

ローリングサークル増幅によるRNA直接検出

Directly RNA detection by rolling circle amplification

広島大学大学院 先端物質科学研究科 **高橋 宏和**

Hirokazu Takahashi, PhD (Researcher)
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University

広島大学大学院 先端物質科学研究科 **堀尾 京平**

Kyouhei Horio (Graduate student)
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 **小堀 俊郎**

Toshiro Kobori, PhD (Senior researcher)
Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

広島大学大学院 先端物質科学研究科 **岡村 好子**

Yoshiko Okamura, PhD (Associate professor)
Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University



キーワード

Rolling circle amplification, phi29 DNA polymerase, RNA detection

01 | はじめに

近年、抗生物質耐性の病原性細菌や、新興または再興の人畜共通感染ウイルスの出現により、迅速診断法やポイントオブケアテスト(POCT)の開発が進められている。これら病原体による被害を最小にし、治療や拡散防止処置、感染経路の特定を円滑に行うためには、先ず初めに菌種の同定と病原性および伝染性の有無の確認を迅速かつ正確に行うことが何よりも重要である。これら病原体を特定する技術としては、ルーチンを主とする検査部門(病院等)や食品産業においては、感度が高いこと、ランニングコストが低いことが重視されて、培養法が標準的な分析方法として採用されてきたが、培養可能な菌種に限定され、かつ時間が掛かるという大きな欠点がある。しかし、ウイルスの場合、その多くが培養できないため、短時間かつ高い正確性で病原を特定可能な方法の開発が求められている。

培養法に替わる最も代表的な診断法は、抗原抗体反応を利用したイムノクロマト法だが、検出感度が低く、擬陽性が発生し易い、微生物の生死判定ができないなどの理由から、必ずしも普及しているという状況では無い。また、PCR法を用いた微生物のDNAやRNAを対象とした分子生物学的測定法は、迅速で正確性や感度に優れている一方で、実施に必要な機材(サーマルサイクラーなど)の導入コストや、増幅産物のキャリアオーバーコンタミネーションなどによる擬陽性を防止するための専用施設(クリーンルーム)の設置やその維持のためのコスト負担が大きい。このため普及の妨げとなっている。

近年は高価なサーマルサイクラーが不要な、等温増幅法に

よる核酸検出、例えばLAMP法が分子生物学的な微生物検出方法として期待されているが、等温とはいえ60-65℃といった比較的高い反応温度が必要であり、かつ、PCRで問題に挙げられているキャリアオーバーコンタミネーションによる擬陽性の問題を克服できていない。そのため、キャリアオーバーコンタミネーションに対して耐性がありつつ、かつ室温程度で反応可能な核酸検出法、特に開発途上の国や地域での使用可能となる方法に注目が集まっている。

我々の研究グループではこれまで主に、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた全ゲノム増幅法を利用した、微生物1細胞のゲノム解析の研究を行っている¹⁾。その一方で、Phi29 DNA ポリメラーゼのもう一つの主な利用方法である、ローリングサークル増幅(rolling circle amplification; RCA)法による、RNAの直接検出方法の開発も行っている。Phi29 DNA ポリメラーゼを利用したRCA法は、室温程度(25-37℃)において等温反応が可能で、かつ簡便なシステムであることから、新たな核酸配列検出方法として、現在注目と期待が集まっている。本稿では、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いたRCA法による、特定の微生物検出方法について概説する。

02 | ローリングサークル増幅(RCA)

まず初めにRCA法について説明しておく。RCA法は1995年にA. Fire(後にRNA干渉に関する研究でノーベル賞を受賞している)らが提唱²⁾した、環状DNAをゲノムとして持つウイルス

やプラスミドDNAの複製を模倣したDNAの合成方法である。環状の1本鎖DNA(ssDNA)を鋳型として、鋳型にハイブリダイズしたプライマーの3'末端を基点にDNAポリメラーゼがDNAを合成していき、環状の鋳型を一周してプライマーの5'末端にDNAポリメラーゼが戻ってきたとき、前方にあるDNA鎖をポリメラーゼが2本鎖DNAを引き剥がしながらDNAを合成する鎖置換(strand displacement)をしながらDNA合成を続け、環状DNAの相補鎖配列がタンデムな状態で並んだ長鎖のssDNAを合成する方法である(図1a)。この反応の鍵はDNAポリメラーゼの鎖置換活性にある。PCRのような反応温度サイクルが不要なので、全て等温で反応可能であり、従って酵素は耐熱性である必然性は無い。

このDNA増幅方法が特に注目され始めたのは、1998年にP. Lizardiら³⁾が5'および3'末端の配列に標的核酸との相補鎖配列を持つ南京錠型のパドロックプローブ(Padlock probe; PLP)を利用したlinear RCA法(これ以降、単にRCAと書いた場合はこのlinear RCAを指す、図1b)、さらにはRCAで合成されたssDNAに対する2種類の増幅用プライマーを加えたHyperbranched-RCA(HRCA)法(図1c)を発表したことによることが大きい。特に、1分子の目的DNA配列の存在をRCA増幅産物(rolling circle product; RCP)として増幅し、蛍光の検出プローブによって可視化したことが発端となっている。この論文以降、検出対象はDNAのみならず、抗原抗体反応のシグナル増幅(immuno-RCA)⁴⁻⁶⁾、生体小分子の有無など多岐にわたっており⁷⁾、特に近年はmiRNAの特異的検出に関する論文が多く、全体の8割以上を占めている。

特筆すべきは、RCA法では初期に投入したサンプルとRCPとの間では、増幅の開始に関わる核酸の3'末端の数は変化しないことである。そのため、PCRやLAMP法とは異なり、例えばキャリアオーバーコンタミネーションを起こしても、次の増幅結果に与える影響は小さいことから、施設整備等の初期投資が少なく済むことが期待されている。またPhi 29 DNAポリメラーゼを利用したRCA法は、室温程度(25-37°C)の等温反応である

ことを鑑みて、迅速診断システムの構築に適していると考えられている。

余談ではあるが、P. Lizardiらの開発したHRCA法の増幅メカニズムは、その後R. Laskenらのグループにより、ランダムプライマーを利用した非特異的増幅法であるmultiply-primed RCA (MPRCA)⁸⁾法に発展していった。この増幅方法は、操作手順が非常に簡便で、かつPhi29 DNAポリメラーゼの高い正確性のため増幅配列にエラーがほとんど含まれないことなどから、サンガーシーケンス用の鋳型調整方法として世界のシーケンス解析拠点で重用されていた。さらに、MPRCA法はランダムプライマーを利用するため対象配列がほとんど不明でも増幅可能なことから、未知の環状DNAゲノムのウイルス検出等に利用されている⁹⁾。また、大腸菌等の宿主経由ではクローニングが難しい配列の*in vitro* cloning¹⁰⁻¹¹⁾や、さらには近年話題の合成生物のゲノム構築にも利用されている¹²⁾。

また、HRCA法の増幅システムはさらにその後、例えばヒトゲノムの様な直鎖状ゲノムでも全ゲノム増幅が可能であるMultiple displacement amplification (MDA)法¹³⁾へと発展しており、現在最も信頼度の高く、また使用頻度の高い方法となっている。

03 | RCAでの微生物mRNA直接検出

RCA法を利用したウイルスや微生物の検出は、多少煩雑な手順を踏むが、検出対象のDNA配列に対するPLP¹⁴⁾を利用した方法が報告されていた。しかしながら、DNAを検出対象とした場合、微生物の生死判定はできず、またRNAを検出対象とした場合には、一度逆転写反応が必須となる。一方、Phi29 DNAポリメラーゼはDNAだけでなくRNAも、プライマーとしてDNA合成に利用できる。そのため、検出対象をDNAからRNAに代替することは理論上可能である。しかし、RNAとPLPがハイブリダイズを形成(RNA/PLP)しても、既存のT4 DNAリガーゼ(T4Dnl)でPLPのシール(プローブの末端を結合して環状化)を試みたとき、DNAのそれと比べシール効率が著しく悪化することが他の研究報告から解っていた¹⁵⁾。そのため、RNAは逆転写を経てcDNAに変換されて、従来法が適用されていた。

そこで我々はRNA検出用プローブをPLPから変更し、予め環状化させたDNAプローブを用いることを検討した。予めプローブを環状化しておけば、RNA/PLPシール効率は無視できるためである。しかしそれまでのDNAの環状化は、PLPをシール用のオリゴDNAとハイブリダイズさせた後、T4Dnlでシールし、その後シール用オリゴDNAをエクソヌクレアー

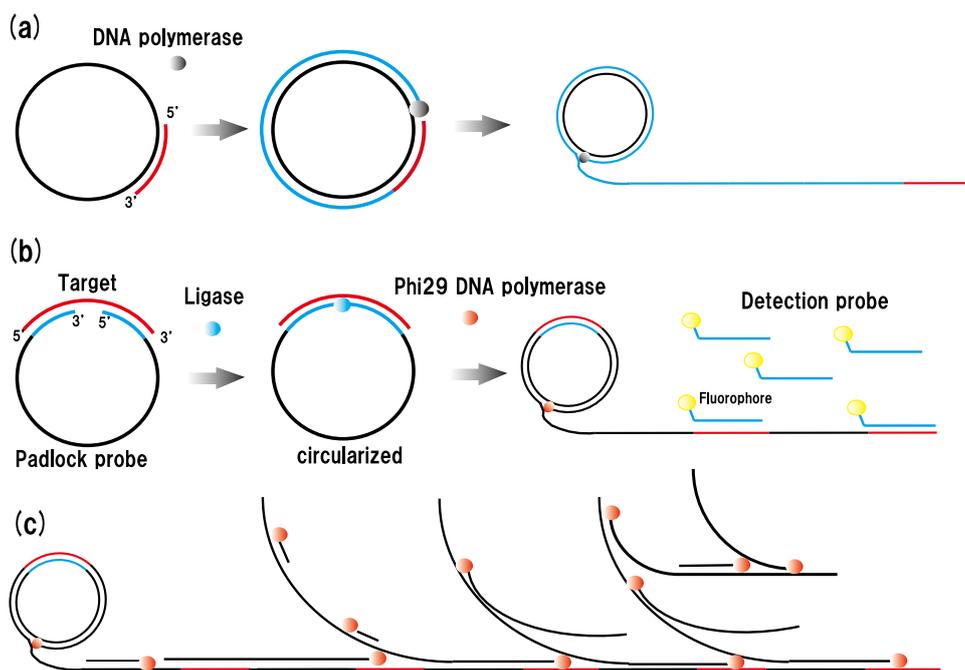


図1 Rolling circle amplification (RCA)
 (a) RCAの基本的な増幅システム
 (b) パドロックプローブ(padlock probe; PLP)を用いたlinear RCA
 (c) Hyperbranched-RCA(HRCA)の増幅模式図

ぜ等で除いていたが、除去が完全では無く、残存したシール用オリゴDNAそのものがノイズの原因と考えられるシグナルノイズ比(SN比)の悪化が問題視されていた。しかし我々は、直接オリゴDNAを環状化できるCircLigaseを利用して、環状化DNAプローブを作成することとした。CircLigaseを用いて事前に目的のオリゴDNAプローブを環状化しておき、未反応(すなわち直鎖状)のオリゴDNAは、直鎖状DNAのみを分解するExonuclease I等で処理して予め除くことで、SN比の向上を試みた。そして、この環状化DNAプローブと、標的微生物が発現しているmRNAの3'末端を利用して、RCA反応を起こさせるRNA-primed RCA(RPRCA)法として確立した(図2)¹⁶⁾。原

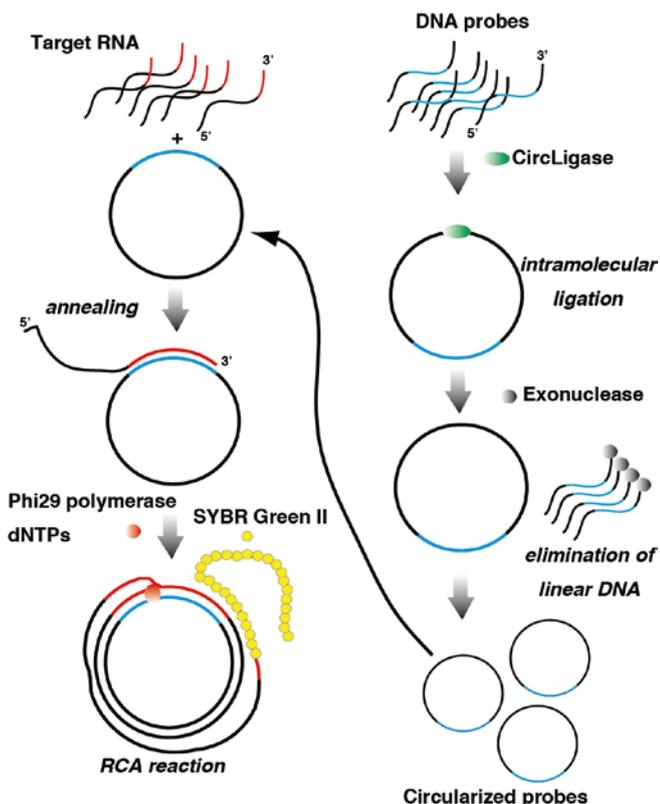


図2 RNA-primed RCA(RPRCA)による微生物mRNA検出法の模式図

核微生物のmRNAの3'末端には、真核生物のmRNAのようなpoly(A)テールが存在しないため、個々のmRNAの区別に利用でき、mRNAそのものを直接RCA法におけるDNA合成開始のプライマーとして利用出来ると考えたからだ。

このシステムで、mRNAを特異的に検出可能かどうかを、蛍光タンパク質GFPを発現している大腸菌を用いて確認した。ネガティブコントロールとしては、GFP発現用のプラスミドを保持しているが、GFP mRNAは発現していない菌体を用いた。その結果、本システムはGFP mRNAのみを特異的に検出できることが確認された¹⁶⁾。

このシステムはこれまでのRNA検出システムとは異なり逆転写反応の必要が無く、またRT-PCR等では必須であったRNA抽出時のDNase処理も必要がなく、それまでのRNA検出法に比べ、RNA抽出時や検出時の操作が簡便であることが特色である。しかしながら、検出感度は1反応当たり 10^3 コピーと、PCRやLAMP法と比べるとかなり見劣りすることも確認されたが、この検出感度の詳細については後述することとする。

04 | RPRCA法の実施における問題点

RPRCA法が微生物のmRNA検出に有効であることが確認されたが、実際に病原性微生物等を検出するに当たっては問題があることが、それ以降の検討で次第に明らかにもなった。その問題とは、第一に微生物mRNAの3'末端配列の情報が極端に少ないこと、第二にゲノム配列情報からの3'末端配列の予測、すなわち転写終結の予測にブレが大きいことである。次世代シーケンサー(NGS)の登場により、微生物でも多数のRNAseqと呼ばれるmRNA配列解析が行われているが、真核生物とは異なり、mRNA配列にpoly(A)配列を持たないため、逆転写反応はランダムプライマーで行われている。その結果、RNAseq解析のデータからは、微生物mRNAの3'末端配列が欠損することとなる。従って、膨大な数のRNAseq解析データがあるにも拘わらず、この情報はRPRCA反応には全く利用できない。

さらに、対象微生物の全ゲノム情報が公開され、mRNA中のタンパク質のコーディング配列は記載されているが、転写終結配列がどこであるかは記載されることは無い。実際、微生物mRNAの転写終結に関わる配列、特に大腸菌で転写終結のシステムとして提唱されている、20 nt程度の逆方向反復配列(inverted repeats)や、転写終結に関わる ρ 因子の結合部位(rho loading site)を予測しいくつか予備実験を行ったが、あまり研究が進んでいない分野であり十分な精度で予測ができず、全く使えない可能性が推察された。

また多少予測がズれていても、Phi29 DNAポリメラーゼは3'-5'リボエキソヌクラーゼ活性を持つとされ、その相補鎖形成していない余りの部分を分解してRPRCA反応が進むことを期待していたが、我々の研究室のみならず他の研究グループもこの活性は全く確認できず¹⁷⁾、予測が間違っていてRPRCA反応が開始しないのか、mRNAが無いから動かないのかの区別が全く付かなくなってしまった。以上のことから、微生物のmRNAを検出対象としても、検出できるのは転写終結配列の解析まで明らかとなっている極僅かなmRNAに限られてしまうこととなり、汎用性が低いことが明らかとなった。

05 | RNase H-assisted RCAによるRNA直接検出法の汎用化

1) RNase H-assisted RCA

そこで我々は、対象RNA配列の位置情報に依存すること無く、プローブをmRNA上に任意に設定できるようにRPRCA反応システムを見直すこととした。もし任意にプローブ位置を設定できれば、mRNA分子内部配列のRNAseqデータも、また真核生物のように末端配列にpoly(A)配列があっても全て検出対象として利用できることとなる。

ここで我々は、環状DNAプローブとハイブリダイズしたRNAの内部配列をRNase Hで切断、ニックを入れることにより強制的に3'末端を作成し、この3'末端からDNA合成を開始させることを思いついた。手始めに*in vitro*転写によって作成したGFP mRNAの内部配列に対してプローブを設計し、環状DNAプローブを作成、RNase H存在下・非存在下でRCA反応

が起こるかどうかが確認した。その結果、予想通りに任意の配列上にプローブを設定でき、かつRCPが確認できた¹⁸⁾。

しかしRNAサンプルをGFP mRNAを発現した大腸菌の全RNAに変更したところ、GFPの発現の有無に関係なくRCPが確認されてしまった。これは環状DNAプローブにミスマッチハイブリダイズを起こした他のRNAに対してもRNase Hがニックを作り、そこからDNA合成が開始されRCA反応が起きているものと予想されたため、環状プローブの配列等を色々変更してみたが、結果は全く改善されなかった。

そこで、環状化プローブの使用は諦めて、PLPを利用したRCA法に切り替え、新たにRNase H-assisted RCA (RHa-RCA)法¹⁹⁾として確立することとした。標的RNAとハイブリダイズしたPLPのみ環状化すれば、例えばPLPに非対象のRNAがハイブリダイズしRNase Hによってニックが形成されても、RCA反応による永続するDNA合成は起こらないはずである(図3a)。

2)リガーゼの検討

この方法を用いるに当たって問題なのは、前述の通りT4Dnlではシール効率がRNA/PLPを対象とした場合に低いことにある。そこで、当時新たにNew England Biolabs社から販売が開始され、RNA/PLPも環状化可能であると推測されたSplintRリガーゼ(SplintR)を利用して、PLPの環状化を行い、T4Dnlと比較することとした。また同時に、他の論文でRNA/PLPをシールできる能力があると報告のあった、T4 RNAリガーゼ2 (T4Rnl2)²⁰⁾も比較対象として検討した。その結果、SplintRのみが効率良くRNA/PLPでもPLPの環状化が可能であり、反応液中のATP濃度にも依存しなかった(図3c)。また、T4DnlはATP

濃度が10 μMの時に僅かにPLPを環状化することができたが、ATP濃度が高くなると、全くシールすることができず、これについては既報通りであった。一方で、T4Rnl2は、いずれのATP濃度においてもPLPを環状化することができず、これは複数のリガーゼの基質特異性を比較した既報¹⁵⁾と同じ結果であり、RCA反応にT4Rnl2が利用できるとした既報とは真逆の結果であった。この結果から、我々のRNA検出用のRCAの反応にはSplintRを利用することとした。

3)プローブの設定箇所の検討

次に、PLPの設定箇所がmRNA上の位置によって、そのシール効率に影響を与えるかどうかを検討した。Circligaseを利用してプローブを予め環状化した場合には、プローブのmRNA上の位置は基本的に環状化効率に影響を与えない。しかし、PLPの設定位置により、例えばRNAの二次構造によるハイブリダイズの効率や、RNA配列そのものがシール効率に大きく影響を与えるようであれば、任意の配列をプローブとしては設定できないことになる。

そこで、GFP mRNAの内部配列中にプローブを5箇所設定し、環状化効率を確認した。その結果、環状化効率に若干の差はあるものの、どの位置のプローブも環状化することが可能であり(図3b, d)、RNase Hの添加によりRCPが生成されることが確認された。今回の結果から、例えばRNAseqのデータのように、mRNAの配列の一部しかない無い情報からでも、基本的にはRHa-RCA用のPLPを設計することが可能であることが示唆された。

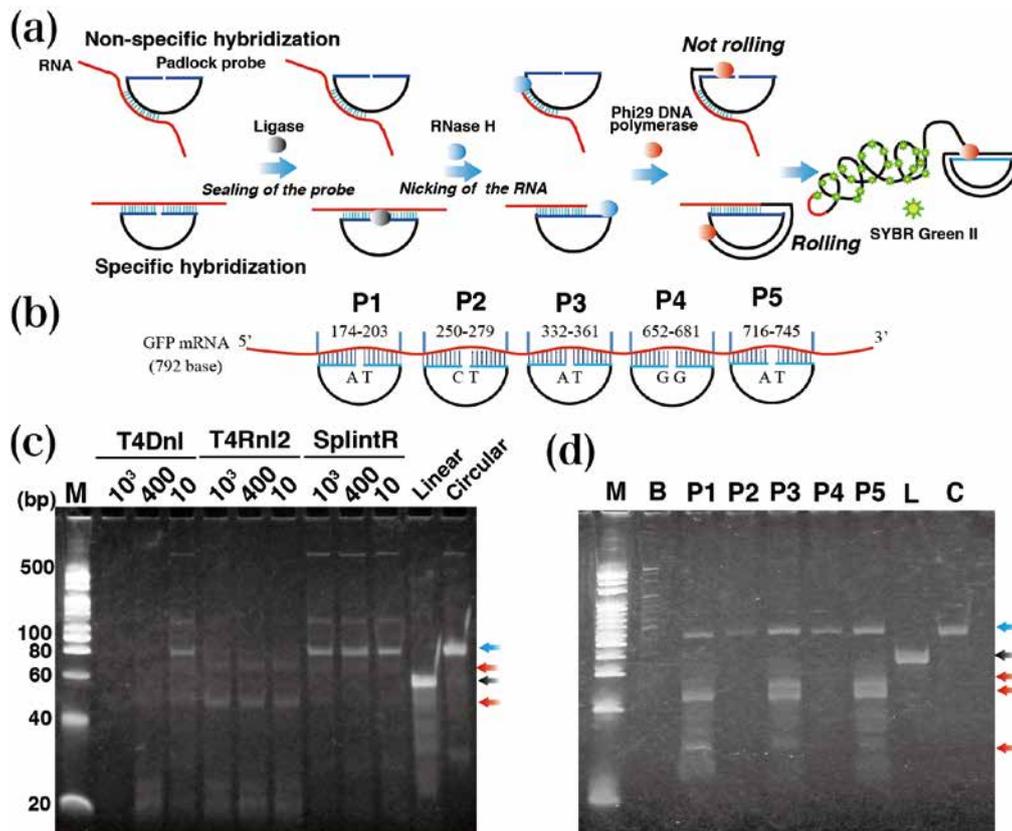


図3
 (a) RHa-RCAによるRNAの検出模式図
 (b) 設定したP1-P5 プローブの、GFP mRNA上の位置、および5'末端と3'末端の塩基
 (c) ライゲースの環状化効率の比較。各レーン上の数字はATP濃度を示す。Linearは未反応のオリゴヌクレオチド、CircularはCircligaseで環状化したssDNAコントロール。Mはサイズマーカー。黒矢印は直鎖状ssDNA、青矢印は環状化ssDNA、赤矢印はヌクレアーゼ処理による破片。
 (d) 各プローブの環状化効率の比較。Lは未反応のオリゴヌクレオチド、CはCircligaseで環状化したssDNAコントロール。Mはサイズマーカー。黒矢印は直鎖状ssDNA、青矢印は環状化ssDNA、赤矢印はヌクレアーゼ処理による破片。

4) RNase Hの濃度の検討

次に、RNase H濃度が濃すぎると、PLPにハイブリダイズしたRNAが全て分解されてしまい、DNA合成が開始できない恐れがあったため、至適なRNase H濃度を決定することを試みた。PLPとしてはGFP mRNAで設定したP4プローブを用い、RNase H濃度を変え、最終的なRCP量で比較した。

その結果、おおよそRCA一反応あたり0.06~0.3 unitsが至適であり、0.6 units以上の時は予想通りRNAの分解のためにRCP量が減少することも確認された。

4) 検出限界の算定

次に、RHa-RCA法の検出限界を、大腸菌から抽出した全RNAに、*in vitro*転写した濃度が既知のGFP mRNAを加えて検討した。また、本RHa-RCA法が、RPRCA法で用いた環状DNAプローブとは異なり、対象mRNA以外のRNAやDNAの影響を受けないことを、GFP mRNAを加えていない全RNAを用いて確認した。

その結果、検出限界は設定したPLPによって多少異なるものの、概ね1~5 fmol、おおよそ1反応あたり 10^9 コピーあることから、以前のRPRCA法と比べて遜色が無いことが確認された(図4a)。また、GFP mRNAを添加していない全RNAからは、一切のRCPが検出されていないことから、GFP mRNAのみを特異的に検出していることが確認された。

さらに実際にGFP遺伝子をプラスミドの形で保有している大腸菌を用いて、GFP mRNAを誘導、および非誘導の状態にて培養後に全RNAを抽出し、RHa-RCA法によりGFP mRNAの検出を試みた。その結果、GFPを誘導した大腸菌のRNAからのみ、

RCPが確認され、おおよそ10~20 ngの極微量のRNAからでも特異的に検出できることが確認された(図4b)。また、GFPを誘導していない大腸菌のRNAからは、一切のRCPが検出されていないことから、GFP mRNAのみを特異的に検出していることが確認された。

06 | RCA法の検出限界について

RPRCAも今回開発したRHa-RCAも共に検出限界が、おおよそ 10^9 copies/反応であり、PCRやLAMP法には遠く及ばない。しかしこれは、RCA法の検出限界では無く、実際の所は、検出に使用するSYBR Green IIの検出限界によるところが大きい。

RCA反応で合成されるDNAは、既存のPCR等のDNA増幅方法とは異なり、指数関数的な増幅を示さない。基本的に、1つの環状DNAプローブから作成されるssDNAは、DNA合成酵素の[合成速度]×[時間]で決定されている。Phi29 DNAポリメラーゼの合成速度は~200 nt/secであると推測されており、市販されているDNA合成酵素の中でも非常に早い。しかし、例えば200 nt/secでも、2時間のRCA反応で合成できるssDNAは1個のRCP当たり 1.44×10^6 baseであり、重さとしては僅か約1.4 fgにすぎない。SYBR Green IIの検出限界は電気泳動のバンドで約2 ng程度であり、RCPが拡散した液中での検出感度はそれより劣ることが容易に推測される。従って、SYBR Green IIを使った場合の検出感度は、どう頑張っても $10^6 \sim 10^7$ copies/反応を超えることができないものと推測される。

現在、*in vitro*のRCA法の検出系では、様々な方法で極微量のRCPを検出する方法が多数報告されており、検出システムに工夫を行えば、RCA法はより高感度化が可能であると考えている。

07 | *in situ* RHa-RCAによる微生物検出

一方で前述のように、RCA法は1分子のRCPを可視化できるために注目を浴びたと記述したが、これは主に蛍光顕微鏡下などでの観察によるものである。実際*in situ*でRCA反応を行い、RCPを検出用蛍光プローブで検出する系では、ゲノム中の1分子のDNA配列やmRNAなどを可視化している報告が既に複数ある¹⁷⁾。RCPは*in situ*の検出において、PCR産物のようには拡散しにくく、またRCPはPLPの相同配列のタンデムリピートであり、70 baseのPLPの場合、PCRは2時間の反応で約2万回もの繰り返し配列となっており、蛍光プローブで検出するのに適した状態となっている。

そこで、今回開発したRHa-RCA法を大腸菌内で発現しているGFP mRNAの検出に適用可能かどうか試してみた。その結果、GFPを誘導した大腸菌内でスポット状に蛍光シグナルが観察された(図5)。また、非誘導の大腸菌ではシグナルが全く確認できない。従って、例えば検出対象の配列をDNAとして保持していても、蛍光シグナルは観察されないことから、RHa-RCAはRNAのみを特異的に検出していることが明らかとなった。大腸菌内の蛍光シグナルがスポット状に観察されたことから、これ

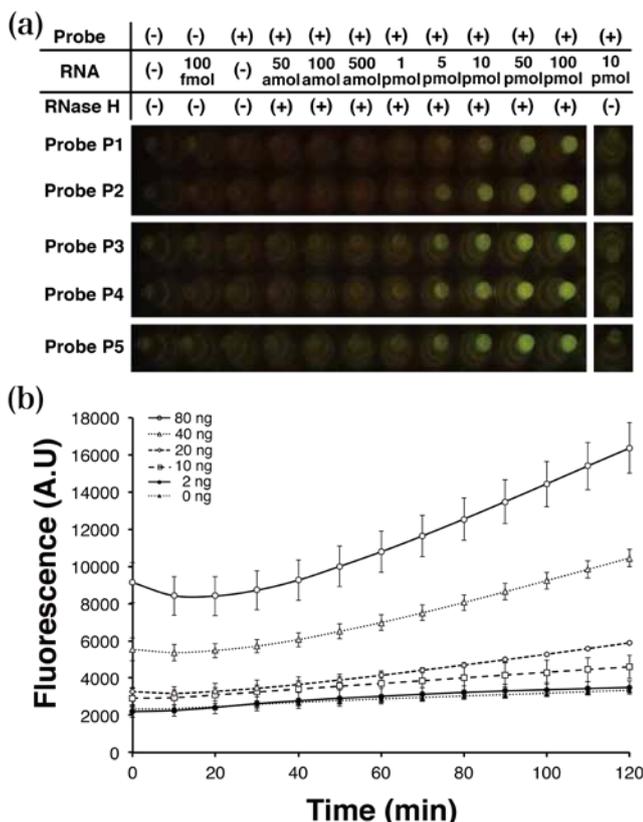


図4 RHa-RCAによるGFP mRNAの検出
(a) *In vitro* 転写したmRNAを用いた各プローブの検出感度の検定。反応が終了したPCRプレートに青色光を当て、SYBR Green IIを可視化している。
(b) 大腸菌全RNAを用いたGFP mRNAのリアルタイム検出。

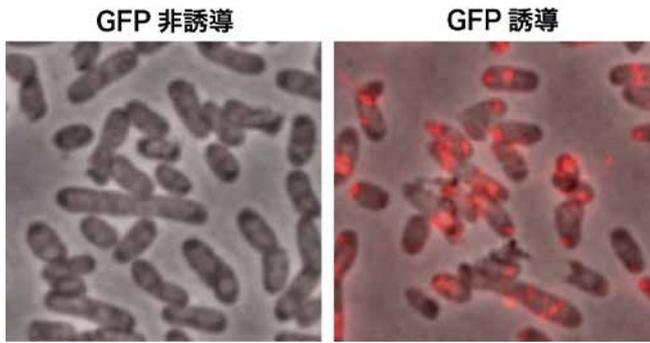


図5 RHa-RCAによる大腸菌で発現しているGFP mRNAの*in situ*検出
RHa-RCA後に、Alexa-568で標識したオリゴヌクレオチドでRCPを検出。明視野像と蛍光像をマージして示している。

までの*in situ* RCAの報告を踏まえれば、これら一つ一つのスポットシグナルが、それぞれ一つのmRNA由来である可能性がある。しかし、我々の保有している顕微鏡の解像度では、それぞれのスポット数を計測することは、大腸菌の細胞が小さすぎるため残念ながら難しい。細胞の大きさがもっと大きい真核生物のmRNAを検出した場合、これらの個々のシグナルが、1分子のmRNAに対応しているかどうかは明らかになるものと思われる。

1分子のmRNAに1分子の蛍光標識プローブでラベルを行っても十分なシグナルが得られない為、これまでの微生物でのFluorescence *in situ* hybridization (FISH)は、主に細胞内で分子数の多い16S rRNAを対象とすることが一般的であった。しかし、16S rRNAを対象とした場合には菌種が解るのみである。これまでも、微生物のみならずmRNAを対象としたFISH法では、検出プローブをHorseradish peroxidase (HRP) でラベルし、シグナル増幅を行う方法が開発されてきたが、これらの方法はシグナルそのものが細胞内に拡散しやすく、少なくともmRNAの定量性は無かった。定量性を持たせるために開発された、single molecule FISH (smFISH)法²¹⁾は、1種類のmRNAに対し50以上の相補鎖配列で、かつ同一蛍光標識プローブでFISHを行うことにより、1分子のmRNAに多数の蛍光標識をハイブリダイズさせることで実現可能となったが、プローブ作成のコストが高い。

今回我々が開発している、*in situ* RHa-RCAとFISHの組み合わせは、簡便でありながら、コストはsmFISHに比べて格段に低く、未だ詳細な検討が必要な部分は残っているものの、smFISH並みにmRNAの定量ができる可能性がある。

08 | おわりに

現状の*in vitro*のRHa-RCA法では、未だ検出レベルが、PCRやLAMP法に比べ使用に耐えうるものではないが、検出方法に何らかのアイデアが加われば、理論的には1分子の対象RNA配列の検出が行えると期待している。また、*in situ* RHa-RCAであれば、1細胞レベルでmRNA配列を指標に微生物を特定可能であり、培養やRNA抽出を行わずに病原微生物やRNAウイルスを、比較的簡便に検出することが可能であると考えている。

細胞内でのmRNAの検出・定量化は、遺伝子発現の正しい理解には必須である。近年環境から、特に腸内細菌叢や土壌細菌叢などの、「培養できない微生物」を含む細菌叢において、メタ

ゲノム解析や、RNAseqが行われている。しかし、これらの手法では菌叢全体の大まかな情報は得られるが、各々の微生物の役割を明らかにすることは難しい。今回我々が開発した、*in situ* RHa-RCAによる微生物mRNAを可視化し、かつ定量化まで行うことができれば、菌叢において「誰が何をやっているか？」が解明できるかもしれないと期待している。

本研究は、JST戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)、「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」、およびJST・A-STEPの支援によって実施した。

参考文献

- 1) 高橋宏和, 岡村好子, 小堀俊郎, THE CHEMICAL TIMES **238**, 22-27 (2015).
- 2) A. Fire, S. Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**(10), 4641-4645 (1995).
- 3) P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Genet.* **19**(3), 225-232 (1998).
- 4) B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kukanskis, Z. Zhu, S. F. Kingsmore, P. M. Lizardi, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(18), 10113-10119 (2000).
- 5) Y. Gusev, J. Sparkowski, A. Raghunathan, H. Ferguson Jr., J. Montano, N. Bogdan, B. Schweitzer, S. Wiltshire, S. F. Kingsmore, W. Maltzman, V. Wheeler, *Am. J. Pathol.* **159**(1), 63-69 (2001).
- 6) T. Kobori, A. Matsumoto, H. Takahashi, S. Sugiyama, *Anal Sci* **25**(12), 1381-1383 (2009).
- 7) M. Stougaard, S. Juul, F. F. Andersen, B. R. Knudsen, *Integr Biol (Camb)* **3**(10), 982-992 (2011).
- 8) F. B. Dean, J. R. Nelson, T. L. Giesler, R. S. Lasken, *Genome Res.* **11**(6), 1095-1099 (2001).
- 9) A. Rector, R. Tachezy, M. Van Ranst, *J. Virol.* **78**(10), 4993-4998 (2004).
- 10) C. A. Hutchison, 3rd, H. O. Smith, C. Pfannkoch and J. C. Venter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**(48), 17332-17336 (2005).
- 11) H. Takahashi, K. Yamamoto, T. Ohtani, S. Sugiyama, *BioTechniques*, **47**(1), 609-615 (2009).
- 12) C. A. Hutchison, R.-Y. Chuang, V. N. Noskov, N. Assad-Garcia, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, J. Gill, K. Kannan, B. J. Karas, L. Ma, J. F. Pelletier, Z.-Q. Qi, R. A. Richter, E. A. Strychalski, L. Sun, Y. Suzuki, B. Tsvetanova, K. S. Wise, H. O. Smith, J. I. Glass, C. Merryman, D. G. Gibson, J. C. Venter, *Science*, **351**(6280), aad6253 (2016).
- 13) F. B. Dean, S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A. F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm, R. S. Lasken, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**(8), 5261-5266 (2002).
- 14) J. Banér, M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **26**(22), 5073-5078 (1998).
- 15) D. R. Bullard, R. P. Bowater, *Biochem. J.* **398**(Pt1), 135-144 (2006).
- 16) H. Takahashi, A. Matsumoto, S. Sugiyama, T. Kobori, *Anal. Biochem.* **401**(2), 242-249 (2010).
- 17) C. Larsson, I. Grundberg, O. Söderberg, M. Nilsson, *Nat. Methods* **7**, 395-397 (2010).
- 18) T. Kobori, H. Takahashi, *Anal Sci* **30**(1), 59-64 (2014).
- 19) H. Takahashi, M. Ohkawachi, K. Horio, T. Kobori, T. Aki, Y. Matsumura, Y. Nakashimada, Y. Okamura, *Sci Rep* **8**, 7770 (2018).
- 20) Y. Cheng, X. Zhang, Z. Li, X. Jiao, Y. Wang, Y. Zhang, *Angew Chem Weinheim Bergstr Ger* **121**(18), 3318-3322 (2009).
- 21) A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat Methods*, **5**(10), 877-879 (2008).