

HCR 法を用いた新規高感度 FISH 法の開発

長岡技術科学大学 ○(学)山口 剛士, (正)幡本 将史, (正)高橋 優信, (正)山口 隆司
 阿南工業高等専門学校 (正)川上 周司, 東北大学 (正)久保田 健吾
 海洋研究開発機構 井町 寛之, 長岡工業高等専門学校 (正)荒木 信夫

1. はじめに

rRNA 遺伝子に基づく微生物構造解析は、排水処理汚泥中をはじめ様々な環境で利用されている。その中でも、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、微生物を原位置で検出することが可能であり、また微生物群集の空間的な把握も可能であるため、微生物群集構造解析において必須なツールとなっている。しかしながら、FISH 法で得られる蛍光強度は標的の存在数に強く依存することが知られており、環境中に多数生息する貧栄養や低温条件下で生育している微生物は、それらの標的分子、すなわち rRNA の保持量が少ないため FISH 法での検出が困難である。近年、このような問題に対して、TSA-FISH 法や RING-FISH 法など、いくつかの高感度 FISH 法が報告されている。高感度 FISH 法は、酵素等の大きい分子を細胞内に浸透させる必要があり、細胞壁処理が必須である。しかし、すべての微生物に有効な細胞壁処理は報告されておらず、標的微生物により細胞壁処理を検討しているが現状である。さらに、未培養微生物を標的とした場合、その細胞壁構造は明確でない場合が多く、これまでに報告されている方法では十分な処理が施せない場合もある。そこで我々は、2004 年に報告された酵素を使用しない遺伝子検出技術の一つである hybridization chain reaction (HCR) 法¹⁾に着目し、細胞壁処理を必要としない新規高感度 FISH 法の開発を目的とし、研究に着手した。

2. 研究の着想

我々が着目した HCR 法の概要を Fig.1 に示す。HCR 法は Initiator (伸長起点; 以下 I) と 2 種のループ及びステム構造のプロープを用いた反応である。本反応は 2 種のプロープの塩基配列の特異性を利用し、I を起点としてプロープ同士の交雑により伸長する。伸長する以前の状態を Fig.1-1 に示す。反応は以下の 3 段階により進行する。① I にプロープ 1 (H1) が交雑し、c と b*が新たな標的となる (Fig.1-2)、② 新たな標的である c と b*にプロープ 2 (H2) が交雑し、再度 a*と b*が新たな標的となる (Fig.1-3)、③ さらにその標的に対して、H1 が交雑する (Fig.1-4)。このように②及び③の繰り返しにより、伸長が進行する。我々はこの HCR 法を用い、各プロープに蛍光物質を標識することで HCR の伸長と共に蛍光強度が増幅する新たな高感度化技術の開発を目指している。HCR 法では、50 塩基程度の蛍光標識プロープを用いることから、酵素等を用いるその他の高感度 FISH 法よりもよりマイルドな細胞壁処理で適用可能と思われる。しかしながら、HCR 法に用いるプロープの詳細な設計方法は報告されておらず、また微生物に適用した報告もない。そこで、本研究ではまず、微生物に HCR 法を適用させるために、バクテリアの代表的な標的部位である EUB338 領域を標的と選定し、プロープの設計を行った。その後、純粋菌株の *E. coli* に HCR 法を用いた FISH 法 (in situ HCR 法) の適用を試みた。

3. 実験方法

3.1 HCR 法の設計指針の検討

Table 1 に本研究に用いた I 及びプロープを示す。本研究では標的と各プロープの交雑における Gibbs 自由エネルギーの変化量 ($\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$)²⁾を考慮し、Yilmaz らが提唱するモデルを用いて、以下の 2 種のプロープを設計した。1) EUB338 領域を標的としたグループ B、2) I が存在していない環境下での H1 と H2 の交雑のしやすさ ($\Delta G^{\circ}_{\text{overall}1}$) と、I と H1 の交雑のしやすさ ($\Delta G^{\circ}_{\text{overall}2}$, Fig.1-2, 4) 及び H1 が I と交雑後、H2 との交雑しやすさ ($\Delta G^{\circ}_{\text{overall}3}$, Fig.1-3) を既報¹⁾ (グループ A) と同等になるように塩基長を調整したグループ C を設計した。実験は、プロープを最終濃度 3 μ M に調整し、95 $^{\circ}$ C で 5 分、25 分で 1 時間インキュベートした後、I を最終濃度 0.3, 1 μ M になるように加え、再び 25 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートさせた。その後、ゲル電気泳動にて HCR 法による伸長を確認した。

3.2 In situ HCR 法

設計指針の検討より得られたグループ C の各プロープに Cy3 を標識させ、*E. coli* に対して in situ HCR 法を試みた。ハイブリダイゼーションバッファー (50mM Na₂HPO₄, 0.9M NaCl, 20% formamide, 0.01% SDS) に各プロープを混合させ、サンプルに滴下後、46 $^{\circ}$ C で 1 晩交雑させた。その後、48 $^{\circ}$ C で 30 分洗浄を行い顕微鏡に供した。

3.3 nector プロープを用いた in situ HCR 法

上述の方法では十分な蛍光強度の増幅は見られなかった (後述)。そこで、Harry らが報告している標的遺伝子に交雑する部位と I 配列の両者をもつ connector プロープ³⁾を介して HCR 法を行う方法を採用し、EUB338 領域に対して再度プロープ設計を行い in situ HCR 法に供した。まず、connector プロープをハイブリダイゼーションバッファー (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.9M NaCl, 20% formamide, 0.01% SDS, 5mM EDTA) に混合させ、サンプルに滴下後、46 $^{\circ}$ C

キーワード : Fluorescence in situ hybridization, 高感度 FISH, Hybridization chain reaction,

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 水圏土壌環境制御工学研究室 0258-47-1611 (6646)

で1晩交雑させた。その後、48°Cで30分洗浄を行い、再び各プローブをハイブリダイゼーションバッファー (50mM Na₂HPO₄, 0.9M NaCl, 0.01% SDS) に混合させ、connectorプローブが交雑しているサンプルに滴下後、46°Cで1晩交雑させた。最後に室温で30分洗浄を行い顕微鏡に供した。

4. 実験結果

4.1 HCR 法におけるプローブの設計指針の検討

Fig.2 に HCR 法を EUB338 領域に適用した実験結果を示す。まず、グループ B を用いた HCR 法を試みたが I の有無に関係なく伸長を示した (Fig.2, B, 6 レーン)。その原因として、 $\Delta G^{\circ}_{overall1}$ が負であり、I の有無に関係なく伸長できる環境であったと考えた。そこで、 $\Delta G^{\circ}_{overall1}$ を正にすることでプローブ同士の交雑を避け、伸長に重要である $\Delta G^{\circ}_{overall2,3}$ を最適化したグループ C を用いて実験を行ったところ、グループ A と同程度の長鎖のバンドが確認でき、I の有無による反応の識別が可能であった (Fig.2, C)。以上の結果から、HCR 反応に最適なプローブの設計には、各プローブの交雑における Gibbs 自由エネルギーの変化量が重要であることがわかった。

4.2 In situ HCR 法の純粋菌株への適用

設計プローブを用い、*E. coli* に対し in situ HCR 法を適用した。交雑におけるストリンジェンシーを変化させ検討した結果、*E. coli* から特異的な蛍光が得られた (data not shown)。しかし、H1 のみを滴下した場合の蛍光と H1 及び H2 を滴下した場合の蛍光を比較すると蛍光強度に違いは見られなかった。この原因として、H1 に H2 が交雑せず HCR 反応が十分に進行していないのではないかと考え、H2 のみを蛍光標識したプローブを用いて再度同様の実験を行ったが、やはり蛍光は得られなかった (data not shown)。この原因については、現在追実験を行い検討中である。

4.3 Connector プローブを用いた in situ HCR 法

上述の方法で十分な蛍光感度の向上が見られなかったことから、真核生物に HCR 法を適用した既報の方法を参考に connector プローブを用いた in situ HCR 法を行った。先ほどと同様に *E. coli* に適用した結果を Fig.3 に示す。Connector プローブを用いることで蛍光感度の向上が見られた。また、プローブ濃度を高くすることで、さらなる蛍光感度の向上が見られた (data not shown)。また、connector プローブの交雑時のストリンジェンシーを変化させることで標的のみを検出できる特異性を確保することが可能であった (data not shown)。

また、嫌気性汚泥に対して connector プローブを用いた in situ HCR 法を行った結果を Fig.4 に示す。結果、FISH 法で得られる感度よりも高感度に検出することが可能であった。

5. まとめ

本研究では、HCR 法を FISH 法に適用するための検討を行った。その結果、HCR 法に用いるプローブの設計指針としては、各条件における Gibbs 自由エネルギーの変化量 ($\Delta G^{\circ}_{overall}$) が重要であった。これは、HCR 法におけるプローブの設計指針となる有用な知見である。また、本研究は in situ HCR 法を初めて微生物に適用した報告であり、環境サンプルへの適用も示した。さらに、通常 *E. coli* は高感度 FISH 法 (例えば TSA-FISH 法) を適用する場合、lysozyme による細胞壁処理を必要とするが、本手法ではパラホルムアルデヒドによる固定以外に細胞壁処理を行っていない。従って本手法は、よりマイルドな細胞壁処理のみで適用可能な高感度 FISH 法としての利用も期待され、微生物群集構造解析において重要なツールになると思われる。

参考文献 1) Dirks et al., 2004, 2) Yilmaz et al., 2004, 3) Harry et al., 2010.

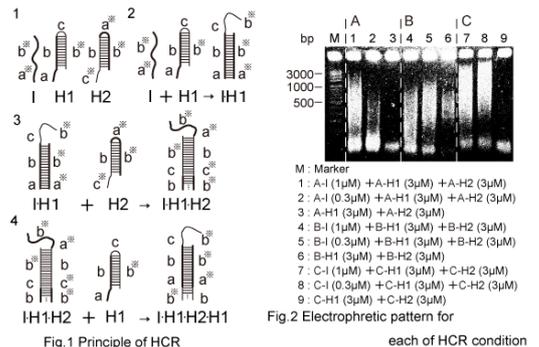


Fig.1 Principle of HCR

Fig.2 Electrophoretic pattern for each of HCR condition

Table1 Initiators and probes used in this study

Group	A			B			C		
Name	A-I	A-H1	A-H2	B-I	B-H1	B-H2	D-I	D-H1	D-H2
Length (mer)	24	48	48	17	34	34	21	42	42
Gibbs free energy change (kcal/mol)									
$\Delta G^{\circ}_{overall1}$: Hybridization of probe1 to probe2	11.73			-0.38			9.00		
$\Delta G^{\circ}_{overall2}$: Hybridization of initiator to probe1	-10.22			-3.00			-18.04		
$\Delta G^{\circ}_{overall3}$: Hybridization of probe2 to duplex	-11.84			-10.39			-8.13		

Duplex means hybridized initiator to probe1

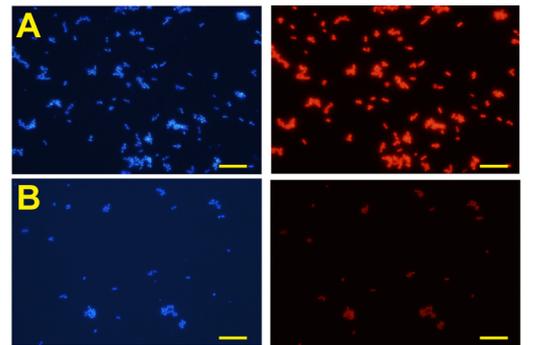


Fig.3 In situ hybridization of *E. coli* using EUB338 targeted by in situ HCR (A) or FISH (B)

The exposure times were 400 ms, Bars represent 10 μm

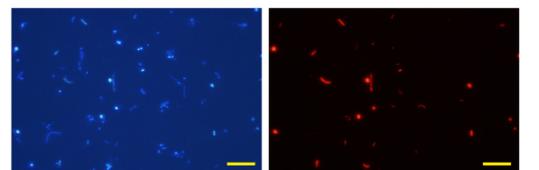


Fig.4 In situ hybridization of a granule sample using EUB338 targeted by in situ HCR.

The exposure time was 400 ms, Bars represent 10 μm