

## 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

### (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

生物機能工学研究部門 バイオメジャー研究グループ 野田尚宏

平成19～20年度合計予算額 8,705千円

(うち、平成20年度予算額 4,200千円)

※ 上記の合計予算額は、間接経費2,019千円を含む

[要旨] 複合微生物群集中の特定微生物群（例えば好気性細菌、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、その変遷を定量的に評価する必要がある場合がある。その場合、各微生物群を検出するためのDNAプローブや、標的とする核酸の国家計量標準および実用標準と計測のトレーサビリティ体系を整備することが重要である。本サブテーマでは、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、サブテーマ(1)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うことを目標とする。本サブテーマでは、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（120種類）。また、特に嫌気性微生物群を検出するDNAプローブ群を68種類整備し、その特異的切断条件を評価した。

[キーワード] 環境質評価、微生物定量技術、DNAプローブ、16S rRNA、核酸標準物質

#### 1. はじめに

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。

## 2. 研究目的

本サブテーマにおいては、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ライブラリを整備する。また、サブテーマ(1)およびサブテーマ(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うことを目標とする。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、脱塩素化細菌等）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。また、DNAマイクロアレイの構築においては、各種の分類群を良く反映しているrRNA座位を検索すると共に、その部位においてどのような配列が存在するかを公共DNAデータベースおよび我々が構築しているデータベースから抽出する作業を行うことを目指した。

## 3. 研究方法

はじめに、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。

次に、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70種類整備し、その特異的切断条件を評価した。

また、このような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。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、合成できるように作成し、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）。特に、嫌気的環境で物質循環に関与する微生物群（アーキア、バクテリア）、好気的環境下で物質循環に関与する微生物群（バクテリア）と共に、窒素循環に関与する微生物群

（*Nitrosomonas*などの硝化細菌や脱窒細菌）、嫌気的脱塩素反応に関与する細菌群（*Dehalococcoides*属細菌や*Desulfitobacterium*属細菌）のrRNA遺伝子ライブラリの構築を重点的に進めた。

また、本ライブラリを利用し、高効率にrRNAを調整する方法を検討した。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、プラスミドから

RNAを直接合成することを考慮し、今後核酸標準物質としてrRNAの頒布を想定した場合、どのようなプラスミドを設計すべきか検討を進めた。

これらの方法は、方法自体の確立と検討を行っており、また結果と考察に密接に関係するものであるため、詳細は4. 結果と考察に記載した。

#### 4. 結果・考察

##### 4. 1. 16S rRNAライブラリ整備

微生物rRNA遺伝子ライブラリは、各微生物群よりゲノムDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子のほぼ全長（1,500塩基長）を既報の方法でPCR増幅した。その後、pUC系プラスミドに配列を挿入しクローン化を行った。各クローンの16S rRNA遺伝子の上流にはT7配列を挿入し、T7 RNA-polymeraseによってin vitroでRNAを合成できる系を構築した。構築した詳細なプロトコールを以下に示す。

##### ・16S rRNA遺伝子のクローニング（in vitro合成）

###### <DNA抽出>

菌体を適当な濃度になるように、滅菌水に懸濁する。

懸濁液	40 μL
Proteinase K	10 μL
BL buffer	50 μL

上記の割合で反応液を調製する。細胞数が多く、懸濁液の量が増えた場合は、それに比例してProteinase KとBLバッファーの量を増加させる。60°Cで20分インキュベートする。ここで、固い菌体の場合は、反応前に凍結融解を行う。またProteinase Kによる反応は、液が透き通って見えると菌体が溶けている確認になる。透き通っていない場合はSDSを最終濃度で1%になるように加えて、さらに60°Cで10分ほどインキュベーションする。

続いて、フェノールクロロホルム精製を行う。DNA抽出液と等量のPCI（フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25:24:1）<pH 8.0>を加え、攪拌する。この時ゲノムがせん断されるのを防ぐため、vortexの使用は避ける。次に、遠心分離し、水層(上層)を新しいチューブに取る。そこに等量のCIA(クロロホルム：イソアミルアルコール=24:1)を加え、よく攪拌し遠心する。水層を新しいチューブに取り、エタノール沈を行う。その後エタノールリンスを行い、減圧乾燥後、適量の滅菌水に溶かす。

###### <16S rRNAの増幅>

抽出したDNAを10倍、100倍希釈したものを用意し、この希釈液と原液とをテンプレートにしてPCRを行う。バクテリアの場合、8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', positions 8-27 in *Escherichia coli*) (Weisburg et al., 1991)、アーキアの場合 7f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3', positions 7-26) (Delong et al., 1992) とユニバーサルプライマー 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', positions 1492-1471, Y represents T or C) (Lane et al., 1991)を使用した。

###### <ライゲーション>

使用するキットは以下の通り。

pT7Blue T-vector (Novagen)

DNA Ligation Kit ver.2 (TaKaRa)

PCR産物をカラム精製後、電気泳動でおおよその濃度を測定する(濃度マーカーなどを使用する)。pT7Blue T-vector (50 ng/μL) 1 μLに対し、PCR産物 0.2 pmolの割合で混ぜる。そこにDNA Ligation Kit中の I液を等量加え、混合、16°Cで30分インキュベーションする。

<トランスフォーメーション>

コンピテントセル100 μLにライゲーション液を2~5 μL加える。氷中に30分置いた後、プレートに塗布し、37°Cで一晩培養する。SOC培地を250~500 μL (コンピテントセルの10倍量) に細胞培養液を加え、37°Cで1時間培養する。培養終了後プレートに塗布し、37°Cで一晩培養する。

<インサートチェックおよびインサートの方向性の確認>

インサートチェックはコロニーダイレクトPCRにより行う。プライマーはT7プライマーと1492rプライマーを使用し、増幅が見られたものは正しい方向にインサートが位置している。10 μLスケールで反応液を調整し、0.2mLチューブに分注しておく。楊枝でホワイトコロニーを選択し、マスタープレートに接種後、反応液に接種する。1枚のプレートにつき、5個程度コロニーを選択すれば十分と思う。

<シーケンス反応>

インサートを確認できたクローンについて、T7プライマーとM13プライマーを用い、50 μLスケールでPCRを行う。確認泳動後、カラム精製を行い、再度電気泳動を行う。その後、シーケンスデータを解析し、塩基配列が正しいものであること、T7側にインサートの5'末端が位置していることを確認する。

<プラスミド抽出>

対象のコロニーから、LB-Amp培地(2 mL)で一晩培養する。QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて抽出、精製を行う。抽出後、電気泳動により抽出されたDNAの確認を行う。

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)。その一覧を表1および表2に示す。ここでは、特に嫌気的環境で物質循環に関与する微生物群(アーキア、

バクテリア)、好気的環境下で物質循環に関与する微生物群(バクテリア)と共に、窒素循環に関与する微生物群(*Nitrosomonas*などの硝化細菌や脱窒細菌)、嫌氣的脱塩素反応に関与する細菌群(*Dehalococcoides*属細菌や*Desulfitobacterium*属細菌)、土壤等に普遍的に見られる微生物群(*Actinobacteria*門、*Gemmatimonadetes*門など)のrRNA遺伝子ライブラリの構築を重点的に進めた。

表 1 好気性微生物群に対する 16S rRNA 遺伝子ライブラリの整備対象リスト

Species	Strain	No. (DSM, ATCC, JCM, OCM)	Type strain
<b>Archaea</b>			
<b>Thermococci</b>			
<i>Pyrococcus horikoshi</i>	OT3	NBRC100139G, DSM12428, JCM9974	type strain
<b>Thermoprotei</b>			
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	7	JCM 10545	type strain
<i>Aeropyrum pernix</i>	K1	NBRC100138G, ATCC 700893, DSM 11879, JCM 9820	type strain
<b>Bacteria</b>			
<b>Alpha-Proteobacteria</b>			
<i>Brevundimonas diminuta</i>	-	DSM7234, ATCC 11568, JCM 2788	type strain
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	-	NBRC14297, ATCC14123	-
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	ORS571	NBRC14845, ATCC43989, DSM5975, CCUG26647, LMG6465	type strain
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	3I1b6	NBRC147833, ATCC10324, IAM12608, DSM30131	type strain
<i>Azospirillum oryzae</i>	COC8	NBRC102291, IAM15130, JCM21588, NBRC102291	type strain
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>		NBRC12388, ATCC14835, IAM1834, DSM5603, LMG1382	type strain
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>		NBRC15237, ATCC23767, DSM6513, JCM7644, NCIB11664	type strain
<i>Catellibacterium nectariphilum</i>	AST4	DSM15620, JCM11959, NBRC100046	type strain
<i>Rhizobium radiobacter</i>		NBRC12607, ATCC6467	type strain
<b>Beta-Proteobacteria</b>			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	DSM50170, ATCC 13637, ICPB 2648-67, NCIB 9203, NCTC 10257	type strain
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fr 2	DSM10138, ATCC 49787, JCM 7819	type strain
<i>Nitrosomonas europaea</i>		ATCC19178, IFO14298	-
<i>Delftia acidovorans</i>		NBRC14950, ATCC15668, JCM5833, DSM39, IAM12409, JCM6203	type strain
<b>Gamma-Proteobacteria</b>			
<i>Escherichia coli</i>	DH5a	DSM5717	-
<i>Pseudomonas straminea</i>	-	AJ 2124, AS 1.1797, ATCC 33636, IAM 1598, IFO 16665, NBRC 16665	

<i>Thiothrix disciformis</i>	B3-1	JCM11364, DSM 14473	type strain
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	H18	DSM 1361, ATCC 29744	type strain
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>		DSM 3072, ATCC 19716	type strain
<i>Pseudomonas putida</i>	KT2440	DSM 6125	
<b>Gemmatimonadetes</b>			
<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	T-27	-	type strain
<b>Actinobacteria</b>			
<i>Microlunatus phosphovorius</i>	NM-1	DSM10555, JCM 9379	type strain
<i>Rhodococcus equi</i>	-	DSM20307, ATCC 25729, ATCC 6939, DSM 43349, JCM 1311	type strain
<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	S 6022	DSM20745, ATCC49802	type strain
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	-	NBRC12168, ATCC13032, DSM20300, IAM12435, JCM1318	type strain
<i>Streptomyces avermitilis</i>		NBRC14893, ATCC31267, JCM5070, NCIMB12804, NRRL8165	type strain
<i>Brachybacterium conglomeratum</i>		NBRC15472, DSM10241, JCM11608, KCTC9915, CCM2589	type strain
<i>Streptomyces griseus subsp. griseus</i>		NBRC12875, ATCC23345, ATCC23921, DSM40236, IAM12311, JCM4644	type strain
<i>Agromyces rhizosphaerae</i>		NBRC16236, DSM14597, JCM11432, ATCC BAA-402, NBRC16236	type strain
<b>Deinobacter-Thermus</b>			
<i>Deinobacter grandis</i>	KS 0485.	DSM3963, ATCC 43672, IAM 13005	type strain
<b>Firmicutes</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	Marburg	DSM10, ATCC 6051, JCM 1465	type strain
<i>Bacillus pumilus</i>		NBRC12092, ATCC7061, DSM27, IAM12469, JCM2508	type strain
<i>Lactobacillus reuteri</i>	F275	NBRC15892,	type strain
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>		NBRC15521, ATCC12856, IAM1077, DSM5562, JCM9024	type strain
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>		ATCC19257, DSM20069, NBRC100676	type strain
<i>Brevibacillus choshinensis</i>		NBRC15518, JCM8505, ATCC51359, DSM8552	type strain
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>		NBRC100933, JCM5805, ATCC19435, ATCC9936, DSM20481	type strain
<b>Bacteroidia</b>			
<i>Bacteroides vulgatus</i>		NBRC14291, ATCC8482, DSM1447, JCM 5826	type strain
<hr/> <b>Eucarya</b>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		-	-

表 2 嫌気生微生物群、脱塩素化細菌に対する 16S rRNA 遺伝子ライブラリの整備対象リスト

Species	Strain	No. (DSM, ATCC, JCM, OCM, TRA)	Type strain
<b>Archaea</b>			
<b>Methanobacteria</b>			
<b>Methanobacteriaceae</b>			
<i>Methanobacterium bryantii</i>	M.o.H.	DSM863, ATCC 33272, OCM 110	type strain
<i>Methanobacterium formicicum</i>	JF-1	DSM 2639	
<i>Methanobacterium formicicum</i>	MF	DSM 1535	type strain
<i>Methanothermobacter wolfei</i>	-	DSM2970, ATCC 43096	type strain
<i>Methanobrevibacter arboriphilicus</i>	A2	DSM2462	-
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	M1	DSM1093, ATCC 35063	type strain
<i>Methanosphaera stadmanae</i>	MCB-3	DSM3091, ATCC 43021, JCM 11832	type strain
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	Marberg	DSM2133, OCM 82	type strain
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	delta-H	DSM1053	type strain
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	type-II	-	-
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	TM		
<b>Methanothermaceae</b>			
<i>Methanothermus fervidus</i>	V24 S	DSM2088, ATCC 43054, JCM 10308	type strain
<b>Methanococci</b>			
<i>Methanococcus vannielli</i>	SB	DSM1224, ATCC 35089	type strain
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	SN-1	DSM2095, ATCC 35097, JCM 10549	type strain
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	JAL-1	DSM2661, ATCC 43067, JCM 10045	type strain
<i>Methanotorris igneus</i>	Kol 5	DSM5666, JCM 11834	type strain
<b>Methanomicrobia</b>			
<b>Methanomicrobiaceae</b>			
<i>Methanomicrobium mobile</i>	BP	DSM1539, ATCC 35094, JCM 10551	type strain
<i>Methanolacinia paynteri</i>	G-2000	DSM2545, ATCC 33997, OCM 124	type strain
<i>Methanogenium cariaci</i>	JR1	DSM1497, ATCC 35093, JCM 10550, OCM 155	type strain
<i>Methanoplanus limicola</i>	M3	DSM2279, ATCC 35062, OCM 101	type strain

<i>Methanoculleus bourgensis</i>	MS2	DSM3045,ATCC 43281, OCM 15	type strain
<i>Methanoculleus thermophilus</i>	CR-1	DSM2373,ATCC 33837, OCM 174, VKM B-1841	type strain
<i>Methanoculleus olentangyi</i>	strain RC/ER	DSM2772,ATCC 35293, OCM 52	type strain
<i>Methanofollis tationis</i>	-	DSM2702,OCM 159	type strain
<i>Methanocorpusculum parvum</i>	XII	DSM3823,ATCC 43721, OCM 63	type strain
<i>Methanospirillum hungatei</i>	JF1	DSM864,ATCC 27890, JCM 10133, OCM 16	type strain
<i>Methanocalculus halotolerans</i>	SEBR 4845	DSM14092,OCM 470	type strain
<i>Methanolinea tarda</i>	NOBI-1	DSM 16494 = JCM 12467 = NBRC 102358	type strain
<b><i>Methanosarcinaceae</i></b>			
<i>Methanosarcina barkeri</i>	MS	DSM800,JCM 10043, OCM 38	type strain
<i>Methanosarcina thermophila</i>	MST-A1 (INRA)	DSM2905,OCM 96	-
<i>Methanosarcina mazei</i>	C16	DSM3318,ATCC 43340, OCM 98	-
<i>Metahnolobus tindarius</i>	Tindari 3	DSM2278,ATCC 35996, OCM 150	type strain
<i>Methanococcoides methylutens</i>	TMA-10	DSM2657,ATCC 33938, OCM 158	type strain
<i>Methanohalobium evestigatum</i>	Z-7303	DSM3721,OCM 161	type strain
<i>Methanohalophilus mahii</i>	SLP	DSM5219,ATCC 35705, OCM 68	type strain
<i>Methanosalsum zhilinae</i>	WeN5	DSM4017,OCM 62	type strain
<i>Methanomicrococcus blatticola</i>	PA	DSM13328,ATCC BAA-276	type strain
<b><i>Methanosaetaceae</i></b>			
<i>Methanosaeta thermophila</i>	PT	DSM6194	type strain
<i>Methanosaeta concilii</i>	GP6	DSM3671	type strain
<b><i>Methanopyri</i></b>			
<i>Methanopyrus kandleri</i>	AV19	DSM6324,JCM 9639	type strain
<b><i>Bacteria</i></b>			
<b><i>Firmicutes</i></b>			
<b><i>Syntrophomonadaceae</i></b>			
<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> (co-culture)	G311	DSM2245A,OCM 41	type strain
<i>Syntrophomonas sapavorans</i> (co-culture)	OM	DSM3441	type strain
<i>Pelospora glutarica</i>	WoG13	DSM6652,ATCC BAA-162	type strain
<i>Synrophothermus lipocalidus</i>	TGB-C1	DSM12680	type strain
<i>Thermosyntropha lipolytica</i>	JW/VS-2 65	DSM11003	type strain
<b><i>Desulfotomaculum-lineage I</i></b>			



<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	Delft 74	DSM574,ATCC 19858, ATCC 19998, NCIB 8395	type strain
<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>	TSB	DSM6193,ATCC 49756	type strain
<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i>	ST90	DSM10259	type strain
<i>Desulfotomaculum thermosapovorans</i>	MLF	DSM6562	type strain
<i>Pelotomaculum thermopropionicus</i>	SI	DSM13744,JCM10971	type strain
<i>Pelotomaculum terephthalicum</i>	JT	DSM 16121, JCM 11824	
<i>Pelotomaculum isophthalicum</i>	JI	JCM 12282 , BAA-1053	
<i>Sporotomaculum syntrophicum</i>	FB	DSM 14795, JCM 11495	
<b>Clostridiaceae</b>			
<i>Clostridium acetobutyricum</i>	-	DSM792, ATCC 824, VKM B-1787	type strain
<i>Clostridium thermocellum</i>		DSM 1237,ATCC 27450,NCBI 10682,JCM 12338	type strain
<i>Clostridium oroticum</i>		DSM 1287,ATCC 13169,NCBI 10650,JCM 1429	type strain
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>		ATCC 19208	type strain
<i>Ruminococcus bromii</i>	VPI6883	ATCC 27255	type strain
<i>Streptococcus bovis</i>	Pearl11	DSM 20480,ATCC 33317,JCM 5802,NCDO 597,NCTC 8177	type strain
<i>Eubacterium siraeum</i>		DSM 15702,ATCC 29066	type strain
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	D1	DSM 3071,ATCC 19171,NCDO 2221	type strain
<i>Butyrivibrio hungatei</i> ( <i>Butyrivibrio</i> sp.)	Bu42	DSM 10302,NCDO 2434	type strain
<i>Selenomonas ruminantium</i>		ATCC 12561,JCM 7528	type strain
<i>Selenomonas lactificex</i>	VB4b	DSM 20757,ATCC 49690	type strain
<i>Anaerovibrio lipoluticus</i>		DSM 3074,ATCC 33276	type strain
<i>Megasphaera elsdenii</i>		ATCC 25940,JCM 1772	type strain
<i>Succiniclasticum ruminis</i>	SE10	DSM 9236	type strain
<b>New lineage</b>			
<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	JE	-	-
<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	JL	JCM 12098T=NBRC 100060T=DSM 15584T	type strain
<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	OL	-	-
<i>Thermoacetogenicum phaeum</i>	PB	DSM12270	type strain
<b>Moorellaceae</b>			
<i>Moorella thermoacetica</i>	-	JCM9319, ATCC 35608, DSM 521, VPI 12984	type strain
<b>Desulfitobacteriaceae</b>			
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	DCB-2	DSM10664,	type strain

<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	XZ-1	ATCC700041	-
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	JW/IU-D C1	DSM9161,ATCC 51507	type strain
<i>Desulfitobacterium sp.</i>	PCE-1	DSM10344	-
<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i>	Co23	DSM11544,ATCC 700175	type strain
<i>Desulfitobacterium hafniense (frappieri)</i>	PCP-1	DSM12420,ATCC 700357	-
<i>Desulfitobacterium hafniense (frappieri)</i>	TCE-1	DSM12704	-
<i>Desulfitobacterium hafniense (frappieri)</i>	DP7	DSM13498	-
<i>Desulfitobacterium hafniense (frappieri)</i>	TCP-A	DSM13557	-
<b>Delta-Proteobacteria</b>			
<b>Syntrophaceae</b>			
<i>Syntrophus buswellii</i> 1984 <i>pure</i>	DM-2	DSM2612M	type strain
<i>Syntrophus gentianae</i> 1996	HQGoe1	DSM8423	type strain
<i>Smithella propionica</i>	LYP	OCM661	type strain
<b>Syntrophobacteriaceae</b>			
<i>Syntrophobacter wolinii</i>	DB	DSM2805M	type strain
<i>Syntrophobacter pfennigii</i>	KoProp1	DSM10092	type strain
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	MPOB	DSM10017	type strain
<i>Desulfacinum infernum</i>	BalphaG 1	DSM9756,ACM 3991	type strain
<i>Thermodesulforhabdus norvegica</i>	A8444	DSM9990	type strain
<i>Desulforhabdus amnigena</i>	ASRB1	DSM10338	type strain
<b>Desulfobulbaceae</b>			
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Lindhors t(1pr3)	DSM2032,ATCC 33891	type strain
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	MUD	DSM6523	-
<i>Desulfobulbus elongatus</i>	FP	DSM2908,ATCC 43118	type strain
<b>Desulfovibrionales</b>			
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>subsp. vulgaris</i>	Hildenb orough	DSM644,TCC 29579, NCIB 8303, VKM B-1760	type strain
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>subsp. desulfuricans</i>	Essex 6	DSM642,ATCC 29577, NCIB 8307, VKM B-1799	type strain
<b>Geobacteraceae</b>			
<i>Geobacter hydrogenophilus</i>	H-2	DSM13691	type strain
<i>Geobacter sulfurranducens</i>	PCA	DSM12127,ATCC 51573	type strain
<b>Pelobacteraceae</b>			
<i>Pelobacter propionicus</i>	OttBd1	DSM2379	type strain

<i>Pelobacter acidigallici</i>	MaGal2.	DSM2377,ATCC 49970	type strain
<b>Syntrophorhabdaceae</b>			
<i>Syntrophorhabdus aromatica</i>	UI	DSM 17771, JCM 13376	
<b>Nitrospira</b>			
<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>	YP87	DSM11347,ATCC 51303	type strain
<i>Thermodesulfovibrio islandicus</i>	TGL-LS 1	-	-
<i>Thermodesulfovibrio islandicus</i>	TGL-P1	-	-
<i>Thermodesulfovibrio aggregans</i>	TGE-P1	JCM 13213T 5DSM 17283T	type strain
<i>Thermodesulfovibrio islandicus</i>	TSL-P1	-	-
<i>Thermodesulfovibrio thiophilus</i>	TDV	JCM 13216T 5DSM 17215T	type strain
<b>Thermodesulfobacteria</b>			
<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	YSRA-1	DSM2178,ATCC 33708, VKM B-1767	type strain
<i>Thermodesulfobacterium mobile</i>	VKM V-1128	DSM1276,VKM B-1128	type strain
<b>Chloroflexi</b>			
<i>Caldilinea aerophila</i>	STL-6-0 1	-	type strain
<i>Anaerolinea thermophila</i>	UNI-1	-	type strain
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	J-10-fl	DSM635,ATCC 29366	type strain
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	114-95.	DSM785,ATCC 23779	type strain
<i>Anaerolinea thermolimosa</i>	IMO-1	JCM 12577T=DSM 16554T	type strain
<i>Leptolinea tardivitalis</i>	YMTK- 2	JCM 12579=DSM 16556	type strain
<i>Levilinea saccharolytica</i>	KIBI-1	JCM 12578T=DSM 16555T	type strain
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	195	(AF004928, nucleotide position 1071-1268)	type strain
<b>Candidate KSB3</b>			
<i>bulking granular sludge clone</i>		-	-
<b>Actinobacteria</b>			
<b>Propionibacteriaceae</b>			
<i>Propionibacterium jensenii</i>	van Niel 1928	JCM 6433, DSM 20279	-
<b>CFB</b>			
<i>Prevotella ruminocola</i>		ATCC 19189,JCM 8958	type strain
<i>Prevotella bryantii</i>	B4	DSM 11371	type strain
<i>Prevotella albensis</i>	M384	DSM 11370	type strain
<i>Bacteroides fragilis</i>		DSM 2151,ATCC 25285,JCM 11019	type strain

<i>Flavobacter saccharophilum</i>	DSM 8520,ATCC 49530,JCM 8520	type strain
<b>Fibrobacteria</b>		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	ATCC 19169	type strain
<b>Bifidobacteria</b>		
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707	type strain
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC 15696	
<b>Spirochaetes</b>		
<i>Treponema bryantii</i>	DSM 1788,ATCC 33254	type strain

これらのライブラリにおいては、各微生物種由来のゲノムDNAと共に、16S rRNA遺伝子ライブラリを整備し、その保管を行っている。

#### 4. 2. 16S rRNA合成方法の確立、安定性試験

次に、4. 1. で構築したライブラリを利用し、高効率にrRNAを調整する方法を検討した。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、プラスミドからRNAを直接合成することを考慮し、今後核酸標準物質としてrRNAの頒布を想定した場合、どのようなプラスミドを設計すべきか、検討を進めた。RNA合成ライブラリは、標準物質としての公表を念頭に、安定なプラスミドの状態 で保管すると共に、標準物質としての保存性の調査や品質管理体制の確立を目指した。RNAに関しては、標準物質として頒布する場合、その安定性が懸念されるため、rRNAの保存性を各種温度条件下で検証した。

各種の検討を行い、以下の方法を利用することによって高効率にRNAの合成を行う系を構築した。

- ・ In vitro transcription (MEGAscript T7 Kit <Ambion> を使用)

##### 【準備】

関連する試薬を溶かす。RNA polymeraseは氷中に置く(グリセロールが入っているので-20°Cでは凍っていない)。10×Reaction Bufferを溶かして室温に置く。リボヌクレオチドを溶かして氷中に置く。また、全ての試薬はフタを開ける前にスピンドウンしておく。

##### 【反応液の調製】

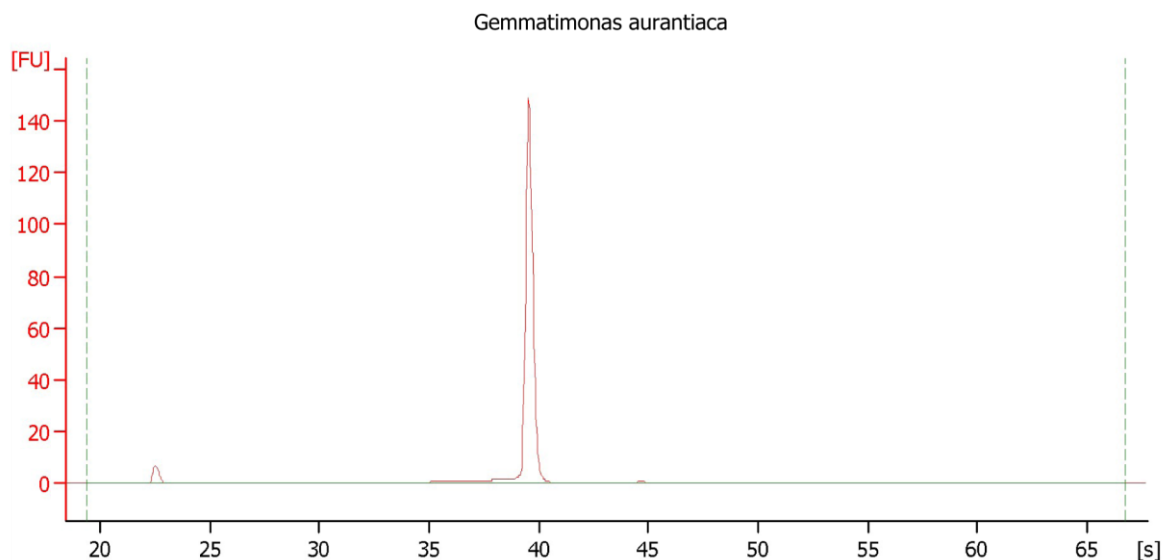
<組成>

鋳型	8 μL
10×Buffer	2 μL
NTP mix	8 μL
Enzyme mix	2 μL
計	20 μL

1. 37°Cで2時間のインキュベーションする。
2. キット添付のTURBO DNaseを1  $\mu\text{L}$ (2 Units)添加し、37°Cで1時間インキュベーションする。
3. DNase処理したサンプルに水を180  $\mu\text{L}$ 添加して全量を200  $\mu\text{L}$ にする。そこに酸性PCIを200  $\mu\text{L}$ 添加し、攪拌、15,000 rpm、室温、3分で遠心分離を行う。
4. 上層を新しいチューブに取り、もう一度酸性PCIを添加して同じ操作を行う。
5. その後、クロイソを200  $\mu\text{L}$ 添加し同じ操作を行う。
6. 上層を新しいチューブに取り、エタノール沈殿を行う。
7. 氷中で5分冷やしたあと、遠心して沈殿を回収し、70%エタノールで2回洗浄する。
8. 減圧乾燥後、適量の水に溶解する。

本手法を利用して人工的に合成した16S rRNAを図1に示す。上記の操作を通じ、予想される長さのRNAが合成されているのがわかる。合成したRNAと、微生物細胞から直接抽出したRNAを用いて、rRNAの配列特異的切断 (RNase H) 法を行ったところ、ほぼ同様の切断結果 (切断率) が得られることが判明した。

これらのライブラリから合成した合成RNAを利用し、以後の研究に利用した。



**Overall Results for sample 4 : Gemmatimonas aurantiaca**

RNA Area:	163.4	rRNA Ratio [23s / 16s]:	0.0
RNA Concentration:	157 ng/ $\mu\text{l}$	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.03)

図1 *Gemmatimonas aurantiaca*由来16S rRNAのin vitro合成結果の一例。

次に、安定性試験を実施した。16S rRNAをin vitro合成し、その試料をDEPC処理水に溶解後、37°C、25°C、0°C、-20°Cで保管した。-20°C、0°Cの試料は、1ヵ月後でも変化は見られなかったが (Agilent

Bioanalyzerを使用)、37°Cおよび25°Cの試料は、2週間後から分解が観察された。-20°Cの試料は、3ヵ月後でも問題なく、保管を行う場合、-20°C以下での保管が必要であることが判明した。

#### 4. 3. プローブ整備

環境微生物を考えた場合、特に嫌気性細菌、嫌気性古細菌を検出するためのプローブ、PCRプライマーが特に未整備である。そのため、はじめに既存の16S rRNA遺伝子塩基配列情報を基に、各種嫌気性微生物（メタン生成古細菌群および共生細菌群）を綱、目、科、属および種レベルで網羅的かつ階層的に検出するオリゴヌクレオチドプローブを設計した。

一部のプローブは、公表されているプローブを改変して使用した。プローブの設計および *in silico*での評価には、ARBプログラム(Ludwig et al., 2004)を使用した。RNase H法は既報の方法(Uyeno et al., 2004)を改良した方法(サブテーマ1の報告を参照)を用いた。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。

嫌気性メタン生成古細菌群に対するプローブでは、表3に示す微生物由来16S rRNA配列を利用した。

表3 メタン生成古細菌を検出するプローブの評価に使用した微生物 16S rRNA

Microorganisms	Strain no. <sup>a</sup>		Strain no.
Domain Archaea		Domain Bacteria	
Order Methanosarcinales		Phylum Proteobacteria	
<i>Methanosarcina barkeri</i> DSM800	1	<i>Escherichia coli</i> DSM5717	33
<i>Methanosarcina thermophila</i> DSM2905	2	<i>Thiothrix disciformis</i> DSM 14473	34
<i>Methanimicrococcus blatticola</i> DSM13328	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DSM50170	35
<i>Methanococcoides methylutens</i> DSM2657	4	<i>Syntrophobacter wolinii</i> DSM2805M	36
<i>Methanohalophilus mahii</i> DSM5219	5	<i>Desulfobivrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSM644	37
<i>Methanobolus tindarius</i> DSM2278	6		
<i>Methanosalsum zhilinae</i> DSM4017	7	Phylum Gemmatimonadetes	
<i>Methanohalobium evestigatum</i> DSM3721	8	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> DSM 14586	38
<i>Methanosaeta concilii</i> DSM3671	9		
<i>Methanothrix</i> ("Methanosaeta") <i>thermophila</i> DSM6194	10	Phylum Actinobacteria	
		<i>Micrococcus phosphovorius</i> DSM10555	39
Order Methanomicrobiales			
<i>Methanoculleus bourgensis</i> DSM3045	11	Phylum Firmicutes	
<i>Methanoculleus thermophilus</i> DSM2373	12	<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> DSM2245A	40
<i>Methanoplanus limicola</i> DSM2279	13	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> DSM574	41
<i>Methanolacinia paynteri</i> DSM2545	14	<i>Clostridium acetobutyricum</i> DSM792	42
<i>Methanomicrobium mobile</i> DSM1539	15	<i>Desulfitobacterium hafniese</i>	43

		DSM10664	
<i>Methanogenium cariaci</i> DSM1497	16	<i>Bacillus subtilis</i> DSM10	44
<i>Methanofollis tationis</i> DSM2702	17		
<i>Methanocalculus halotolerans</i> DSM14092	18	Phylum <i>Bacteroidetes</i>	
<i>Methanocorpusculum parvum</i> DSM3823	19	<i>Prevotella bryantii</i> DSM 11371	45
<i>Methanospirillum hungatei</i> DSM864	20	<i>Bacteroides fragilis</i> DSM 2151	46
Order <i>Methanobacteriales</i>		Phylum <i>Fibrobacteria</i>	
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> DSM2462	21	<i>Fibrobacter succinogenes</i> ATCC 19169	47
<i>Methanobrevibacter ru</i> 分 <i>antium</i> DSM1093	22		
<i>Methanosphaera stadtmanae</i> DSM3091	23	Phylum <i>Spirohaetes</i>	
<i>Methanobacterium bryantii</i> DSM863	24	<i>Treponema bryantii</i> DSM 1788	48
<i>Methanobacterium formicicum</i> DSM1535	25		
<i>Methanothermobacter</i> <i>thermautotrophicus</i> DSM1053	26	Phylum <i>Chloroflexi</i>	
<i>Methanothermus fervidus</i> DSM2088	27	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> DSM635	49
		<i>Anaerolinea thermophila</i> DSM14523	50
Order <i>Methanococcales</i>			
<i>Methanococcus vannielii</i> DSM1224	28	Phylum <i>Nitrospira</i>	
<i>Methanothermococcus</i> <i>thermolithotrophicus</i> DSM2095	29	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i> DSM11347	51
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM2661	30		
<i>Methanotorris igneus</i> DSM5666	31	Phylum <i>Thermodesulfobacteria</i> <i>Thermodesulfobacterium commune</i> DSM2178	52
Order <i>Methanopyrales</i>			
<i>Methanopyrus kandleri</i> DSM6324	32	Phylum <i>Deinococcus-Thermus</i> <i>Deinobacter grandis</i> DSM3963	53
		Domain <i>Eucarya</i>	
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54

<sup>a</sup> Numbers for each strain are used for abbreviation in Table 1.

これらの微生物から得られた16S rRNAを利用し、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。ここで作成したDNAプローブ配列と標的微生物群、プローブ長、最適な切断条件（ホルムアミド濃度）とその条件下での切断効率の例を図2に示す。

図2のMG1200mプローブは、*Methanomicrobiales*を検出するプローブである。本プローブを利用した場合、*Methanogenium cariaci*の16S rRNAではホルムアミド濃度40%においてほぼ100%の切断が見られるのに対し、*Methanosarcina barkeri*ではその切断はまったく起こらない。そのため、

MG1200mプローブは標的を40%ホルムアミド濃度時に標的分子のみを特異的に切断できることが判明した。同様に、MX825mixプローブ (*Methanosaeta*属) を利用した場合、*Methanosaeta concilii* の16S rRNAではホルムアミド濃度60%においてほぼ100%の切断が見られるのに対し、*Methanobolus tindarius*ではその切断はまったく起こらない。そのため、MX825mixプローブは標的を60%ホルムアミド濃度時に標的分子のみを特異的に切断できることが判明した。同じく、F2SC668プローブ (*Methanomicrobiales* SC2サブファミリーを検出) を利用した場合、*Methanoculleus bourgensis*の16S rRNAではホルムアミド濃度70%においてほぼ100%の切断が見られるのに対し、*Methanoplanus limicola*ではその切断はまったく起こらない。そのため、F2SC668プローブは標的を70%ホルムアミド濃度時に標的分子のみを特異的に切断できることが判明した。

このような検討を全てのプローブにおいて行い、最適なホルムアミド条件を見出した。その結果、各種のメタン生成古細菌の分類群に特異的なプローブとして、表4に示す40種類のプローブの特異性と至適反応条件を見出した (表4)。

同様に、嫌気生各種共生細菌に対する切断プローブを作成した。同様の検討を行い、全てのプローブにおいて行い、最適なホルムアミド条件を見出した。その結果、各種の嫌気生共生細菌の分類群に特異的なプローブとして、表5に示す20種類のプローブの特異性と至適反応条件を見出した (表4)。

また、尿尿などによる河川汚濁、河川汚濁の汚濁源の特定を想定し、牛などの糞便に普遍的に存在する微生物群を標的としたDNAプローブを作成した (表6)。先の検討と同様の実験を行い、全てのプローブにおいて行い、最適なホルムアミド条件を見出した。その結果、各種の嫌気性細菌 (糞便中細菌) の分類群に特異的なプローブとして、表6に示す11種類のプローブの特異性と至適反応条件を見出した (表4)。

その他、*Dehalococcoides*細菌の16S rRNAを検出するためのプローブを作成、計約70種類のDNAプローブの整備と、特異的な反応条件の検討を行った。



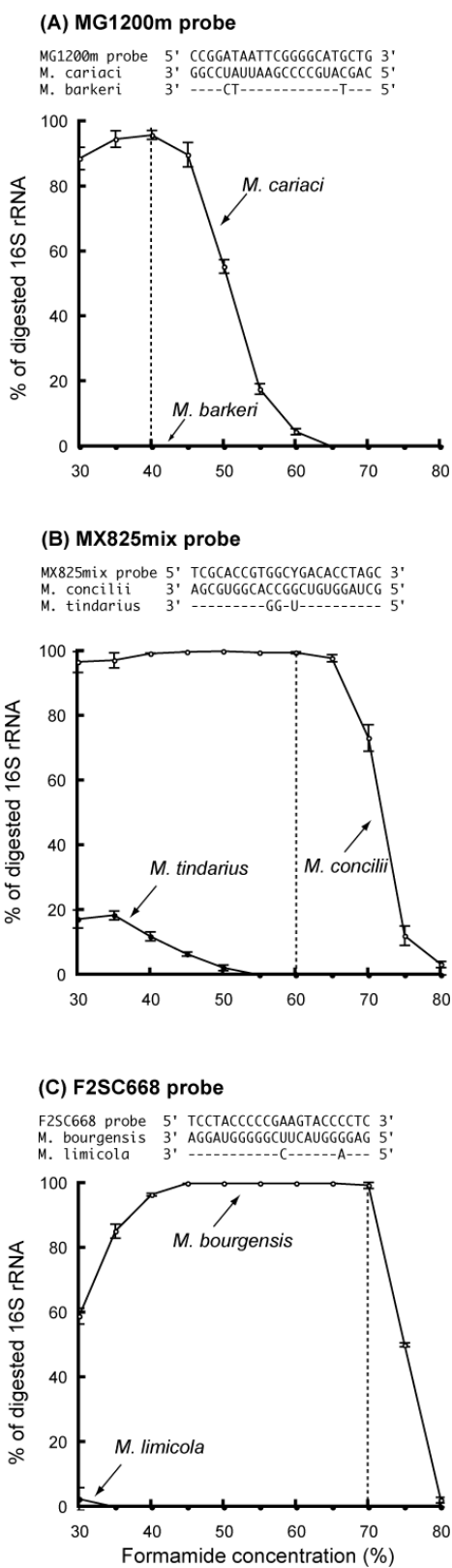


図2 作成した切断DNAプローブの特異性評価の一例

表4 メタン生成古細菌群用切断プローブ

Probe name	Target group	Probe sequence (5'-3')	Probe length (mer)	Target site ( <i>E. coli</i> position) <sup>a</sup>	16S rRNA used for <sup>b</sup> :		Optimal cleavage condition		Reference
					target organism	non-target organism	Formamide (%)	Cleavage coefficient	
ARC915	Domain Archaea	GTGCTCCCCGCCCAATTCCT	20	912-929	1, 2, 9, 10, 15, 20, 24, 26, 28, 32	33, 54	70	1	Stahl <i>et al.</i> (1988)
CMSMM1068m	Class <i>Methanomicrobia</i>	GGATGCTTCACAGTACGAAC	20	1068-1087	1-20	22, 24	35	1	Banning <i>et al.</i> (2005)
MSMX860m	Order <i>Methanosarcinales</i>	GCTCGCTTCACGGCTTCCTC	20	860-879	1-10	11, 16	45	1	Raskin <i>et al.</i> (1994b)
MG1200m	Order <i>Methanomicrobiales</i>	CGGATAAATTCGGGGCATTGGT	22	1200-1221	11-20	1, 9	40	0.96	Raskin <i>et al.</i> (1994b)
FMSC394	Family <i>Methanosarcinaceae</i>	ATGCTGGCACTCGGTTGTC	20	394-417	1,2,4,5,7	13, 20	50	0.99	This study
MX825mix <sup>c</sup>	Family <i>Methanosarcinaceae</i>	TGGCACCGTGGCYGACACTAGC	23	825-845	9	4, 6	60	1	Croceati <i>et al.</i> (2006), Raskin <i>et al.</i> (1994b)
MB1175m	Family <i>Methanobacteriaceae</i>	CGGTGCTCACCTCTCTCTC	20	1175-1194	21-26	9, 17	60	1	Raskin <i>et al.</i> (1994b)
FMTH1183	Family <i>Methanothermobacterium</i>	TACGGACTACCTCGCCGGCA	22	1183-1204	27	1, 4, 10, 32	65	0.97	This study
FMCM1044	Family <i>Methanocaldococcaceae</i>	GTCAACTGGCCCTTCATCTGC	22	1044-1044	30-32	5, 28	50	0.89	This study
MSR21m	Subfamily <i>Methanosarcinales</i>	GCCATGCTGACACTAGCG	20	824-841	1-3	5	55	0.99	Raskin <i>et al.</i> (1994b)
F2SC668	Subfamily <i>Methanomicrobiales</i> SC-2	TCCTACCCCGAAATGACCCCTC	22	668-690	11, 12	9, 13	70	0.99	This study
F2SC732	Subfamily <i>Methanomicrobiales</i> SC-2	TGAAAGCCGCTCTGGTAGGGG	22	732-753	11, 12	1, 9	50	0.99	This study
F3SC984	Subfamily <i>Methanomicrobiales</i> SC-3	CATATCGCTGTCTACCCGG	20	984-1044	17	14	55	1	This study
F6SC393	Subfamily <i>Methanomicrobiales</i> SC-6	GACAGGCACACAGGGTTCC	20	393-420	18, 19	11	50	0.99	This study
F7SC1260	Subfamily <i>Methanomicrobiales</i> SC-7	TATCTCACTCTCGGTGC	20	1260-1279	20	18	50	1	This study
SARC1551	Genus <i>Methanosarcina</i>	GACCAATAATCACGATCAC	20	551-570	1, 2	7, 8, 9	35	0.93	Sorensen <i>et al.</i> (1997)
GMIB1254	Genus <i>Methanomicrococcus</i>	CACCTTCGGTGTAGTTGCC	20	1254-1273	3	11, 19	45	0.97	This study
GMHB842	Genus <i>Methanohalobium</i>	TGGCAGCTAGGAAGGCCGCT	20	842-859	8	7	45	0.96	This study
GMSS261	Genus <i>Methanosalsum</i>	GTCCGCTAGCAGGTACTTGG	20	261-280	7	4	45	0.98	This study
GMCO441	Genus <i>Methanococoides</i>	ACATGCCGTTTACACATGTG	20	441-492	4	5	40	0.81	This study
GMLB834	Genus <i>Methanolobus</i>	TGAAAACGGTCGACCGTCCAG	22	834-851	6	5	70	0.84	This study
GMHP1258	Genus <i>Methanohalophilus</i>	CGGTCACTTTACGTTAGG	20	1258-1277	5	24	30	0.96	This study
GMMS29	Genus <i>Methanomicrobium</i>	CTCGATGTACAGGCACACC	20	829-845	15	13	40	1	Yanagita <i>et al.</i> (2000)
GMG1128	Genus <i>Methanogenium</i>	CGTTCGGAGAACAGGTAG	20	1128-1139	16	5, 13, 15	35	0.99	This study
GMCP489	Genus <i>Methanocarpascalum</i>	GGCCTCGCCTTCTCTACAT	20	489-507	19	14, 16	60	1	This study
GMCL488	Genus <i>Methanocaldococcus</i>	CCCCGCCCTTCTCTCGTGTG	20	488-506	18	11, 17	60	0.99	This study
GMBA006	Genus <i>Methanobrevibacter</i>	GCCATCCGTTAAGAATGGC	20	406-436	21, 22	24, 25, 26	45	0.98	This study
GMBA755	Genus <i>Methanobacterium</i>	TGGCTTTCGTTTACTCACCC	18	755-772	23	26, 27, 28	25	0.98	This study
GMSP838	Genus <i>Methanosphaera</i>	CCGGAACAACCTCGAGGCCAT	20	838-853	23	24	45	1	This study
GMFB541	Genus <i>Methanothermobacter</i>	AAAAGCGCTACCACTTGAGCT	22	541-562	26	21, 23, 25	55	0.90	This study
GMCT28	Genus <i>Methanococcus</i>	ACCCGTTCCAGACAAGTGCCTT	22	728-749	28	29, 31	55	0.98	This study
GMCC31	Genus <i>Methanococcus</i>	ACTACCTAATCGAGCGCAGTCC	22	231-252	28	31	30	0.83	This study
GMCH16	Genus <i>Methanococcus</i>	TTGATAAAGGCCATCGTGTGGC	22	416-445	28	29	35	0.85	This study
GMPL1331	Genus <i>Methanopyrus</i>	GGTTACTACCGATTCCACCTTC	22	1331-1352	32	31	30	0.96	This study
GTMS393m	Thermophilic <i>Methanoseta</i> group	ACCCAGCCTCAGGTCCTCC	20	393-416	10	9	65	1	Zheng & Raskin (2000)
TMX745	Thermophilic <i>Methanoseta</i> group	CCCTTGGCTCGGATCCGTT	20	743-762	10	4, 9	65	0.97	This study
MMX1273	Mesophilic <i>Methanoseta</i> group	GGTTTTAGGAGATCCCGTC	20	1273-1292	9	7, 10	45	1	This study
SMCU1253	<i>Methanoculleus thermophilus</i>	GCCTTTGGCGTCAATACC	20	1253-1272	12	16, 22	59	0.76	This study
SMPL623	<i>Methanoplanus linicola</i>	TTCTCTAAAGCGCTGCAGG	20	623-641	13	19	20	0.99	This study
SMPP1252	<i>Methanoplanus endosymbiosus</i> <i>Methanoplanus petrolearius</i> <i>Methanoplanus pyritari</i>	CTTCTCAGTGTCTGTGCTCA	20	1252-1273	14	13	40	1	This study
EUB338	Most of the domain Bacteria	GCTGCTCCCTCGTAGGAGT	18	338-355	33-49, 51-53	9, 54	65	0.97	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338III	phylum <i>Terrificobacteria</i> class <i>Anaerolineae</i>	GCTGCCACCCGTTAGGTGT	18	338-355	50	10	65	0.97	Daims <i>et al.</i> (1999)

<sup>a</sup> Position of 16S rRNA was referred as *Escherichia coli* numbering system designed based on Brosius *et al.* (1978).<sup>b</sup> Abbreviated strain names are shown in Supplemental Table 1.<sup>c</sup> MX825mix probe consists of equal parts of MX825 (Raskin *et al.* 1994) and MX825c (Croceati *et al.* 2006) probes.

表5 嫌気的環境下に存在する嫌気共生細菌群に対する切断プローブ

Probe name	Target group	Probe sequence (5'-3')	Probe length (mer)	Optimal cleavage condition		Reference
				Formamide (%)	Cleavage coefficient	
<i>Deltaproteobacteria</i>						
GSP469	Genus <i>Syntrophus</i>	GTACCGTCAAAGTACAAAAGGC	20	40	0.98	This study
SYN835	Genus <i>Syntrophobacter</i>	GCAGGAATGAGTACCCCGC	18	45	0.95	Scheid and Stubner (2001)
S223m	<i>Syntrophobacter wolnii</i>	ACGCAGACTCATCCCGTGC	20	60	0.99	Harmsen <i>et al.</i> (1996)
MPOB2m	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	CCGTACGCCATGAAGCTTAT	20	40	0.97	Harmsen <i>et al.</i> (1995)
KOP1m	<i>Syntrophobacter pfennigii</i>	TCAAAGTCCCAGTCTCTCGAC	22	30	0.96	Harmsen <i>et al.</i> (1995)
GSM443	Genus <i>Smithella</i>	GCCACTATGCATTCTTCCCGC	22	50	0.99	McMahon <i>et al.</i> (2004)
<i>Firmicutes</i>						
GSYM1240	Genus <i>Syntrophomonas</i>	TCGCTGCTCTGTACCATCCA	22	60	0.91	This study
S.wol180	<i>Syntrophomonas wolfei</i>	ACATGGTATTGTACAGTTA	21	30	0.98	Hansen <i>et al.</i> (1999)
GTS465	Genus <i>Thermosyntropha</i>	CGTACCTCACGCCACTAAT	20	55	0.98	This study
GST1015	Genus <i>Syntrophothermus</i>	CCCTAAGGCAACCCAGTGT	20	63	0.94	This study
GTAG992	Genus <i>Thermacetogenium</i>	CCAGTCCGCAAGAGATGCA	20	45	0.95	This study
GTE1002	Genus <i>Tepidanaerobacter</i>	TCCGTTTCCGGTCTTACCA	20	55	0.99	This study
GSP634	Genus <i>Sporotomaculum</i>	AAGCTCTGCAGTTTCAATCG	20	40	0.95	This study
Glh821m	Genus <i>Pelotomaculum</i>	ACCTCTACACCTAGCACCC	20	60	0.95	Imachi <i>et al.</i> (2006)
SPTS637	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	CCCTCAAGTCCCTCAGTTTCAA	22	50	0.99	This study
JJTT1145	<i>P. isophthalicum, P. terephthalicum</i>	GGCAGTTCGCTAGAGTG	18	45	0.8	This study
<i>Nitrospirae</i>						
GTDV1015	Genus <i>Thermodesulfobivrio</i>	CCCCTAAGGTCGTCCCCCTT	20	70	0.99	Sekiguchi <i>et al.</i> (2008)
<i>Chloroflexi</i>						
PGNSB941	phylum <i>Chloroflexi</i>	AAACCACACGCTCCGCT	17	50	0.94	Gich <i>et al.</i> (2001)
CFX784	<i>Chloroflexi</i> subphylum I	ACCGGGTCTCTAAATCCC	18	45	0.96	Bjornsson <i>et al.</i> (2002)
SAT634	<i>Anaerolinea thermophila</i>	TAGCCCGCCAGTCTTGAACG	20	60	0.98	This study

<sup>a</sup> Position of 16S rRNA was referred as *Escherichia coli* numbering system designed based on Brosius *et al.* (1978)

表6 牛ルーメン・糞便中に存在する微生物群に対する切断プローブ

Name	Target group	Standardized probe name*	Probe sequence <sup>†</sup>	% of formamide	Cleavage coefficient (reference strain)	Reference
Eub338	Bacteria	S-D-Bact-0338-a-A-18	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	0.96**	Amann et al., 1990
		S*-BactP-0338-a-A-18	GCAGCCACCCGTAGGTGT			Daims et al., 1999
		S*-BactV-0338-a-A-18	GCTGCCACCCGTAGGTGT			
Arc915m <sup>‡</sup>	Archaea	S-D-Arch-0912-a-A-18	CCCCCGCCAAATTCCTTA	30	0.80**	Stahl et al., 1988
Bac303m <sup>‡</sup>	Bacteroides/Prevotella	S*-Bacto-0303-b-A-17	CCARTGTGGGGACCTT	10	0.86 ( <i>Prevotella ruminicola</i> [ATCC19189])	Manz et al., 1996
Erec482m <sup>‡</sup>	<i>Clostridium coccooides</i> - <i>Eubacterium rectale</i> group <sup>§</sup>	S*-Erec-0481-a-A-20	GCTTCTTAGTCARGTACCCT	20	0.76 ( <i>Clostridium coccooides</i> [DSM935])	Franks et al., 1998
Fibr225	<i>Fibrobacter</i>	S-G-Fibr-0225-a-A-21	AATCGGACGCCAAGTCATCCC	25	0.84 ( <i>Fibrobacter succinogenes</i> [ATCC19169])	Stahl et al., 1988
Rfla1269	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	S-S-Rfla-1269-a-A-20	TTCTCTTTTGTAAATGGCCAT	10	0.92 ( <i>Ruminococcus flavefaciens</i> [ATCC19208])	Odenyo et al., 1994
Ralb196	<i>Ruminococcus albus</i>	S-S-Ralb-0196-a-A-18	GTCAACGGCAGTCCTGCT	20	0.92 ( <i>Ruminococcus albus</i> [DSM20455])	Odenyo et al., 1994
Rbro730m <sup>‡</sup>	<i>Ruminococcus bromii</i> , <i>Clostridium sporosphaeroides</i>	S*-Rbro-0730-b-A-18	TAAAGCCCGCAGGCCCGC	30	0.94 ( <i>Ruminococcus bromii</i> [ATCC27255])	Harmsen et al., 2002
Phasco741m <sup>‡</sup>	<i>Phascolarctobacterium</i> and relatives	S*-Phas-0741-a-A-20	TCFCAGCGTCAGACACAGTC	25	0.74 ( <i>Succinilactium ruminis</i> [DSM9236])	Harmsen et al., 2002
Lab158m <sup>‡</sup>	<i>Lactobacillus/Enterococcus</i>	S*-Lacto-0156-a-A-22	GGTATTAGCACCTGTTCCAAAG	20	0.94 ( <i>Lactobacillus plantarum</i> [DSM20174])	Harmsen et al., 1999
		S*-Lacto-0156-b-A-22	GGTATTAGCATCTGTTCCAGG			
Stirc493	<i>Streptococcus/Lactococcus</i>	S*-Stirc-0493-a-A-19	GTTAGCCGTCCTTTCTGG	10	0.98 ( <i>Streptococcus bovis</i> [DSM20480])	Franks et al., 1998
Snm1418	<i>Selenomonas</i> and relatives	S*-Snm-1418-a-A-20	GGCTTCGGGTGTGAATGACT	15	0.66 ( <i>Selenomonas ruminantium</i> [ATCC27209])	This study
Other432	<i>Clostridium thermocellum</i> subgroup	S*-Cther-0432-a-A-20	TCTTCCCTGACTAAAGAAGT	15	0.90 ( <i>Clostridium thermocellum</i> [DSM1237])	This study
		S*-Cther-0432-b-A-20	TCKTCCCCAATCAAAGAAGT			

\*Probe nomenclature according to the earlier description (Alm et al., 1996). †R, A or G; K, T or G.

‡The scissor probes (Arc915m, Bac303m, Erec482m, Rbro730m, Phasco741m, Lac158m) are the modified versions of respective probes described in the references (see the Discussion section). Positions that are modified are shown underlined in the sequences.

§*Butyrivibrio fibrisolvens* is affiliated with this group, but because of one base mismatch we were not able to detect this species by Erec482m probe (data not shown).

\*\*This value has already been determined as described previously (Uyeno et al., 2004).

#### 4. 4. 実環境への適用

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。

その前に、土壌や汚泥試料からRNAを抽出するためのプロトコールを検討し、以下の方法を構築した。

##### <RNA抽出>

1. 試料の重さを測定する。（この時点で0.1g程度）
2. 2 mLスクリーキャップチューブへ1×pH 5.1 buffer 400  $\mu$ Lを加えホモジナイザーで汚泥を破砕する。
3. チューブに0.2 mmジルコニウムビーズを0.4g量り取り、20%SDS 80  $\mu$ L、酸性フェノール 500  $\mu$ Lを添加し、ボルテックスで十分に混合する。
4. ビーズビーターを使用してビーディングを行う。（スピード5.5、40sec×3）
5. 遠心分離（15000 rpm、5分）を行い、水層（上澄み層）を15mLチューブに回収する。
6. 回収サンプル液量に対して等量のbuffer RLT\*を15 mLチューブに添加後、ボルテックス混合する。  
\* buffer RLTの調整：buffer RLT 1 mLに対し、メルカプトエタノール10  $\mu$ lの割合で加え、混合する。  
（サンプル数分を15mLチューブ内で作成し、15 mLチューブに分注する。5.の遠心の際に作成しておく。よって、ステップ5.および6.はbuffer RLTにサンプルを添加する操作となる s）  
\* サンプル：500  $\mu$ l → buffer RLT：500  $\mu$ l、メルカプトエタノール：5  $\mu$ l
7. 回収サンプル液量に対して2倍量の70%EtOHを15 mLチューブに添加後、軽くピペッティング混合する。  
\* サンプル：500  $\mu$ l → 70%EtOH：1 mL
8. 混合液をRneasy分i columnに滴下し（最大700  $\mu$ l）、遠心分離（15000 rpm、15秒）を行い、フロースルーを捨てる。混合液がなくなるまでこのステップを繰り返す。
9. columnにbuffer RW1(Wash buffer) 350  $\mu$ lを滴下し、遠心分離（15000 rpm、15秒）を行い、フロースルーを捨てる。
10. 1.5mLチューブにDNase 10  $\mu$ L、buffer RDD (DNaseに添付) 70  $\mu$ lを添加し、手でゆっくり攪拌する。
11. columnに【DNase + buffer RDD】80  $\mu$ Lを添加し、室温で30分間静置する。  
（マニュアルは15分静置とあるが、長くなっても良い。）
12. buffer RW1 350  $\mu$ Lを滴下し、遠心分離（15000 rpm、15秒）を行い、フロースルーを捨てる。
13. columnを新しい2 mLチューブ（kitに添付）に入れ、buffer RPE\* 500  $\mu$ lを滴下し、遠心分離（15000 rpm、15秒）を行い、フロースルーを捨てる。  
\* buffer RPEの調整：buffer RPEが新品の場合、EtOH加える。
14. columnにbuffer RPE\* 500  $\mu$ Lを滴下し、遠心分離（15000 rpm、2分）を行い、フロースルー

を捨てる。

\*この遠心分離でEtOHを十分に飛ばす。

15. 回収用1.5 mLチューブ（サンプル名記入）にcolumnをセットし、RNase-free H<sub>2</sub>O 50 µLを滴下し、遠心分離（15000 rpm、1分）を行う。
16. 再度RNase-free H<sub>2</sub>O 50 µlを滴下し、遠心分離（15000 rpm、1分）を行う。  
よって、最終的な回収サンプル量は100 µlとなる。

本方法を活用し、下水消化汚泥を含む6種類の汚泥からRNAの抽出を行った。対象とした汚泥のリストおよびその性状を表7に示す。これらの汚泥を利用し、メタン生成古細菌群、および嫌気性共生細菌群を検出した例を表8およびお表9に示す。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（表8）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、本手法を土壌サンプルに適用する試みを行った。様々な試行錯誤を行ったが、土壌試料から上記方法で高い質を示すRNAサンプルを得ることができなかった。RNA試料が分解されていない状態で、かつある程度の量のRNAが得られないと、現状のRNase H法を適用することはできない。従って、土壌試料において特定の微生物群を定量する場合、DNAを標的として、定量PCRによる定量法を行う必要があることが分かった。

その一例として、標的DNAを*Dehalococcoides* 16S rRNA遺伝子（標準DNAは、表2において整備）とし、標的DNAを10<sup>2</sup>~10<sup>7</sup>コピーまで希釈して、定量的PCRを行った。本研究で作成したDNAプローブ配列をTaqmanプローブとして利用した方法を採用し、ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems)で評価を行った。その結果、R=0.9996の高い相関性を示す検量線を作成することができた。

次に、土壌サンプル0.5 gからDNAを抽出した。用いた試料(抽出DNA濃度)は、黒ボク土 (横浜) (10.1 ng/µL)、黒ボク土 (青梅) (67.7 ng/ µL)、黒ボク土 (鹿沼) (9.8 ng/ul)、赤黄色土(長門) (78.4 ng/µL)、水田土壌 (青梅) (13.7 ng/µL)、川砂 (9.7 ng/µL)、褐色森林土(新潟) (133.4 ng/µL)、油汚染土 (35.7 ng/ul)であり、地下水サンプルも利用し、*Dehalococcoides*属細菌の検出を行った。その結果、いずれの土壌試料からも*Dehalococcoides*属細菌由来のrRNA 遺伝子は検出されなかった。一方、地下水中からは*Dehalococcoides*属細菌由来のrRNA 遺伝子が10<sup>4-6</sup> copies/mLのオーダーで検出された。本地下水はTCE等で汚染されており、その結果*Dehalococcoides*属細菌が検出されたものと思われる。

本研究で整備したプローブは、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。また、FISH (Fluorescent in situ hybridization) 法などにも利用できると思われる。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と思われる。

表7 サンプルとして利用した嫌気生廃水処理プロセス

Reactor No.	Wastewater type	Reactor type	Volume (m <sup>3</sup> )	Temperature (°C)	COD loading rate (kg COD/m <sup>3</sup> /d)	COD removal (%)	VFA concentration in influent (mg COD/l)		
							Acetate	Propionate	
1	Sugar-processing	UASB	380	35-40	10	87	410	260	
2	Amino-acid processing	UASB	65	35-40	3.7	55	430	110	
3	Clear-liquor processing	UASB	2.5	50-55	60	89	3000	N.D. <sup>a</sup>	
4	Clear-liquor processing	UASB	2	37	36	90	2600	N.D.	
5	Sewage wastewater	EGSB	0.071	23	2.0	36	16	10	
6	Sewage wastewater	Digester	170	30	0.038	93	N.T. <sup>b</sup>	N.T.	

<sup>a</sup> Not detected.<sup>b</sup> Not tested.

表8 SSU rRNA切断法による嫌気性廃水処理プロセスの微生物群集構造の解析結果

Target group	Probe name	Cleavage SSU rRNA fragment (%) at reactor No.						No. of clones retrieved from reactor No. <sup>b</sup>	
		1	2	3	4	5	6	1	2
Domain <i>Bacteria</i>	EUB338	70.2 ± 2.6	23.8 ± 4.6	50.9 ± 3.7	31.5 ± 1.2	29.4 ± 2.8	42.0 ± 0.2		
	EUB338III	3.3 ± 0.5	2.3 ± 0.3	N.D. <sup>a</sup>	2.2 ± 1.1	N.D.	9.3 ± 0.3		
Domain <i>Archaea</i>	ARC915	28.1 ± 0.9	42.0 ± 3.2	57.0 ± 1.4	70.9 ± 0.3	78.9 ± 0.9	33.9 ± 3.5	49 (100)	75 (100)
Class <i>Methanomicrobia</i>	CMSMM1068m	19.4 ± 1.9	33.1 ± 2.4	38.4 ± 0.4	59.3 ± 1.6	69.2 ± 0.2	22.3 ± 2.0	25 (51)	53 (70.1)
Order <i>Methanosarcinales</i>	MSMX860m	15.4 ± 2.1	32.8 ± 1.0	39.2 ± 1.3	55.8 ± 1.4	69.0 ± 0.5	15.6 ± 1.0	25 (51)	53 (70.1)
Family <i>Methanosarcinaceae</i>	FMSC394m	N.D.	N.D.	39.9 ± 0.2	N.D.	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)
Subfamily <i>Methanosarcinaceae</i>	MS821m	N.D.	N.D.	40.1 ± 5.2	N.D.	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)
Genus <i>Methanosarcina</i>	SARCI551	N.D.	N.D.	41.7 ± 3.1	N.D.	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)
Family <i>Methanosarcinaceae</i>	MX825mix	9.2 ± 0.2	33.5 ± 0.9	N.D.	54.8 ± 1.2	64.4 ± 0.0	16.6 ± 0.7	25 (51)	53 (70.1)
Mesophilic <i>Methanosaeta</i> group	MMX1273m	5.7 ± 1.7	23.9 ± 0.9	N.D.	48.5 ± 0.8	41.8 ± 3.4	12.1 ± 0.6	12 (24.5)	53 (70.1)
Order <i>Methanomicrobiales</i>	MG1200m	2.9 ± 0.3	17.2 ± 0.6	N.D.	5.0 ± 0.1	N.D.	10.3 ± 1.5	9 (18.4)	11 (14.7)
Family <i>Methanoplanus limicola</i>	SMP1623	N.D.	N.D.	N.D.	2.0 ± 0.1	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)
Family <i>Methanobacteriaceae</i>	MB1175m	2.0 ± 0.0	N.D.	1.8 ± 0.0	12.7 ± 0.3	10.3 ± 2.0	N.D.	15 (30.6)	11 (14.7)
Genus <i>Methanobrevibacter</i>	GMB406	1.2 ± 0.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)
Genus <i>Methanobacterium</i>	GMBA755	N.D.	N.D.	N.D.	12.7 ± 0.5	9.8 ± 0.5	N.D.	15 (30.6)	11 (14.7)
Genus <i>Methanothermobacter</i>	GMTB541	N.D.	N.D.	2.0 ± 0.0	N.D.	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)
Family <i>Methanothermaceae</i>	FMTH1183	N.D.	N.D.	4.7 ± 0.4	N.D.	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)
Family <i>Methanocaldococcaceae</i>	FMCM1044	N.D.	N.D.	4.8 ± 0.6	N.D.	N.D.	N.D.	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup> Not detected (below detection limit [ $<1\%$  of the total SSU rRNA]).<sup>b</sup> The number in parentheses shows the percentage of respective clones in the total clones examined.



表9 SSU rRNAの配列特異的切断反応による主要細菌群集の評価

Target group	Probe name	Cleavage SSU rRNA fragment (%) at reactor No.:				
		1	2	3	4	5
Domain <i>Bacteria</i>	EUB338 <sup>a</sup>	68.1 ± 2.5	23.1 ± 4.2	49.3 ± 3.6	30.6 ± 1.2	40.8 ± 0.2
	EUB338III <sup>a</sup>	3.2 ± 0.5	2.2 ± 0.2	N.D. <sup>b</sup>	2.1 ± 1.1	8.9 ± 0.3
Domain <i>Archaea</i>	ARC915 <sup>a</sup>	28.1 ± 0.9	42.0 ± 3.2	57.0 ± 1.4	70.9 ± 0.3	33.9 ± 3.5
Phylum <i>Proteobacteria</i>						
Genus <i>Syntrophobacter</i>	SYN835	3.0 ± 0.1	3.9 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Syntrophobacter wolinii</i>	S223m	1.8 ± 0.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Genus <i>Smithella</i>	GSM443	N.D.	N.D.	N.D.	3.4 ± 0.4	N.D.
Phylum <i>Firmicutes</i>						
Genus <i>Pelotomaculum</i>	GIh821m	N.D.	N.D.	3.5 ± 0.7	N.D.	N.D.
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	SPTS637	N.D.	N.D.	1.5 ± 0.1	N.D.	N.D.
Phylum <i>Chloroflexi</i>						
Class <i>Anaerolineae</i>	PGNSB941	20.2 ± 1.0	8.5 ± 1.0	3.3 ± 0.3	N.D.	10.5 ± 1.2
	CFX784	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.2 ± 0.9

<sup>a</sup> The data of domain-specific probes were adopted from Narihiro et al. (2008)

<sup>b</sup> N.D., not detected.

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

本サブテーマで作成した、嫌気性微生物群を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と考えられる。

### (2) 地球環境政策への貢献

本サブテーマは、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、その計測の基盤となる核酸標準物質の整備を目指したものである。そのため、本指針の具体化を進める上での基盤となり得るライブラリが構築されつつあると考えている。今後、これらの標準物質のさらなる整備と頒布体制の構築を行い、地球環境施策を実施する上でのものさしの一つとして利用されるものであると考える。

## 6. 引用文献

- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
- Delong, E. F. (1992). *Archaea* in Coastal Marine Environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:5685-5689.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. John Wiley & Sons: Chichester, United Kingdom., 115-175pp.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar et al (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363-1371.
- Uyeno Y, Sekiguchi Y, Sunaga A, Yoshida H, Kamagata Y (2004). 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. *Appl Environ Microbiol* 70: 3650-3663.
- Stahl et al., 1988
- Banning N, Brock F, Fry JC, Parkes RJ, Hornibrook ERC, Weightman AJ (2005). Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. *Environ Microbiol* 7: 947-960.
- Raskin L, StromLey JM, Rittmann BE, Stahl DA (1994b). Group-specific 16S ribosomal-RNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 60: 1232-1240.
- Crocetti et al., 2006
- Sorensen et al., 1997
- Yanagita et al., 2000
- Zheng D, Raskin L (2000). Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. *Microb Ecol* 39: 246-262.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990). Combination of 16S ribosomal-RNA-targeted oligonucleotide probes with flow-cytometry for analyzing mixed

- microbial-populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919-1925. Ariesyady HD, Ito T, Okabe S (2007). Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res* 41: 1554-1568.
- Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 22: 434-444.
  - Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 4801-5.
  - ?? Raskin et al., 1994 → a or b?
  - Scheid D, Stubner S (2001). Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 175-183.
  - Harmsen HJM, Akkermans ADL, Stams AJM, deVos WM (1996). Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 62: 2163-2168.
  - Harmsen HJM, Kengen KMP, Akkermans ADL, Stams AJM (1995). Phylogenetic analysis of two syntrophic propionate-oxidizing bacteria in enrichments cultures. *Syst Appl Microbiol* 18: 67-73.
  - McMahon KD, Zheng DD, Stams AJM, Mackie RI, Raskin L (2004). Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnol Bioeng* 87: 823-834.
  - Hansen KH, Ahring BK, Raskin L (1999). Quantification of syntrophic fatty acid-beta-oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65: 4767-4774.
  - Imachi H, Sekiguchi Y, Kamagata Y, Loy A, Qiu YL, Hugenholtz P et al (2006). Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with *Desulfotomaculum* cluster I are widely distributed in methanogenic environments. *Appl Environ Microbiol* 72: 2080-2091.
  - Sekiguchi Y, Muramatsu M, Imachi H, Narihiro T, Ohashi A, Harada H et al (2008). *Thermodesulfovibrio aggregans* and *Thermodesulfovibrio thiophilus* sp. nov., two anaerobic, thermophilic, sulfate-reducing bacteria isolated from thermophilic methanogenic sludge, and emended description of the genus *Thermodesulfovibrio*. *Int J Syst Evol Microbiol* (in press).
  - Gich F, Garcia-Gil J, Overmann J (2001). Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch Microbiol* 177: 1-10.
  - Bjornsson L, Hugenholtz P, Tyson GW, Blackall LL (2002). Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology* 148: 2309-2318.
  - Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K. H. Schleifer. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142:1097-106.
  - Franks, A. H., H. J. Harmsen, G. C. Raangs, G. J. Jansen, F. Schut, and G. W. Welling. 1998.

Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3336-45.

- Odenyo, A. A., R. I. Mackie, D. A. Stahl, and B. A. White. 1994. The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3688-96.
- Harmsen, H. J., G. C. Raangs, T. He, J. E. Degener, and G. W. Welling. 2002. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2982-90.
- Harmsen, H.J.M., Raangs, G.C., He, T., Degener, J.E. and Welling, G.W. 2002. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68:2982-2990.
- Alm, E. W., D. B. Oerther, N. Larsen, D. A. Stahl, and L. Raskin. 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3557-3559.

## 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