

## Tyramide Signal Amplification によるメタン生成古細菌の検出

長岡技術科学大学 ○(学)久保田 健吾 (正)大橋 晶良 (正)原田 秀樹

### 1. 目的

現在、16S rDNA および rRNA に基づいた手法が、廃水処理汚泥中の微生物の解析などに、広く用いられている。その中でも FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法は、微生物の検出を原位置 (*in situ*) で行うことが可能であり、その数や空間分布の把握に非常に大きな力を発揮する。

しかし、微生物を対象とした FISH 法では、微生物の活性が低い、DNA プローブの浸透性が悪い、RNA が高次構造をとるために DNA プローブがハイブリダイズしにくいといった問題から、しばしば検出が困難となる。環境中には、貧栄養や非至適温度条件下で活動している微生物も多く存在し、それらは FISH 法でターゲットとしている 16S rRNA の保持量が少ないことから、特にその検出が困難となる。

近年、Alkaline phosphatase<sup>1)</sup>や Horseradish peroxidase (HRP)<sup>2)</sup>などの酵素を用いた FISH 法、*in situ* PCR 法<sup>3)</sup>などが開発され、低コピー数の RNA の検出もシングルセルレベルで可能となった。しかしながら、これらの手法では、蛍光物質を修飾した DNA プローブに比べ、高分子である酵素を菌体内へ浸透させなければならないことが問題となっている。その問題を改善するために、その多くの場合はリゾチームなどの酵素を用いて細胞壁を処理し、高分子な酵素の浸透を促進する方法を採っている。しかしこの方法では、細胞壁がペプチドグリカンの微生物には効果が見込めるものの、メタン生成古細菌などのように、細胞壁の構造がシュドムレイン、S レイヤー、メタノコンドロイチン、シースなど多岐にわたるものに対しての効果は定かではなく、その報告も少ない。

そこで本研究では、メタン生成古細菌に着目し、HRP を用いた FISH 法の適用について検討した。

### 2. 検出原理

HRP を用いた FISH 法に Tyramide Signal Amplification (TSA) がある。この方法はまず、Digoxigenin (DIG) を標識した DNA プローブを 16S rRNA にハイブリダイズさせる。次に、抗原抗体反応により、HRP を修飾した抗 DIG 抗体を DIG と結合させる。検出反応は、HRP が Cy3 化チラミドをラジカル化し、近傍の組織と共有結合することにより固定される Cy3 を、蛍光顕微鏡で観察する。

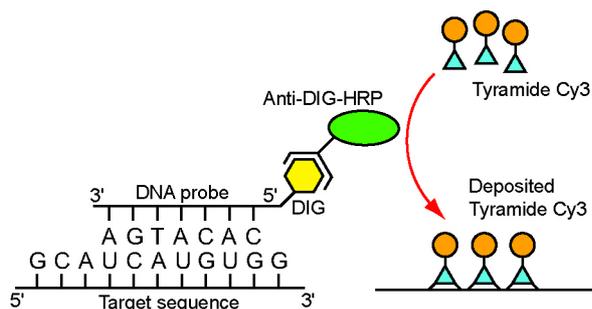


Fig. 1. Illustration of tyramide signal amplification Cy3 system.

### 3. 実験方法

#### 3.1 供試サンプル

本研究では、*Methanococcus vannielii* (S レイヤー)、*Methanospirillum hungatei* (シース) を用いた。菌体は活性が高いときに、それぞれ 4% パラホルムアルデヒドもしくは 50% エタノール/PBS で固定し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 3.2 FISH 法

FISH 法による検出には、*Archaea* を特異的に検出する ARC915 プローブ (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') を用いた。DNA プローブの 5'末端には Cy3 を標識した。

#### 3.3 FITC 標識抗 DIG 抗体を用いた FISH 法

TSA の適用には、蛍光物質を標識した DNA プローブに比べ分子量の大きい酵素標識抗体を菌体内へ浸透させなければならない。そこで、TSA による検出の前検討として、菌体への処理が適切であるかを知るために、酵素標識に比べ分子量の小さい蛍光物質 (FITC) 標識抗体を用いて、浸透性の検討を行った。

実験はまず、5'末端に DIG を標識した DNA プローブをハイブリダイズさせた。余剰な DNA プローブを洗浄後、TNT (100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.05% Tween-20) に浸した。次に、TNB (100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.5% Blocking reagent) をマウントし室温で 30 分間、前反応させてから、FITC 標識抗 DIG 抗体と TNB が 1:4 に調製したものをマウントし、室温で 1 時間、抗原抗体反応させた。最後に TNT で洗浄し、抗 DIG 抗体に標識されている FITC を、蛍光顕微鏡で観察した。

なお、細胞壁を処理するために、ハイブリダイゼーションバッファーの SDS 濃度を 0.01% のものと、既報<sup>4)</sup>にある

キーワード：FISH, メタン生成古細菌, TSA

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 水圏環境制御研究室 0258-47-1611 (6646)

ように1%にあげて行い、ハイブリダイゼーションを46℃、3時間に統一して行った。

### 3.3 TSA を用いた FISH 法

TSA は DIG 標識 DNA プローブをハイブリダイズさせ、余剰な DNA プローブを洗浄した。次に TNT に浸した後、TNB をマウントし室温で30分間、前反応させてから、HRP 標識抗 DIG 抗体と TNB を 1:50 に調整したものをマウントした。TNT で洗浄後、Tyramide Cy3 溶液をマウントし、室温で8分間反応させた。TNT による洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。

ハイブリダイゼーション条件は、FITC 標識抗 DIG 抗体による検出と同様に行った。

## 4. 実験結果および考察

### 4.1 FITC 標識抗 DIG 抗体による検出

パラホルムアルデヒド固定された *M. vannielii* は、蛍光強度に大きなばらつきが見られた。蛍光強度は、菌が保持している 16S rRNA の量に依存することから、菌体間に差が生じることは考えられる。しかし Cy3 標識 DNA プローブによる一般的な FISH 法による検出において、さほど大きなばらつきは見られなかった。そのため、抗原と抗体の反応効率、もしくは FITC が抗原抗体反応の立体構造の中で、消光されてしまっている可能性があるのではないかと推察されたが、Cy3 と FITC という異なる蛍光物質による比較であるため定かではない。また、SDS 濃度を 1%まであげた場合も同様に輝度にばらつきが見られた。さらに位相差顕微鏡による観察においては、SDS 濃度 1%のものにおいて、溶菌が見られた。エタノール固定したものは、一般的な FISH 法では検出することが出来なかった。固定により細胞壁が壊れ、RNA などが菌体外へ流出してしまっただと考えられるが、原因は定かではない。これより、*M. vannielii* を標的とした FISH 法を行う場合、エタノール固定は適さず、パラホルムアルデヒドによる固定を行った方が良いと考えられる。

一方、*M. hungatei* は、パラホルムアルデヒド固定したものからは、蛍光が得られたのに対し、エタノール固定したものは、殆ど検出されなかった。これは、エタノール固定より、パラホルムアルデヒド固定の方が、高分子物質の菌体への浸透性が増加したためと考えられる。

### 4.2 TSA による検出

*M. vannielii* は、SDS 濃度 0.01%、1%共に TSA-Cy3 system を用いて検出することが可能であった。Cy3 標識 DNA プローブを用いた一般的な FISH 法による検出では、1.5-2.0 s の露光時間を要したのに対し、TSA を用いた場合、100-150 ms と非常に少ない露光時間で、十分な輝度が得られた。これは、HRP 標識抗 DIG 抗体が菌体内へ浸透し、TSA によりシグナルが増幅したことから、強い蛍光が得られたと考えられる。

*M. hungatei* は、パラホルムアルデヒド固定、エタノール固定したもの共に、検出されなかった。この原因として、FITC 標識抗 DIG 抗体程度の分子量であれば菌体内へ浸透し、検出が可能であるが、それよりも大きい酵素標識抗 DIG 抗体は、菌体内への浸透が困難であったと考えられる。

## 5. まとめと今後の展開

今回の実験より、メタン生成古細菌のうち、細胞壁が S レイヤーで構成される属 (*Methanococcus* 属など) は、SDS 濃度をコントロールすることで、検出することが可能であることが示唆された。

一方、*M. hungatei* は FITC 標識抗 DIG 抗体を用いて検出できたが、TSA では検出されなかった。この原因として、酵素標識抗体の浸透性が考えられたため、菌体への適切な処理の検討が必要である。また、今回用いた菌以外 (シェードムレイン、メタノコンドロイチンなどの細胞壁を持つもの) についても検討を要する。

## 謝辞

本研究は、一部(財)交流協会の平成13年度共同研究事業による補助を受けた。ここに、厚く謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Yamaguchi et al., 1996, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 275-278
- 2) Schönhuber et al., 1997, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3268-3273
- 3) Hoshino et al., 2001, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5261-5266
- 4) Amann et al., 1992, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3007-3011

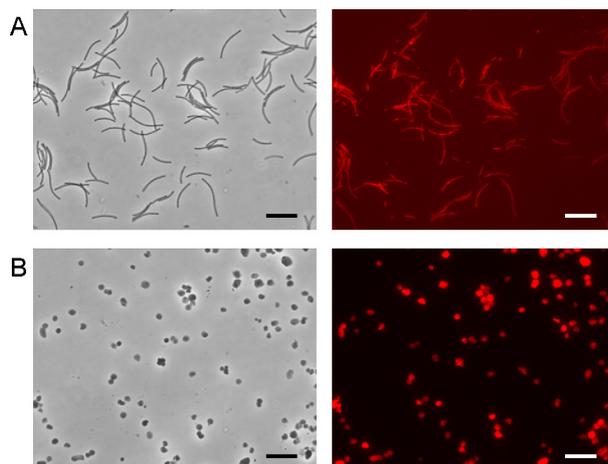


Fig. 2. In situ hybridization of *M. hungatei* (A) and *M. vannielii* (B). (A) Anti-DIG-FITC system hybridization with probe ARC915. (B) TSA-Cy3 system hybridization with probe ARC915. Bars represent 10 µm.