

## 酵素反応を必要としない蛍光増幅技術 (HCR 法) を用いた環境微生物の mRNA の視覚的検出方法の開発

長岡技術科学大学大学院 ○大宮恭平, 山口 剛士, 幡本 将史, 山口 隆司  
 東北大学 久保田健吾, 阿南高専 川上 周司, 長岡高専 荒木 信夫

## 1. はじめに

近年, メタゲノム解析等の発展により, 我々は網羅的に有用遺伝子を把握する事が可能になった. また, メタゲノム解析で得られた有用遺伝子やその遺伝子から転写された mRNA をシングルセルレベルで視覚的に検出することで, in situ におけるシングルセルレベルでの空間分布やモニタリングが可能となる. 特定の機能遺伝子や mRNA を視覚的に検出する方法として, 酵素反応を用いた高感度 fluorescence in situ hybridization (FISH) 法である catalyzed reporter deposition (CARD) -FISH 法が一般的に用いられている<sup>1)</sup>. しかし, CARD-FISH 法に用いる horseradish peroxidase (HRP) 酵素は, 蛍光物質と比較して約 40 倍の大きさを有しており, プローブの細胞浸透性が低いことが知られている. これまでに, プローブの細胞浸透性を向上させるいくつかの細胞壁処理が報告されているが, すべての微生物に効果を示す細胞壁処理方法は報告されておらず, 標的微生物ごとに最適化を行っているのが現状である. また, 微生物中に内在性 HRP 活性が存在する場合, 擬陽性の蛍光が得られる場合も報告されている. その失活方法に関しても標的微生物により最適化が必要である. これまでに, 我々はこれらの問題を克服するために, 酵素反応を用いない蛍光増幅技術として hybridization chain reaction (HCR) 法に着目し, 新規の高感度 FISH (in situ DNA-HCR) 法の開発を行ってきた<sup>2)</sup>. 本研究では, 微生物の特定の機能を把握することが可能である機能遺伝子から転写された mRNA を標的とした新規の高感度 FISH (in situ dual DNA-HCR) 法の開発を行った. しかし, これまでに本手法を用いて mRNA や機能遺伝子を視覚的に検出された報告はなく, mRNA を視覚的に検出するためには更なる蛍光強度の増幅が必要ではないかと考えた. そこで, mRNA を標的とした本手法は, in situ DNA-HCR 法のプロトコルをベースにして菌体内で HCR 法による蛍光増幅が二回行えるようにした (Fig. 1).

本研究では, バイオリアクター等で汚染物質を処理することが可能であり, 系統と機能が一致しないと知られているトルエン分解菌<sup>3)</sup>を選定し, トルエン分解に関与する機能遺伝子の一つである *tmoA* 遺伝子<sup>4)</sup> から発現する *tmoA* mRNA を検出することを目的とした. まず, 操作が

容易な rRNA を標的として本手法のプロトコルの最適化を行った. 次に, *tmoA* mRNA を標的としたプローブを設計し, その有用性を Clone-FISH 法により確認した. 最終的に, トルエンガスを生物学的に処理しているバイオリアクター内のスポンジから汚泥を採取し, 環境生物中のトルエン分解に関与する *tmoA* mRNA の検出を試みた.

## 2. 実験方法

## 2.1 標的微生物の選定及び汚泥サンプルの調整

In situ dual DNA-HCR 法のプロトコルの最適化には, 標的微生物として *Escherichia coli* K12 を用いた. また, 非標的微生物として *Methanococcus maripaludis* S2 を用いた. 各微生物は, LB 培地もしくは Japan Collection of Microorganisms が指示する培地で培養した後, 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し, エタノール/PBS 溶液中にて, -20°C で保存した. バイオリアクター内の汚泥は, リアクター内のスポンジから汚泥を採取し, 直ちに 4%パラホルムアルデヒド溶液で 3 時間固定した後, エタノール/PBS 溶液中にて, -20°C で保存した.

## 2.2 本研究に用いたプローブ

本研究で使用したプローブを Table 1 に示す. rRNA を標的とした connector プローブは EUB338 領域に交雑する配列及び伸長起点の配列を有したプローブである. mRNA の検出には *tmoA* mRNA 塩基配列に特異的に交雑する配列及び伸長起点の配列の両者を有した *tmoA*-connector プローブを設計した. さらに, *tmoA*-connector プローブの特異性を確認するために, 1-3 塩基ミスマッチプローブを設計した. また, in situ dual DNA-HCR 法の伸長反応に用いる D1, D2, D3 及び D4 プローブについても本研究で設計を行った.

## 2.3 In situ DNA-HCR 法

In situ DNA-HCR 法は山口らの方法<sup>2)</sup>に準拠し行った.

## 2.4 In situ dual DNA-HCR 法

In situ dual DNA-HCR 法は, in situ DNA-HCR 法における HCR を菌体内で 2 回行う方法である. まず, D1 及び D2 の伸長起点を有する connector プローブと hybridization buffer を混合させ, 46°C で標的部位と交雑させた (Fig. 1, A). その後, 48°C で 30 分間の洗浄を行った. 次に, connector プローブから伸長反応を示す D3 及び D4 の伸長起点を有してい

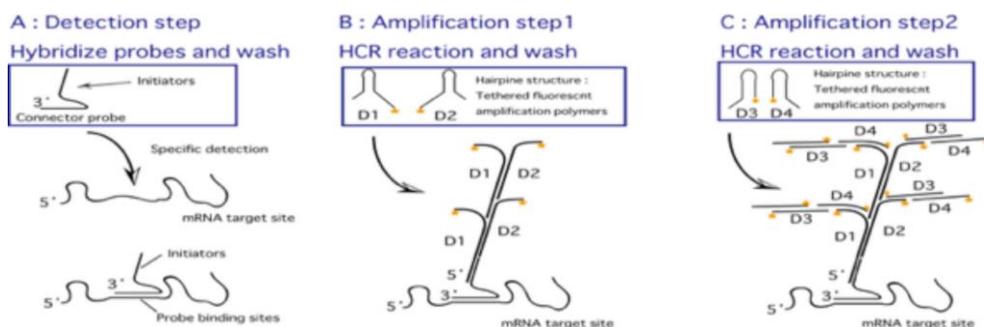


Fig. 1 Scheme of in situ dual DNA-HCR

キーワード: 高感度 FISH, Hybridization chain reaction, mRNA, トルエン

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)

E-mail: ecoya@vos.nagaokaut.ac.jp

Table 1 Probes used in this study

Method	Probe name	Sequence (5' - 3')*	length (mer)	Formamide (%)	Reference
Clone-FISH	One miss match	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac egg gat atg tyt ctt csa gcc a	55	15	This study
	Two miss match	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac egg gat atg tyt ctt csa gcc a	55	15	This study
	Three miss match	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac egg gat atg tyt ctt csa gcc a	55	15	This study
In situ dual HCR	TmoA_connector probe	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac egg gat att tyt ctt csa gcc a	55	15	This study
	EUB338_connector probe	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Agc tgc ctc ceg tag gang t	49	20	2
	D1	TCT AGT CGT TGA TGC TTT GTA TTC GGC GAC AGA TAA CCG AAT ACA AAG CAT CGC AGC ATC AAT ACG CCC TAA GAA TCC	78	0	This study
	D2	TAC GCC CTA AGA ATC CGA ACC CTA TGC CGA ATA CAA AGC ATC AAC GAC TAG AGA TGC TTT GTA TTC GGT TAT CTG TCG	78	0	This study
	D3	CAT AGG GTT CGG ATT CTT AGG GCG TAG CAG CAT CAA TAC GCC CTA AGA ATC C	52	0	This study
	D4	TAC GCC CTA AGA ATC CGA ACC CTA TGG GAT TCT TAG GGC GTA TTG ATG CTG C	52	0	This study
In situ HCR	H1	TCT AGT CGT TGA TGC TTT GTA TTC GGC GAC AGA TAA CCG AAT ACA AAG CAT C	52	0	2
	H2	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAG ATG CTT TGT ATT CCG TTA TCT GTC G	52	0	2

\* Under lines are shown stem structure. Small letter are shown initiator sequence.  
Gray box : It shown the mismatch sequence.

るD1及びD2とamplification bufferを混合して一回目の伸長を46°Cで2時間行った(Fig. 1, B)。最後に、D1及びD2から伸長反応を示すD3及びD4とamplification bufferを混合して2回目の伸長を46°Cで2時間行い、枝分かれのように蛍光増幅させた(Fig. 1, C)。

## 2.5 Clone-FISH 法

Clone-FISH法はKubotaらの方法<sup>5)</sup>に準拠し行った。

## 2.6 蛍光強度の算出

蛍光強度は画像解析ソフトウェアのdaime<sup>6)</sup>を用いて算出した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 In situ dual DNA-HCR 法のプロトコル確立

まず、in situ DNA-HCR法により適用が可能であったEUB338領域に対しin situ dual DNA-HCR法を適用させ、プロトコルの確立を行った。蛍光増幅させるamplification bufferの組成を検討した結果、50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 1% blocking reagent, 10% dextran sulfate, 0.01% SDSで最も蛍光強度が強かった。この要因としてプローブの実効濃度を向上させるdextran sulfateの存在が蛍光強度に影響を及ぼしていると考えられる。また、スライドから得られた非特異的な蛍光を抑制するため、洗浄方法の検討を行った結果、界面活性剤としてTween 20を添加することが有効であった。In situ dual DNA-HCR法のプロトコルの最適化を行った結果、*E. coli*のみから蛍光が得られ、非標的微生物である*M. maripaludis*からは蛍光が得られなかった(データ非表示)。従って、標的微生物のみを特異的に検出できたと判断した。

次に、プロトコルの最適化を行ったin situ dual DNA-HCR法とin situ DNA-HCR法の蛍光強度を算出した。その結果、in situ dual DNA-HCR法で得られる蛍光強度は、in situ DNA-HCR法と比較して約2倍程度高かった(Fig. 2)。また、in situ dual DNA-HCR法による2回のHCRによる伸長で得られる蛍光強度は、in situ dual DNA-HCR法に用いるD1及びD2を用いた1回のみHCRによる伸長よりも約4倍程度高かった。この結果より、HCRによる伸長が、菌体内で複数回できることが明らかとなった。

### 3.2 Clone-FISH法によるプローブの有用性の確認

Clone-FISH法を行った結果、*tmoA*遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌から蛍光が得られた(Fig. 3)。一方で、ネガティブコントロールとした*tmoA*遺伝子以外の機能遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌では蛍光が得られなかった(データ非表示)。この結果より、*tmoA*-connectorプローブは、プラスミド上の*tmoA*遺伝子から発現したRNAに特異的に交雑したと判断した。さらに1-3塩基ミスマッチプローブを用いてプローブの特異性を確認した結果、2-3塩基ミスマッチのプローブでは菌体から蛍光が得られなかった。しかし、1塩基ミスマッチ

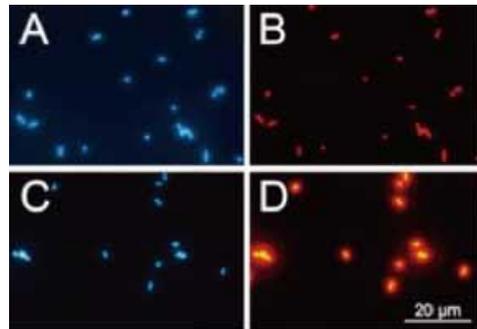


Fig. 2 Detection of *E. coli* by in situ DNA-HCR (A, B) and in situ dual DNA-HCR (C, D). Photomicrographs of DAPI (A, C) and epifluorescence (B, D) shows identical fields. The exposure times for each method were 20 ms.

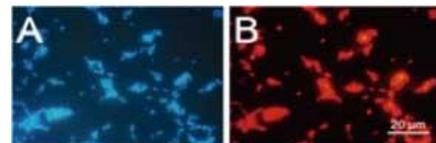


Fig. 3 Detection of *tmoA* RNA expressed in *E. coli* by in situ dual DNA-HCR. Photomicrographs of DAPI (A) and epifluorescence (B) shows the identical field. The exposure time was 50 ms.

プローブでは非特異的な蛍光が得られたため、非特異的な蛍光を抑制するために競合プローブを用いる必要があると考えられる。

### 3.3 環境微生物中の *tmoA* mRNA への適用

バイオリクター内のスポンジから採取したサンプルにin situ dual DNA-HCR法を適用し、*tmoA* mRNAを保持する微生物の検出を試みた結果、一部の菌体から蛍光を得ることに成功した。しかし、菌体からの蛍光以外にもスライド上から非特異的な蛍光も得られた(データ非表示)。今後は、洗浄方法等の最適化を行い、標的mRNA特異的な検出を試みる。

## 4. まとめ

In situ dual DNA-HCR法は、in situ DNA-HCR法よりも高い蛍光強度が得られ、菌体内で複数回のHCRによる伸長反応が起こっていると考えられた。また、本研究で設計した*tmoA*-connectorプローブは、標的微生物を特異的に検出することが可能であった。

## 参考文献

- 1) Kubota *et al.*, *Journal of Microbiol. Methods*, 2006.
- 2) 山口ら, *土木学会論文集G(環境)*, 2011.
- 3) Okunishi *et al.*, *Journal of the Air and Waste Management Association*, 2012.
- 4) Podar *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007.
- 5) Kubota *et al.*, *Journal of Microbiol. Methods*, 2008.
- 6) Daims *et al.*, *Environ. Microbiol.*, 2006.