

Two-pass TSA-FISH 法による微生物 genome 上のシングルコピー遺伝子の検出

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

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、微生物の機能を反映する機能遺伝子 (mRNA や genome DNA) に基づいた検出は、感度の問題から非常に難しいとされている。これは細胞内に存在する機能遺伝子のコピー数が圧倒的に少ない事に原因がある (mRNA で 10^1 - 10^2 コピー程度、genome DNA 上で 1-10 コピー程度、16S rRNA は 10^3 コピー以上)。

近年、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 TSA-FISH 法の適用例が、環境微生物に対しても数多く報告されている¹⁾。TSA-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 TSA-FISH 法は、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、tyramide-Cy3 等による 2 回目の TSA 反応を行うことで (two-pass TSA-FISH 法)、従来の FISH 法に比べて約 400 倍近い感度を得る事ができる²⁾。我々は昨年の学会でこの two-pass TSA-FISH 法とオリゴ DNA プローブを用いる事で、純粋培養した *Methanococcus vannielii* の Methyl coenzyme M reductase (*mcr*) mRNA の検出に成功した事を報告した²⁾。

本研究では、この two-pass TSA-FISH 法を用いて、微生物の genome DNA 上にコードされている機能遺伝子の検出を目的とした。本報では、DNA プローブの作成および genome DNA 検出の試みについて報告する。

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 two-pass TSA-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 *M. 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、メタン生成に関与するタンパク質 *mcr* をコードする遺伝子の Alpha-subunit (*mcrA*) の配列とした。

2.2 DNA プローブの作成

DNA プローブには *M. vannielii* の DNA をテンプレートとして、*mcrA* に特異的な ME1-ME2 プライマー³⁾で増幅した PCR 産物 (757bp) を dsDNA プローブとして用いた。ssDNA プローブの作成には、5'末端側から 5 リン酸基を S 化し、エキソヌクレアーゼ耐性を持たせた ME1S プライマーを用いて、PCR 増幅を行った。その PCR 産物を dsDNA 特異的 5'→3'エキソヌクレアーゼで消化し、センス鎖 ssDNA を作成した。なお、プローブには、dinitrophenol (DNP) 標識 dUTP を PCR 反応により取り込ませた。

2.3 Two-pass TSA-FISH 法

固定した *M. vannielii* にプローブをハイブリダイズさせる前に、RNase 処理で RNAs を完全消化した。標的 DNA の変性は、スライドにハイブリダイゼーションバッファーとプローブをマウントした後、80°C で 20 分間行った。その後、ハイブリダイゼーションを 37°C で一晩行った。次に、HRP 標識抗 DNP 抗体を反応させ、tyramide-DNP

キーワード：Two-pass TSA-FISH, genomeDNA, *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)

を用いて一回目のシグナル増幅反応を行った。そして再度 HRP 標識抗 DNP 抗体を反応させ、視覚化のための二回目のシグナル増幅反応を tyramide-Cy3 を用いて行った。

3. 結果と考察

3.1 DNP 標識ポリ DNA プロープの作成

まずプロープにより多くの DNP を標識させるため、PCR 反応液中加入する DNP-dUTP の濃度について検討を行った。DNP-dUTP の取り込み率は、電気泳動の泳動距離の違いで評価した (DNP が多く標識されると泳動距離が短くなる)。すると Mg_2^+ 濃度が 1.5 mM の時、DNP-dUTP 濃度が 40 nM の時 (dTTP に対する濃度比で 1:4) が最も高い取り込み率を示し、それ以上の濃度では PCR 増幅が確認されなかった。そこで、更に多くの DNP を取り込ませるために Mg_2^+ の濃度を上げ、検討を行った。非特異的増幅が起こらない最大 Mg_2^+ 濃度を模索した所、アニーリング温度 55°C の時、3.5 mM であった。そこでこの Mg_2^+ 濃度で再度 DNP-dUTP 濃度の検討を行った所、70 nM (濃度比で 7:13) までで増幅を確認する事ができた (それ以上は未検討)。しかしながら PCR 産物 (合成プロープ) 量が著しく減少したため、 Mg_2^+ 濃度 3.5 mM、60 mM DNP-dUTP でプロープを合成する事とした (Fig. 1)。この条件で作成されたプロープに標識されている DNP 数を吸光度から算出した所、dsDNA あたり約 50-60 個程度と推察された。この数はおおよそ 25 塩基に一個の割合で標識されていることを意味する。



Fig. 1 Capillary electrophoresis of PCR product. Lane 1: PCR without DNP-dUTP. Lane 2: PCR with 60 nM DNP-dUTP and 3.5 mM Mg_2^+ (polyDNA probe).

次に、ssDNA プロープ作成のために、S 化したプライマーを用いて同条件で合成した dsDNA をエキソヌクレアーゼ消化した。その産物を電気泳動で解析した所、dsDNA とは異なる位置にバンドが得られ、かつ EtBr 染色では微弱な蛍光しかえられないのに対し、SYBR Gold で染色すると強い蛍光が得られた。この事からこのバンドは ssDNA 由来であると考えられ、本エキソヌクレアーゼが DNP-dUTP に対しても有効であることが判明した。

3.2 Two-pass TSA-FISH 法による genome DNA の検出

次に本研究で作成した dsDNA および ssDNA プロープを用いて微生物の genome 上にコードされている機能遺伝子の検出を試みた。まず、dsDNA および ssDNA プロープを用いて TSA-FISH 法を適用した所、菌体からは微弱な蛍光しか得られなかった。そこで two-pass TSA-FISH 法を適用した所、dsDNA、ssDNA プロープのいずれを用いても、菌体から強い蛍光を得る事ができた (Fig. 2)。この事は約 50 個のレポーター基を持つ

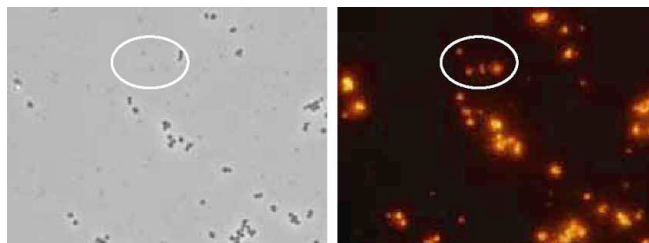


Fig. 2 Two-pass TSA-FISH targeting *mcr* gene encoded on archaeal genome DNA. The cells were successfully detected, however unspecific fluorescence was observed from the slide surface (circle area).

つプロープと two-pass TSA-FISH 法は、シングルもしくは数コピーしか存在しない核酸を検出するのに十分な検出感度を持ち合わせている事を示唆している。しかしながら、非特異的蛍光もスライド上からも発せられた (Fig. 2 白丸)。この非特異的蛍光の原因としては、ハイブリダイゼーション後のプロープ洗浄が不十分、抗体が非特異的にスライドに沈着、などが挙げられる。現在、洗浄バッファの改善や様々な方法によるスライドのブロッキングを試みているが、改善は見られていない。Two-pass TSA-FISH 法は、シグナル増幅反応を繰り返すために、プロープや抗体のわずかな非特異的沈着が結果として強い蛍光を発するバックグラウンドとなってしまう。より厳しい洗浄およびブロッキングを行い、シグナル-ノイズ比を向上させる事が今後の課題である。

参考文献

- 1) Schönhuber et al., 1997. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3268-3273.
- 2) 久保田ら, 2004, 第 59 回土木学会全国大会, VII-080.
- 3) Hales et al., 1996. Appl. Environ. Microbiol., 62: 668-675.