

オリゴプローブを利用した FISH 法の mRNA への適用

長岡技術科学大学 環境システム工学専攻 ○大塚 勇輝 山口 隆司
 東北大学 土木工学専攻 久保田 健吾
 長岡工業高等専門学校 環境都市工学専攻 荒木 信夫

1. 研究背景

近年, Fluorescence in situ hybridization(FISH)法によって汚泥内に存在する機能を視覚化する手法である, 機能遺伝子の mRNA を標的とした FISH 法の開発が行われている. これまでに, 機能遺伝子の mRNA を検出する手法として, ポリプローブを用いた FISH 法が報告をされた. しかし, このポリプローブを用いた FISH 法では, 使用するプローブの塩基が非常に長大であるため特異性が低い. このため, 複合微生物系を持つ排水汚泥のようなサンプルへの適用は困難である. そこで本研究では, この問題を解決するためにオリゴプローブを用いた mRNA FISH の汚泥サンプルへの適用を試みた. 適用した手法は, 高感度 FISH 法の一つである Tyramide signal amplification(TSA)-FISH 法で, 硫酸塩還元菌群が共通して保有する機能遺伝子である *apsA* mRNA を標的とした. この *apsA* とは硫酸塩還元菌がアデノシンホスホ硫酸(APS)を亜硫酸に還元する酵素である, APS リダクターゼの一部をコードする遺伝子である. また, 本研究の目的は硫酸塩還元菌の *apsA* mRNA を標的とした FISH 法を適用することであるが, 硫酸塩還元菌の 16S rRNA を標的とするプローブとの多重染色も試みた.

2. 実験方法

2.1 モデル微生物, 汚泥サンプルの調整

モデル微生物には, *Desulfovibrio vulgaris*(DSM644)を選定した. *D.vulgaris* は widdel 培地に主要有機源として乳酸を加え, 30°Cで3日間培養した後, 4%パラホルムアルデヒド[w/v]で固定した.

硫酸塩還元菌を含む汚泥サンプルとしては混合有機酸を主成分とする人工廃水 (COD/SO₄²⁻=20) を処理するUASBリアクターから採取したグラニューール汚泥を用いた. 汚泥は, 採取した後, 直ちに4%パラホルムアルデヒド[w/v]で固定した.

2.2 Clone-FISH 法

本研究で標的とするmRNAは, 16S rRNAと比較して菌体内における存在量が少ないという特徴がある. このため, 設計したプローブの有効性は, オリゴプローブを利用したFISH法により確認することが困難である. Kubotaらは, mRNAを標的としたFISH法を適用する際に, プローブの有効性をClone-FISH法により確認している. 本研究でも同様にして確認を行った. Clone-FISH法はKubotaら¹⁾の方法に準拠して行った.

2.3 TSA-FISH 法

TSA-FISH法は, Kubotaら¹⁾の方法に若干の変更を加えて行った. まず, 高撥水性スライドガラス(松浪硝子)を3%過酸化水素水に10分間浸してRNase-freeにした. その後, サンプルを0.1%低融点アガロース(Invitrogen)にて包埋し, スライドガラスにマウントし, 60°Cで急速に乾燥させ50,80,96%エタノールそれぞれ3,1,1分間浸して脱水を行った. 細胞壁処理は, TEバッファー(1mM Tris-HCl [pH7.5], 1mM EDTA [pH8.0])で1mg/mLに調整したリゾチームを各ウェルに10μLずつ滴下し, Double distilled water(以後DDW)の湿潤チャンバー内で37°C, 30分で反応させた.

ハイブリダイゼーションは, あらかじめハイブリダイゼーションバッファー(10% Dextran sulphate, DDW, 20mM Tris-HCl [pH7.5], 900mM NaCl, 1% Blocking reagent (Roche), 40% Formamide, 0.01% SDS)を各ウェルにマウントし, ブロッキング反応を40°C, 1時間で行った. 次に, Horseradish peroxidase(HRP)標識のプローブとハイブリダイゼーションバッファーを1:100の割合で混合したものを各ウェルに滴下し, 湿潤チャンバー内で40°C, 2時間で反応させた. その後, 洗浄バッファーにスライドを浸し42°C, 20分にてプローブを洗浄した. さらにTNTバッファー(100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl,

キーワード: Fluorescence in situ hybridization, mRNA, adenosine-5'-phosphosulfate reductase gene, tyramide signal amplification

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 水圏土壌環境制御研究室

TEL: 0258-47-1611(内線 6646) E-mail: ootsuka@stn.nagaokaut.ac.jp

0.05% Tween-20)に室温で15分間浸した。

TSA反応は、チラミド溶液と Amplification バッファー(PerkinElmer)を1:50の割合で混合したものを滴下し、暗所で10分間反応させた。その後、スライド表面をDDWで軽く洗い流し、TNTバッファーに15min、DDWに1min、96%エタノールに1min浸し、風乾させた。

3. 実験結果

3.1 プローブの有効性の確認

Clone-FISH法によりプローブの有効性を確認した。ポジティブコントロールは*apsA*遺伝子を順方向に組み込んだプラスミドを有する大腸菌で、ネガティブコントロールは*apsA*遺伝子を逆方向に組み込んだプラスミドを有する大腸菌である。ポジティブコントロールからは*apsA*遺伝子から転写されたRNA由来のシグナルが検出された。また、ネガティブコントロールからのシグナルは検出されなかった。このことから、プローブAPS8Rは*apsA*遺伝子の塩基配列に特異的であり、プローブAPS8Rは*apsA*遺伝子に対して適用可能であると判断した。

3.2 *D. vulgaris* の *apsA* mRNA の検出

*D. vulgaris*の菌体内の*apsA* mRNAを標的としたFISH法を適用し、*apsA* mRNAに対してプローブAPS8Rが適用可能であるのかを検討した。ネガティブコントロールには*apsA*遺伝子を保有していない*Escherichia coli*を用いた。*D. vulgaris*から*apsA* mRNA由来のシグナルが検出された。また、*E. coli*からはシグナルは検出されなかった。このことから、プローブAPS8Rは*apsA* mRNAに対して適用が可能であると判断した。

3.3 汚泥サンプル内の *apsA* mRNA の可視化と 16S rRNA との多重染色

UASBリアクターから採取した後、直ちに固定を行った汚泥サンプルに対してmRNA FISHを適用した。Fig.1にmRNA FISHの写真を示す。汚泥サンプル内から*apsA* mRNA由来のシグナルを検出できた(Fig.1 B)。また、硫酸塩還元菌群の16S rRNAを標的とするプローブSRB385を用いたFISH法との多重染色を適用したところ、両者のシグナルはほぼ一致していた(Fig.1 B,C)。このことから、本実験で検出された*apsA* mRNAは、全て硫酸塩還元菌から転写されたものであり、オリゴプローブを利用したmRNAを標的としたFISH法は、汚泥サンプルへ適用することが可能であった。

汚泥サンプルに対して*apsA* mRNAと16S rRNAを標的としたFISH法による多重染色を適用した際、*apsA* mRNA由来のシグナルが検出されず、16S rRNA由来のシグナルが検出された部分が確認された。この部分は、菌体周辺の硫酸塩が希薄になったために*apsA* mRNAの転写を停止、又は極端に低下させている菌体であると考えられ、検討を行う必要がある。



Fig.1 集積をかけていない汚泥サンプルに対して TSA-FISH 法を適用した顕微鏡写真。A：観察視野内の全菌体，B：*apsA* mRNA由来のシグナル，C：硫酸塩還元菌の16S rRNA由来のシグナル。A,B,Cの写真は顕微鏡の同一視野。B,Cにおける露光時間はそれぞれ2.0sec。

4. まとめ

オリゴプローブを用いたmRNA FISHを汚泥サンプルへ適用し、以下の知見が得られた。

- 1) 汚泥サンプルへmRNA FISHを適用したところ、*apsA* mRNA由来のシグナルが検出できた。
- 2) 汚泥サンプルに対して*apsA* mRNAを標的としたFISH法と硫酸塩還元菌16S rRNAを標的としたFISH法による多重染色を適用したところ、両者のシグナルはほぼ一致していた。

5. 参考文献

- 1) K. Kubota, A. Ohashi, H. Imachi, H. Harada : Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH) , Journal of Microbiological Methods, **66**, pp. 521-528, 2006