

嫌気性グラニューール汚泥に CARD-FISH 法を適用するための細胞壁処理方法の有効性の評価

長岡技術科学大学 ○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、岐阜大学 中村浩平、広島大学 大橋晶良

1. 研究背景と目的

メタンは、二酸化炭素の 20 倍以上の温室効果を持つ地球温暖化ガスとしてその挙動が注目される。地球環境上で放出されるメタンの多くは自然界由来のものが多く、その発生源は水田や湿地帯、地中からの噴出などがあげられる。また近年メタンは嫌気性処理技術の発展に伴いカーボンニュートラルなエネルギーとしても注目を集めている。これら様々な環境中におけるメタン生成には、メタン生成古細菌が大きく関与していることが知られている。

分子生物学的手法の発展に伴い、我々は環境中の微生物の挙動を把握できるようになりつつある。中でも fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、標的微生物を培養に依存せず視覚的に検出できることから環境中の微生物の同定に用いられている。細胞内の rRNA を標的とする FISH 法の検出感度は、対象微生物の rRNA 数に依存にすることが知られている。しかし、貧栄養下で生息する環境中のメタン生成古細菌は低活性である場合が多く、しばしば検出が困難になる¹⁾。我々はこうした問題に対し、高感度検出技術の一つである catalyzed reporter deposition (CARD) -FISH 法に着目しその適用性について検討してきた。CARD-FISH 法は、horseradish peroxidase (HRP) 酵素の酵素触媒反応によるシグナル増幅法である CARD 反応を用いることで細胞内に蛍光標識チラミドを大量に沈着させ、蛍光強度を高めることが可能である。しかし、高分子である HRP 標識プローブを細胞内に浸透させるための適切な細胞壁処理が必要であり、さまざまな細胞壁構造を有するメタン生成古細菌における細胞壁処理に関する知見は乏しいのが現状である。我々はこれまでに、分離培養された 12 種類のメタン生成古細菌に対し、様々な加水分解酵素を用いた細胞壁処理を施し CARD-FISH 法が適用可能か検討してきた。そして、組換え体から作成したシュードモレイナ加水分解酵素 (以下 PeiW) を用いることで菌体の溶解が全くなく、さまざまなメタン生成古細菌に対しある程度の効果が一様に得られることを報告した²⁾。

そこで本研究では、この PeiW 処理を環境中のメタン生成古細菌に対し用いた場合の有効性について検討した。サンプルには、中温 UASB 槽のグラニューール汚泥を用い、その有効性の評価は、PeiW 処理の有無による FISH 法と CARD-FISH 法のメタン生成古細菌の検出率を比較することで行った。また、それら結果から PeiW 処理の効果と問題点について考察した。

2. 実験方法

2.1 サンプル及び固定

実験に用いたグラニューール汚泥は、ラボスケールで運転する中温 UASB (35°C) から採取した。汚泥サンプルは、3% パラホルムアルデヒドで固定後、PBS に懸濁させ等量のエタノールで希釈し-20°C で保存した。

2.2 アガロースゲルでの包埋及び PeiW による細胞壁処理

固定したサンプルは、スライドガラスに低融点アガロースゲルで包埋し、エタノールで脱水後風乾させた。細胞壁処理は、組換え体から作成したシュードモレイナ加水分解酵素 (PeiW; 16 U/ml in 50 mM HEPES [pH 7.0], 5 mM dithiothreitol, 21 mM Na₂S) を滴下し、60°C で 15 分間反応させた。その後 PBSX (0.05% Triton X-100 in PBS) に 5 分間、超純水 1 分間、96%エタノールに 1 分間浸し風乾させた。

2.3 FISH 法および CARD-FISH 法

FISH 法は、Sekiguchi らの方法³⁾に準拠した。プローブには Cy3 を標識した ARC915 (*Archea* を標的)、MX825 (*Methanosaeta* 属を標的)、MB1174 (*Methanobacteriaceae* 科を標的) をそれぞれ用いた。CARD-FISH 法は、Kubota らの方法²⁾に準拠した。プローブには HRP を標識した ARC915 プローブを用い、CARD 反応には FITC 標識チラミドを用い可視化した。サンプルは DAPI による全菌染色を行った後顕微鏡観察に供し、DAPI 染色細胞と蛍光細胞をカウントすることで検出率を算出した。また、t 検定による統計処理により計測結果を比較した。

3. 結果と考察

中温グラニューール汚泥に対し PeiW 処理を施し、その有効性を検証した。まず、PeiW 処理を行うことで菌体が溶

キーワード: CARD-FISH 法、細胞壁処理、メタン生成古細菌、嫌気性処理

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)

菌するかを DAPI 染色菌体の検出率で比較したところ、処理の有無による菌体の溶菌はみられなかった。

次に、PeiW 処理の有無による FISH 法と CARD-FISH 法の検出率の比較を行った。その結果を table 1 に、その際の写真を Fig.1 に示す。まず、Arc915 プロブを用い FISH 法を行ったところ、グラニュール内の *Archea* の検出率は $41.9 \pm 5.0\%$ であった。次に、PeiW 処理を行ったところ検出率の向上は見られなかった ($39.7 \pm 2.7\%$, $P > 0.05$)。このことは、Cy3 標識プローブであればパラホルムアルデヒド固定のみで細胞内に浸透可能であることを示している。次に HRP を標識した Arc915 による CARD-FISH 法を行ったところ、無処理の場合 $8.0 \pm 2.8\%$ であった検出率は、PeiW 処理を行うことで 17.4% まで向上し、処理効果を確認できた。しかしながら、PeiW 処理の反応時間を延長しても検出率の向上はみられず、FISH 法で得られた検出率を達成することはできなかった。

この原因を解明するために、グラニュール内のメタン生成古細菌の菌相について調査した。FISH 解析により各メタン生成古細菌の存在率を確認したところ、菌相は主に *Metanosaeta* 属と *Methanobacteriaceae* 科に属する細菌群で構築されていることがわかった (MX825: $20.5 \pm 1.3\%$ 、MB1174: $20.3 \pm 3.2\%$)。 *Metanosaeta* 属に属する細菌群の多くは sheath と呼ばれる細胞壁構造を有しており、我々は *Metanosaeta* 属に対して PeiW 処理の効果が不均一であることを報告している²⁾。また、*Methanobacteriaceae* 科に属する細菌群が純水菌株で生育する時より環境中で生育する場合の方が細胞壁が厚くなるという報告⁴⁾もあり、PeiW 処理による効果が低下した可能性も考えられる。さらに PeiW の触媒反応に物質特異性があることも報告⁵⁾されており、こうしたことも PeiW の処理効果が不十分であった原因であると思われる。

また、サンプルを長期間保存することで検出率が向上することも確認された (Table 1)。長期保存サンプルに対し無処理の場合には FISH 法と CARD-FISH 法の検出率の向上にそれほど大きな効果はみられなかったが、PeiW 処理を行った際には飛躍的に検出率が向上し (20.5%の上昇)、FISH 法と同等の検出率を達成した ($P > 0.05$)。これは、長期保存によって何らかの損傷を受けた細胞壁に対し、PeiW の可蝕性が向上したことなどが考えられる。サンプルの長期保存によるプローブの浸透性の向上は、*alphaproteobacteria* における FISH 解析でも報告されている⁵⁾。しかしながら、その機構についての詳細は不明である。

4. まとめ

本研究により、PeiW 処理が中温グラニュール汚泥中のメタン生成古細菌に CARD-FISH 法を適用するための細胞壁処理方法として有効であることがわかった。PeiW 処理において菌体の損失がないことは特出すべき点である。しかし、すべてのメタン生成古細菌に対し CARD-FISH 法を適用可能にする処理方法ではない。細胞壁処理の現状に関しては、分子量の大きい物質を用いるその他の高感度検出技術 (*in situ* PCR 法、RING-FISH 法など) においても問題となっており、今後さらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Chen, A. C. *et al.*, 2003, *Biotechnol. Lett.* 25: 1563-1569.
- 2) Kubota, K. *et al.*, 2008, *J. Microbiol. Methods*, 72: 54-59.
- 3) Sekiguchi, Y. *et al.*, 1999, *App. Environ. Microbiol.*, 65: 1280-1288.
- 4) Nakamura, K. *et al.*, 2006, *App. Environ. Microbiol.*, 72: 6907-6913.
- 5) Morii, H. and Koga, Y., 1992, *J. Ferment. Bioeng.*, 73: 6-10.
- 6) Zarda, B. *et al.*, 1997, *Arch. Microbiol.*, 168: 185-192.

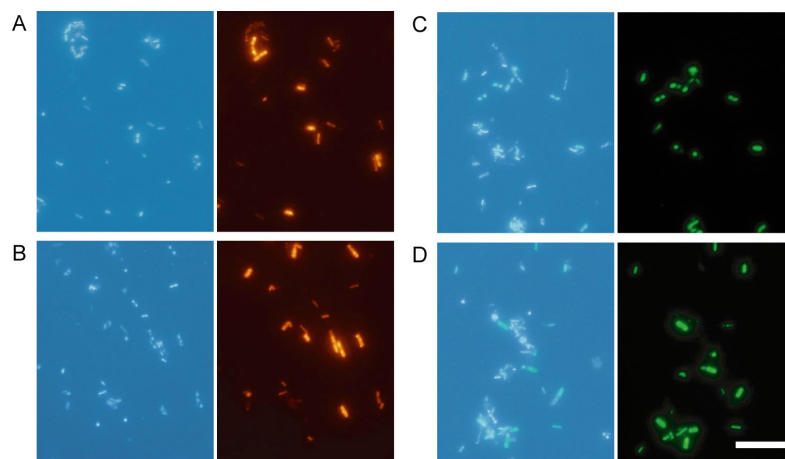


Fig. 1. In situ hybridization of Archaea in granular sludge. Each double panel depicts DAPI staining in blue (left) and probe staining in red or green (right). A & B: FISH with the Cy3-labeled ARC915 probe. C & D: TSA-FISH with the HRP-labeled ARC915 probe. B, D: hybridization was performed after the PeiW treatment. Scale bar, 10 μ m.

Table 1 Detection rates (%) of Archaea in the granular sludge by FISH or CARD-FISH with or without PeiW treatment

	FISH	CARD-FISH	
		2-week old	6-month old
No treatment	41.9 (5.0) ^a	8.0 (2.8)	13.8 (0.7)
PeiW treatment	39.7 (2.7)	17.4 (2.8)	34.3 (3.3)

^a Figures in parenthesis are standard deviation.