

In situ HCR 法による細胞浸透性の低い海洋性細菌の検出

長岡技術科学大学 ○(学) 山口 剛士, (正) 幡本将史, (正) 山口 隆司
 東北大学 (正) 久保田健吾, (正) 高橋 優信, 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, 阿南工業高等専門学校 川上 周司

1. はじめに

海洋に生息している微生物の中には、我々が未遭遇の有用微生物群が数多く存在していると思われる。近年、報告された例として、海洋中からリン回収が見込まれる海洋性ポリリン酸蓄積細菌¹⁾や、高塩濃度排水の硝化脱窒を担う可能性がある海洋性アナモックス細菌²⁾などが挙げられる。このような有用微生物群を有効に利用するためには、それら微生物の生態を把握する必要がある。微生物の分離培養が困難を極める中、近年では、パイロシーケンシング解析、環境メタゲノミクス解析など遺伝子網羅的な解析の進展が目立つ。しかし、個々の微生物の生態を把握するには、細胞を破壊せず標的微生物を原位置かつ視覚的に検出することが可能である fluorescence in situ hybridization (FISH) 法が有効である。FISH 法は、菌体形状やニッチェを確認できるだけでなく、近年では標的微生物のみを回収しゲノム解読を行う解析方法が報告され、微生物生態解明に利用されている。しかし、FISH 法で得られる蛍光強度は細胞内に存在する rRNA 含有量に強く依存するため、主に貧栄養下で生息し rRNA 含有量が少ない海洋性細菌群の検出には不向きである³⁾。この問題に対し、高感度 FISH 法の一つである catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法が広く用いられている。CARD-FISH 法は分子量が大きい horseradish peroxidase (HRP) 酵素 (約 40 kDa) を利用するため細胞壁処理を施す必要がある。しかしながら、これまで報告されている細胞壁処理方法ではすべての微生物に効果を示さず標的微生物ごとに最適な細胞壁処理方法を検討しているのが現状である。従って、有効な細胞壁処理方法のない微生物が存在した場合、これまでの技術ではそれら微生物を検出することは困難である。

我々の研究グループは、酵素触媒反応を利用しない遺伝子検出技術である hybridization chain reaction (HCR) 法を FISH 法に応用させた in situ HCR 法を報告した⁴⁾。In situ HCR 法は、標的領域に交雑する connector プローブ及び connector プローブの一部である伸長起点から伸長を示す蛍光標識した二種のプローブ (約 1 kDa) を用い、プローブのネットワーク形成を人為的に制御した高感度 FISH 法である。In situ HCR 法は、FISH 法よりも高感度であり、また 50 塩基程度のプローブを用いるため細胞浸透性も極めて高いと思われる。本研究では、in situ HCR 法が海洋性細菌群の検出に有効な方法であることを確認することを目的とした。海水中に生息する海洋性細菌を標的として FISH 法、CARD-FISH 法、in situ HCR 法の各手法を適応させ、海洋性細菌の検出率を比較することで in situ HCR 法の細胞浸透性の評価を行った。さらに、各手法による検出率に影響を及ぼした要因を確認するため、16S rRNA 遺伝子に基づくクローニング解析を行った。

2. 実験方法

2.1 サンプルの調整

海洋サンプルは新潟県柏崎市の海岸において海表面の海水を浜辺より採取した。サンプルの回収後、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、メンブレンフィルター (pore size : 3 µm) を用いて砂利等を除去し、さらに、メンブレンフィルター (pore size : 0.2 µm) を用いて集菌後、-20°C で保存した。

2.2 プライマー及びプローブの選定

Table 1 に本研究で用いたプライマー及びプローブを示す。本研究では、バクテリアの代表的な交雑部位である EUB338 領域を標的とした connector プローブを設計した。FISH 法及び CARD-FISH 法には 5'末端に Cy3 もしくは HRP 酵素を標識させた。

2.3 FISH 法、CARD-FISH 法

FISH 法は Sekiguchi ら方法⁵⁾に準拠し、CARD-FISH 法は Kubota らの方法⁶⁾に準拠し行った。

2.4 in situ HCR 法

in situ FISH 法は以下の手順で行った。まず、固定したサンプルに対して connector プローブを交雑させた。その後、伸長反応を示す蛍光標識した二種のプローブを用いて蛍光増幅を行い顕微鏡に供した。

Table 1 Primers and probes used in this study

Methods	Name	Sequence (5' -3')	Length (bp)
Cloning	EUB8f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	20
	U1492r	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	19
FISH	EUB338-Cy3	Cy3 - GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18
CARD-FISH	EUB338-HRP	HRP - GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18
in situ HCR	Connector probe	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGAAAAA</u> Agctgcctccgtaggagt ^{a)}	49
	H1	TCTAGTCGTTGATGCTTTGTATTTCGGCGACAGATAACCGAATACAAAGCATC - Cy3	52
	H2	Cy3 - CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGAGATGCTTTGTATTTCGGTTATCTGTCTG	52

a) Under line indicates the sequence of origination of extension. Small letter show the sequence of EUB338 probe.

キーワード : Fluorescence in situ hybridization, Hybridization chain reaction, in situ HCR, 海洋性細菌

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)

2.5 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統解析

海洋性細菌の菌叢解析は、細菌を標的としたプライマーセット (EUB8f/U1492r) を用いたクローニング解析により行った。得られた塩基配列は、Ribosomal Database Project を用いて細菌群の特定を行った。

3. 実験結果

3.1 海洋性細菌の検出

細胞壁処理の有無による各手法の検出率の結果を **Table 2** に示す。まず、細胞壁処理を施した結果、FISH 法の検出率は 64.8% を示し、CARD-FISH 法では 87.6% を示した。一般的に海洋性細菌は rRNA 含有量が少ない場合が多く³⁾、本研究で標的とした海洋性細菌も rRNA 含有量が少ない微生物群であり高感度 FISH 法を必要とするサンプルであった。そこで、in situ HCR 法を適応したところ、検出率は 88.1% を示し CARD-FISH 法と同等の検出率を示した。従って、in situ HCR 法は、CARD-FISH 法と同様に rRNA 含有量が少ない海洋性細菌の検出に有効であることを示した。さらに、古細菌に特異的なプライマーセットを用いて PCR 法を行った結果、増幅が確認された (データ非表示)。従って、検出されなかった 10% 程度の微生物群については古細菌の存在や EUB338 では検出が困難である微生物群集の存在が考えられる。

次に、細胞壁処理を施さず海洋性細菌の検出を行ったところ、FISH 法では 57.6%、CARD-FISH 法では 68.5% を示し、CARD-FISH 法の検出率は細胞壁処理を施した検出率と比較して検出率が低下した (**Table 2, Fig. 1**)。この結果より、本研究で用いた海洋性細菌は、CARD-FISH 法では細胞壁処理を必要とする微生物が存在していたことが示唆された。一方で、in situ HCR 法を適応した結果、検出率は 80.1% でありその他の手法と比較して高い検出率を示した。このことは、in situ HCR 法が CARD-FISH 法では細胞壁処理を必要とする微生物群に対して細胞壁処理を施さずとも検出できる可能性を示唆するものである。以上の結果より in situ HCR 法は、CARD-FISH 法よりも細胞浸透性が高く細胞浸透性の低い微生物群に対して有効な手法であると思われる。

3.2 海洋性細菌の微生物群集構造解析

各手法による検出率の差異に影響を及ぼした要因について確認するため、クローニング解析による微生物群集構造解析を行った。その結果を **Table 3** に示す。クローニング解析の結果、主に *Proteobacteria* 門と *Actinobacteria* 門が海水中に存在していた。特に *Actinobacteria* 門は CARD-FISH 法を適応する際、細胞壁処理に lysozyme の他に achromopeptidase を必要とする微生物群集であることが知られている⁷⁾。従って、*Actinobacteria* 門の存在が検出率に影響を及ぼしたのではないかと考えられる。

4. まとめ

In situ HCR 法を海洋性細菌に適応した結果、in situ HCR 法は CARD-FISH 法と同様に高感度 FISH 法として利用することが可能であり、さらに CARD-FISH 法よりも細胞浸透性が高かった。また、クローニング解析の結果、海水中には細胞浸透性の低い *Actinobacteria* 門などに属する微生物も存在していた。したがって、本手法は、環境中に生息している *Actinobacteria* 綱などに属しているポリリン酸蓄積細菌や *Planctomycetes* 門に属しているアナモックス細菌⁸⁾などの rRNA 含有量が少なく細胞浸透性が低い微生物群に対して有効な手法であると考えられる。近年の遺伝子網羅的解析の進展をみても新規な微生物群の発見が期待される。細胞浸透性が高い本手法は細胞壁構造が未知である未培養微生物に対して有効な手法である。したがって、本手法は有用微生物のモニタリングや微生物の生態解明に多いに寄与すると期待される。

5. 参考文献 1) 間口ら., 第46回日本水環境学会年會 講演集 p.31. 2) Hanning *et al.*, *Limnology and Oceanography* **52**, 2007. 3) Pemthaler *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2002. 4) 山口ら., 第66回年次学術講演会講演概要集 VII-58. 5) Sekiguchi *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1999. 6) Kubota *et al.*, *Journal of Microbiological Methods* **72**, 2008. 7) Seker *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2003. 8) Pizzetti *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 2011.

Table 2 Detection rates of the marine bacteria by FISH, CARD-FISH and in situ HCR.

Method	Cell wall treatment	
	-	+
FISH	57.6±6.2	64.8±0.7
CARD-FISH	68.5±3.5	87.6±6.4
In situ HCR	80.1±4.8	88.1±3.0

+ : Lysozyme treatment (1 mg·mL⁻¹ for 30 min. at 37°C).
- : without cell wall treatment.

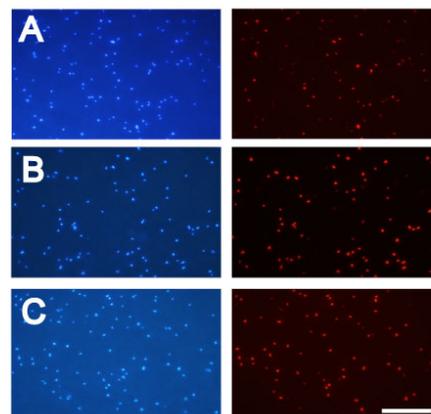


Fig. 1 Detection of the marine bacteria using FISH (A), CARD-FISH (B) and in situ HCR (C) without any cell treatments. Exposure times were adjusted to each methods. DAPI (left) and epifluorescence (right) show identical fields. Bar represents 20 μm.

Table 3 16S rRNA gene based microbial composition of the marine sample.

Phylum (Class)	No. of clones (% of total clones)	
Proteobacteria	37 (44)	
(α-proteobacteria)	30 (35)	
(γ-proteobacteria)	5 (6)	
(β-proteobacteria)	2 (2)	
Actinobacteria	35 (41)	
(Actinobacteria)	35 (41)	
Firmicutes	9 (11)	
(Bacilli)	8 (9)	
(Clostridia)	1 (1)	
Bacteroidetes	2 (2)	
(Bacteridia)	2 (2)	
Others	2 (2)	
	85 (100)	85 (100)