

Acridine Orange 染色を用いた環境中微生物の簡易型 *in situ* RNA 含量推定法の開発

長岡技術科学大学 ○丸山 康貴 関口 勇地
大橋 晶良 原田 秀樹

1. はじめに

現在、バイオレメディエーションでの微生物動態のモニタリング、実環境中の微生物群集構造解析等に、rRNA をターゲットとした様々な分子生物学的手法が用いられている。その中の一つ的手法としてFluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法が有効な手法として広く活用されている。しかし、FISH 法を自然環境中に存在する微生物群に適用した場合、様々な原因により目的とする微生物が蛍光を発しないという問題が生じる。その原因の一つとして、実環境中の微生物は活性が低く、RNA 含量が少ないということが挙げられる。実際に実環境中の微生物群構造解析として、年間平均気温が15℃前後の極めて低温環境のシベリア土壌サンプルにFISH法を適用したが、ほとんどの微生物が蛍光を発しないという問題が生じた。

そこで自然環境中の微生物に対してFISH法を適用する場合、それらの微生物がFISH法で検出されるほどのRNA 含量を含んでいるのかをあらかじめ把握する事が望まれる。本報告では環境中の微生物に対して *in situ* で簡易的にRNA 含量を把握する手法の開発を目的とした。今回開発した手法にはDNA と RNA を別々に検出する事のできる Acridine Orange(以下AO と略す) 染色剤を用いた。AO 染色剤は一般的に核酸染色剤として使われるが、480nm 付近の波長を持つ励起光を染色後の微生物に照射すると、DNA を染色している AO 染色剤は580nm 付近の波長を持つ蛍光（以下AO (DNA)蛍光と示す）を発し、RNA を染色した AO 染色剤は650nm 付近の蛍光（以下AO(RNA)蛍光と示す）を発する。そこでRNA 含量の異なる大腸菌を用いて、RNA 含量の減少に伴うAO(RNA)蛍光の検出輝度の変化を確認した。また、同じサンプルを使用して、FISH 法でのプローブの輝度とAO(RNA)蛍光輝度との関係を調査し、FISH 法適用時にどの程度のAO(RNA)蛍光が必要なのか把握した。更に本実験で開発した手法を適用して、実環境サンプルがFISH 法で検出可能か検討した。

2. 実験方法

(1)使用サンプル

本実験では、大腸菌(*Escherichia coli* JM109)をLB培地で37℃攪拌培養を行い、対数増殖期におけるサンプルをAmann らの手法¹⁾に準じ直ちに固定・保存した。固定後の大腸菌をスライドグラスに定着し、RNase(0.1 μ g/mL)処理を0～20 分間施した。このサンプルを用い菌体内のRNA 含量減少に伴うAO(RNA)蛍光の変化を確認した。また、活性が低くRNA 含量が少ないと予想されるサンプルとして、年平均気温が15℃前後のきわめて低温環境のシベリアにある沼地より採取した土壌サンプルを使用した。また、微生物活性が高くRNA 含量が高いと予想されるサンプルとして、人工廃水を処理している中温（35℃）UASB リアクター内から採取したグラニュール汚泥を使用した。これらのサンプルはAmann らの手法²⁾に準じ固定・保存を行った。

(2)Acridine Orange 染色

Acridine Orange 染色剤（20 μ M）をスライドグラスに滴下し、10 分間反応したものを蛍光顕微鏡（OLYMPUS FLOUVIEW BX50）で観察を行った。AO(DNA)蛍光を観察する場合には、470-490nm の励起波長で515-550nm の蛍光波長を取り込めるNIBAバンドパスフィルターを使用した。また、AO(RNA)蛍光観察時は510-550nm の励起波長で590nm 以上の蛍光波長を取り込めるWIGバンドパスフィルターを使用し、CCD カメラ(OLYMPUS SENSYS OL1401E-G1)で露光時間を1.5 秒に固定して観察を行った。その後、解析ソフトQuantity One(Bio Rad)を使用して輝度の解析を行った。また、グラニュール汚泥及びシベリア土壌サンプルに関しては、RNase 処理を行わずにスライドグラスに滴下後、大腸菌と同様にAO 染色、観察、解析を行った。

(3)FISH 法の適用

AO 染色と同様にRNase 処理後の大腸菌を使用し、細菌を特異的に検出できるプローブを使用してFISH 法を適用し輝度変化を観察した。使用するプローブはEUB338(TRITC 標識)を使用し、Amann らの手法に準じ行った。その後、AO 染色時と同じ条件で蛍光顕微鏡観察を行い、Quantity One で輝度の解析を行った。また、大腸菌をスライドグラスに滴下後に、古細菌を特異的に検出できるARC915(TRITC 標識)プローブをhybridization し、大腸菌への非特異的なプローブの吸着による輝度を測定した。

キーワード：Fluorescence *in situ* hybridization、RNA、Acridine Orange 染色

連絡先：〒940-2114 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 環境・建設系

TEL 0258-46-1611（内線6313） FAX. 0258-47-9600

3. 実験結果及び考察

16S rRNA をターゲットとする FISH 法を適用する場合、(1)菌体内に十分な RNA 含量がない、(2)細胞壁によるプローブ浸透性の問題が、目的とする微生物の検出を妨げる。先のシベリア土壌サンプルに FISH 法を適用した場合、細菌、古細菌に特異的なプローブのいずれにおいても全く蛍光が得られなかった。これが、(1)、(2)のどちらに起因しているかは不明で、あらかじめ(1)の問題を検証する手法として *in situ* で簡易的に RNA 含量が推定できれば、今後このようなサンプルに FISH 法を適用する場合に対策が立てやすい。そこで今回は AO 染色に着目した。そこでまず RNA 含量が異なる大腸菌を用い、AO 染色剤を用い RNA 含量による検出輝度の変化を確認した。その結果 RNA 含量が減少するに従い AO(RNA) 蛍光の輝度も減少する事が確認できた (Fig.1)。また、同じサンプルを用い細菌を特異的に検出できる EUB338 (TRITC 標識) プローブで hybridization を行った場合にも AO(RNA) 蛍光輝度と同じ傾向で輝度の減少が確認できた。また、FISH 法で微生物を検出する際、どの程度の AO(RNA) 蛍光 (RNA 含量) が必なのか検証するため、大腸菌に ARC915 (TRITC 標識) プローブを適用し、その輝度を FISH 法で特異的な微生物を検出できる最低輝度とした。この結果 RNA 含量に関わらず、大腸菌での ARC915 プローブの輝度は 500-1000 intensity/cell であった (Fig.2)。また、この結果と大腸菌の AO(RNA) 蛍光輝度の関係より、少なくとも AO 染色時に 1000 intensity/cell 程度の輝度がなければ、ローダミン標識の FISH 法を適用できないことが推定できた。これにより、本実験で開発した AO 染色剤を用いた手法は、*in situ* で簡易的に RNA 含量を推測でき、FISH 法適用可能、不可能の指標を決定することができるものであると示唆された。

そこで、今回開発した手法で人工廃水を処理している中温 UASB グラニュール汚泥に AO 染色を行ったところ、対数増殖期の大腸菌と同じ 3000 intensity/cell 程度の輝度が確認できた。このことより、中温 UASB 内のグラニュール汚泥内の微生物は、FISH 法を行うためには十分な RNA 含量を持っていることが示唆され、実際に FISH 法を適用した場合も高い輝度を示すことが確認できた (Fig.3)。一方、シベリア土壌サンプルへ AO 染色を行った結果を見ると、AO(RNA) 蛍光の輝度が 800 intensity/cell 程度と極めて低い値となった。つまり、シベリア土壌サンプルのように低温環境で生息している微生物には十分な RNA 含量なく、FISH 法を適用した場合には非常に輝度が低く、ターゲットとする微生物を FISH 法で検出するのは不可能であると推測される。また、シベリア土壌サンプルに今回開発した手法を用いることにより、特異的な微生物を検出できない理由は、微生物内に FISH 法で検出するための十分な RNA 含量がなかったことが確認できた。

4. 今後の予定

本実験より AO 染色により環境中の微生物群に対し FISH 法を適用する場合に、その環境に存在する微生物がどの程度の輝度で観察ができるかの目安を得ることができた。しかし、自然環境中への FISH 法の適用は地球温暖化に関わるメタン生成古細菌及びメタン酸化細菌の解析が例として挙げられるように重要である。そこで今後は、活性が低く従来の FISH 法では検出が困難な微生物群へも適用できる、高感度 FISH 法の開発を行う予定である。

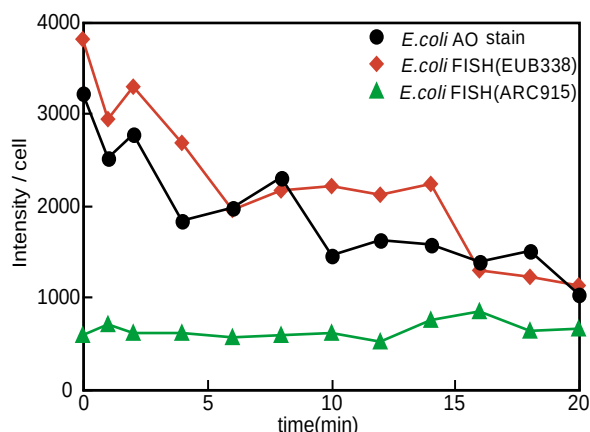


Fig.1 RNA content of *E. coli* at different RNase-digestion time. The RNA content was estimated by AO stain and hybridization with the probe EUB338.

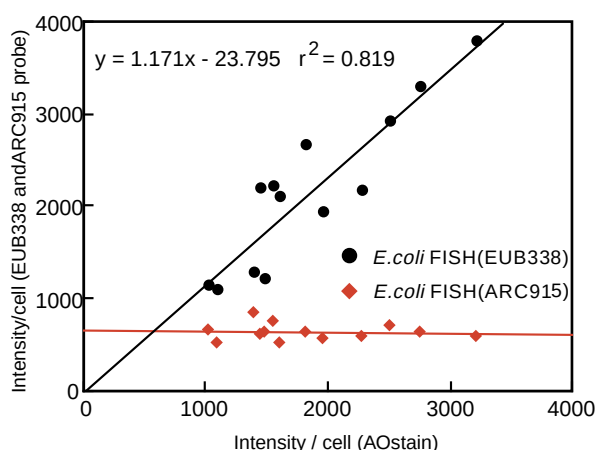


Fig.2 Relationship between signal intensities from AO(RNA) and DNA probe.

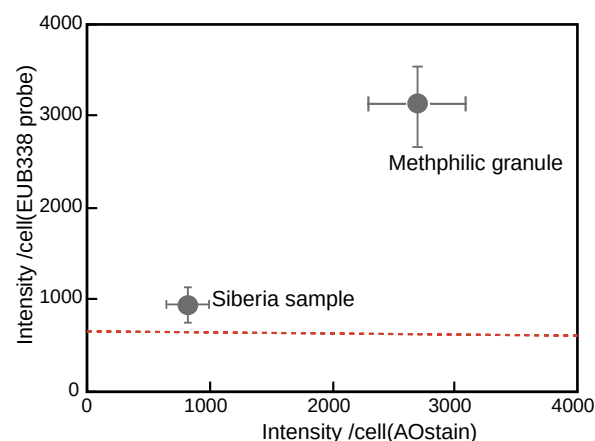


Fig.3 Signal intensities from AO(RNA) and EUB338 probe for mesophilic granule and Siberia soil.

参考文献

1) Amann *et al.* (1995). *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169.