

## 嫌気性汚泥からの機能遺伝子に基づく微生物の視覚的検出

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、広島大学 大橋晶良

## 1. 研究背景と目的

rRNA アプローチの普及により、我々は水圏環境中や処理反応槽内に生息する微生物群を容易に同定することが可能になりつつある。中でも fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、標的微生物を培養を伴わずに視覚的に分子系統学に基づく同定が可能であることから、キー微生物や未培養微生物の解析に対して必須の技術である。しかし、個々の微生物機能を理解するには、rRNA を標的とする FISH 法では近縁な分離株の情報に頼るところが大きく、標的微生物が未培養微生物群に属する場合困難になる。微生物機能を知るためには mRNA や遺伝子といった分子を標的にすることが有効であるが、これらは微生物細胞内の存在数が少なく、蛍光強度が標的分子の存在数に依存する FISH 法では感度が不足する。我々はこれまでに酵素触媒反応によるシグナル増幅法の一つである tyramide signal amplification (TSA) 法に着目して研究を行っており、純粋菌株を用いた検討から mRNA<sup>1)</sup> やシングルコピー遺伝子の検出<sup>2,3)</sup>を報告してきた。中でもマルチラベルポリヌクレオチドプローブ (以下ポリプローブ)を用いた two-pass TSA-FISH 法は、標的遺伝子を極めて高い感度で特異的に検出することが可能であり、これまでに純粋菌株を用いた系において検出までのプロトコルを報告している<sup>3)</sup>。本研究では、我々が開発した遺伝子検出技術を環境サンプルに適用可能な技術にまで引き上げることを目的としている。まず環境サンプルに対し標的遺伝子を対象とした cloning 解析を行い、標的遺伝子を保有する微生物を確認した。次に得られたクローンライブラリーの中から主要なクローンを一種選択し、プラスミドからポリプローブの合成を行った。最終的に環境サンプル中から標的微生物の特異的検出を試みた。

## 2. 実験方法

### 2.1 サンプルの調整と標的遺伝子

サンプルには中温 upflow anaerobic sludge blanket (UASB) リアクター (流入 COD: 3000 mg/l) の嫌気性汚泥を用いた。サンプルは、4%パラホルムアルデヒドで固定し、超音波により分散処理を施した。また標的遺伝子は methyl coenzyme M reductase (*mcr*) 遺伝子とし、汚泥内に存在するメタン生成古細菌を標的とした。

### 2.2 *mcr* 遺伝子を標的とした cloning 解析およびポリプローブの合成

汚泥サンプル中にどのようなメタン生成古細菌が存在するのかを確認するために *mcr* 遺伝子を標的とした cloning 解析を行った。また cloning 解析で得られたプラスミドを用い、既報の方法<sup>3)</sup>に準拠して dinitrophenyl (DNP) を多数標識したポリプローブを PCR 法により合成した。Cloning 解析およびポリプローブの合成には ME3f-ME2r プライマーペア (増幅塩基長 465bp) を用いた。

### 2.3 Two-pass TSA-FISH 法

Two-pass TSA-FISH 法は、長谷川らの方法<sup>3)</sup>に準拠し以下の示す手順で行った。まず、peiW 処理<sup>4)</sup>により汚泥内のメタン生成古細菌の細胞壁処理を施した。次に染色体とプローブを同時に熱変性させた後、ポリプローブを標的遺伝子に交雑させた。その後、抗原抗体反応によりポリプローブに anti-DNP- horseradish peroxidase (HRP) を結合させ、さらに tyramide-DNP を用いた TSA 反応により DNP を細胞内に沈着させた。次に、再度抗

キーワード：TSA-FISH 法、メタン生成古細菌、UASB

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)

原抗体反応を行い tyramide-DNP に anti-DNP-HRP を結合させ、TSA 反応により Tyramide-Cy3 を沈着させ可視化した。

### 3. 結果

#### 3.1 汚泥内に存在する *mcr* 遺伝子保有微生物

まず、汚泥サンプル中に存在する *mcr* 遺伝子を保有する微生物を特定するために *mcr* 遺伝子を標的とした cloning 解析を行った。結果、*Methanobacterium* 属に近縁なクローンが数多く検出された (存在率: 7/20 クローン)。また汚泥サンプルに対し、MB1174 プローブ (*Methanobacteriaceae* 科を標的) を用いた FISH 解析を行ったところ、10%程度の存在を確認した。また、我々はこれまでに同様の嫌気性汚泥から *Methanobacterium* 属に属する微生物に対し TSA-FISH 法を適用するための細胞壁処理技術の開発を行っている<sup>4)</sup>。従ってこれら結果などを考慮し、*Methanobacterium* 属に近縁なクローンを標的に選定した。

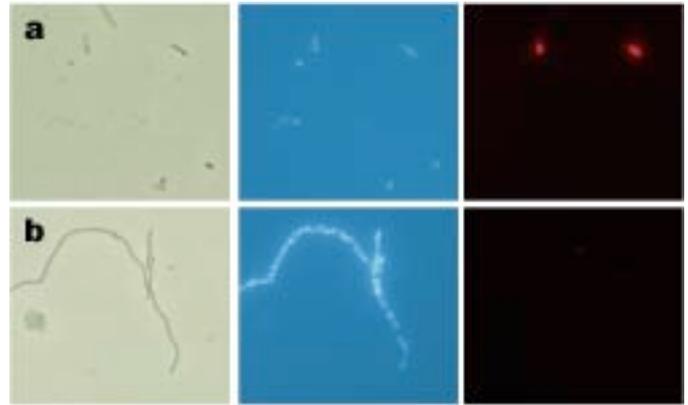


Fig.1 Detection of the *mcr* genes in sludge samples (a) or *M. bryantii* (b) by two-pass TSA-FISH. Photomicrographs of phase contrast (left panels), DAPI (middle panels) and epifluorescence (right panels) show identical fields.

#### 3.2 環境サンプルからの *mcr* 遺伝子の検出

Cloning 解析の結果を踏まえ、*Methanobacterium* 属に近縁なクローンの遺伝子配列が挿入されたプラスミドをテンプレートとして、ポリプローブの合成を行った。さらに作成したポリプローブを用い two-pass TSA-FISH 法により *Methanobacterium* 属に近縁な微生物の検出を試みた。結果、*Methanobacterium* 属に多く見られる桿形の微生物が検出された (Fig.1, a)。また、コントロール実験として標的クローンの遺伝子配列と同一性が約 68% の遺伝子をもつ *Methanobacterium bryantii* (DSM863) の純粋菌株に対しても同様に検討を行い、コントロール系からは蛍光が得られないことを確認している (Fig.1, b; 最適ストリンジェンシー: ハイブリダイゼーションバッファー中のホルムアミド濃度 50%)。また得られた蛍光はプローブ交雑におけるストリンジェンシーを高めることで得られなくなり、またプローブの交雑を行わずに two-pass TSA 反応のみを行った系からは蛍光が全く得られなかった。これらのことから、本実験で得られた蛍光は標的由来であると判断した。

### 4. まとめ

環境サンプルから得られた遺伝子断片をもとにプローブを作成することで標的遺伝子を保有する微生物の特異的検出に成功した。本手法は標的遺伝子の遺伝子断片などが手に入る cloning 解析やメタゲノム解析などの結果を利用する事が可能であり、また我々が最適化したプロトコルに沿う事で容易に目的の遺伝子の検出が可能である。本手法は、内在性 HRP 活性をもつサンプルへの適用や分散処理の必要性などの課題も指摘されているが<sup>3)</sup>、既報の方法に比べハンドリングが容易であり、遺伝子検出技術に新たな選択肢を提供するものである。

### 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.*, *J. Microbiol. Methods*, 2006., 2) Kawakami *et al.*, *Microbes & Environ.*, *in press.*, 3) 長谷川ら, *環境工学研究論文集*, 2009., 4) Kubota *et al.*, *J. Microbiol. Methods*, 2008.