

## LNA/DNA プローブの FISH 法への適用 -交雑効率の改善と特異性評価-

東北大学 ○ 久保田 健吾, 原田 秀樹, 長岡技術科学大学 大河原 正博

(独) 海洋研究開発機構 井町 寛之, 広島大学 大橋 晶良

## 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 FISH 法は 1) 微生物の保持している rRNA 量が少ない、2) プローブが菌体内へ浸透しにくい、3) プローブと rRNA の交雑効率が悪いなどの問題から、しばしばその適用が困難となる。中でもプローブと rRNA の低交雑効率は新しくプローブを設計する際、大きな問題となる。Amann の研究グループは計算式 ( $4 \times \text{GC 数} + 2 \times \text{AT 数}$ ) より算出されるプローブの Td (乖離温度) がハイブリダイゼーション温度よりも高くなるように設計した数百ものプローブを用いて 16S および 23S rRNA における交雑効率について調査を行った<sup>1,2,3)</sup>。その結果、同一菌体を標的としても、FISH 法で得られるシグナルはプローブによって著しく異なることを明らかにした。中でもプローブに適した rRNA の多変異領域は保存領域に比べ、得られるシグナルが弱い (交雑効率が低い) 傾向が見られた。このことは新しく FISH 法で有効に働くプローブを設計することが如何に難しいかを物語っている。彼らは更に詳細な研究を行うことで、プローブの交雑効率に影響を与える因子として、rRNA の二次構造 (塩基間結合) が rRNA 蛋白や rRNA の三次構造に比べて大きい事を明らかにした<sup>4)</sup>。

近年、Noguera の研究グループはプローブの交雑効率を決定する指標として新たに親和性を提案した<sup>5)</sup>。この親和性は 1. プローブ-rRNA 交雑 2. プローブの二次構造 3. rRNA の二次構造 から構成されるモデルを用いて算出される Gibbs の自由エネルギー変化量 ( $\Delta G^\circ$ ) で定義される。彼らは十分な親和性を持つように設計したプローブを用いることで、16S rRNA のほぼ全領域から中程度もしくは強いシグナルを得ることに成功している<sup>6)</sup>。しかしながら彼らはプローブを長くすることで親和性を上げたが、この方法はプローブ設計の自由度を制限してしまう。

そこで我々はプローブの長さを変えずに親和性を上げる方法として、近年報告された locked nucleic acid (LNA) に着目した。LNA はリボース環の 2'-O と 4'-C がメチレンを介してロックされている RNA 類似体で、DNA や RNA に対する結合親和性が DNA よりも高い事が知られている。本研究ではプローブに LNA を導入することでプローブの標的配列への親和性が増し、交雑効率が改善するかを調べた。更に LNA 導入がプローブの特異性 (ミスマッチ識別能) にどのような影響を与えるかについても検討を行った。

## 2. 実験方法

## 2.1 使用微生物

交雑効率の改善を見るためのモデル微生物には *Escherichia coli* TOPO10 (Invitrogen) を用いた。特異性の評価については、*E. coli* の他に *Comamonas testosteroni* (NBRC14951) および *Anaerolinea thermophila* UNI-1 (長岡技術科学大学 分離株) を用いた。菌株はそれぞれ至適条件下で培養し、対数増殖期に回収、パラホルムアルデヒドで固定した。

## 2.2 LNA/DNA プローブの設計

交雑効率の改善を見るためのプローブ配列は、Behrens ら<sup>3)</sup>の報告においてシグナルがほとんど得られていない 3 プローブ (Eco468, Eco621, Eco1068) とした。LNA にはプローブ配列中の親和性を高くすると考えられた塩基が

---

キーワード : fluorescence in situ hybridization (FISH) 法, locked nucleic acid (LNA), 交雑効率, プローブ設計

連絡先 : 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学 環境保全工学研究室 TEL : 022-795-7466

ら置換した。特異性評価については、1塩基ミスマッチの検討には GAM42a、2塩基ミスマッチの検討には Eub338 を用いた。LNA はそれぞれミスマッチ部位に導入した。DNA および LNA/DNA プローブの 5'末端には Cy3 を標識した。

### 2.3 FISH 法

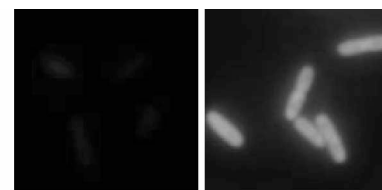
FISH 法は 20 mM Tris-HCl [pH7.2], 900 mM NaCl, 0.01% SDS, 0-80% ホルムアミドを含むバッファーにプローブ (0.5  $\mu$ M) を加え、46°C で 3-4 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、プローブを含まないバッファーで 48°C, 15 分間の洗浄を行った。交雑効率の改善を判断するために、FISH 法で得られたシグナルは CCD カメラで撮影し、Quantity One (BioRad) ソフトウェアで輝度を計測した。

## 3. 実験結果と考察

### 3.1 交雑効率の改善

まず選定した 3 配列の DNA プローブを用いたところ、ほとんどシグナルが得られない、もしくは弱いシグナルしか得られなかった (Fig. 1. 左)。そこで DNA を順次 LNA に置換していくと、LNA の置換数に伴いシグナルの増幅が見られた。プローブ配列によってその数は異なるが、最終的に 2-4 箇所 LNA に置換する事で Eub338 よりも強い同程度のシグナルを得る事ができた (Fig. 1. 右)。Quantity One による計測結果から、Eco468、Eco621、Eco1068 の輝度はそれぞれ 22、8、2 倍になった。

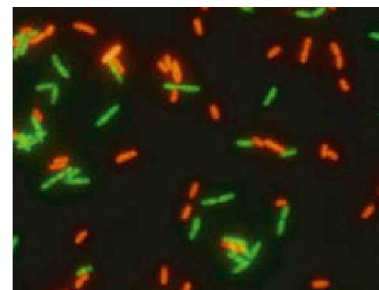
次に用いた DNA および LNA/DNA プローブの Td をハイブリダイゼーションバッファー中のホルムアミドの濃度を増加させて評価した。その結果、各プローブ配列とも 1 LNA 置換に対し Td のホルムアミド濃度が 5-20% 増加した。このことは LNA 置換によりプローブの標的配列への親和性が増加していることを意味している。最終的に Td のホルムアミド濃度が 35% を超えるプローブから得られるシグナルはプラトーに達した。これらの結果からプローブの交雑効率を最大限にするためには、プローブの Td のホルムアミド濃度が 35% 以上になるように LNA を導入することが 1 つの方法であると言える。



**Fig. 1.** Example of epifluorescence micrographs after FISH with DNA probe (left) and LNA/DNA probe (right). Both DNA and LNA/DNA probes are the same sequence. Exposure times for both pictures were the same.

### 3.2 特異性評価

次に GAM42a に完全マッチの *E. coli* と 1 塩基ミスマッチの *C. testosteroni* を用いて LNA/DNA プローブの特異性について検討を行った。その結果、DNA プローブを用いた場合と同様に、競合プローブを用いることで、1 塩基ミスマッチを識別することが可能であった。次に *E. coli* と *A. thermophila* を用いて、2 塩基ミスマッチの識別能について検討を行った。*E. coli* に特異的な Eub338 プローブを用いたところ、*A. thermophila* は検出されなかった。以上の結果から、LNA/DNA プローブの特異性は DNA プローブとほとんど変わらないことが分かった。これらの結果は LNA/DNA プローブが環境サンプルへ適用可能であることを示している。



**Fig. 2.** Specific identification of microorganisms using LNA/DNA probes.

### 参考文献

- 1) Fuchs et al., 1998, AEM. 4973-4982.
- 2) Fuchs et al., 2001, AEM. 961-968.
- 3) Behrens et al., 2003, AEM. 1748-1758.
- 4) Behrens et al., 2003, AEM. 4935-4941.
- 5) Yilmaz et al., 2004, AEM. 7126-7139.
- 6) Yilmaz et al., 2006, AEM. 733-744.