

RNA を指標とするルーメン細菌の活性測定法の確立とその応用

生物資源科学専攻 家畜生産生物学講座 家畜栄養学 七條 佑弥

1. はじめに

反芻動物第一胃（ルーメン）には多種多様な細菌が棲息し、宿主が摂取した飼料を分解している。したがって、反芻動物の栄養システムを理解する上でルーメン細菌の働きを正確に把握することが重要である。近年の DNA を指標とする分子生物学的手法の発展により、ルーメン細菌の種類や生態的情報は蓄積しつつある。しかし、DNA 情報ではルーメン細菌が活発に活動しているかどうかは判断できない。一方、細菌の RNA 合成量は増殖や活性とリンクすることから、これを活性指標として利用できると考えられている。そこで、本研究ではルーメン内容物からの高純度 RNA 抽出法とリボソーム RNA (rRNA) を指標とする活性測定法を確立した。さらに、その有効性を *in vitro* 試験により検証した。

2. 方法

RNA 抽出法の確立では供試サンプルとしてグラム陰性菌 (*Fibrobacter succinogenes*) , グラム陽性菌 (*Ruminococcus flavefaciens*) 及びルーメン内容物を用いた。酵素法、ビーズ法または凍結粉砕法を用いて供試サンプルから総 RNA 抽出し、収量及び純度を比較した。確立した手法の有効性はルーメン細菌 R-7 株 (以下, R-7) および *Prevotella ruminicola* 基準株 (以下, Pr) を用いた *in vitro* 試験により検証した。両菌株の培養液を経時的にサンプリングし、総 DNA および総 RNA を抽出し、後者からは cDNA を合成した。それぞれの菌株に特異的な PCR プライマーを用いて、総 DNA を鋳型に rRNA 遺伝子 (rDNA) を、総 cDNA を鋳型に rRNA をそれぞれ *real-time* PCR により定量した。各サンプルで rRNA/rDNA 比を算出することで菌体活性をモニタリングできるか検証した。

3. 結果と考察

検証した総 RNA 抽出法のうち凍結粉砕法は収量および純度が他の方法よりも高く、グラム陽性菌やルーメン内容物からも高純度 RNA を取得できた。したがって、ルーメン内容物からの RNA 抽出には凍結粉砕法が有効と判断した。ルーメン細菌の *in vitro* 試験において、細菌の増殖に伴い rRNA/rDNA 比は増加したことから、rRNA/rDNA 比は細菌の活性を反映することを確認した。一方、rDNA 数は培養時間とともに増加し、やがてプラトーに達するのに対し、rRNA/rDNA 比は培養時間に伴い増加した後、顕著な減少が見られた。この結果は細菌の静止期への移行を示すものであり、本研究で確立した活性測定法によりルーメン細菌の活性を正確にモニタリング出来るものと考えられる。