原核生物の機能遺伝子をシングルセルレベルで検出する高感度 TSA-FISH 法の開発

長岡技術科学大学 〇川上周司、山口隆司、東北大学 久保田健吾、原田秀樹 (独)海洋研究開発機構 井町寛之、広島大学 大橋晶良

1. 研究背景と目的

環境ゲノム時代の到来により、環境工学、衛生工学の分野においても、メタゲノム解析あるいはマイクロアレイ 解析といった遺伝子網羅的解析が盛んに行われるようになってきた。しかし、このような解析から得られた大量の 遺伝子プールからは、対象サンプルの全体像(代謝経路や有用遺伝子の発見)は掴めても、どの微生物がどの遺伝子 を保有しているかまでは分からず、微生物個々の生態を推定するまでに至らない。こうした事を理解するには、遺 伝子をシングルセルレベルかつ in situ (原位置) で検出可能な技術が不可欠である。

これまでに報告されている遺伝子検出技術には、*in situ* PCR 法, *in situ* LAMP 法、*in situ* RCA 法、cycle PRINS-FISH 法や RING-FISH 法などがある。しかし、これらの方法では、複数のプライマーあるいは設計に制約のあるプローブ、 長い塩基長を有するポリプローブなどを必要とすることから、検出レンジに柔軟性がない、特異的配列箇所が制約 される、特異的な検出が困難になるといった問題が懸念される。このような問題に対し、ミスマッチ識別能に長け、 設計が容易なオリゴプローブは有効である。しかし、これまでにオリゴプローブにより遺伝子を検出した例は報告 されていない。これは、オリゴプローブでは多数のレポータ基を標識できないため、遺伝子を直接検出するだけの 十分な感度が得られないことが主な理由の1つである。

我々はこれまでに、酵素触媒反応を利用したシグナル増幅法の1種である Tyramide Signal Amplification (TSA)反応に着目し研究を行ってきた。そして TSA-FISH 法よりも高感度な two-pass TSA-FISH 法を開発し、これまでにメタン生成古細菌の Methyl coenzyme M reductase (*mcr*)遺伝子を標的とし、オリゴプローブにて mRNA を¹⁾、ポリプローブにて *mcr*遺伝子を十分な感度をもって検出することに成功した²⁾。我々はこれらの研究を通し、two-pass TSA-FISH 法を用いれば、オリゴプローブでも遺伝子を検出できる十分なポテンシャルがあると判断した。本研究では、two-pass TSA-FISH 法を用い、オリゴプローブにより微生物の遺伝子を検出する技術の開発を目的とした。

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 TSA-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微生物として *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 *mcr* 遺伝子とした。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 と MR1の4種^{3,4)}をそれぞれ *M. maripaludis* のセンス鎖に特異的に結合するように設計した。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 一部を人工核酸 locked nucleic acid に置換した。プローブの両端には DIG を修飾した。

2.2 Clone-FISH 法に用いるクローン菌体の作成

Clone-FISH 法は Schramm らの方法⁵⁾に若干の変更を加えて行った。クローン菌体の作成には、まず *M. maripaludis* の *mcrA* 遺伝子の全長を PCR により増幅し、TOPO TA cloning kit (invitrogen) によりクローン化した。また、この際 にコントロール菌体としてセルフライゲーションのプラスミドを組込んだクローン菌体も作成した。クローン化し た菌体は、LB 培地で震盪培養を行い、対数増幅期に回収しパラホルムアルデヒドで固定した。

2.3 TSA-FISH 法

TSA-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 TSA 反応により可視化した。

2.4 Two-pass TSA-FISH 法

Two-pass TSA-FISH 法は、上述の TSA-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-

キーワード: TSA-FISH、two-pass TSA-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)

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-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 Clone-FISH 法によるプローブの in situ hybridization 法への適用可能性評価

本手法で用いるプローブが in situ hybridization 法に適用可能か Clone-FISH 法により確認した。mcrA 遺伝子を挿入 したプラスミドを組込んだクローン菌体に対し two-pass TSA-FISH 法を適用したところ、全てのプローブにおいて強 い蛍光が得られた。また、セルフライゲーションのプラスミドを組込んだ菌体に対し同様の実験を行ったところ、 蛍光は得られなかった。これは、プローブが組み込んだ mcrA 遺伝子に特異的に結合していることを示唆するもので ある。以上のことから、本手法で用いるプローブは、in situ hybridization 法に適用可能だと判断した。

3.2 純粋菌株を用いたシングルコピー遺伝子の検出

モデル微生物である *M. maripaludis* に対し、本手法を適用し標的遺伝子の検出を試みた。まず、4種のプローブを 同時に交雑させ TSA-FISH 法を適用ところ、菌体からは全く蛍光が得られなかった。そこで、two-pass TSA-FISH 法 を適用したところ、菌体から強い蛍光が得られた。しかし、全ての菌体から蛍光を得ることはできなかった(検出率: 28.5 ± 4.6%)。また、得られた蛍光は菌体から一様に得られるものではなく局所的なものであった。これは標的遺伝 子の近傍でシグナル増幅が生じたものだと思われる。また、DNase 処理により *M. maripaludis* の染色体を消化した後 に two-pass TSA-FISH 法を適用したところ、シグナルは得られなかった。これは、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ことを示している。

次に、プローブの数を減らしても検出可能か検討した。まず、2種のプローブを同時に交雑させ two-pass TSA-FISH 法を適用したところ、十分な感度をもって検出することが可能であった。しかし、4種のプローブを同時に用いた場 合に比べ若干検出率が低下した (検出率: 17.1 ± 1.9%)。さらに1種のオリゴプローブでも十分な感度をもって検出可 能であった。しかし、検出率は2種の場合に比べ、さらに低下した (検出率: 15.5 ± 6.6%)。これは、プローブの標的 遺伝子への交雑効率が低いことが原因と考えられる。今後、プローブのマウント量や交雑温度、時間などを検討し、 交雑効率の向上を試みる予定である。

3.3 本手法の特異性について

M. maripaludis と M. vanneilii を用いて本手法の特異性について検討 した。まず、M. vanneilii の mcrA 遺伝子と3 ミスマッチを有する ME3 と MR1 プローブの2 種で two-pass TSA-FISH 法を行い、両者が識別可 能か検討した。結果、両者をほぼ識別できたが、M. vanneilii に若干の 非特異的な蛍光が観察された (Fig.1 B)。そこで、両者に対しプローブ をマウントせずに two-pass TSA 反応のみを行ったところ、同様に若干 の非特異的な蛍光が観察された。従って、この非特異的な蛍光は HRP 標識抗体が菌体に非特異的に吸着したことが原因であると考えられ、 プローブ由来の蛍光ではないと思われる。今後、抗体の洗浄等実験条 件を最適化することが必要である。また、M. vanneilii の mcr 遺伝子と 1 ミスマッチを有する ME1 と ME2 プローブの2種で行ったところ、 先の実験と同様の結果が得られた。これら結果は、本手法がミスマッ チを識別できる特異性を有している可能性を示唆するものであった。



Fig.1 Detection of *mcrA* gene in *M. maripaludis* (A) or *M. vanneilii* (B) by twopass TSA-FISH. Circles show nonspecific signals. Phase contrast (left) and epifluorescence micrograph (right) show identical fields. Exposure time was 200 ms.

4. まとめ

オリゴプローブと two-pass TSA-FISH 法を組み合わせた本手法において、オリゴプローブ1種でもシングルコピー 遺伝子を十分な感度をもって検出することが可能であった。また、1ミスマッチを識別できる可能性が示唆された。 今後、抗体の洗浄条件やプローブの交雑効率の改善などの問題点を解消することで、本手法は *in situ* かつシングル セルレベルで遺伝子を検出できる強力なツールになると考えられる。

参考文献

¹⁾ Kubota *et al.*, J. Microbiol. Methods, 66;21-8, 2006., 2) 川上ら, 環境工学研究論文集, 43: 143-148, 2006., 3) Hales *et al.*, AEM., 62: 68-675, 1996., 4) Simankova *et al.*, Syst. Appl. Microbiol., 26:312-8, 2003., 5) Schramm *et al.*, Environ. Microbiol. 4: 7713-720.,2002.