# In situ HCR 法による環境微生物の多重染色法の検討

長岡技術科学大学 ○山口 剛士, 幡本 将史, 中村明靖, 山口 隆司阿南工業高等専門学校 川上 周司, 長岡工業高等専門学校 荒木 信夫

### 1. はじめに

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、シングルセルレベルで特異的かつ視覚的に標的微生物のみを検出することが可能であり、微生物の生態を把握する有効な手法である  $^1$ . さらに、複数種の任意の微生物を特異的に検出し同時に染色を行うことで、微生物群のニッチェをより詳細に明らかにすることが可能になる.これまでに、嫌気性汚泥中のグラニュールの空間分布の把握  $^2$ )や嫌気的メタン酸化古細菌と硫酸還元細菌の共生関係の確認  $^3$ )等に適用されている.しかしながら、FISH 法で得られる蛍光強度は、菌体内の標的とする  $^2$ RNA の存在数に依存し、深海や土壌等の貧栄養環境下に生息する  $^2$ RNA 含有量が少ない微生物には適用は難しい.こうした中、酵素反応や長鎖プローブを用いて蛍光増幅を行う高感度  $^3$ FISH 法が報告されているが、それら方法は分子量の大きなプローブ等を細胞内に浸透させるための細胞壁処理を必要とする  $^3$ 1. しかし、すべての微生物に一様に効果を示す細胞壁処理方法はなく、微生物種各々で最適な処理法を検討しているのが現状である.また近年では、上述した空間分布の把握に多重染色が利用されるだけなく、 $^3$ RNA の多重染色によるシングルセルにおける機能と系統の把握  $^3$  や combination labeled spectral image  $^3$ FISH による数十種類の微生物の同時染色の場合,上述した問題の他にプローブに標識した酵素の失活の操作が必要となり、操作が煩雑になることや高いバックグラウンドを伴うなどの問題もあり、汎用性は高くない.

我々は、上述した問題を補う高感度 FISH 法の構築を目指し、酵素反応を必要とせず、プローブのネットワークによりシグナル増幅を示す in situ hybridization chain reaction (HCR) 法の開発に成功した  $^{7}$ . これまでに、海洋サンプルや嫌気性汚泥中の微生物群へ適応しており、環境微生物への適応可能性について示してきた。さらに in situ HCR 法は、従来の高感度 FISH 法と比較して容易に多重染色が可能になるのではないかと考えた。しかし、in situ HCR 法による多重染色の場合、同時に複数種のプローブを用いる必要があり、それらプローブが同時に特異的に伸長反応を示すのか確認する必要がある。そこで、本報告では、in situ HCR 法を用いて多重染色を行うことを目的とし、純粋菌株及び環境サンプルへ適用を試みた。まず、純粋菌株として Escherichia coli 及び Methanococcus maripaludis を選定し、in situ HCR 法による細菌と古細菌の同時染色を試みた。さらに、環境サンプルとして嫌気性汚泥中に生息している細菌及び古細菌の多重染色を行い、環境微生物における適用性の検討を行った。

## 2. 実験方法

# 2.1 モデル微生物及びサンプルの調整

モデル微生物には、細菌である E.coli 及び古細菌である M. maripaludis を選定した。各微生物は、培養後、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、エタノールと PBS を 1:1 で混合させ、 $-20^{\circ}$ C で保存した。嫌気性汚泥中の微生物は、都市下水を処理している up-flow anaerobic sludge blanket 槽内の汚泥を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、エタノールと PBS を 1:1 で混合させ、 $-20^{\circ}$ C で保存した。

# 2.2 In situ HCR 法

In situ HCR 法は、山口らの方法  $^{7}$  に準拠し行った.まず、EUB338 領域に交雑する connector プローブ (EUB338-connector probe) 及び ARC915 領域に交雑する connector プローブ (ARC915-connector probe) を混合させ、40%のホルムアミド濃度の hybridization buffer を用いて両 connector プローブを  $46^{\circ}$ C で 2 時間以上交雑させた.その後、connector プローブを  $48^{\circ}$ C で洗浄した.さらに、EUB338 領域に交雑した connector プローブから伸長する Alexa555 を標識させた H1 及び H2 と ARC915 領域に交雑した connector プローブから伸長反応を示す Alexa488 を標識させた H1 及び H2 を混合させ、計4種類のプローブが混在している状態で各 connector プローブからの伸長反応により、シグナル増幅を行った.最後に、余剰なプローブを洗浄した後、顕微鏡観察に供した.

#### 3. 実験結果

# 3.1 純粋菌株を標的とした in situ HCR 法による多重染色

まず、4種類の伸長に用いるプローブが多重染色時に特異的に伸長反応を示すのか、各 connector プローブを用いて確認した。その結果、EUB338-connector プローブ及び 4種類の伸長に用いるプローブを用いた場合、E.coli の

キーワード: 高感度 FISH, In situ HCR, 多重染色,

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

みから蛍光が得られ、また ARC915-connector プローブ 及び 4 種類の伸長に用いるプローブを用いた場合には M. maripaudis のみから蛍光が得られた (データ非表示). この結果から、4種類の伸長に用いるプローブは、他の 16S rRNA 領域や他の connector プローブから伸長反応を 示さず、標的としている connector プローブのみ、配列依 存的に伸長反応を示すことが明らかとなった. 次に、 EUB338-connector プローブ及び ARC915-connector プロ ーブの両方を同時に交雑させ、その後、4 種類の伸長に 用いるプローブを同時に滴下してシグナル増幅反応を 行った. その結果、各 connector プローブが標的としてい る微生物から特異的な蛍光が得られた (Fig.1). また, 多重染色による蛍光物質間でのクロストークは見られ なかった. この結果から, in situ HCR 法による同時染色 は、複数種の connector プローブの交雑及び各 connector プローブから伸長するプローブの交雑の2度の交雑を行 うだけで多数の微生物を同時に検出することが可能で あることが示唆された. これは、プローブに標識した酵 素を失活させる必要がある高感度 FISH 法と比較して実 験操作が容易であると考えられる.

### 3.2 嫌気性汚泥内の細菌及び古細菌の多重染色

次に、環境微生物に対して in situ HCR 法による多重染色が可能であるか判断するために、細胞壁処理の最適化が困難なメタン生成古細菌が生息している嫌気性汚泥を用い、そこに生息している細菌と古細菌の多重染色を行った。その結果、嫌気性汚泥のように多様な微生物が生息している環境サンプルにおいても in situ HCR 法による多重染色が可能であった (Fig. 2). 通常、酵素や長鎖のプローブを用いた高感度 FISH 法では、細胞壁処理を施さず環境微生物を検出することが困難である. 細胞壁処理を施さずとも環境微生物を検出することが可能であった in situ HCR 法は、高感度 FISH 法の適用が困難な環境微生物群に対する複数の微生物の多重検出に有効な手法であると考えられる.

# 4. まとめ

本研究では, in situ HCR 法による同時染色の適用可能性について確認した. その結果, 各微生物から特異的な

B D \_\_\_\_

Fig.1 Micrographs of artificial mixtures of *E.coli* and *M.maripaludis* after hybridization by in situ HCR. (A) Shown is a phase-contrast image. (B) A mixture of *E.coli* and *M. maripaludis* were analyzed by in situ HCR using a mixture of Alexa555-labeled probes for targeting EUB338-connector probe and Alexa488-labeled probes for targeting ARC915-connector probe. (C) Specific detection of *E.coli* by in situ HCR using EUB338-connector probe and Alexa555-labeled probes (Exposure time, 20 ms). (D) Specific detection of *M.maripaludis* by in situ HCR using EUB338-connector probe and Alexa555-labeled probes (Exposure time, 20 ms). The scale bar is shown 10 μm.

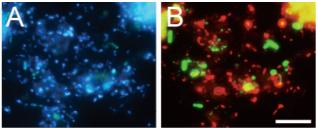


Fig.2 Photomicrographs of Bacteria and Archaea in anaerobic sludge sample detected in situ HCR. (A) Shown is DAPI stained cells. (B) Green color indicates in situ HCR signal for targeting Archaea, red color indicates in situ HCR signal for targeting Bacteria. Both panels shows same field. The exposure times were adjusted the each fluorescent signal. The scale bar is shown 10 μm.

蛍光が得られ、またクロストークも見られず、in situ HCR 法のみでも多重染色が可能であることが明らかとなった。また、伸長に用いるプローブが多数混在している環境下においても connector プローブの配列依存的に特異な伸長を示すことが確認された。さらに、複数の微生物が存在している環境サンプル中の微生物群にも適用可能であった。近年急速な発展を見せているメタゲノム解析や次世代シーケンサーを用いた微生物群集構造解析と本手法による多重染色を組み合わせることで、これまで検出されてこなかった活性汚泥中や排水処理装置内の未培養微生物の空間分布の把握や生態解明に寄与するのではないかと考えられる。

# 5. 参考文献

1) Amann et al., Journal of bacteriology 172 (2), 1990, 2) Sekiguchi et al., Applied and Environmental Microbiology, 65 (3) 1999, 3) Orphan et al., Applied and Environmental Microbiology, 67 (4), 2001. 4) Kubota et al., Microbes and Environments, 28 (1), 2013. 5) Pernthaler et al., Applied and Environmental Microbiology, 70 (9), 2004. 6) Valm et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, 108 (10), 2011. 7) 山口ら, 土木学会論文集 G (環境), 67 (7), 2011. 8) Kubota et al., Journal of Microbiological Methods, 72 (1), 2008.