

機能遺伝子の mRNA を標的とした FISH 法による硫酸還元菌群の機能と系統分類の同時検出

長岡技術科学大学 環境システム工学専攻 ○大塚 勇輝 川上 周司 山口 隆司

東北大学 土木工学専攻 久保田 健吾 原田 秀樹

長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 荒木 信夫

1. 研究背景

近年、微生物の反応を触媒する酵素の遺伝情報である機能遺伝子の塩基配列から微生物叢の解析が行われている。これまでに、機能遺伝子の塩基配列情報を利用したクローニング解析から、同一機能を保有する微生物群を機能遺伝子により網羅的に検出し、更に Real-time PCR 法により菌数の変遷をモニタリングする技術が報告されている。微生物機能を利用した解析が行われる中、機能遺伝子による解析結果と 16S rRNA 遺伝子による解析結果を一致させる試みが行われている。その方法の一つとして、オリゴヌクレオチドプローブにより微生物の 16S rRNA を、ポリヌクレオチドプローブにより機能遺伝子の mRNA を検出し、顕微鏡の同一視野内で一致させる方法が報告されている。しかし、ポリヌクレオチドプローブは、その塩基の長さから、塩基配列のミスマッチを識別する為に、厳しい実験条件の設定が必要であり、実験的な特異性を得る事が難しい特徴を持つ。このため、廃水汚泥のような複雑な菌叢には対応が難しいと考えられ、より特異性の高い手法の適用が望まれる。そこで本研究では、廃水汚泥内に存在する微生物群の機能と系統分類の FISH 法による一致を、塩基配列の選択制の高い手法により実施する事を目的とした。実験的な特異性の高い FISH 法として、オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法を選択し、微生物機能を検出する為に機能遺伝子の mRNA を標的とした。しかし、mRNA は細胞内での存在数が極めて少ない為、既存の方法では検出に十分な感度を得ることができない。そこで、高感度 FISH 法である Catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法により mRNA を検出した。

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 培地に主要有機原として乳酸を加え、30℃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としては混合有機酸を主成分とする人工廃水 ($\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}=12$) を処理する UASB リアクターから採取したグラニュール汚泥を用いた。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、オリゴヌクレオチド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¹⁾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. CARD-FISH 法

菌体内の mRNA を検出する為に、高感度なシグナルを得る事ができる CARD-FISH 法を採用した。CARD-FISH 法は、Horseradish peroxidase (HRP) の触媒反応により蛍光物質を標識したチラミド分子をラジカル化し、それらを細胞組織に結合させる事によりシグナルを増幅する手法である。本研究での CARD-FISH 法は、Kubota ら¹⁾の方法に準拠している。

3. 実験結果

3-1. プローブの有効性の確認

Clone-FISH 法により、*apsA* 遺伝子に特異的なプローブ APS8R の有効性を確認した。標的は、*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ある。*apsA* RNA は T7 RNA ポリメラーゼにより発現させた。ネガティブコントロールには、プラスミドを組み込んでいない大腸菌を用いた。実験の結果、クローン内の *apsA* 遺伝子から転写された RNA を検出す

キーワード：Fluorescence in situ hybridization , mRNA , adenosine-5'-phosphosulfate reductase gene , Catalyzed reporter deposition

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 環境システム工学専攻 水圏環境研究室

る事ができた (Fig.1-B)。また、ネガティブコントロールからはシグナルが検出されなかった (Data not shown)。このことから、APS8R は *apsA* 遺伝子の塩基配列を特異的に検出する事が確認された。

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。この結果、*D.vulgaris* から *apsA* mRNA 由来のシグナルが検出された (Data not shown)。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、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 との二重染色

まず UASB リアクターから採取したグラニューール汚泥の HRP 標識プローブの細胞浸透性、および内在性 HRP 活性を評価するため、プローブ Eub338, NonEUB338 による CARD-FISH 法を適用した。その結果、Eub338 でグラニューール汚泥内のバクテリアが検出されたのに対し、NonEUB338 ではシグナルが得られなかった (Data not shown)。そこで、*apsA* mRNA を標的とした FISH 法と硫酸還元菌の 16S rRNA に特異的なプローブ SRB385 による FISH 法との二重染色を実施した。Fig.2 に結果を示す。グラニューール汚泥からは、*apsA* mRNA 由来のシグナルを、全菌体のうち 1%以下であるが検出する事ができた (Fig.1-B)。しかし、16S rRNA との二重染色の結果が一致しなかった (Fig.2-B, C, D)。

検出されたシグナルは、APS8R がポジティブであり、SRB385 がネガティブであったことから、硫酸還元反応は SRB385 で検出できない種類の硫酸還元菌によって行われている可能性が示唆された。この結果から、FISH 法により顕微鏡の同一視野内で微生物の機能と系統分類を一致させる手法によって、これまで不可能であった機能と系統分類の一致による新たな知見を得ることができる可能性を示唆できた。しかしながら、APS8R がポジティブな細胞の検出率が、SRB385 ポジティブな細胞の検出率 (約 26%) (Fig.2-C) よりも極めて低かった (<1%) ため、このような細胞が他にも存在するのを確認する事はできなかった (Data not shown)。

4. まとめ

オリゴヌクレオチドプローブを用いた mRNA FISH を汚泥へ適用し、以下の知見が得られた。

- 1) 汚泥内から硫酸還元機能遺伝子 *apsA* の mRNA を検出。
- 2) 微生物機能と 16S rRNA による系統分類を顕微鏡の同一視野内で一致させるツールの可能性を示唆。

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

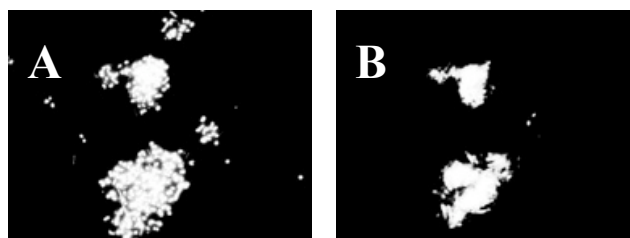


Fig.1 *apsA* 遺伝子を順方向に組み込んだプラスミドを有する大腸菌に対して CARD-FISH 法を適用した顕微鏡写真。A: DAPI 染色観察視野, B: APS8R により *apsA* 遺伝子から転写された RNA を検出

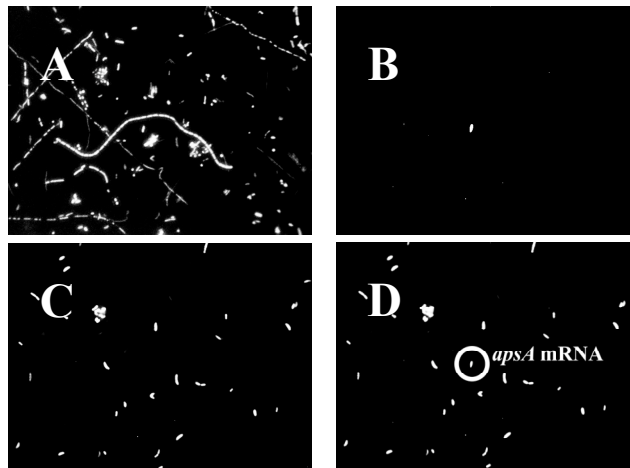


Fig.2 グラニューール汚泥に対して mRNA を標的とした FISH 法と 16S rRNA を標的とした FISH 法の二重染色を適用した顕微鏡写真。A: DAPI 染色観察視野, B: APS8R により *apsA* mRNA を検出, C: SRB385 により硫酸還元菌の 16S rRNA を検出, D: B と C の観察視野を合成, 写真 D の円で囲ってある部分が *apsA* mRNA を検出した細胞