

(38) **メタン生成古細菌に CARD-FISH 法を適用するための細胞壁処理**

Cell Wall Treatments for Applying CARD-FISH to Methanogens

久保田 健吾*, 大橋 晶良*, 井町 寛之*, 原田 秀樹*

Kengo KUBOTA*, Akiyoshi OHASHI*, Hiroyuki IMACHI*, and Hideki HARADA*

ABSTRACT; Cell wall treatment methods were investigated to apply CARD (catalyzed reporter deposition)-FISH (fluorescence in situ hybridization) technique for the detection of methanogenic archaea. To determine the effective treatment for enhancing the cell wall permeability, we employed purely cultured methanogens, which have any one of four different types of cell wall: s-layer, pseudomurein, sheath and methanochondroitin, and tested pretreatments such as lysozyme-EDTA, detergents, proteinase K, pseudomurein endopeptidase extracted from *Methanothermobacter wolfei*, and freeze and thaw cycle. Of eight tested methanogens, six species were successfully detected by CARD-FISH, but some of them stained heterogeneously. Applicability of CARD-FISH with the treatments, proteinase K and pseudomurein endopeptidase, was evaluated using anaerobic digested sludge. As results, CARD-FISH was successfully applied for the detection of methanogens in anaerobic digested sludge with proteinase K treatment.

KEYWORDS; CARD-FISH, cell wall, methanochondroitin, methanogen, pseudomurein, sheath, s-layer

1. はじめに

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、微生物種を特異的に検出できるのみでなく、その形態も視覚的に理解できることから環境微生物の分野では広く用いられている技法である¹⁾。しかし FISH 法では、蛍光強度が微生物の保持している rRNA 量に大きく依存するため、rRNA 含有量が少ない微生物からは、微弱な蛍光もしくは蛍光が全く得られないといった問題が生じる¹²⁾。この問題を打破するために、様々な研究グループによって FISH 法を高感度化する試みが行われている。現在までに、オリゴヌクレオチドプローブ (DNA プローブ) に標識する蛍光物質を cyanine 系などの蛍光強度の強い物質にする方法³⁾、また HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate) and Fast Red TR-FISH 法⁴⁾、CARD (Catalyzed reporter deposition) -FISH 法⁵⁶⁾といった酵素反応を用いて蛍光物質を菌体内に蓄積する方法が確立している。特にこれらの中でも CARD-FISH 法は、現在のところ、蛍光標識を付加した従来型の FISH 法に比べて最も高い輝度を得ることが可能な方法である⁵⁾。

CARD-FISH 法は、Horseradish peroxidase (HRP) を標識した DNA プローブを用いて、tyramide signal amplification (TSA) 反応を利用する。これは、tyramide が H₂O₂ の存在下で HRP の触媒作用によってラジカル化され、微生物体内に含まれるトリプシンやチロシンといった芳香族アミノ酸と結合する反応である。tyramide には様々な蛍光物質が修飾でき、tyramide の沈着した量に比例して蛍光物質も蓄積し、蛍光が飛躍的に増加する。しかし CARD-FISH 法は、DNA プローブに付加している HRP の分子量が蛍光物質に比べて極めて大きい (約 40,000 v.s. 約 400)、菌体内への DNA プローブの浸透性が悪いという問題を抱えている。従って、いかに HRP を付加した DNA プローブを菌体内に浸透させるかが CARD-FISH 法の成功の鍵

* 長岡技術科学大学 環境システム工学 (Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka Univ. of Tech.)

となっている。

このような問題を抱えていることから CARD-FISH 法は非常に高感度な検出が可能であるにもかかわらず、その適用範囲は酵素標識プローブを菌体内に浸透させるための適切な細胞壁処理方法について知見の得られている微生物に限られている^{5,6,7,8)}。今日まで報告がなされているのは細胞壁がリゾチームなどで容易に加水分解される *Bacteria* のみであり、メタン生成古細菌のような *Archaea* への適用報告は付加的なところに留まっており、皆無に等しい^{5,9)}。

本研究ではメタン生成古細菌に CARD-FISH 法を適用するため、メタン生成古細菌の特徴的な細胞壁構造である S レイヤー、シュードムレイン、シースおよびメタノコンドロイチンについて^{10,11)}それぞれの細胞壁をもつ純菌を用いて細胞壁処理方法の検討を行った。また、本研究で得られた細胞壁処理方法を用いて従来の FISH 法ではメタン生成古細菌の検出が困難であった嫌気性消化汚泥への適用を試みた。

2. 実験方法

2.1 メタン生成古細菌と消化汚泥および固定

細胞壁処理方法の検討に用いたメタン生成古細菌の純菌とその細胞壁構造を Table 1 に示す。メタン生成古細菌は純菌株を購入した Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) および理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorganisms [JCM]) が推奨する条件に従って培養した。

Table 1 List of tested methanogens corresponding to cell wall structures

Cell-wall structures	Methanogens
S-layer	<i>Methanococcus vannielii</i> (DSM1224)
	<i>Methanoculleus bourgensis</i> (DSM3045)
Sheath	<i>Methanospirillum hungatei</i> (DSM864)
	<i>Methanosaeta concilii</i> (DSM3671)
Pseudomurein	<i>Methanobacterium bryantii</i> (DSM863)
	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> (JCM9316)
Methanochondroitin	<i>Methanosarcina barkeri</i> (DSM800)
	<i>Methanosarcina mazei</i> (JCM9314)

CARD-FISH 法を適用した汚泥は都市下水処理場の嫌気性消化槽 (運転温度 35°C) から採取した。

メタン生成古細菌の純菌および嫌気性消化汚泥サンプルは、PBS (Phosphate-buffered saline) 緩衝液で洗浄後、3%パラホルムアルデヒドで 4°C、3-5 時間の固定を行った。固定したサンプルはエタノール/PBS 溶液 (1:1 [v/v]) に浸し、-20°C で保存した¹²⁾。

2.2 FISH 法

FISH 法は Amann ら¹²⁾の方法に準拠して行った。本研究ではメタン生成古細菌を標的としているため、古細菌 (*Archaea*) の 16S rRNA に特異的な ARC915 プローブ (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3')¹³⁾を使用した。ハイブリダイゼーションは Cy-3 標識プローブを含む (5 ng/μl) ハイブリダイゼーションバッファー (900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH7.2], 0.01% SDS [w/v], 35% formamide [v/v])¹⁴⁾を用い、46°C で 2 時間以上行った。余剰なプローブの洗浄は、プローブを含まないハイブリダイゼーションバッファーを用いて 48°C で 20 分間行った。FISH 法終了後に、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で全菌染色を行った。

2.3 CARD-FISH 法

CARD-FISH 法は Schönhuber⁵⁾および Pernthaler ら⁶⁾の方法に準拠して行った。CARD-FISH 法に供した菌体サンプルはすべて 0.1% 低融点アガロースと混ぜ合わせ⁶⁾、8 穴高撥水性印刷スライドガラス (松浪硝子) 上に包括固定した。次に 50, 80, 95% エタノールに 3 分ずつ浸して脱水を行い、プローブの浸透性を上げるための前処理に供した。ハイブリダイゼーションは、HRP 標識プローブを含む (0.5 ng/μl, ThermoHybaid) ハイブリダイゼーションバッファー (900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH7.2], 60% formamide [v/v], 0.01% SDS [w/v],

10% dextran sulphate [w/v], 1% blocking reagent [w/v])⁶⁾ を 15 μ l/well マウントし、40°C のチャンバー中で 2 時間行った。プローブの洗浄は、ハイブリダイゼーションバッファーに 5 mM EDTA [pH8.0] を加えた 42°C の洗浄バッファー 50 ml に、スライドガラスを 20 分間浸すことで行った。プローブの洗浄後、直ちにスライドを 50 ml の TNT バッファー (100 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) に 15 分間浸して平衡化させ、TSA 反応に供した。TSA 反応は、Cy-3 が標識されている TSA 反応キット (NEN Life Science) を用いた。Tyramide の希釈率を 1:25 とした反応液を 10 μ l/well マウントし、室温で 10 分間 TSA 反応を行った。TSA 反応終了後、50 ml の TNT バッファーで 15 分間の振とう洗浄、50 ml の超純水で 1 分間の洗浄を行った。最後に 96% エタノールに 1 分間浸して脱水後、乾燥させた。ハイブリダイゼーションが始まってから TSA 反応が終了するまで、サンプルが乾燥しないようにした。すべての CARD-FISH 法のステップ終了後に、DAPI による全菌染色を行った。

2.4 細胞壁処理

HRP 標識プローブの細胞への浸透性を上げるために、ハイブリダイゼーション反応前もしくは反応中に細胞壁処理を行った (Table 2)。細胞壁処理後には界面活性剤処理および凍結融解処理を除くすべての処理において PBSX 溶液 (0.05% Triton X-100 in PBS) により 10 分間の振盪洗浄を行い、超純水ですすいだ。最後に、96% エタノールに 1 分間浸すことにより脱水を行い、風乾させた後、サンプルをハイブリダイゼーションに供した。

(1) リゾチーム・EDTA 処理

リゾチーム・EDTA 溶液 (10 mg/ml in 100 mM Tris-HCl [pH7.5], 50 mM EDTA [pH8.0]) を 20 μ l/well マウントし、37°C で 40-70 分間反応させた⁶⁾。

(2) 界面活性剤処理

SDS⁹⁾, Triton X-100, Tween-20, CHAPS, sodium cholate あるいは sucrose monopalate をハイブリダイゼーションバッファー中に 0.01, 0.1, 1% の濃度で加えて、ハイブリダイゼーションを行った。

(3) プロテアーゼ K 処理

プロテアーゼ K 溶液 (15, 50, 100, 500, 1,000 μ g/ml in 10 mM Tris-HCl [pH7.5]) を 20 μ l/well マウントし、室温で 10-30 分間反応させた⁷⁾。

(4) シュードムレイン加水分解酵素処理

シュードムレイン加水分解酵素は *Methanothermobacter wolfei* (DSM 2970) から抽出したものをを用いた。酵素の抽出は *M. wolfei* を集菌し (O.D.₅₄₆=3.1)、H₂ 欠乏条件下 (無基質条件) で *M. wolfei* が完全に溶菌するまで 60°C で培養することで行った¹⁵⁾。溶菌した培養液を 10,000 g で 5 分間遠心分離し、上澄みをシュードムレイン加水分解酵素溶液として用いた。細胞壁加水分解反応は酵素溶液に還元溶液 (10 mM dithiothreitol, 0.5 g/l Na₂S·9H₂O, 0.5 g/l L-cysteine) を加え¹⁶⁾、それを 20 μ l/well マウントし、60°C に保った嫌気チャンバー中で 40-120 分間反応させることにより行った。

(5) 凍結融解処理

菌体をスライドガラスに固定する前に、菌体を PBS に懸濁し、-80°C で凍結、60°C で融解することを 5-10 回繰り返した¹⁴⁾。

Table 2 Pretreatment techniques to penetrate HRP-labeled probe into methanogens

Treatment	Protocol	Reference
Lysozyme + EDTA	10 mg/ml in 100 mM Tris-HCl [pH7.5], 50 mM EDTA [pH8.0] for 40-70 min at 37°C.	6
Detergents	0.01, 0.1, 1% SDS, Triton X-100, Tween-20, CHAPS, sodium cholate or sucrose monooctate in hybridization buffer.	9 and in this study
Proteinase K	15, 50, 100, 500, 1,000 µg/ml in 10 mM Tris-HCl [pH7.5] for 10-30 min at room temperature.	7
Pseudomurein endopeptidase	crude enzyme extracted from <i>M. wolfei</i> for 40-120 min at 60°C.	in this study
Freeze and thaw	5-10 times freeze-thaw cycle (-80 and 60 °C) prior to embedding.	14

2.5 顕微鏡と蛍光強度解析

微生物の観察には、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50F) および CCD カメラ (SenSys OL1401E-G1) を用いた。蛍光の強さは、CCD カメラで取り込んだ画像を画像解析ソフト Quantity One (BIORAD) で解析して評価した。

3. 実験結果および考察

3.1 細胞壁処理無しでのメタン生成古細菌純菌への CARD-FISH 法の適用

まず初めに、S レイヤー、シュードムレイン、シース、メタノコンドロイチンの細胞壁を持つメタン生成古細菌の純菌 (Table 1) に対して全く細胞壁処理を行わずに、CARD-FISH 法による検出を試みた。その結果、細胞壁に S レイヤーを持つ *M. vannielii* と *M. bourgensis* が非常に強い蛍光で検出され、メタノコンドロイチンを持つ *M. mazei* も不均一な染色であったが検出された。その一方で、シース、シュードムレインを持つメタン生成古細菌、また同じメタノコンドロイチンを持つメタン生成古細菌でも *M. barkeri* は検出されなかった。

3.2 ARC915 プローブの stringency の決定

次に、本研究で使用する古細菌に特異的な ARC915 プローブの stringency の決定を行った。供試サンプルには細胞壁処理せずに検出が可能であった S-レイヤーを持つメタン生成古細菌 *M. vannielii* を用いた。

一般に広く用いられているハイブリダイゼーション温度 (46°C) では、プローブに標識してある HRP の失活が懸念される。そこで、HRP の失活を回避するため、既報に従い 35°C のハイブリダイゼーション温度^{6,7,8)}で ARC915 プローブの stringency の調節を試みた。しかしながら、本研究ではホルムアミド濃度を 70% まで上昇させても、プローブの解離が観察されなかった。そこでハイブリダイゼーション温度を 40°C に上昇させたところ、ホルムアミド濃度 60% で最適な stringency を得ることができた。

3.3 CARD-FISH 法による蛍光強度の増幅

本研究で行っている CARD-FISH 法の蛍光強度の増幅量について検証した。これは、従来の FISH 法で得られる蛍光強度と CARD-FISH 法で得られる蛍光強度を比較することにより行った。供試菌体は *M. vannielii* とし、CARD-FISH 法および FISH 法によって得られた蛍光を、画像解析ソフト Quantity One を用いて、300 菌体以上解析した。本来ならば、画像解析では、解析のための画像の取込露光時間を一定にして行うことが望ましいが、CARD-FISH 法によって得られる蛍光は FISH 法に比べて格段に強いので、取込露光時間を一定にすることは困難であった。そこで、蛍光強度が 2 倍になれば取込露光時間が 1/2 になるという相関関係があると仮定して解析を行った。

CARD-FISH 法の露光時間を 50 ms、FISH 法の露光時間を 650 ms として取り込んだ画像を画像解析ソフトで解析した結果、CARD-FISH 法の $24,700 \pm 5,900$ (実測値; $1,900 \pm 460$) に対し FISH 法では $1,200 \pm 360$ が得られ、蛍光強度は約 20 倍に増幅していることが判明した (Fig. 1)。これは、既に報告されている CARD-FISH 法のシグナル増幅量⁵⁾と同等であった。

3.4 メタン生成古細菌の細胞壁処理

細胞壁にシース、シュードムレイン、メタノコンドロイチンをもつメタン生成古細菌は、細胞壁処理無しでは CARD-FISH 法を用いて検出することが出来なかった。そこで、検出できなかったメタン生成古細菌の純菌について、プローブの浸透性を高めるための細胞壁処理方法の検討を行った。その検討方法は既に報告されている *Bacteria* への CARD-FISH 法の適用例^{5,6,7,8)}を参考に、加水分解酵素による細胞壁処理法を中心に行った。

(1) シース

シースは *Methanospirillum* 属や *Methanosaeta* 属に見られる鞘状のメタン生成古細菌が持つ細胞壁である¹⁰⁾。本研究で用いた *M. hungatei* と *M. concilii* は、細胞壁をプロテアーゼ K (15 $\mu\text{g/ml}$, 10 分, 室温) で処理したところ、位相差顕微鏡での観察では菌体が薄くなり観察しづらくなるものの、CARD-FISH 法を用いて検出することができた。しかしながら *M. concilii* については、染色が不均一であった。

プロテアーゼ K 処理の他に、リゾチーム・EDTA 処理、界面活性剤処理や *M. wolfei* から抽出したシュードムレイン加水分解酵素による細胞壁処理を行ったところ (シュードムレイン加水分解酵素の詳細は 3.4.2 節)、シュードムレイン加水分解酵素処理においても検出可能であった。しかし、プロテアーゼ K による細胞壁処理と比較するとシュードムレイン加水分解酵素を用いた場合の蛍光強度は弱かった。

(2) シュードムレイン

Methanobacteriales 目にみられる細胞壁構造のシュードムレインは、蛍光標識プローブでさえ浸透性が悪いことが知られている¹⁴⁾。本研究ではシュードムレインを持つメタン生成古細菌として *M. bryantii* と *M. arboriphilus* を用いたが、リゾチーム・EDTA、界面活性剤やプロテアーゼ K による細胞壁処理は全く効果が見られなかった。Sekiguchi ら¹⁴⁾は高温 *Methanothermobacter* 属への蛍光標識プローブの浸透性を高めるために凍結融解処理を行うことで検出を可能にしている。そこで凍結融解処理を行い、CARD-FISH 法を行ったが、全く効果は見られなかった。

そこで、シュードムレインを加水分解する酵素を用いることを考えた。これまでに報告されているシュードムレイン加水分解酵素は、*M. wolfei* が自己溶解するときに出す酵素のみであり¹⁵⁾、今日の段階では商業的に販売されているシュードムレイン加水分解酵素はない。そこで本研究では、大量培養した *M. wolfei* を自己溶解させ、その培養液をシュードムレイン加水分解酵素として使用した。この酵素を用いたところ、*M. bryantii* を検出できた。しかしながら、その検出は非常に不安定であり、検出の是非は酵素の抽出状態 (酵素濃度)、処理時間に依存するところが大きかった。

これに対して、同じシュードムレインの細胞壁構造を持つ *M. arboriphilus* は全く検出できなかった。Morii と Koga¹⁶⁾はこのシュードムレイン加水分解酵素を約 7 時間反応させることで *M. arboriphilus* を溶菌することができたと報告している。本研究では 2 時間までしか酵素反応処理を行っていないため、*Methanobrevibacter*

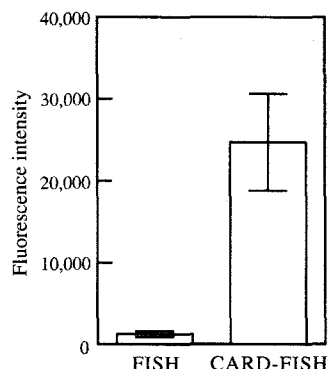


Fig. 1. Fluorescence intensity obtained by FISH and by CARD-FISH. Error bars indicate standard deviations of fluorescence from over 300 cells.

属のメタン生成古細菌を検出するには、より長い反応時間もしくはより精製された高濃度な酵素による細胞壁処理を行う必要があると考えられる。

(3) メタノコンドロイチン

メタノコンドロイチンは *Methanosarciana* 属に見られる細胞壁構造である¹⁰⁾。本研究で用いた細胞壁処理方法では検出率に若干の影響は与えるものの、ほとんど効果はなかった。Schönhuber ら⁵⁾は *M. barkeri* をエタノールで固定することで CARD-FISH 法による検出が可能であったと報告しているが、本研究でそのようなことは観察されなかった。

(4) S レイヤー

S レイヤーを持つメタン生成古細菌は細胞壁処理をすることなく CARD-FISH 法で検出が可能であった。しかし、シースをもつメタン生成古細菌に効果的であったプロテアーゼ K による処理を行うと、位相差顕微鏡による観察では菌体が確認されなくなった。これに伴い DAPI、CARD-FISH 法によるシグナルは鮮明でなくなり、蛍光強度にも低下が見られた。これは、リボソームの菌体外流出のほかに、溶菌に伴った tyramide の共有結合サイトの損失が考えられる⁸⁾。また、菌体の完全な溶菌にも関わらず、DAPI、CARD-FISH 法によるシグナルが確認された理由としては、菌体を低融点アガロースで包括固定したことが効果的であったと考えられる⁹⁾。プロテアーゼ K による細胞壁処理により菌体は完全に溶菌されてしまったが、DNA やリボソームといった標的分子はスライドガラス上に保持されたと考えられる。事実、S-レイヤーを持つメタン生成古細菌をアガロースで包括固定せず、MAS コーティング (松浪硝子) によるスライドガラスへの菌体保持のみでプロテアーゼ K 処理を行った場合、*M. vannielii* は CARD-FISH 法、DAPI 染色共に全く検出されなかった。この結果は、環境サンプルに対してプロテアーゼ K で前処理を行った場合、S レイヤーをもつメタン生成古細菌の検出率が低下する可能性があることを示唆するものである。

3.5 嫌気性消化汚泥への CARD-FISH 法の適用

従来の FISH 法では検出が困難であった嫌気性消化汚泥サンプル (Fig. 2A & B) に対して、本研究で得られた知見を元に、CARD-FISH 法によるメタン生成古細菌の検出を試みた。環境サンプルでの検出に先立って、サンプル中に存在する微生物の内在性 peroxidase 活性の有無を調べた。これは CARD-FISH 法が HRP の酵素反応を利用することで蛍光を増幅させているため、tyramide をラジカル化させるような働きを持っている微生物が存在すると、それらが反応し、プローブに標識した HRP 活性由来ではない、非特異的な蛍光が発せられる可能性が考えられるためである。そこで嫌気性消化汚泥サンプルに、Cy-3 標識 tyramide を用いた TSA 反応のみを行ったところ、非特異的な蛍光は観察されなかった。このことから、本実験で用いたサンプルには内在性 peroxidase 活性を持つ微生物が存在しない、もしくは観察に支障をしたさない程度の peroxidase 活性しか存在していないことが明らかとなった。

TSA 反応のみによる非特異的な蛍光が見られないことが確認されたため、嫌気性消化汚泥に存在するメタン生成古細菌の検出を試みた。今回の実験では純菌を用いた実験で効果のあったシュードムレイン加水分解酵素とプロテアーゼ K 処理の 2 種類の細胞壁処理を行った。シュードムレイン加水分解処理の場合にはほとんどメタン生成古細菌は検出されなかったが、プロテアーゼ K 処理を行った結果、メタン生成古細菌を特異的に検出することに成功した (Fig. 2C & D)。また、検出されたメタン生成古細菌はその細胞の形態から *Methanospirillum* 様や *Methanosaeta* 様のメタン生成古細菌であると考えられた。これは純菌における細胞壁処理方法の検討結果である、プロテアーゼ K 処理がシースをもつメタン生成古細菌に効果的であることと一致している。

今回シュードムレイン加水分解酵素処理でほとんどメタン生成古細菌が検出されなかったが、その理由と

してサンプル中に *Methanobacterium* 属のメタン生成古細菌があまり存在しなかったことも考えられた。それを裏付けるように、本研究で用いた嫌気性消化汚泥サンプルの古細菌は *Methanosaeta* 属や *Methanospirillum* 属のメタン生成古細菌が多数を占めていることが 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析により明らかとなっている¹⁷⁾。これらのことから、シュードムレイン加水分解酵素処理が環境サンプルに適用可能であるかは明らかにしていないが、少なくとも本研究で得られたプロテアーゼ K による細胞壁処理方法を使うことにより、蛍光標識を付加した DNA プローブによる従来型の FISH 法で検出困難であった嫌気性消化汚泥中のメタン生成古細菌を検出することが可能となった。

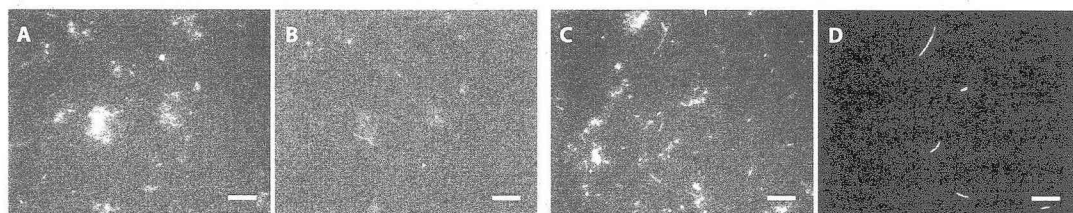


Fig. 2. In situ identification of ARC915 probe specific microbes in anaerobic digested sludge detected by FISH with Cy-3-labeled probe (B) or by CARD-FISH with proteinase K treatment (D). DAPI staining (A, C) and epifluorescence (B, D) micrographs show the identical field. Bars represent 10 μ m.

3.6 CARD-FISH 法適用のための今後の課題と展望

プロテアーゼ K 処理を行うことで、嫌気性消化汚泥のメタン生成古細菌を CARD-FISH 法により特異的に検出可能であることを示した。検出されたメタン生成古細菌はプロテアーゼ K 処理が効果的な *Methanospirillum* 属や *Methanosaeta* 属であったと考えられ、これらが比較的存在しているサンプルに対しては本法を適用することにより、特定微生物の視覚化が可能となる。しかしこの細胞壁処理方法では、S レイヤーをもつメタン生成古細菌はシグナルが損失される (3.4.4 節)、*Methanosaeta* 属の検出は十分ではない (3.4.1 節)、*Methanobacterium* 属はシュードムレイン加水分解酵素を用いないと検出されない (3.4.2 節)、などの理由から CARD-FISH 法による定量的解析を行うには不十分であると言える。また、今回用いた嫌気性消化汚泥は *Methanobacterium* 属がほとんど存在しないサンプルであったので、シュードムレイン加水分解酵素処理が環境サンプルに有効であることを示すには至らなかった。今後、*Methanobacterium* 属が存在する環境サンプルを用いて確認する予定である。

本研究で得られたメタン生成古細菌の細胞壁処理方法は酵素に依存しているため、検出されるメタン生成古細菌に大きな偏りが見られた。加えて、本研究ではメタンノコンドロイチンを持つメタン生成古細菌や *Methanobrevibacter* 属のメタン生成古細菌を検出可能とする細胞壁処理方法は確立していない。従って、CARD-FISH 法の適用範囲を拡大する為には、各細胞壁構造に対して働く酵素の情報のさらなる蓄積が重要であると考えられる。ただ、メタン生成古細菌の細胞壁構造は多様性に富んでおり、本研究の様な酵素反応に依存した細胞壁処理方法には限界があるとも考えることもでき、より汎用性の高い方法、例えば物理的処理方法を開発することが、CARD-FISH 法普及のために必要不可欠であると考えられる。

4. まとめ

メタン生成古細菌に CARD-FISH 法を適用するための細胞壁処理方法について、得られた知見を以下に記す。

- (1) S レイヤーを持つメタン生成古細菌は特別な細胞壁処理を必要としない。しかし、プロテアーゼ K 処理を行った場合、シグナルの低下が見られたことから、菌体損失の可能性がある。
- (2) シースを持つメタン生成古細菌には、プロテアーゼ K による処理が効果的であった。

- (3) シュードムレインを持つ *Methanobacterium* 属は *M. wolfei* から抽出したシュードムレイン加水分解酵素による処理が効果的であった。しかし、同じくシュードムレインの細胞壁を持つ *Methanobrevibacter* 属への適用は困難であった。
- (4) メタノコンドロイチンをもつメタン生成古細菌への適切な細胞壁処理方法について今回の研究では適切な知見は得られなかった。
- (5) 嫌気性消化汚泥中に存在するメタン生成古細菌の検出を試みたところ、プロテナーゼ K 処理を行うことでメタン生成古細菌を特異的かつ非常に強い蛍光で検出することができた。

以上のことから、メタン生成古細菌を網羅するような細胞壁処理方法は確立していないものの、細胞壁の種類ごとに適切な細胞壁処理を行えば、従来の FISH 法では検出できなかった環境中に存在するメタン生成古細菌が検出できる可能性を示した。

謝辞

本研究は NEDO (新エネルギー産業技術総合開発機構) の生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発プロジェクト - (平成 14 年度) - ((株)海洋バイオテクノロジー研究所より再委託) および文部科学省科学研究費 (課題番号 15656126) の研究費補助を受けた。また、Max Plank Institute for Marine Microbiology の石井浩介研究員には、CARD-FISH 法の技術的指導を頂いた。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- 1) Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- 2) Hahn, D., R. I. Amann, W. Ludwig, A. D. L. Akkermans, and K.-H. Schleifer. 1992. Detection of micro-organisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 879-887.
- 3) Wessendorf, M. W., and T. C. Brelje. 1992. Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry* **98**: 81-85.
- 4) Yamaguchi, N., S. Inaoka, K. Tani, T. Kenzaka, and M. Nasu. 1996. Detection of specific bacterial cells with 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphatase and Fast Red TR in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 275-278.
- 5) Schönhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko, and R. Amann. 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3268-3273.
- 6) Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3094-3101.
- 7) Schönhuber, W., B. Zarda, S. Eix, R. Rippka, M. Herdman, W. Ludwig, and R. Amann. 1999. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1259-1267.
- 8) Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, and R. Amann. 2003. An improved protocol for quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2928-2935.
- 9) Amann, R. I., B. Zarda, D. A. Stahl, and K.-H. Schleifer. 1992. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3007-3011.

- 10) 古賀洋介, 亀倉正博 編. 1998. 古細菌の生物学. 東京大学出版会.
- 11) Boone, D. R., Castenholz, R. W. and Garrity, G. M. (Eds.). 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn., vol. 1: The *Archaea* and the deeply branching and Phototrophic *Bacteria*. Springer. New York.
- 12) **Amann, R. I.** 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, p. 1-15. In A. D. C. Akkerman, J. D. v. Elsas, and F. J. d. Bruijn (ed.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- 13) **Stahl, D. A., and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom.
- 14) **Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada.** 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1280-1288.
- 15) **Kiener, A., H. König, J. Winter, and T. Leisinger.** 1987. Purification and use of *Methanobacterium wolfei* pseudomurein endopeptidase for lysis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **169**: 1010-1016.
- 16) **Morii, H., and Y. Koga.** 1992. An improved assay method for a pseudomurein-degrading enzyme of *Methanobacterium wolfei* and the protoplast formation of *Methanobacterium thermoautotrophicum* by the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 6-10.
- 17) クーシヴィライ パイラヤ, 多川正, 関口勇地, 大橋晶良, 原田秀樹. 2002. 多段型 UASB リアクターによる焼酎蒸留粕廃液の超高速メタン発酵処理 - スタートアップ期間及び再スタートアップ期間のプロセス挙動 -. 環境工学研究論文集. **39**: 77-85.