環境微生物の mRNA を標的とした酵素反応を用いない高感度 in situ HCR 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, 中村 明靖, 山口 隆司 阿南高專 川上 周司,長岡高専 荒木 信夫

1. はじめに

近年、下水処理汚泥中や土壌中の環境微生物の解析に微 生物中の DNA や RNA を抽出することなく標的微生物の検 出, 定量することが可能な fluorescence in situ hybridization (FISH) 法が広く普及している. rRNA を標的とした FISH 法 は標的微生物の系統学的な位置を把握することが可能であ る一方で、微生物の機能を把握することが困難である。微生 物の機能を把握する方法として特定の機能遺伝子やその mRNA を標的とした解析方法が有効である. FISH 法による 特定微生物の視覚的な検出の可否は、菌体内の標的分子に 依存することが知られており、rRNA と比較して菌体内の存 在数が少ない機能遺伝子 (10⁰~10¹ copies/cell) や mRNA (10⁰~10² copies/cell) の検出が困難である. 現在, 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 を利用した高感度 FISH 法である catalyzed reporter deposition (CARD) -FISH 法¹⁾が一般的に用いられている. CARD-FISH 法は、 蛍光物質を標識した DNA プローブよりも分子量が大 きい酵素を標識した DNA プローブを用いるため、細胞内へ DNA プローブを浸透させるための細胞壁処理が必須である. しかしながら、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、そこで我々は、酵素反応を利用せず mRNA を検出するために、酵素反応を用いない高感度 FISH 法である in situ hybridization chain reaction (HCR) 法²⁾ を利用 した in situ dual HCR 法の開発を行った. In situ dual HCR 法は、 菌体内で HCR 反応による伸長反応を利用した蛍光増幅を二 回行う技術である (Fig.1).

本研究では、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³⁾ から発現する tmoA mRNA を in situ dual HCR 法により検出することを目的とした.まず, rRNA を標 的としin situ dual HCR 法のプロトコルの最適化を行った.次 に、in situ dual HCR 法に用いる新規に設計した 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. その後、トルエンガスを生物学的に処理し

ている down-flow hanging sponge (DHS) 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 HCR 法のプロトコルの最適化では、標的微生物 として Escherichia coli K12 を選定した. また、非標的微生物 として Methanococcus maripaludis S2 を選定した. Clone-FISH 法に用いるサンプルの調整は Kubota4) らの方法に準拠し行 った. 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、エタノールとPBSを1:1で混合さ せ,-20℃で保存した.DHSリアクター内の汚泥は、リアクタ 一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、エタノールとPBSを1:1 で混合させ,-20℃で保存した.

2.2 本研究に用いたプローブ

Table 1 に本研究で使用したプローブを示す.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tmoAmRNA 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 HCR 法の伸長反応に用いる D1, D2, D3 及び D4 プローブ に関しても本研究で設計を行った.

2.3 In situ HCR 法

In situ HCR 法は山口らの方法²⁾に準拠し行った.

2.4 In situ dual HCR 法

In situ dual HCR 法は, in situ HCR 法における HCR を二回行 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℃ 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



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 水圈土壤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)	FA (%)	Reference
Clone FISH	One mismatch	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac cgg gat atā tyt ctt csa gcc a	55	15	This study
	Two mismatch	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac cgg gat ata tya ctt csa gcc a	55	15	This study
	Three mismatch	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac cgg gat ata tya cat csa gcc a	55	15	This study
	TmoA-connector probe	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Aac cgg gat att tyt ctt csa gec a	55	15	This study
In situ dual HCR	EUB338-connector probe	CCG AAT ACA AAG CAT CAA CGA CTA GAA AAA Age tge etc eeg tag gag t	49	20	2
	D1	TCT AGT CGT T <u>GA TGC TTT GTA TTC GG</u> C GAC AGA TAA <u>CCG AAT ACA AAG CAT C</u> GC AGC ATC AAT ACG CCC TAA GAA TCC	78	0	This study
	D2	TAC GCC CTA AGA ATC CGA ACC CTA TG <u>C CGA ATA CAA AGC ATC</u> AAC GAC TAG A <u>GA TGC TTT GTA TTC GG</u> T TAT CTG TCG	78	0	This study
	D3	CAT AGG GTT C <u>GG ATT CTT AGG GCG TA</u> G CAG CAT CAA <u>TAC GCC CTA AGA ATC C</u>	52	0	This study
	D4	<u>TAC GCC CTA AGA</u> ATC CGA ACC CTA TGG GAT <u>TCT TAG GGC GTA</u> TTG ATG CTG C	52	0	This study
In situ HCR	H1	TCT AGT CGT T <u>GA TGC TTT GTA TTC GG</u> C GAC AGA TAA <u>CCG AAT ACA AAG CAT C</u>	52	0	2
	H2	<u>CCG AAT ACA AAG CAT C</u> AA CGA CTA GA <u>G ATG CTT TGT ATT CGG</u> TTA TCT GTC G	52	0	2
* Under lines are shown stem structure. Small letter are shown binding sequence for target site.					

Gray box : It shown the mismatches. FA : Formamide concentration.

及び D4 の伸長起点を有している D1 及び D2 と amplification buffer を混合して一回目の伸長を 46℃ 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℃ 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 Kubota⁴⁾ らの方法に準拠し行った.

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[®]を用いて算出 した.

3. 実験結果及び考察

3.1 In situ dual HCR 法のプロトコル確立

まず. in situ dual HCR 法を in situ HCR 法による適用が可能 であったEUB338領域に対し適用し、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 Na2HPO4, 0.9 M NaCl, 1 % blocking regent, 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 の存在が影響を及ぼしていると考えられる. また, 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 tween20 を添加することが有効であった. プロ トコルの最適化を行ったin situ dual HCR法は, 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 HCR 法と in situ HCR 法の蛍光強度 を算出した結果, in situ dual HCR 法で得られる蛍光強度は, in situ HCR 法と比較して約2倍程度高かった (Fig. 2). また, in situ dual HCR 法で得られる蛍光強度は、D1 及び D2 のみの HCRよりも約4倍程度高かった.この結果より,HCRは、菌 体内で二回の伸長反応を示すことが明らかとなった.

3.2 In situ dual HCR 法に用い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検出された (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 mRNA 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, 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. 従って, tmoA-connector プローブは tmoA mRNA を特異的に検 出可能であると判断した.



Fig. 2 Detection of *E.coli* using in situ HCR (A, B) and in situ dual 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* mRNA in *E.coli* which inserted *tmoA* gene in plasmid by clone-FISH. Photomicrographs of DAPI (A) and epifluorescence (B) shows identical fields. The exposure time for clone-FISH was 50 ms.

3.3 In situ dual HCR 法による環境微生物の mRNA の検出

DHS リアクター内のスポンジから採取したサンプルに in situ dual 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られた.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,非特異的な蛍光を抑制していく予定である.

4. まとめと今後の展望

In situ dual HCR 法は, in situ 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) Podar *et al., Appl. Environ.Microbiol.*, 2007. 4) Kubota *et al., Journal of Microbiol. Methods*, 2008. 5) Daims *et al., Environ. Microbiol.*, 2006.