sekiguchi	This study
UNI1406r	1392-1406	All organisms (universal)	ACGGCGGTGTGTRC	15	-	1986	Pace, NR	Adv. Microb. Ecol. 9
UNI1407r	1392-1407	All organisms (universal)	GACGGCGGTGTGTRC	16	-	1985	Lane, D.J.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82
UNI1390r	1390-1407	All organisms (universal)	GACGGCGGTGTACAA	18	61.1	1996	Zheng et al.	AEM 62, 4504-4513
UNI1389	1390-1406	All organisms (universal)	ACGGCGGTGTTRCAA	17	64.7	2001	Liu et al.	Env. Microb. 3: 619-629
UNI1421r	1406-1421	All organisms (universal)	ACGGCGGTGTTRCA	16	-	1991	Lane, D.J.	Nucleic Acid Tech. in Bac. Syst.
UNI1489r	1471-1489	Archaea and <i>Bacteria</i>	GGTTACCTTTACGACTT	19	50	1991	Weisberg, W.	J. Bacteriology 173
UNI1492r	1471-1492	Archaea and <i>Bacteria</i>	TACGGYTACCTTTACGACTT	22	-	1991	Lane, D.J.	Nucleic Acid Tech. in Bac. Syst.
UNI1510r	1496-1510	All organisms (universal)	GGGTACCTTTGTTAGG	15	53.3	1995	Lin, C	Appl. Environ. Microbiol. 61
UNI15102r	1494-1510	-	GGGTACCTTTGTTACGAC	17	52.9	2007	Sekiguchi, Y.	This study
UNI1541r	1525-1541	Archaea and <i>Bacteria</i>	AAGGAGGTGWTCCARC	17	-	1992	Lane, D.J.	Nucleic Acid Tech. in Bac. Syst.
UNI1542r	1528-1542	All organisms (universal)	AAAGGAGGTGTGCCA	15	44.4	1995	Lin, C	Appl. Environ. Microbiol. 61

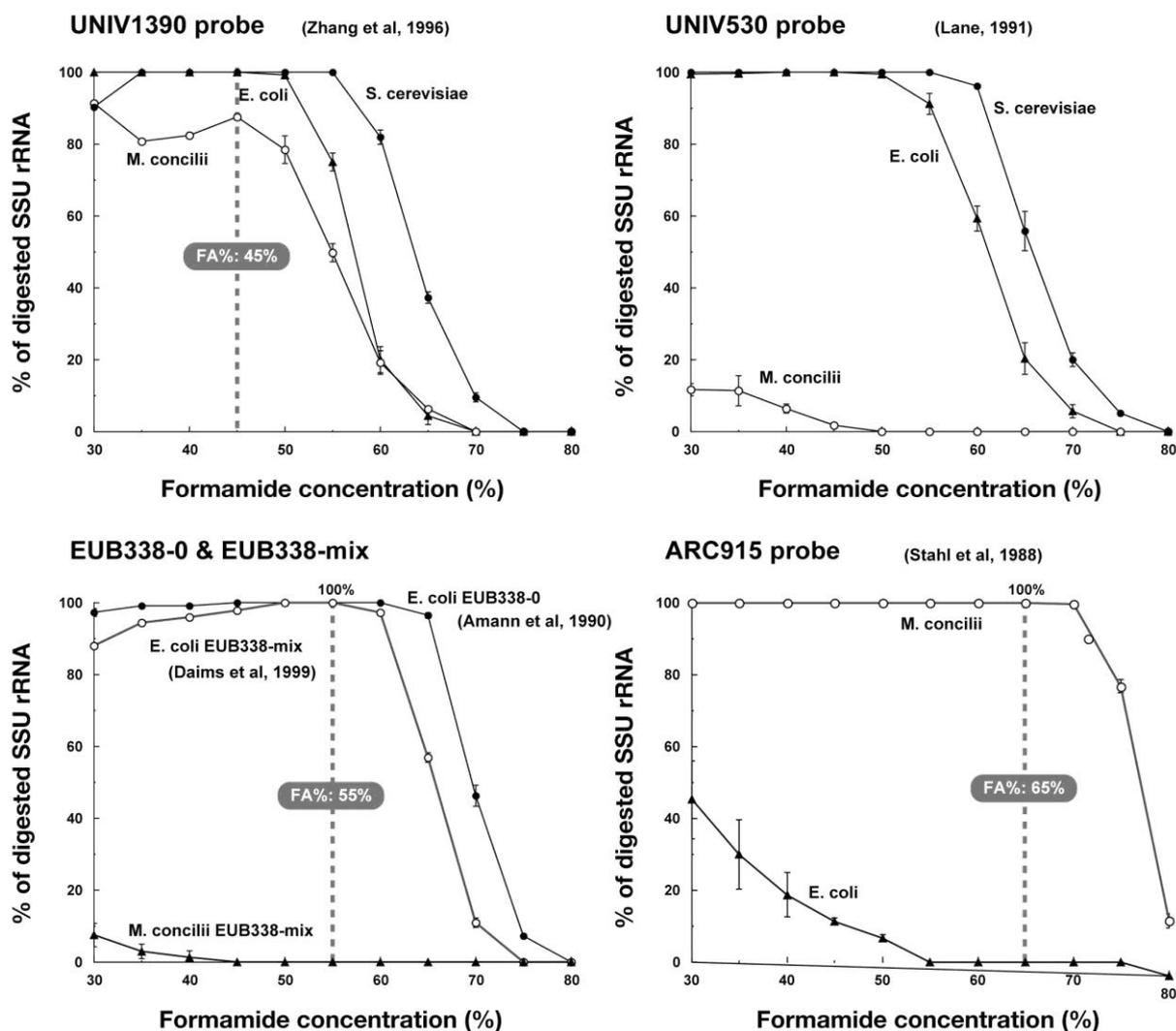


図5 大腸菌、メタン生成アーキア (*Methanosaeta concilii*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来SSU rRNAの切断パターン。それぞれ、異なるプローブ(ユニバーサルプローブおよびアーキア、細菌用プローブ)によって各種ホルムアミド条件下でrRNAを切断している。特異的な切断が見られているホルムアミド濃度 (FA%) を点線で示す。

次に、切断条件を最適化したrRNA標的プローブ(ユニバーサル、細菌用、アーキア用)によって、8種のアーキア、22種の多数の門にまたがる細菌、および1種のユーカリア(真核生物)の切断を試みた(図6)。全てのrRNAは、サブテーマ(2)で作製したin vitro RNA合成ライブラリから選択したプラスミドからRNAを合成し、切断反応に供した。

その結果、細菌用、アーキア用プローブとも標的とするrRNAはほぼ100%の切断率で切断を行ったのに対し、非標的rRNAでは全く切断が行われなかったことが判明した(図5)。従って、両DNAプローブとも特異的かつ高効率に標的rRNAを切断できることが実証された。

一方ユニバーサルプローブであるUNIV1390 (Zheng et al., 1996)では、対象とする生物種によって異なる切断率を示した(図6)。配列上、対象としている全ての生物のrRNAはUNIV1390プローブと相補的な配列を有していることが確かめられている。従って、この切断率の相違は、各rRNAの持つ高次構造等に由来するDNAプローブのアクセス効率が影響していると考えられた。3'末端の蛍光ラベリングを考えた場合、全てのrRNA配列を均一に切断しラベリング化することが重要である。従って、この切断効率の不均一性は以後の研究に影響する。今後、この問題を解決する必要があることが示された。

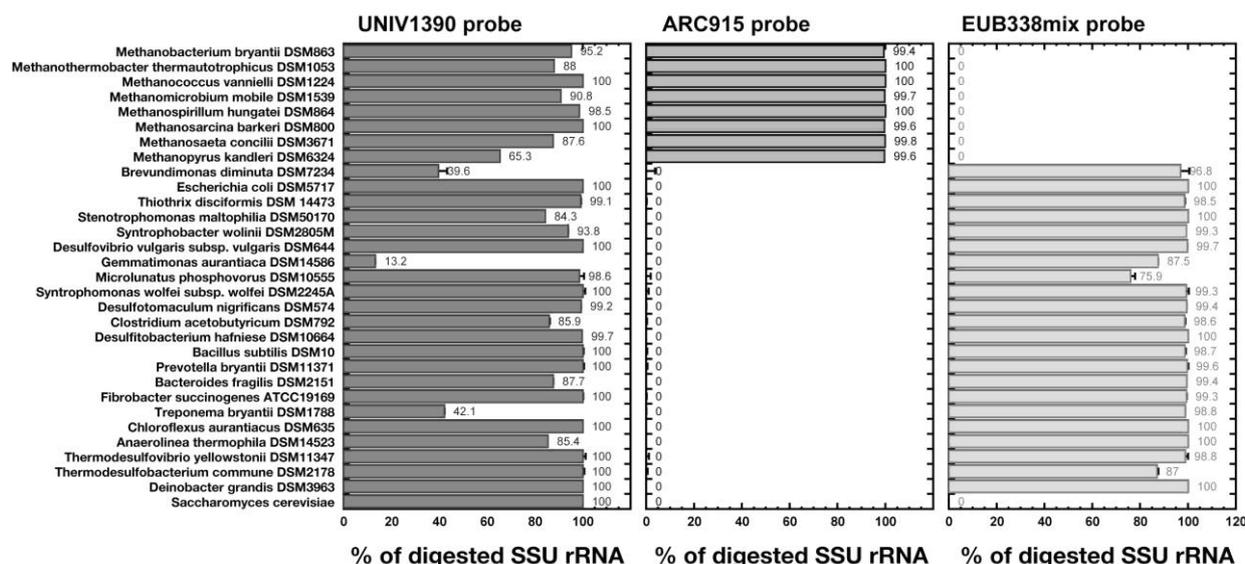


図6 切断条件を最適化したrRNA標的プローブ(ユニバーサル: UNIV1390、アーキア: ARC915、バクテリア用EUB338)によって、8種のアーキア、22種の多数の門にまたがるバクテリア、および1種のユーカリア(真核生物)を切断した際の切断効率。

次に、ユニバーサルプローブであるUNIV1390を利用したrRNA3'末端の蛍光標識反応が可能であるかどうかを検討した。様々な試行錯誤を経て、以下のような標識プロトコルを確立した(Sobczak et al., 2002)。

・使用する試薬

(i) 酵素

Ex Taq polymerase <TaKaRa, RR001A, 250U>

KlenTaq LA DNA polymerase <SIGMA, D5062, 125U>

(ii) バッファー

各酵素に付属の10×bufferを使用する。

(iii) 100 pmol/ μ L 標識用2'-O-Me化オリゴ/DNAキメラプローブ

詳細は表3を参照。

(iv) Cy5-dCTP オリゴ <GE ヘルスケア, PA55021>

(v) RNA template (最終濃度0.6 μ g/ μ L)

切断反応は上記RNase H反応プロトコルを参照。in vitro合成RNAを用いる場合は、in vitro RNAサブテーマ(2)のin vitro RNA合成プロトコルを参照。

(vi) 100%エタノール、70%エタノール

・ 操作手順

1) 反応溶液を調製する。

	for 10 μ L (後添加する酵素を含めた容量)	
10 \times buffer	1.0 μ L	
100 pmol/ μ Lオリゴプローブ	2.0 μ L	20 μ M (最終濃度)
1 mM Cy5-dCTP	0.2 μ L	20 μ M (最終濃度)
1 mM dATP	0.2 μ L	20 μ M (最終濃度)
1 mM dTTP	0.2 μ L	20 μ M (最終濃度)
1 mM dGTP	0.2 μ L	20 μ M (最終濃度)
RNA template + DEPC water	4.2 μ L	5 μ M (ca. 0.6 μ g/ μ L) (最終濃度)
5 U/ μ L Enzyme	2.0 μ L	(熱変性後に添加)

2) サーマルサイクラーで80°C、1分熱変性する。

3) アイスブロックで氷冷する。

4) サーマルサイクラーで、50°C、1分反応させる。

5) 5 U/ μ L酵素溶液を2 μ L添加し、ピペッティングで10回程度攪拌する。

6) サーマルサイクラーで、50°C、30分反応させる。

7) アイスブロックで氷冷。

8) 反応溶液を1.5 mLマイクロチューブに移し、1 μ L 3 M NaOAc (pH5.2)、1 μ L 100 mM EDTA、1 μ L グリコーゲン、30 μ L 100% EtOHを加え、15,000 rpm、4 °C、15分遠心分離を行う。

9) 沈殿を吸い込まないように上澄みを除去し、200 μ L 70% EtOHを添加し、15,000 rpm、4 °C、5分遠心分離を行う。

10) アスピレータで減圧乾燥し、20 μ L SLSに溶解する。Agilent Bioanalyzer 2100で解析する場合、20 μ L DEPC水に溶解する。

11) 測定可能な濃度に適宜希釈する (通常、1/20~1/40)。

12) CEQ2000XLで解析する場合、Genome Lab DNA size standard kit 600 <Bechman, #608095> をSLSで1/10希釈したものを、0.5 μ L添加し、良く混合する。

13) ヒートブロックで75°C、1分熱変性後、氷冷せずに室温に戻す。

また、3'末端を蛍光標識化されたRNAフラグメントの解析は、キャピラリー電気泳動装置（ベックマン、CEQ2000XL）を利用した。基本的な操作は塩基配列解析と同じであり、メソッド設定のみ変更する。メソッドは、熱変性0 sec、キャピラリー温度が42°C、泳動時間が60分間に設定。塩基配列解析とは異なり、サンプルセットの段階でAnalyzeを設定しない。また、Agilent Bioanalyzer 2100 によるCy5-labeled Nucleic acids analysisを利用して解析を行うことも可能であることが判明した。その場合のプロトコールを以下に示す。

- 1) Bioanalyzer 2100の本体電源ON、PC 電源を入れる。
- 2) 65 μ Lのゲル溶液と1.7 μ Lの200 nM Cy5-dCTPを1.5 mLチューブに添加し、13,000 rpm、10分遠心分離し、ホコリなどを沈降させる。
- 3) 80 μ L のMarker溶液に対し、2 μ Lの200 nM Cy5-dCTPを加える。
- 4) RNA用Chipにゲル溶液を充填する。空気が入らないように注意。もし泡ができたならピペット等で慎重に除く。
- 5) Ladderウェルに6 μ L、1-12 サンプルウェルに5 μ Lのマーカ（内部標準としてCy5-dCTP含む）溶液を添加する。
- 6) 1-12 サンプルウェルに試料を1 μ L添加する。
- 7) 洗浄用RNase AWAYプレートをBioanalyzerにセットしふたを閉め、1分洗浄する。
- 8) chip専用ボルテクスミキサーにセットし、1分混合する。
- 9) 洗浄用DEPC水プレートに交換し、10 sec洗浄する。
- 10) 洗浄後、10秒ふたを開けたまま風乾、chipをセットする。
- 11) PC上で2100 エキスパートプログラムを起動。
- 12) 解析方法として、Assay-Electrophoresis-others-Cy5 labeled Nucleic acids Nanoを選択する。
- 13) サンプルプレートをセットし、画面左上の機器の絵が緑のプレートに代わるのを確認する。
- 14) ファイル名、サンプル数を登録して画面左上のStartボタンを押し、分析を開始する。ゲル注入から分析開始までの時間は、できるかぎり短くする（5分以内が望ましい）。
- 15) 分析が終了するとウインドウが出てくるのでOKボタンを押す。
- 16) 最後に洗浄用DEPCプレートをセットし、洗浄、風乾。
- 17) 洗浄用プレートに残った溶液を流しに捨て、乾燥する。

本実験開始当初は、*E. coli*由来のKlenow fragment <Promega, M2201> を使用し、37°Cで標識反応を行っていた。基本的にRNase Hによる切断を経て、標識反応を行なうが、標識反応のみを検討する段階で、いくつかのDNAプローブと、*in vitro* RNAを使用した（表3）。UNIV1390を基本に、様々な長さのO-methyl-RNA (2'-O-Me) を付加したもの（6-13塩基）、EUB338プローブを基本に、プローブの5'末端側に突出配列を付加したもの、EC327プローブ（*E. coli*特異的のプローブ）の5'末端側に突出配列を付加したもの、あるいは一部の配列を2'-O-Meに置換したものなどを利用し、様々なテストを行った。

表3 rRNAの3' ラベリングに使用したプローブ群

Probe name	Probe seq (5'-3')	標識	RNase HIによる切断	長さ (mer)	GC%	備考
UniV1390シリーズ						
UNI1387	-----GCGGTGTGTACAAGGC			16	62.5	
UNI1390-20me	--GACGGGGGUGUGUACAA	切断効率が低いため使用不可	FA0%でT7-M13を85%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me6	-AGCGGGGUGUGUACAA	切断効率が低いため使用不可	FA0%でT7-1100f-M13を79%切断	16	19	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me7	--GACGGGGGUGUGUACAA	T7-1100f-M13で切断、標識確認 (高温)	FA30%でT7-1100f-M13を95%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me8	--GACGGGGGUGUGUACAA	T7-1100f-M13で切断、標識確認 (高温)	FA10-30%でT7-1100f-M13を98%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me9	--GACGGGGGUGUGUACAA	T7-1100f-M13で切断、標識確認 (高温)	FA30%、40%でT7-1100f-M13を99%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me10	--GACGGGGGUGUGUACAA	T7-1100f-M13で切断、標識確認 (高温)	FA0、10%でT7-1100f-M13を99%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me11	--GACGGGGGUGUGUACAA	T7-1100f-M13で切断、標識確認 (高温)	FA0-30%でT7-1100f-M13を100%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me12	--GACGGGGGUGUGUACAA	T7-1100f-M13で切断、標識確認 (高温)	FA10%でT7-1100f-M13を100%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-20Me13	--GACGGGGGUGUGUACAA	標識されない	FA0、10%でT7-1100f-M13を99%切断	16	18	下線：2'-O-Me化部位
UNI1390-L1	-----IGGC6GTGTGTACAA	T7-1100f-UniV1387で標識確認 (中温)		15	53.3	下線：突出部位
UNI1390-L2	-----GGGC6GTGTGTACAA	T7-1100f-UniV1387で標識確認 (中温)		15	60.0	下線：突出部位
EC327シリーズ						
EC327-2	-----TGTCAAGTCCAGTGTGGC			18	56.0	
EC327	-----TGTCTCAGTTCACAGTGTG		FA0-30%でT7-Uni519を98%以上切断	18	50.0	
EC327-20Me	----TGUUCAGUUCACAGUGUG	切断効率が低いため使用不可	FA0-30%でT7-Uni519は切断されなかった	18	50.0	
EC327-20Me3	----TGTUCAGUUCACAGUGUG	切断効率が低いため使用不可	FA0%でT7-Uni519は68%しか切断されなかった	18	50.0	
EC327-20Me4	----TGTUCAGUUCACAGUGUG	標識されない	FA0%で94%の切断を確認	18	50.0	
EC327-20Me5	----TGTCTCAGUUCACAGUGUG	T7-Uni519で切断、標識 (中温、高温)	FA0%で95%の切断を確認	18	50.0	
EC327-L1 (=EC327)	----TGTCTCAGTTCACAGTGTG	T7-EC327-2を標識 (中温)		18	50.0	下線：突出部位
EC327-L2	----TGGTCTCAGTTCACAGTGT	T7-EC327-2を標識 (中温)		18	50.0	下線：突出部位
EC327-L3	--TGTGTCTCAGTTCACAGTGT	T7-EC327-2を標識 (中温、高温)		18	50.0	下線：突出部位
EUB338シリーズ						
EUB338-0	--GCTGCCCTCCGTTAGGAGT			18	66.7	
EUB338-L1	IGGCTGCCCTCCGTTAGGA	T7-EUB338で標識確認 (中温)		18	60.0	下線：突出部位
EUB338-L2	GGGCTGCCCTCCGTTAGGA	T7-EUB338で標識確認 (中温)		18	65.0	下線：突出部位

はじめに、*E. coli* DH5aの16S rRNA遺伝子をクローン化したプラスミドを鋳型として、T7 配列を付加した1-520座位部分の16S rRNA遺伝子をPCR増幅した。PCR産物を鋳型としてin vitro RNA合成し、EUB338プローブを用いてRNase H法により配列特異的に切断した。EUB338-0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（EUB338-L1 or EUB338-L2）を用いて、3'末端標識反応を行った結果、約380 bのところに標識されたRNAフラグメントが確認された。Klenow fragmentをDEPC水に置き換えたコントロール系ではそのフラグメントは見られなかった。また、サイズはDNAスタンダードを用いているため、実際には約365 b程度だと考えられた（バイオアナライザーで確認済み）、ほぼ予想された長さのrRNAが標識されていた。しかしながら、標識された蛍光輝度は弱く、また実験に応じて蛍光の取り込みが行われたり、うまく行われていなかったりと、実験間のばらつきも大きく、蛍光標識反応は安定しなかった。

EUB338プローブは比較的GC含量の高いプローブであるため、その影響で蛍光標識がうまく行かない可能性が考えられた。そのため、EUB338プローブからEC327プローブに変更し実験を行った。同時に、*E. coli* DH5aの16S rRNA遺伝子をクローン化したプラスミドを鋳型としてT7配列付加1100 f-UNIV1387rプライマーセットでPCR後、そのPCR産物を鋳型としてin vitro RNA合成した。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（Uni1390-L1とUni1390-L2）、および一部を2'-O-Me化したUni1390キメラプローブを用いて、切断反応と3'末端標識反応を行った。

はじめに、それぞれの切断効率を評価したところ、EC327プローブでは、DNA部位が4nt以上あれば良好な切断効率が得られる、UNIV1390プローブでは、DNA部位が7nt以上あれば良好な切断効率が得られることが判明した（図7、表3）。

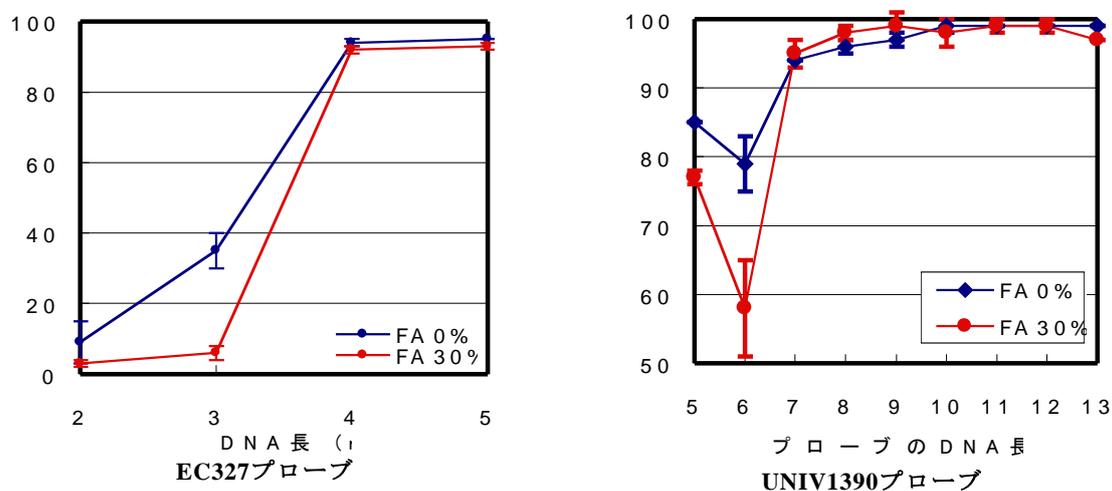


図7 EC327プローブおよびUNIV1390プローブによる*E. coli* 16S rRNAの切断効率の検討結果

次に、上記と同様の方法（Klenow fragment使用）で、良好に切断反応が行われたプローブによる蛍光標識反応を行った。その結果、T7配列付加1-520座位部分の16S rRNAではEC327-2OMe5プローブで、T7配列付加1100-1500座位部分のRNAではUNIV1390-2OMe7プローブで、切断後の標識が

成功した。しかしながら、CEQフラグメント解析では、未反応のオリゴ反応物と思われるピークが確認された。これを改善するために、中温（37°C）での反応から高温（50°C）に切り替えた。酵素も耐熱性のDNA polymeraseに変えた。その結果、T7配列付加UNIV519 RNAではEC327-2OMe5プローブによる蛍光ラベリングが確認された（図8）。

また、*E. coli* DH5aの16S rRNA遺伝子をクローン化したプラスミドを鋳型としてT7配列付加1100 f-UNIV1387rプライマーセットでPCR後、そのPCR産物を鋳型としてin vitro RNA合成した。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(Uni1390-L1とUni1390-L2)、および一部を2'-O-Me化したUni1390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 bのところらに標識されたRNAフラグメントが確認された。DNA polymeraseをDEPC水に置き換えたコントロール実験では、そのフラグメントは見られなかった。サイズ標準としてはDNAスタンダードを用いているため、実際には約270 bp程度だと考えられ（バイオアナライザーで確認済み）、予想された部位に蛍光物質の取り込みが行われていたことが推察された。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た。そのうち、UNIV1390-2'OMe10で最も高い蛍光値が得られた（図8）。

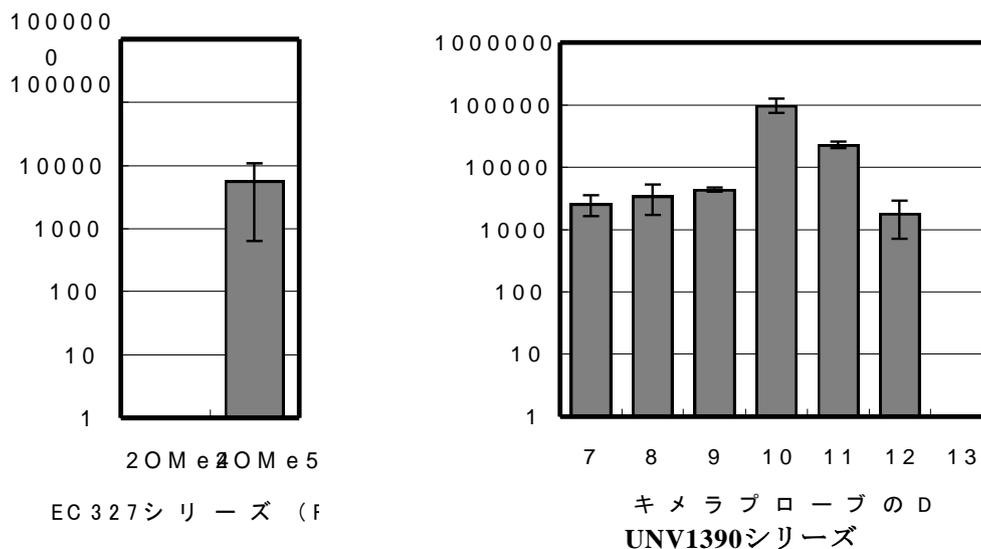


図8 EC327プローブおよびUNIV1390プローブによる*E. coli* 16S rRNAの配列特異的蛍光ラベリング化効率の検討結果

本結果より、UNIV1390-2'OMe10プローブを利用することにより良好なrRNA切断、およびその配列特異的蛍光ラベリングが達成できることが判明した。以後、UNIV1390-2'OMe10プローブを利用してさらに検討を進めた。

先の検討では、UNIV1390プローブにおいて対象rRNA種が変化すると切断効率が変動することが

明らかになっていた（図6）。しかしながら、この現象は後の定量に大きな影響を与えるため、切断効率の変動は可能な限り抑える必要があった。幸い、2'-O-Me化したキメラプローブとRNAとのハイブリダイゼーションは、一般的なDNA-RNAハイブリダイゼーションよりも強固であることが知られているため、UNIV1390-2'OMe10プローブでは広いrRNA種に対して高効率に切断反応が起こることが期待された。そのことを確かめるため、図6で行った実験と同様のものを、UNIV1390-2'OMe10プローブを利用して実施した（図9）。その結果、ほぼ全てのrRNA種において100%近い切断効率を示すことが明らかとなった。この結果は、プローブの一部を2'-O-Me化したキメラプローブを利用することにより、RNase H法をさらに高感度化することができることを示していた。



図9 UNIV1390-2'OMe10プローブによる、8種のアーキア、22種の多数の門にまたがるバクテリア、および1種のユーカリア（真核生物）を切断した際の切断効率。

次に、UNIV1390-2'OMe10プローブを利用して、*Escherichia coli* (DSM5717)、および*Methanosaeta concilii* (DSM3671)由来の16S rRNA（ほぼ全長）をin vitro合成し、人工的に所定量混合したものを作成した。RNAの測定は、RiboGreen（Molecular Probe）を利用した。rRNAのin vitro合成は、サブテーマ(2)で述べる方法を使用した。その結果の一例を図9に示す。

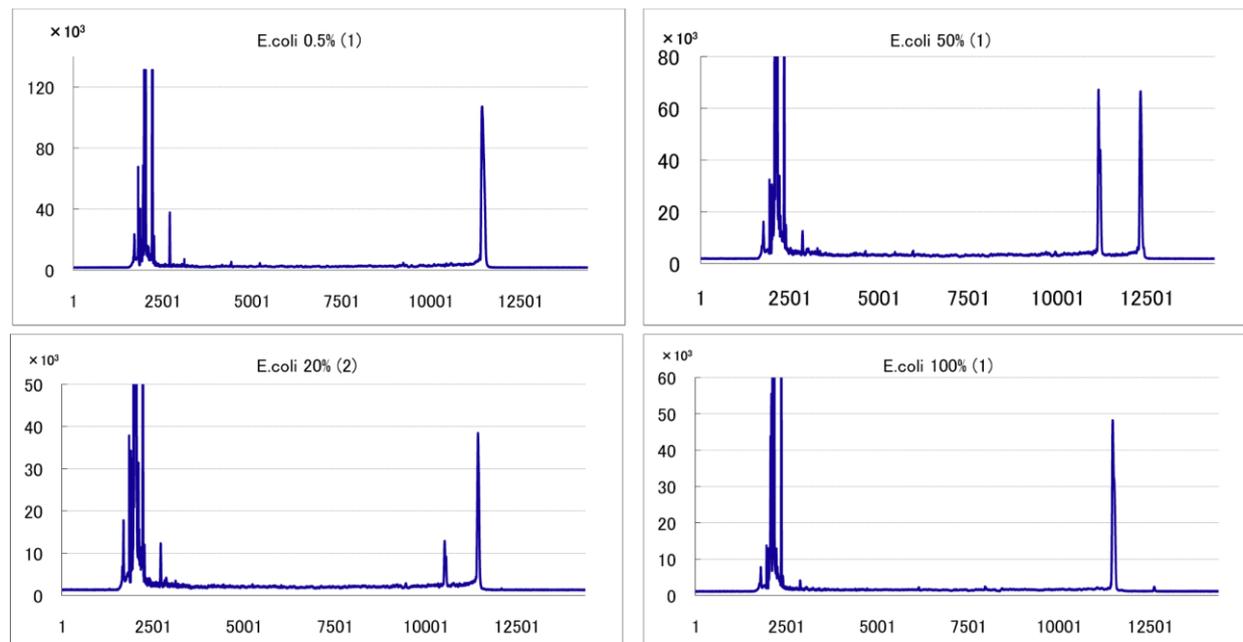


図10 *E. coli*および*M. concilii*由来16S rRNAを混合したRNAに対するRNase H反応および配列特異的ラベル化反応の結果の一例。左上の図は、0.5% *E. coli*由来rRNAが混合されているサンプルに対し、UNIV1390-2'OMe10プローブによる切断および蛍光ラベリング反応を行った後、EUB338プローブで*E. coli*由来rRNAを切断した後の電気泳動結果を示す。他の図は、それぞれ異なる*E. coli*由来rRNA混合率を示すサンプルに対する定量結果。

図10に示すとおり、*E. coli*および*M. concilii*由来16S rRNAは、UNIV1390-2'OMe10プローブによる切断および蛍光ラベリング反応により蛍光ラベル化され、断片として検出されていることが分かる。その後、EUB338プローブで*E. coli*由来rRNAのみが切断されているため、*E. coli*由来rRNAは短い断片になっており、その結果電気泳動上では手前（短い泳動時間）で検出される。その結果、それぞれのrRNA分子が異なるピークとして検出されていることがわかる。結果から、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ることが推察された。

それらの結果を、あらかじめ設定した混合率（横軸）に対する本手法での定量結果（縦軸）の関係としてまとめたものを図11に示す。

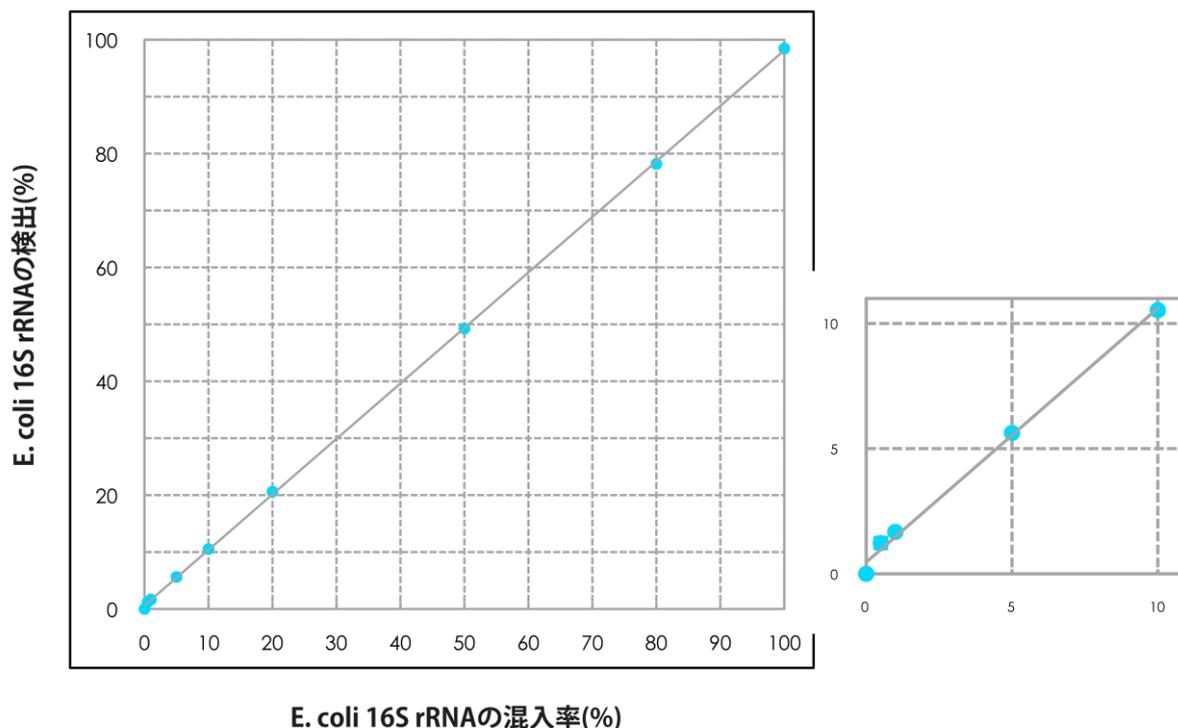


図11 *E. coli*および*M. concilii*由来16S rRNAを混合したRNAに対するRNase H反応および配列特異的蛍光ラベル化反応の結果。あらかじめ設定した混合率（横軸）に対する本手法での定量結果（縦軸）の関係を示す。

図11に示すとおり、測定された結果は高い定量性を示していた。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、有効性を発揮できてい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と思われる。

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、その技術を発展させた。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。また、本研究の結果、さらなる高感度化が達成できている。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と思われる。

(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. 引用文献

- Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.
- Sekiguchi, Y. 2006. Yet-to-be cultured microorganisms relevant to methane fermentation processes. *Microbes and Environments* 21:1-15.
- Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, H. Yoshida, A. Sunaga, and Y. Kamagata. 2004. Sequence-specific cleavage of small-subunit (SSU) rRNA with oligonucleotides and ribonuclease H: a rapid and simple approach to the SSU rRNA-based quantitative detection of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3650-3663.
- Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, and Y. Kamagata. 2008. Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. *Int J Food Microbiol* 122:16-22.
- Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, K. Tajima, A. Takenaka, M. Kurihara, and Y. Kamagata. 2007. Evaluation of group-specific, 16S rRNA-targeted scissor probes for quantitative detection of predominant bacterial populations in dairy cattle rumen. *Journal of Applied Microbiology* 103:1995-2005.
- Amann, R. I., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919-1925.
- Huang, Z., and J. W. Szostak. 1996. A simple method for 3'-labeling of RNA. *Nucleic Acids Res* 24:4360-1.
- Huang, Z., and M. Alsaidi. 2003. Selective labeling and detection of specific mRNA in a total-RNA sample. *Anal Biochem* 322:269-74.
- Daims, H., A. Breul, R. Amann, K.-H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.* 22:434-444.
- Stahl, D. A., B. Flesher, H. R. Mansfield, and L. Montgomery. 1988. Use of phylogenetically based

hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.54 No.5:1079-1084.

- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing., p. 115-175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons., Chichester.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. P. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6955-6959.
- Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, and D. A. Stahl. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:614-623.
- Pace, N. R., G. J. Olsen, and C. R. Woese. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45:325-6.
- Zheng, D., E. W. Alm, D. A. Stahl, and L. Raskin. 1996. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 62:4504-13.
- Liu, J. R., and R. J. Seviour. 2001. Design and application of oligonucleotide probes for fluorescent in situ identification of the filamentous bacterial morphotype *Nostocoida limicola* in activated sludge. *Environmental Microbiology* 3:551-60
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- Lin, C., and D. A. Stahl. 1995. Taxon-specific probes for the cellulolytic genus *Fibrobacter* reveal abundant and novel equine-associated populations. *Appl Environ Microbiol* 61:1348-51.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing., p. 115-175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons., Chichester.
- Sobczak, K., and W. J. Krzyzosiak. 2002. RNA structure analysis assisted by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 30:e124.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

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) 口頭発表 (学会)

なし

(3) 出願特許

なし

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

なし

(5) マスコミ等への公表・報道等

なし

(6) その他

なし