

シングルセルレベルでの微生物の機能遺伝子の特異的検出

東北大学工学部 学生会員 ○長谷川拓也
長岡技術科学大学 川上周司
東北大学 久保田健吾, 原田秀樹
広島大学 大橋晶良, JAMSTEC 井町寛之

1. はじめに

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は標的微生物のみを分離培養によらず in situ (原位置) かつシングルセルレベルで検出できる手法であり、微生物解析の分野で重要な役割を担っている技術である。FISH 法では主に rRNA を標的としており、rRNA 遺伝子情報を基にプローブを設計することで分子系統学に基づく解析が可能である。しかし rRNA 遺伝子に基づく解析だけでは、系統学的な解析は可能であっても微生物の機能までを完全に理解することが困難な場合が多く、それらを理解するためにはその機能を司る機能遺伝子や mRNA を標的とした解析が求められる。ところが、FISH 法の検出感度は標的の存在数に大きく依存するため、細胞内に $10^4 \sim 10^5$ コピー存在する rRNA は検出できても、数十コピーの mRNA や主にシングルコピーで存在する機能遺伝子を検出することは難しい。

このような中、我々の研究グループは酵素触媒反応によるシグナル増幅法 tyramide signal amplification (TSA) 法を二度行う two-pass TSA-FISH 法を開発し¹⁾、さらにハプテンを多数標識可能なポリプローブ (プローブ塩基長: 約 450 or 750 bp) と組み合わせ検出感度を上げることににより、シングルコピー機能遺伝子の検出の可能性を示した²⁾。しかし、遺伝子配列の相同性が 60%程度の微生物間の識別を試みたが、ネガティブコントロール微生物からの非特異的な蛍光を完全に消すことはできず両者を識別するまでに至っていない。

そこで本研究では、検出の特異性を高めるためにプローブの長さの短縮を試みた。しかし、プローブを短縮することで標識されるレポータ基の数が減少し感度が低下することが予想される。そこで、レポータ基の標識数の高効率化についても検討を行い、十分な特異性を持って検出可能な技術の開発を行った。

2. 実験方法

2-1. ポリプローブの合成

ポリプローブは PCR 法を用いて合成した。標的遺伝子は *Methanococcus maripaludis* S2 株 (JCM13030) の *mcr* 遺伝子とし、プローブのテンプレートには標的微生物のゲノム DNA を用いた。PCR 反応液中に dUTP-11-DNP を添加し PCR 産物に DNP 抗原を取り込ませた。本研究では、三種類のプライマーセットを用い、長さの異なる三種類のプローブ (150, 465, 756 bp) を合成した。その際、添加する dUTP-11-DNP 濃度、 Mg^{2+} 濃度、アニーリング温度について検討し、高い DNP 取り込み量と収量が得られるように条件を最適化した。

2-2. Two-pass TSA-FISH 法

Two-pass TSA-FISH 法とは、TSA 反応 (過酸化水素存在下で horseradish peroxidase (HRP) の酵素触媒反応によりラジカル化した tyramide 化合物を菌体内に多量に沈着させるシグナル増幅法) を二度行い、さらなる感度増幅を可能にする手法である。

実験の手順は川上らの方法²⁾に準拠して行った。まず、染色体とプローブを熱変性させた後、ホルムアミドを含むハイブリダイゼーションバッファーを用いプローブを交雑させた。次に、抗原抗体反応により HRP 標識 DNP 抗体をプローブに結合させた後、TSA 反応で DNP 抗原標識 tyramide を多量に沈着させた。再度、抗原抗体反応を行い HRP 標識 DNP 抗体を結合させ、TSA 反応で蛍光標識 tyramide を多量に沈着させ蛍光顕微鏡で観察した。

3. 実験結果及び考察

3-1. レポータ基標識率の高効率化によるシングルコピー遺伝子の検出

高い検出感度を得るためにプローブにより多くの DNP 抗原を標識しようと試みたが、標識率の増加に伴いプローブの収量が低下するという問題が生じた (データ非表示)。そこで PCR 反応液に Mg^{2+} 溶液を加える事にした。一般に PCR 法では反応液

キーワード: Two-pass TSA-FISH 法, ポリプローブ, シングルコピー遺伝子

東北大学大学院工学研究科 土木工学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06

環境保全工学研究室 TEL: 022-795-3584, FAX: 022-795-7465

中の Mg^{2+} 濃度を高くすることで増幅産物の収量が増加することが知られている。本研究では、十分な標識率と収量を得るための最適 Mg^{2+} 濃度の検討を行い、さらに dUTP-11-DNP 濃度、アニーリング温度の検討も行うことでPCR 反応条件を最適化した。その結果、既報よりもプローブに多くの DNP 抗原を標識でき、且つ十分な収量のプローブが得られた。このプローブを用いて以下の検討を行った。

まず、モデル微生物として *M. maripaludis* を、ネガティブコントロール微生物として *Escherichia coli* を用い標的遺伝子の検出を試みた。756 bp のプローブを用いて two-pass TSA-FISH 法を行ったところ、モデル微生物からシグナルを得ることができた。さらに交雑条件を最適化したところ両者を識別して検出できた。

次に、モデル微生物とネガティブコントロール微生物を混合した系で実験を行ったところ、モデル微生物と隣接するネガティブコントロール微生物から非特異的なシグナルが得られた。この原因は、ポリプローブ同士の結合により、プローブのネットワークが形成され菌体の外側でも TSA 反応が起き、tyramide がモデル微生物以外の箇所にも沈着したためと考えられる。この問題を解消するために、交雑条件を厳しくする、プローブ濃度を下げる、交雑時間を短くするなどの検討を行ったが非特異的なシグナルを消すことは困難であった。そこで、菌体同士を分散させて検出を試みたところ標的微生物のみを特異的に検出することができた (Fig.1)。

3-2. 本手法の特異性

川上らの報告では、遺伝子配列の相同性が 60%程度の微生物間の識別を試みたがネガティブコントロール微生物からの非特異的な蛍光を完全に消すことはできず両者を識別するまでに至っていない²⁾。そこで本研究では、相同性の高い菌種間でも識別の可能性がある短いプローブを用いることで問題の解決を試みた。

まず、短いプローブでも遺伝子の検出が可能か確かめた。465 bp のプローブでの検出を試みたところ、検出率 100%を達成することはできなかったが、菌全体から十分なシグナルを得ることができた。さらに短い 150 bp のプローブを用いたところ、465 bp のプローブよりさらに検出率が低下するものの菌体からシグナルが得られた。得られるシグナルは菌体の一部分からであったが、ネガティブな蛍光とは十分に識別可能であった。これらの結果より、短い

プローブでも遺伝子検出が可能であることがわかった。

次に、三種類の長さのプローブを用い、相同性の異なる三種類の微生物 (*E. coli*, *Methanococcus vannielii*, *Methanoculleus chikugoensis*) をネガティブコントロール微生物として、モデル微生物との識別を試みた。まず、756 bp のプローブを用いたところ相同性 60%程度の *M. chikugoensis* は識別できたが、相同性 90%程度の *M. vannielii* からは非特異的なシグナルが得られ両者の識別は困難であった。しかし、短い 150 bp のプローブを用いたところ相同性 90%程度の *M. vannielii* でもほぼ識別可能となった。これらの結果より、短いプローブの方が近縁種の識別に有利であることがわかった。150~350 bp 程度のポリプローブで識別可能な相同性の閾値は 85~75%であるという報告もあり³⁾、本研究の結果はこれと同等、もしくはそれ以上の結果が得られた。

4. まとめ

レポータ基の標識数を増大させたポリプローブと two-pass TSA-FISH 法を用いることにより、微生物のシングルコピー機能遺伝子の特異的検出が可能であった。また 150 bp のプローブでも遺伝子の検出が可能であり、相同性 90%程度の微生物の識別可能性が示唆された。今後は、様々な微生物や遺伝子への適用可能性や 16S rRNA との二重染色等の検討についても行う予定である。

謝辞

この研究の一部は環境省及び文部科学省の補助を受けて実施したものである。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- 1) Kubota *et al.*, 2006, J. Microbiol. Methods
- 2) 川上ら, 2006. 環境工学研究論文集
- 3) Ludwig *et al.*, 1994, Appl. Environ. Microbiol.

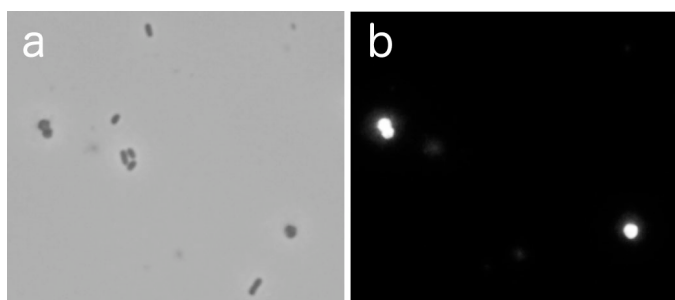


Fig.1 Specific detection of the *mcr* gene in an artificial mixture of *M. maripaludis* (cocci) and *E. coli* (rod-shaped cells) by two-pass TSA-FISH. Phase contrast (a) and epifluorescence (b) micrographs show the identical fields.