

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

長岡技術科学大学 ○川上周司、久保田健吾

井町寛之、原田秀樹、大橋晶良

1. 研究背景と目的

Fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) 法は、形態的に識別が困難な環境中の微生物群に対し、特定の微生物群のみを *in-situ* かつシングルセルレベルで検出することが可能である。中でも rRNA を標的とした FISH 法は、rRNA 遺伝子配列に基づいた系統分類学上での同定が可能なことから、環境微生物工学の分野でも広く用いられている。

近年 rRNA を標的とした FISH 法の他に、微生物の生理学的活性や生理学的機能ポテンシャルを評価できる mRNA や染色体上にコードされた機能遺伝子を標的とした FISH 法が報告され始めている。これまでに mRNA を検出した例は 8 報、機能遺伝子を検出した例は 1 報あるが、環境微生物に適用するには課題が残されている。中でも検出感度の不足は、コピー数の少ない mRNA や機能遺伝子を検出する際の大きな問題である。そのため mRNA や機能遺伝子を検出した多くの報告において、より高感度検出が可能な数百塩基からなるポリヌクレオチドプローブ（ポリプローブ）が用いられており、今日までに唯一、機能遺伝子を検出した報告においてもポリプローブが用いられている¹⁾。一方、18~25 塩基からなるオリゴヌクレオチドプローブ（オリゴプローブ）は、ポリプローブに比べミスマッチ識別能力が高く、プローブ設計の自由度が高いにも関わらず、感度の問題から mRNA や機能遺伝子の検出にはあまり用いられていないのが現状である。

我々のグループは two-pass Catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法を用いることで、オリゴプローブでも mRNA を信頼性のあるシグナルで検出できることを報告した²⁾。Two-pass CARD-FISH 法は、horseradish peroxidase (HRP) の酵素触媒反応によるシグナル増幅を繰り返すことで、CARD-FISH 法に比べ著しく高い検出感度を得ることができる（CARD-FISH 法は通常の FISH 法の約 20 倍の輝度が得られるのに対し、two-pass CARD-FISH 法は約 400 倍との試算がある³⁾）。そこで我々はこの two-pass CARD-FISH 法を用いれば、感度が不十分なため困難であったオリゴプローブを用いた機能遺伝子の検出が可能なのではないかと考えた。本研究では、two-pass TSA-FISH 法を用いて、オリゴプローブで微生物のシングルコピー遺伝子が検出可能か検討した。

2. 実験方法

2.1 モデル微生物と標的遺伝子

モデル微生物には、全ゲノム配列が解読され、細胞壁処理を施さなくとも CARD-FISH 法が適用可能な *Methanococcus maripaludis* S2 株 (JCM13030) を用いた。また、ネガティブコントロールとして *Methanococcus vanneilii* (DSM1229) を用いた。両者は対数増殖期に回収し、パラホルムアルデヒドで固定した。

標的遺伝子は、*M.maripaludis* S2 株のゲノム上にシングルコピーとして存在する Methyl coenzyme M reductase (*mcr*) とした。プローブは、*mcr* の alpha subunit に特異的なプライマーとして知られる ME1、ME2、ME3、MR1 の 4 種⁴⁾をそれぞれ *M.maripaludis* のセンス鎖に特異的に設計した。また、プローブと標的分子との親和性を高めるためにプローブの一部を locked nucleic acid (LNA) に置換した。プローブの両端には DIG を修飾した。

2.2 CARD-FISH 法

CARD-FISH 法は、以下の手順で行った。まず、染色体とプローブを変性させた後、同時に 4 種のプローブを交雑させた。その後、抗原抗体反応により anti-DIG-HRP を結合させ Tyramide-Cy3 を用いた Tyramide Signal Amplification (TSA) 反応により可視化した。

2.3 Two-pass CARD-FISH 法

Two-pass CARD-FISH 法は、上述の CARD-FISH 法と同様に 4 種のプローブを交雑させた後、抗原抗体反応により anti-DIG-HRP を結合させ、Tyramide-DNP を用いた TSA 反応を行い、DNP を菌体内に沈着させた。続いて anti-

キーワード：CARD-FISH、two-pass CARD-FISH、シングルコピー遺伝子、オリゴヌクレオチドプローブ

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)

DNP-HRP を抗原抗体反応により結合させ、TSA 反応により Tyramide-Cy3 を沈着させ、可視化した。

3. 結果と考察

3.1 CARD-FISH 法、two-pass CARD-FISH 法による検出

まず *M.maripaludis* に対して CARD-FISH 法を適用したところ、菌体からは全く蛍光が得られなかった (Fig.1-A、露光時間：1000ms)。そこで、two-pass CARD-FISH 法を適用したところ、菌体から強い蛍光が得られた (Fig.1-B、露光時間：100ms)。しかし、すべての菌体から蛍光を得ることはできなかった。また、蛍光は菌全体から一様に得られるものではなく、局所的に得られた。これは、菌体内の標的遺伝子の近傍でシグナル増幅が生じたためだと考えられる。

次に、得られた蛍光が標的遺伝子に交雑したプローブ由来であるか確認するために *M.maripaludis* に対し DNase 処理を行い、標的遺伝子を消化した。その結果、菌体からのシグナルは全く観察されなくなり、蛍光が標的遺伝子に交雑したプローブ由来であることが確認された。

また、FA 濃度と反応温度を高くすることでハイブリダイゼーション時におけるストリンジェンシーを上げ、プローブが染色体から剥離することによるシグナルの消光を確認しようとしたところ、高ストリンジェンシー下 (eg. ホルムアミド濃度 90%、反応温度 48°C) でも完全にシグナルを消す事はできなかった。しかし、ネガティブコントロールである *M.vannielii* (4 種のプローブとのミスマッチは 1~3 塩基) においては、低ストリンジェンシー条件下で見られた非特異的蛍光が、ストリンジェンシーを上げていく事で見られなくなった。このことは、本技術がミスマッチを識別する特異性を有していることを示唆している。今後、どの程度のミスマッチを識別可能かについて、更に詳細な検討が必要である。

3.2 バックグラウンドの原因について

Two-pass CARD-FISH 法と 4 種類のプローブを同時に用いることで標的遺伝子を検出する事ができたが、菌体がマウントされていない箇所からの非特異的な蛍光が観察された (Fig.1-B)。そこで、この非特異的な蛍光の原因を特定するため、two-pass CARD-FISH 法を操作工程ごとに中断し、TSA 反応の Cy3 沈着を行い可視化した後、顕微鏡にて観察した。その結果、anti-DIG-HRP を用いた一回目の抗原抗体反応後に、微小ではあるが菌体がマウントされていない箇所からの非特異的な蛍光が観察された。これは、anti-DIG-HRP がスライドに非特異的に吸着し、それを起点としたシグナル増幅によるものと推察される。また、この抗体の非特異的な吸着が二回の TSA 反応により、最終的に非特異的なバックグラウンドになると考えられる。そこで、抗原抗体反応時における反応条件の検討 (反応バッファの組成、ブロック方法、反応時間、抗体量など) を行ったが、非特異的吸着を解消することは今のところできておらず、本法における課題の一つとなっている。

4. まとめ

本研究では、two-pass CARD-FISH 法を用いることで微核生物のシングルコピー遺伝子が検出可能か検討した。その結果、CARD-FISH 法では感度不足で検出できなかったが、two-pass CARD-FISH 法を用いることで標的遺伝子を検出することができた。しかしながら、全ての菌体から蛍光を得ることができず、また非特異的なバックグラウンドも観察された。今後、これらの問題を解決することで two-pass CARD-FISH 法は、*in situ* かつシングルセルレベルで遺伝子を可視化できる強力なツールになると考えられる。

参考文献

- 1) Zwirgmaier *et al.*, 2004, *Molec. Microbiol.* 51: 89-96.
- 2) Kubota *et al.*, 2006, *J Microbiol Methods.*, *in press*.
- 3) 久保田ら, 2005, 土木学会第 60 回年次学術講演会講演集, VII-63.
- 4) Hales *et al.*, 1996, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 668-675.

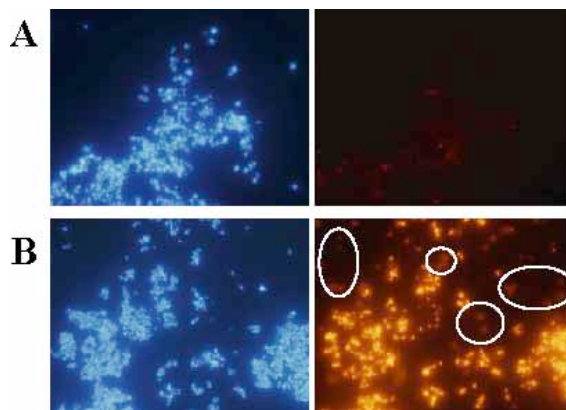


Fig.1 Detection of *mcrA* gene in *Methanococcus maripaludis* strain S2 cells by CARD-FISH (A) or by two-pass CARD-FISH (B). Circles show unspecific signals. DAPI (left) and epifluorescence micrograph (right) show identical fields. Exposure time for right panel (A) was 1000ms, and right panel (B) was 100ms.