

Gene FISH による環境中未培養微生物の機能同定

東北大学 学生会員 ○長谷川拓也, 久保田健吾, 原田秀樹, 長岡技術科学大学 川上周司
(独) 海洋研究開発機構 井町寛之, 広島大学 大橋晶良

1. はじめに

微生物は、排水処理やバイオレメディエーション等の土木環境工学分野のみに留まらずあらゆる分野で利用されており、その機能を解明することは有意義である。しかし、環境中の大多数の微生物は人為的な分離・培養が困難であり、その機能を解明することは非常に困難である。この問題に対する一つの解決策として、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による機能遺伝子のシングルセルレベルでの視覚的検出 (Gene FISH) が有効である。

我々の研究グループは酵素触媒反応によるシグナル増幅法 tyramide signal amplification (TSA) 法を二度行う two-pass TSA-FISH 法を開発し¹⁾、さらにハプテンを多数標識可能なポリプローブ (プローブ塩基長: 約 450 or 750 bp) と組み合わせ検出感度を上げることで、従来の FISH 法では検出不可能とされるシングルコピー遺伝子の検出の可能性を示した²⁾。しかし、ネガティブコントロール微生物からの非特異な蛍光を完全に消すことはできず、実用的な技術には至っていない。

そこで本研究では、検出の特異性を高めるためにプローブの長さの短縮を試みた。しかし、プローブを短縮することで標識されるレポータ基の数が減少し感度が低下することが予想される。そこで、レポータ基の標識数の高効率化についても検討を行い、十分な特異性を持って微生物の機能遺伝子を検出可能な技術の開発を行った。

2. 実験方法

2-1. ポリプローブの合成

ポリプローブは PCR 法を用いて合成した。標的遺伝子は *Methanococcus maripaludis* S2 株 (JCM13030) の methyl coenzyme M reductase (*mcr*) 遺伝子とし、プローブのテンプレートには標的微生物のゲノム DNA を用いた。PCR 反応液中に dUTP-11-DNP を添加し PCR 産物に DNP 抗原を取り込ませた。本研究では、三種類のプライマーセットを用い、長さの異なる三種類のプローブ (150, 465, 756 bp) を合成した。その際、添加 dUTP-11-DNP 濃度、Mg²⁺濃度、アニリング温度について検討し、高い DNP 取り込み量と収量が得られるように条件を最適化した。

2-2. Two-pass TSA-FISH 法

Two-pass TSA-FISH 法とは、TSA 反応 (過酸化水素存在下で horseradish peroxidase (HRP) の酵素触媒反応によりラジカル化した tyramide 化合物を菌体内に多量に沈着させるシグナル増幅法) を二度行うことで、飛躍的な感度増幅を可能にする手法である。

実験の手順は川上らの方法²⁾に準拠して行った。まず、熱変性により染色体とプローブの二本鎖を解離させた後、ホルムアミドを含むハイブリダイゼーションバッファーを用いプローブを交雑させた。次に、抗原抗体反応により HRP 標識 DNP 抗体をプローブに結合させた後、TSA 反応を行い DNP 抗原標識 tyramide を多量に沈着させた。再度、抗原抗体反応により HRP 標識 DNP 抗体を結合させた後、TSA 反応を行い蛍光標識 tyramide を多量に沈着させ蛍光顕微鏡で観察した。

3. 実験結果及び考察

3-1. メタン生成古細菌の *mcr* 遺伝子の検出

まず、モデル微生物として *M. maripaludis* を、ネガティブコントロール微生物として *Escherichia coli* を用い *mcr* 遺伝子の検出を試みた。756 bp のプローブを用いて two-pass TSA-FISH 法を行ったところ、モデル微生物からシグナルを得ることができた。さらに交雑条件を最適化したところ両者を識別して検出できた。

次に、今までの研究で成功していない近縁種の識別を試みた。川上らの報告では、遺伝子配列の相同性が 60%程度の微生物間の識別を試みたがネガティブコントロール微生物からの非特異な蛍光を完全に消すことはできず両者を識別するまでに至っていない²⁾。そこで本研究では、相同性の高い菌種間でも識別の可能性がある短いプローブを用いることで問題の解決を試みた。

そのためにはまず、短いプローブでも遺伝子の検出が可能であるか確認する必要がある。465 bp のプローブでの検出を試みたところ、検出率 100%を達成することはできなかったが、菌全体から十分なシグナルを得ることができた。さらに短い 150 bp のプローブを用いたところ、465 bp のプローブよりさらに検出率が低下するものの菌体からシグナルを得ること

キーワード : Gene FISH, Two-pass TSA-FISH, ポリプローブ, シングルコピー遺伝子

東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06

環境保全工学研究室 TEL: 022-795-3584, FAX: 022-795-7465

ができた。また、得られるシグナルは菌体の一部分からであった。これらの結果より、短いプローブでも遺伝子の検出が可能であることがわかった。

これらの長さの短いプローブを用い、遺伝子配列の相同性の異なる二種類の微生物 *Methanococcus*

vannielii (JCM1229), *Methanoculleus chikugoensis* (JCM10825) をネガティブコントロール微生物として、モデル微生物との識別を試みた。150, 465 bp のプローブを用いたところ遺伝子配列の相同性が 90%程度の *M. vannielii* からはシグナルが得られ両者の識別は困難であったが、相同性 60%程度 of *M. chikugoensis* からはシグナルが得られず、モデル微生物との識別が可能であった。以上のように、遺伝子配列相同性 60%程度の微生物間の識別は可能であった。

3-2. 混合系での識別

次に、モデル微生物とネガティブコントロール微生物を混合した系で実験を行ったところ、モデル微生物と隣接するネガティブコントロール微生物から非特異なシグナルが得られた。この原因は、ポリプローブ同士の結合により、プローブのネットワークが形成され菌体の外側でも TSA 反応が起き、tyramide がモデル微生物以外の箇所にも沈着したためと考えられる。この問題を解消するために、交雑条件を厳しくする、プローブ濃度を下げる、交雑時間を短くするなどの検討を行ったが非特異なシグナルを消すことは困難であった。しかし、菌体同士を分散させてスライドガラスに固着させる方法を考案し検出を試みたところ、標的微生物のみを特異的に検出することができた。

3-3. 様々な遺伝子の検出

ここまではメタン生成古細菌の *mcr* 遺伝子の検出について述べたが、技術の有用性を示すために *mcr* 遺伝子以外の遺伝子にも適用する必要がある。そこで、本研究では硫酸還元菌の adenosine-5'-phosphosulfate reductase (*aps*) 遺伝子、大腸菌の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子の検出も試みた。

805 bp のプローブを用いて *aps* 遺伝子の検出を試みたところ、モデル微生物の *Desulfobulbus propionicus* (DSM6523) からシグナルを得ることができた。ネガティブコントロール微生物には *Desulfobulbus elongatus* (DSM2908) と *Desulfovibrio vulgaris* (DSM644) を用いた。*D. elongates* (相同性約 90%) からはシグナルが得られたが、*D. vulgaris* (相同性約 67%) からはシグナルが得られずモデル微生物との識別が可能であった。また、313 bp のプローブを用いて GAPDH 遺伝子の検出を試みたところ、モデル微生物の *E. coli* からシグナルを得ることができた。一方、ネガティブコントロール微生物に用いた *M. maripaludis* からはシグナルが全く得られなかった。以上のことから、本技術は様々な遺伝子に対して適用可能であることがわかった。

3-4. 環境サンプルへの適用

環境サンプルには嫌気性排水処理リアクターの汚泥を用いた。プローブには、環境サンプルから抽出した DNA をテンプレートとして合成した *aps* 遺伝子標的のプローブを用いた。805 bp のプローブを用い、環境中の *aps* 遺伝子保持微生物の網羅的検出を試みたところ、一部の菌体からシグナルを得ることができた (図-1)。プローブをマウントしないで two-pass TSA-FISH 法を行った系からはシグナルが全く得られなかったこと、交雑条件を厳しくするとシグナルが消えたこと、環境サンプルに内在 HRP 活性はなかったことから、得られたシグナルは標的遺伝子にプローブが交雑したことに由来するものであると考えられる。以上より、環境サンプル中の微生物の機能遺伝子の検出に成功したと判断した。

4. まとめ

微生物の機能遺伝子を、シングルセルレベルで特異的に検出可能な技術を開発した。本技術は様々な遺伝子にも適用可能な技術であった。さらに、環境サンプルからの機能遺伝子の検出にも成功した。本技術により、環境中の未培養微生物の機能同定が可能になり、微生物に関わるあらゆる分野へ貢献できると考えられる。

謝辞

この研究の一部は環境省及び文部科学省の補助を受けて実施したものである。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- 1) Kubota *et al.*, 2006, J. Microbiol. Methods, 2) 川上ら, 2006. 環境工学研究論文集

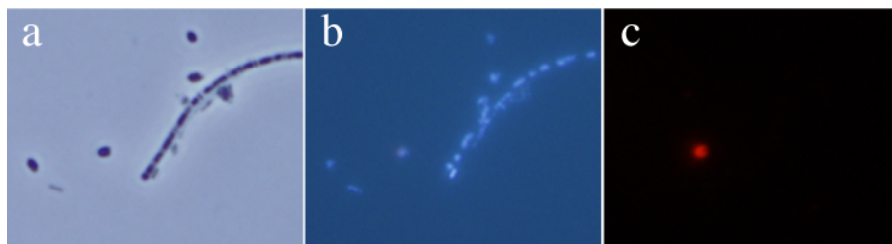


図-1: 環境サンプルに対し two-pass TSA-FISH 法を適用した顕微鏡写真. (a) 位相差視野, (b) DAPI 染色, (c) *aps* 遺伝子標的のプローブによる蛍光視野. 露光時間は 20 ms.