

機能遺伝子を標的とした CARD-FISH 法による微生物の特異的検出

長岡技術科学大学 ○(学)久保田健吾 (正)大橋晶良, 井町寛之, 原田秀樹

1. 目的

近年発達の著しい分子生物学的手法の一角を担っている FISH (Fluorescence in situ Hybridization) 法は、特定微生物を培養によらず、特異的に検出することができるため、環境微生物の解析には必須のツールとなっている。しかしながら現在の FISH 法では、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統学的検出は可能であるものの、微生物の機能に由来した情報、例えば機能遺伝子 (messenger RNA; mRNA) に基づいた検出は、感度の問題から非常に難しいと言われている。一般に FISH 法による検出は、標的分子の発現量が 10^3 コピー以下になると難しくなると言われており、 10^1 - 10^2 コピー程度しか発現していない mRNA はその検出限界以下とすることになる。

一方、HRP (Horseradish peroxidase) の触媒作用を利用してシグナルを増幅する TSA (Tyramide Signal Amplification) 反応を用いた CARD (Catalyzed Reporter Deposition)-FISH 法は、従来の FISH 法に比べて検出感度を、約 10-20 倍に増幅することが可能である¹⁾。また CARD-FISH 法は、例えば、tyramide-DNP を 1 回目の TSA 反応に用い、HRP 標識抗 DNP 抗体を反応させた後 (以下この反応を“HRP-layer を加える反応”と表記する)、tyramide-Cy3 等による 2 回目の TSA 反応を行うことで、理論的には従来の FISH 法に比べて、約 100 倍以上 (10×10) の感度が得られると考えられる。

本研究は、この CARD-FISH 法に着目し、従来の FISH 法では検出することができなかった低発現な mRNA の検出を試みた。研究の戦略としては、まず Clone-FISH 法を用いて機能遺伝子を標的とした FISH 法のためのポジティブコントロールを作成した。それを用いて検出に用いるプローブの選定を行ったのち、機能遺伝子を標的とした CARD-FISH 法を行った。

2. 実験方法

2.1 供試菌体および標的機能遺伝子

供試菌体 (モデル微生物) には既に CARD-FISH 法を行うための細胞壁処理方法について知見の得られているメタン生成古細菌 *Methanococcus vannielii* を用いた。菌体は、対数増殖期にパラホルムアルデヒドで固定した。

標的機能遺伝子にはメタン生成古細菌特有のタンパク質をコードする遺伝子である Methyl-Coenzyme M Reductase の Alpha-subunit (*mcrA*) の遺伝子配列とした。

2.2 CARD-FISH 法

基本的に CARD-FISH 法は既報に準じて行った¹⁾。HRP-layer を加える反応は、次のように行った。まず、1 回目の TSA 反応を tyramide-DNP を用いて行った後、TNT (100 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) で洗浄を行い、TNB (100 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 0.5% Blocking reagent) で 30 分間ブロッキングを行った。次に、HRP 標識抗 DNP 抗体を TNB で 100 倍希釈した溶液をマウントし、30 分間抗原抗体反応を行った。洗浄を TNT 溶液中で行った後 (15 分)、tyramide-Cy3 を用いて 2 回目の TSA 反応を行った。

2.3 Clone-FISH 法

基本的に既報に準じて行った²⁾。Vector には pCR2.1 TOPO (Invitrogen) を、Competent cell には NovaBlue (DE3) (Novagen) を用いた。PCR 用のプライマーには *M. vannielii* の *mcrA* 配列のほぼ全長を網羅するものを用いた。

キーワード : CARD-FISH, *mcrA*, 機能遺伝子、メタン生成古細菌

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)

3. 結果と考察

3.1 Clone-FISH 法によるポジティブコントロールの作成およびプローブの選定

NovaBlue (DE3) と pCR2.1 TOPO の組み合わせによる Clone-FISH 法は、検出に十分なだけの RNA を発現しており、ポジティブコントロールとしての機能を十分に有しているものであった。固定した *Escherichia coli* 全てからシグナルを得ることはできなかったが、これはプローブの選定及びポジティブコントロールとして用いる事を考えると実用上特に問題はないと判断した。

次に、この Clone 化された *E. coli* を用いて、*mcr* 検出に用いるためのプローブの選定を行った。選定に用いたプローブは ME1r³⁾ と ME3r³⁾ である。その結果、ME1r プローブからはシグナルを得ることができたが、ME3r プローブからは得られなかった。プローブの二次構造も考慮すると、ME3r プローブは *in situ* hybridization (ISH) 法に適さない、また、ME1r プローブは、ISH 法に使用できる可能性が示唆された。この結果を踏まえ、*mcr* オペロンの検出には ME1r プローブを用いることとした。

3.2 CARD-FISH 法による機能遺伝子 *mcr* 検出

ME1r プローブを用いて、*mcr* の検出を試みたところ、菌体内に局所的に強い蛍光が得られたが、全ての菌体からポジティブシグナルを得ることができなかった。(Fig. 1A)。まず局所的に強い蛍光が得られた理由として、mRNA は rRNA とは異なり、菌体内全体に分布していないことが考えられる。また全ての菌体からポジティブシグナルを得ることができなかった事に関しては、*mcr* オペロンの発現量に菌体間で差があったためではないかと考えられ、固定したときの菌体の状況を反映していることが推察された。

次に、より高感度な検出を行うために HRP-layer を加える反応を付加した。CARD-FISH 法で検出されなかった菌体は、*mcr* オペロンの発現量が少なかったと考えることができるため、より高感度検出が可能となればほぼ全ての菌体からシグナルが得られるはずである。予想通り、CARD-FISH 法に HRP-layer を加えると、非常に強い蛍光をほぼ全ての菌体から得ることができた (Fig. 1B)。露光時間だけで単純に評価すると、HRP-layer を加えることで CARD-FISH 法に比べ約 20 倍の輝度が得られ、その結果、発現量が少ないと考えられた菌体からも、シグナルを得ることができたと考えられる。

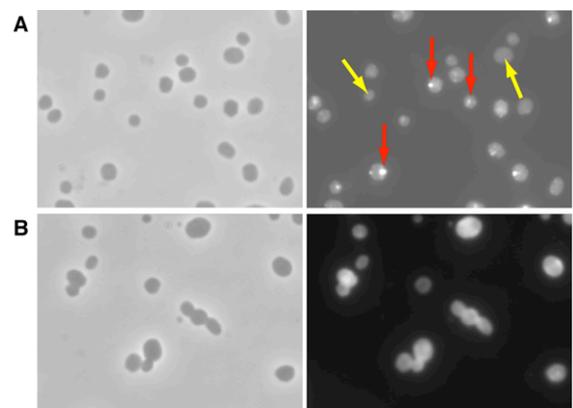


Fig. 1 Detection of *mcr* operon expressed in *M. vanielii* cells by CARD-FISH (A) or by CARD-FISH with HRP-layer (B). Red arrows show positive signals and yellow arrows show negative cells in micrograph A. Most of cells showed positive signal in micrograph B. Phase contrast (left) and epifluorescent (right) micrographs show identical field. Exposure times for A and B were >1000ms and <50ms, respectively.

4. まとめ

微生物の機能を分子レベルで解析するために非常に有用なツールとなりうる ”機能遺伝子を標的とした CARD-FISH 法” に着目し、その検出方法の確立を試みた。その結果、CARD-FISH 法だけでは感度が不十分でも、HRP-layer を加える反応を付加することで、mRNA 発現量が少ないと思われる菌体からもシグナルを得ることができた。この HRP-layer を加える反応を用いれば、mRNA よりも更にコピー数が少ない genome DNA 上に存在する標的配列を *in situ* で視覚的に検出できる可能性が見えてくる。これらの検出を併用して行っていくことで、微生物の持つポテンシャルと実際に働いている遺伝子を視覚的に見分けることが可能となり、分離培養が困難な微生物の機能推定に貢献できるものと考えている。

参考文献

- 1) 久保田ら, 環境工学論文集, 40: 363-371. 2) Schramm *et al.*, Environ. Microbiol., 4: 713-20. 3) Hales *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 62: 668-675.