

(18) Two-pass TSA-FISH法によるメタン生成古細菌の*mcr*遺伝子の検出

川上 周司¹・久保田 健吾¹・井町 寛之^{1,2}・原田 秀樹^{1,3}・大橋 晶良^{1*}

¹長岡技術科学大学大学院 環境システム工学専攻 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

²海洋研究開発機構 極限環境生物研究センター (〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2番地15)

³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)

* E-mail: ecohashi@vos.nagaokaut.ac.jp

ポリデオキシリボヌクレオチドプローブとtwo-pass tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization (two-pass TSA-FISH) 法を用いてメタン生成古細菌*Methanococcus vannielii*のmethyl coenzyme M reductase遺伝子の検出を試みた。プローブはPCR法を用いて合成し、PCR反応液中のハプテン標識ヌクレオチド、Mg²⁺濃度を最適化する事で、プローブにより多くのハプテンを標識することが可能となった。合成したプローブを用いてtwo-pass TSA-FISH法を適用したところ、*M. vannielii*からシグナルを得ることができた。このシグナルはDNase処理、プローブの洗浄条件を強めることで消失したため、標的遺伝子に交雑したプローブ由来であることが示唆された。しかし、プローブとの相同性が60%以下の*Methanococcus bourgenis*, *Escherichia coli*に対し本手法を適用したところ、一部菌体からシグナルが得られた。

Key Words : two-pass TSA-FISH, polynucleotide probes, Methanogen, methyl coenzyme M reductase gene

1. はじめに

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法は、形態的に識別が困難な環境中の微生物群集から、培養によらず特定の微生物群のみをシングルセルレベルで検出することが可能であり、微生物生態の解析において必須な技術となっている^{1,2}。今日、我々が用いている蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法では、主に rRNA を標的とし、16S rRNA 遺伝子に基づく系統分類学的な検出が可能である。しかし近年、環境微生物群集構造解析は、rRNA 遺伝子という分子マーカーの枠を超え、微生物の機能遺伝子を網羅的に解析するメタゲノム解析³、あるいは特定の機能遺伝子に焦点をあてたクローン解析⁴、あるいは特定の機能遺伝子に関する遺伝子情報から解析を行う時代を迎えている。このような中、蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法では、代謝機能に関する遺伝子情報を用いて微生物をシングルセルレベルで検出することは困難である。最大の問題は、10⁴~10⁵ copies/cell 程度で存在する rRNA に比べて、主にシングルコピーで存在する機能遺伝子を十分な感度で検出できないこと、すなわち検出感度の不足である。

これまでに原核生物の機能遺伝子をシングルセルレベルで検出した手法として *in situ* PCR⁵, *in situ* loop-mediated

isothermal amplification (LAMP)⁶, *in situ* rolling circle amplification (RCA)¹⁰, recognition of individual genes (RING) - FISH¹¹法等がある。しかし、これら手法においても標的遺伝子を増幅させるためのプライマーの設計が困難であることや、標的遺伝子を増幅反応に用いる酵素を細胞内に浸透させ、かつ増幅産物が細胞外に流出しない適切な細胞壁処理が必要であること、細胞壁構造や標的遺伝子によりプローブの交雑条件を検討する必要があるなどの問題があり、さまざまなサンプルに対し、一様に適応できる技術にまでは至っていない。

近年、Kubota らは、HRP 標識オリゴヌクレオチドプローブを用いて原核生物の mRNA を検出可能な two-pass TSA-FISH 法を報告した¹²。Two-pass TSA-FISH 法は tyramide signal amplification (TSA) 反応を繰り返す事で検出感度を著しく向上させることが可能である。TSA 反応とは、horseradish peroxidase (HRP) の酵素触媒反応によりラジカル化した蛍光標識 tyramide が菌体内に多量に沈着することで感度を増幅させる反応である¹³。Two-pass TSA-FISH 法は、この反応によりまず抗原標識 tyramide を菌体内に沈着させた後、抗原抗体反応により HRP 標識抗体を結合させ、再度蛍光標識 tyramide により可視化することで、TSA-FISH 法に比べさらに高い感度を得ることができる。

我々は、この two-pass TSA-FISH 法にハプテンを多数標識できるポリプローブを併用することで染色体上にコードされた機能遺伝子を検出できるのではないかと考えた。そこで本研究では、two-pass TSA-FISH 法とポリプローブを用いて、原核生物の機能遺伝子を検出する新たな FISH 法の開発を目的とした。まず、ポリプローブにより多くのハプテンを標識するためのプローブ合成法について検討を行った。そして、合成したプローブと two-pass TSA-FISH 法を用いてメタン生成古細菌の methyl coenzyme M reductase (*mcr*) 遺伝子の検出を試みた。

2. 実験方法

(1) サンプルの調製

モデル微生物には、*Methanococcus vannielii* (DSM1229) を用いた。また、ネガティブコントロール微生物として *Methanococcus borgeensis* (DSM3045), *Escherichia coli* (strain JM109 [TaKaRa]) を用いた。*M. vannielii* と *M. borgeensis* は、HRP 標識抗体を菌体内に浸透させるための細胞壁処理が不要である¹⁴⁾。*M. vannielii* と *M. borgeensis* は、Weddel 培地¹⁵⁾に DSMZ (Braunschweig, Germany) の指示する基質を加えて 37°C で培養した。*E. coli* は LB 培地にて培養した。培養した菌体は対数増殖期に回収し、4%パラホルムアルデヒドで固定した (4°C, 12h)。菌体は、エタノール-PBS 溶液中にて -20°C で保存した。

(2) プローブの合成

標的遺伝子は、*M. vannielii* の *mcr* 遺伝子とし、プローブはその alpha subunit (*mcrA*) を標的としたものを、PCR 法を用いて合成した。プローブのテンプレートには、プロテアーゼ K (3.3 mg/ml for 20min at 60°C) を用いて抽出した *M. vannielii* の DNA を用いた。プライマーセットには、ME3-ME2 (増幅塩基長: 465 bp)、もしくは ME1-ME2 (756 bp) を用いた (表-1)。PCR は、PCR 反応液 (1 x PCR バッファー, 200 nM dVTP mix [V = A, C, G], 0.025 U/μl Taq polymerase [Applied Biosystems], 0.5 pmol/μl の各プライマーに、dUTP-11-Dinitrophenyl [DNP] [10 nM-70 nM, PerkinElmer] と dTTP [dUTP-11-DNP との合計が 200 nM になるようにそれぞれ 190 nM-130 nM, Applied Biosystems]) に適量の抽出 DNA を加え、95°C-9 分のホットスタートを行った後、95°C-40 秒、50°C-30 秒、72°C-3 分、40 サイクルの条件で行った。ま

た、ポリプローブの収量を上げるために、PCR 反応液の Mg²⁺ 濃度についても検討を行った (1.5 mM-4 mM)。PCR 法によって合成したプローブは、MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) により精製した後、キャピラリー電気泳動 Agilent 2000 (Agilent Technologies) を用いて dUTP-11-DNP の取り込み量を確認した。また、精製したプローブの濃度は紫外線吸光度計にて測定した。

(3) TSA-FISH 法

TSA-FISH 法は Pernthaler らの方法¹⁶⁾に若干の変更を加えて行った。まず、高撥水性印刷スライドガラス (松浪硝子) にサンプルをマウントし、風乾させた後、エタノールシリーズにより脱水を行った (50, 80, 96% エタノールに 5, 1, 1 分)。その後、RNA を除去するために RNase (0.5 mg/ml in 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 15 mM NaCl [Nippon Gene]) を各ウェルに 15 μl マウントし、37°C で 30 分間反応させた。RNase 処理後には、TNT バッファー (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) に 10 分、超純水に 1 分浸して洗浄し、96% エタノールに浸して脱水、乾燥させた。

ハイブリダイゼーションは、まずハイブリダイゼーションバッファー (2 x SSC {1 x SSC は 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate [pH 7.5]}, 50% formamide [vol/vol], 10% Dextran sulphate [wt/vol], 1% Blocking Reagent [wt/vol], 0.1% SDS [wt/vol], 1x Denhard's solution) を各ウェルに 20 μl マウントし、プレハイブリダイゼーションを行った。その後、125 pg/μl のプローブを含むハイブリダイゼーションバッファーを各ウェルに 20 μl 滴下し、80°C で 20 分間の熱変性¹¹⁾を行った後、37°C で 12 時間交雑させた。その後、37°C の洗浄バッファー-1 (2 x SSC [pH 7.5], 50% formamide [vol/vol]) に計 60 分間 (30 分 x 2) 浸し、次に 37°C の洗浄バッファー-2 (2 x SSC [pH 7.5], 0.01% SDS [wt/vol]) に計 30 分間 (15 分 x 2) 浸し、プローブの洗浄を行った。

プローブの洗浄後、プローブに HRP 標識抗 DNP 抗体を用いた抗原抗体反応を行った。スライドを TNT バッファーに 10 分間浸し平衡化させた後、各ウェルに TNB バッファー (0.5% Blocking reagent [wt/vol] in 100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl) を 15 μl 滴下し、室温で 30 分間ブロッキング反応を行った。次に anti-DNP-HRP (PerkinElmer) と TNB バッファーを 1:100 で混合した反応液を、先のに

表-1 プローブ合成に用いたプライマー

プライマー	塩基配列(5'-3') ^a	塩基長	プライマー結合部位 ^b	参考文献
ME1	GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC	20	694-713	6)
ME3	GGT GGH GTM GGW TTC ACA CA	20	985-1004	6)
ME2	TCA TKG CRT AGT TDG GRT AGT	21	1429-1450	6)

^a M, A or C; R, A or G; H, not G; W, A or T; K, G or T; D, not C.

^b プライマー結合部位は、*M. vannielii* の *mcrA* 遺伝子を基準

せてある TNB バッファーと置換し、さらに室温で 30 分間反応させた。反応後、スライドを TNT バッファーに計 30 分間 (15 分 x 2) 浸し、余剰な抗体を洗浄した。

TSA 反応は、tyramide-Cy3 と amplification buffer (0.5 x plus Amplification Diluent [ParkinElmer], 0.01% blocking reagent [wt/vol], 20% dextran sulphate [wt/vol])¹²⁾ を 1:50 で混合したものを各ウェルに 10 μ l 滴下し、37°C で 10 分間反応させた。その後 50°C の TNT バッファーに計 30 分間 (15 分 x 2) 浸して洗浄した後、超純水に室温で 1 分、100% エタノールに 1 分間浸し風乾させた。

(4) Two-pass TSA-FISH 法

Two-pass TSA-FISH 法は、Pentthaler らの方法¹⁰⁾と Kubota らの方法¹²⁾を組み合わせ若干の変更を加えて行った。一回目の TSA 反応までを TSA-FISH 法と同様の手順で行い、tyramide-Cy3 を tyramide-DNP に置き換えて行った。反応後、50°C の TNT バッファーに計 30 分間 (15 分 x 2) 浸して洗浄した。その後、各ウェルに TNB バッファーを 15 μ l 滴下し、室温で 30 分間ブロック反応を行った。次に、anti-DNP-HRP と TNB バッファーを 1:100 で混合した反応液を、先にのせてある TNB バッファーと置換し、さらに室温で 30 分間反応させた。抗原抗体反応終了後、スライドを TNT バッファーに計 30 分間 (15 分 x 2) 浸し、余剰な抗体を洗浄した。二回目の TSA 反応は、tyramide-Cy3 と amplification buffer を 1:50 で混合したものを各ウェルに 10 μ l 滴下し、37°C で 10 分間反応させた。その後 50°C の TNT バッファーに計 30 分間 (15 分 x 2) 浸して洗浄した後、超純水に室温で 1 分、100% エタノールに 1 分間浸し風乾させた。

(5) DNase 処理

菌体内の DNA を消化するための DNase 処理は、DNase (0.1 U/ μ l DNase in 1xReaction buffer [Promega]) を各ウェルに 15 μ l マウントし、37°C で 15 分間反応させることで行った。DNase 処理後、TNT バッファーに 10 分、超純水に 1 分浸して洗浄後、96% エタノールに 1 分間浸して脱水、乾燥させた。

(6) 顕微鏡観察

顕微鏡観察には、落射蛍光顕微鏡 BX50F (Olympus) を用いて行った。画像の取得にはカラー CCD カメラ DP70 (Olympus) を使い、菌体由来の蛍光と菌体以外からの非特異的な蛍光を識別するために付属のフィルターを二枚 (U-ND6-2, U-ND25-2 [Olympus]) 用いて励起力を調節した。

3. 結果及び考察

(1) ポリプローブの合成

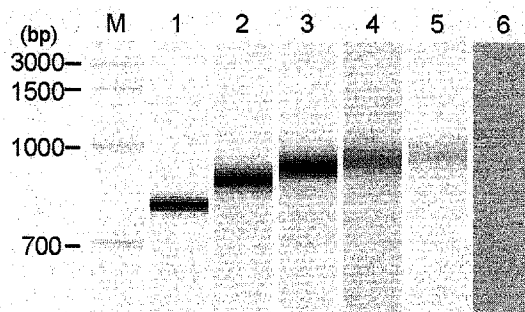


図-1 合成したポリプローブのキャピラリー電気泳動の写真。プライマーは ME1-ME2。Mg²⁺濃度は 3.5 mM。M ; マーカ、1 ; dUTP-11-DNP なし、2 ; 40 nM dUTP-11-DNP、3 ; 50 nM dUTP-11-DNP、4 ; 60 nM dUTP-11-DNP、5 ; 70 nM dUTP-11-DNP、6 ; ネガティブコントロール (超純水)。

より多くの DNP を標識したポリプローブを合成する事は、シングルコピー遺伝子を検出する感度を得るために重要である。そこで、PCR 反応液中に添加する dUTP-11-DNP の濃度について検討を行った。

まず、ME3-ME2 (増幅塩基長: 465 bp) プライマーセットを用いて PCR 反応液中の dUTP-11-DNP と dTTP の割合を 20 nM : 180 nM ~ 50 nM : 150 nM まで変化させて PCR を行った。その増幅産物をキャピラリー電気泳動により確認したところ、dUTP-11-DNP を加えた系において、dUTP-11-DNP を添加していない系に比べて泳動距離の短いバンドが得られた。これは dUTP-11-DNP の分子量が dTTP に比べて大きいため、dUTP-11-DNP が取り込まれると増幅産物の分子量が大きくなり、泳動距離が短くなるためである。言い換えると、泳動距離が短いプローブほど、より多くの DNP を取り込んだことになる。泳動距離は dUTP-11-DNP の濃度が高くなる程短くなり、増幅産物により多くの dUTP-11-DNP が取り込まれていると推察された。一方で dUTP-11-DNP の濃度が上がるにつれてバンドの輝度は弱くなっていった。そして dUTP-11-DNP を 50 nM 含む系で全く増幅を確認することができなくなった。これより dUTP-11-DNP の取り込み量とプローブの収量には相反する関係が成り立つことが分かる。これら結果から、dUTP-11-DNP の濃度を 40 nM として PCR を行い、その増幅産物をプローブとして用いた。

しかしながら、ME3-ME2 プライマーセットを用いて合成したプローブでは、*mcr* 遺伝子を検出するのに十分な感度が得られなかった (後述)。そこで、より長いプローブを用いる事でプローブ当りの DNP 標識数をさらに増やし、感度を上げることとした。ME1-ME2 (増幅塩基長: 756 bp) プライマーセットを用いて、先ほどと同様に dUTP-11-DNP の濃度を変化させてプローブを合成したところ、同様に 50 nM で増幅が見られなくなった。この ME1-ME2 プライマーセットにより合成したプローブを

用いて two-pass TSA-FISH 法を行ったところ、十分な感度を得ることができた(後述)。

しかしながら、dUTP-11-DNP の濃度を 40 nM に調整し、ME1-ME2 プライマーセットを用いて、PCR 法により合成されるプローブの収量は極めて少なかった。一般に、PCR 法では反応液中の 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¹⁷⁾。また、dUTP を用いた PCR 法では、dTTP を用いた時に比べ高い Mg^{2+} 濃度が必要である。そこで、プローブの収量を上げるために Mg^{2+} 濃度について検討した。まず、dTTP を用いた PCR により、非特異的増幅が発生しない最適な条件について検討した。 Mg^{2+} 濃度を 1.5 ~ 4 mM と 0.5 mM 刻みで変化させ検討したところ、3.5 mM において非特異的増幅を伴わず、最大の収量が得られた。そこで Mg^{2+} 濃度を 3.5 mM に調整し、再度、PCR 反応液に加える dUTP-11-DNP の濃度について検討を行った。図-1 に ME1-ME2 のプライマーセットを用いて dUTP-11-DNP と dTTP の割合を 40 nM : 160 nM ~ 70 nM : 130 nM まで変えた時の増幅産物のキャピラリー電気泳動結果を示す。 Mg^{2+} 濃度を上げることで増幅産物の収量は増加した。更に、dUTP-11-DNP の取り込み量も増加し、60 nM の dUTP-11-DNP を添加しても増幅が可能になった。そのため、より多くの DNP が標識されていると考えられる反応条件 (60 nM dUTP-11-DNP) にてプローブを作成した。

(2) Two-pass TSA-FISH 法による *mcrA* 遺伝子の検出

PCR 法により合成したプローブを用いて、*M. vacuolii* の *mcrA* 遺伝子の検出を試みた。まず、ME3-ME2 (465 bp) プライマーセットにより 40 nM の dUTP-11-DNP を添加して合成したプローブを用いて TSA-FISH 法を行ったところ、菌体からシグナルは全く得られなかった。次に、two-pass TSA-FISH 法を適用したところ、極めて高いバックグラウンドと共に菌体からシグナルを得る事ができたが、実験の再現性は低かった。これは、465 bp のポリプローブではシングルコピー遺伝子を検出するだけの十分な感度を有していなかったためだと考えられた。

そこで、更に高い感度を得るために、プローブの塩基長を延長し、DNP の標識数を増やしたプローブを合成し、再度 *mcrA* 遺伝子の検出を試みた。ME1-ME2 (756 bp) プライマーセットにより 40 nM dUTP-11-DNP を添加して合成したプローブを用いて two-pass TSA-FISH 法を行ったところ、感度の向上が見られ、菌体から有意なシグナルが観察された(図-2 A, B)。また、実験には再現性があり、安定した検出が可能になった。観察されるシグナルは主に二種類あり、菌体を囲むようにして得られるもの(図-3 A, B)と、ちょうど三日月のように一部のみから得られるもの(図-3 C, D)があった。菌体を取り囲むようにして

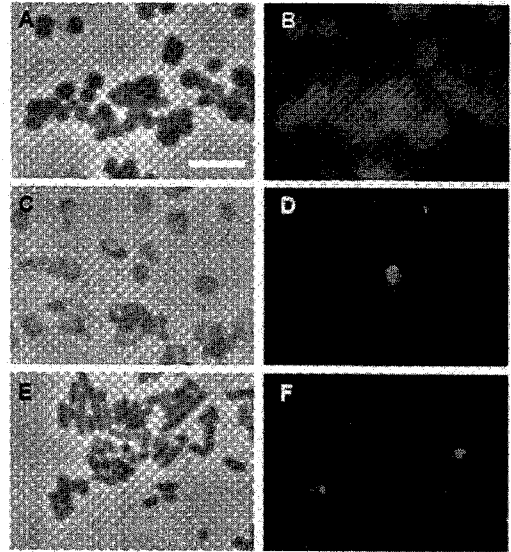


図-2 Two-pass TSA-FISH 法による顕微鏡写真。プローブは 756 bp で *mcr* 遺伝子を標的。A, B パネルは *Myxanellia*, C, D パネルは *M. bourgenis*。E, F パネルは *E. coli*。A, C, E パネルは位相差視野、B, D, F は G 励起視野で両者はそれぞれ同一視野。B, D, F における露光時間は 1 秒。バーは 5 μ m。

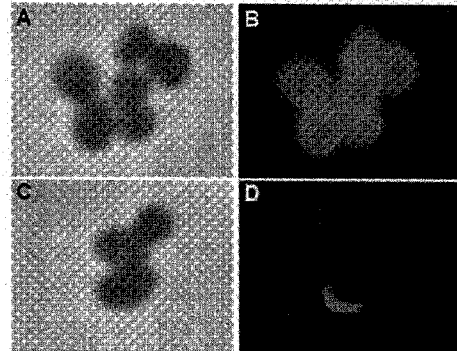


図-3 Two-pass TSA-FISH 法により得られる二種類の蛍光。サンプルは *M. vacuolii* の純粋菌株。プローブは 756 bp で *mcr* 遺伝子を標的。A, C パネルは位相差視野、B, D は G 励起視野で両者はそれぞれ同一視野。B, D における露光時間は 1 秒。

蛍光が得られる現象は、Kubota らがオリゴプローブを用いて two-pass TSA-FISH 法により mRNA を検出した際にも観察されており¹²⁾、two-pass TSA-FISH 法特有の蛍光なのかもしれない。しかし、詳細な検討については不十分であり、今のところ原因は分かっていない。

次に、得られているシグナルが *mcrA* 遺伝子に交雑したプローブ由来であるか確認するために、ハイブリダイゼーション前に DNase 処理を行い、標的 DNA を消化した。その結果、菌体からシグナルは全く得られなくなった。更に洗浄バッファー 1 中のホルムアミド濃度を上げ

洗浄時のストリンジェンシーを強めると、菌体からのシグナルは得られなくなった。これらの事より得られた蛍光は *mcrA* 遺伝子に交雑したプローブ由来のものであると考えられる。

しかし、問題点として菌体がマウントされていない箇所からの非特異的な蛍光が観察された。この非特異的な蛍光は、プローブや抗体等がスライドに非特異的に結合したことが原因であると考えられる。スライドの洗浄、ブロッキング剤の濃度やブロッキング反応時間、抗体の濃度や反応時間、反応バッファー中に界面活性剤 (SDS, Tween 20, TritonX-100) を添加する、洗浄の時間や温度の検討などを行ったが、今のところ解消できていない。しかしながら、これら非特異的な蛍光と菌体からの蛍光には蛍光強度に有意な差があり、識別は可能であった。

次に、40 nM dUTP-11-DNP 濃度にて合成したプローブと、 Mg^{2+} 濃度を上げ 60 nM の dUTP-11-DNP 濃度にて合成したプローブの検出感度の違いについて検討した。その結果、60 nM の dUTP-11-DNP 濃度にて合成したプローブを用いても、40 nM の dUTP-11-DNP 濃度で合成したプローブから得られるシグナルとほとんど差は見られなかった。キャピラリー電気泳動の泳動距離から推察すると、60 nM の dUTP-11-DNP を加えた系の方がより DNP を取り込んでいるため、より強いシグナルが得られると考えられる。この現象は、1) 既に蛍光感度が飽和している、2) Tyramide の沈着サイトが飽和している、3) プローブに DNP が高頻度に標識されているため、サイズの大きい抗体同士が物理的に隣接して結合できず、標識されている DNP が有効に利用されていない、などが考えられる。

(3) Two-pass TSA-FISH 法の特異性について

M. burgensis, *E. coli* の純粋菌株サンプルに対し two-pass TSA-FISH 法を行い、合成したポリプローブの特異性について検討した。その結果、両者ともに若干の非特異的な蛍光が得られた (図-2, C, D, E, F)。この蛍光は、ストリンジェンシーを上げることで消光したが、その条件では *M. varmieli* からも蛍光は得られず、両者を識別することは困難であった。Ludwig らは 148-358nt のポリプローブを用いた場合、検出の閾値が 85-75% であったと報告している¹⁸⁾。本研究で用いたプローブと *M. burgensis*, *E. coli* の相同性は共に 60% 以下であるため、両者を識別する事は可能であると考えられた。このような非特異的な蛍光が得られた原因として、two-pass TSA-FISH 法の高感度さ、Ludwig らが用いたプローブよりも長いプローブを使用したため検出の閾値が低下した、などが挙げられる。プローブがわずかにでも交雑し、菌体内に残存すると、それを起因としてシグナルが得られてしまう可能性がある。より長い

プローブは検出感度の面において大きなアドバンテージがあるが、特異性が低下する点においては、本手法を適用するにあたり、条件設定を難しくする要因にもなりうると思われる。

(4) 今後の展望と課題

本研究で開発した two-pass TSA-FISH 法とポリプローブを組み合わせた高感度 FISH 法を用いることで原核生物の遺伝子を検出できる可能性が示唆された。一方で、ネガティブコントロールから得られる非特異的な蛍光や菌体がマウントされていない箇所からの蛍光など解決すべき課題も多い。

本手法は、その他の遺伝子検出技術に比べ、プローブの設計が容易なことや、標的遺伝子そのものを増幅していないという点において大きく異なる。また、得られるシグナルは rRNA 標的蛍光標識プローブを用いた FISH 法よりも強く、十分な感度も有している。さらに、増幅段階でシビアな実験条件の設定が必要な他の手法に比べ、シグナル増幅ステップがシンプルである。

本研究では検出に有効なシグナルを得るのに 756 bp のプローブ長を必要としたが、プローブ合成反応時に Mg^{2+} 濃度を高くしハプテン標識ヌクレオチドの取り込み量を増やすことでさらに短いプローブを用いても遺伝子を検出することが可能になると思われる。更には近年報告された TSA の増感技術¹⁹⁾を組み合わせる事で、より短いプローブ (特異性の高いプローブ) を用いた検出が可能になると考えられる。

本報ではポリプローブと two-pass TSA-FISH 法を用いた *in situ* での遺伝子検出法の可能性と問題点について述べた。克服すべき課題は多いが、本手法は微生物の代謝機能に関する解析を行うための強力なツールになり、培養に依存しない *in situ* での微生物生態解析の可能性を広げられると考えられる。

謝辞: 本研究は、NEDO (新エネルギー産業技術総合開発機構)、文部科学省科学研究費、及び日本学術振興会特別研究員奨励費の助成を受けた。ここに記して、感謝します。

参考文献

- 1) Amann, R. L, Ludwig, W. and Schleifer, K.-H.: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbial Rev.*, Vol.59, pp.143-169, 1995.
- 2) Amann, R. L, Fuchs, B. M. and Behrens, S.: The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization, *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol.12, pp.231-236, 2001.
- 3) Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovvey, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., Banfield,

- J. F. : Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment, *Nature*, Vol.428, No.6978, pp.37-43, 2004.
- 4) Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulse, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Neelson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkuch, C., Rogers, Y. H. and Smith, H. O. : Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, Vol.304, No.5667, pp.66-74, 2004.
- 5) Rothauwe, J. H., Witzel, K. P., and Liesack, W. : The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.63, pp.4704-4712, 1997.
- 6) Hales, B. A., Edwards, C., Ritchie, D. A., Hall, G., Pickup, R. W., and Saunders, J. R. : Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.62, pp. 668-675, 1996.
- 7) 阿部憲一, 荒木信夫, 井町寛之, 角野晴彦, 山口隆司, 西尾尚道 : 硫黄の酸化還元サイクルを活性化した下水処理システム内の硫酸還元機能遺伝子の解析と定量, 水環境学会誌, Vol.28, No.8, pp.501-507, 2005.
- 8) Hodson, R. T., Dustman, W. A., Garg, R. P. and Moran, M. A. : In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.61, No.11, pp.4074-4082, 1995.
- 9) Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, K., Tani, K. and Nasu, M. : Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.69, No.8, pp.5023-5028, 2003.
- 10) Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, K., Tani, K. and Nasu, M. : Visualization and enumeration of bacteria carrying a specific gene sequence by in situ rolling circle amplification, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.71, No.12, pp.7933-7940, 2005.
- 11) Zwirgmaier, K., Ludwig W. and Schleifer, K.-H. : Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization-RING-FISH, *Mol. Microbiol.*, Vol.51, No.1, pp.89-96, 2004.
- 12) Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., and Harada, H. : Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH), *J. Microbiol. Methods*, Vol.66, No.3, pp.521-8, 2006.
- 13) Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. and Amann, R. : Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.63, No.8, pp.3268-73, 1997.
- 14) 久保田健吾, 大橋晶良, 井町寛之, 原田秀樹 : メタン生成古細菌に TSA-FISH 法を適用するための細胞壁処理, 環境工学研究論文集, Vol.40, pp.363-371, 2003.
- 15) Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. and Harada, H. : *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol.50, pp.771-779, 2000.
- 16) Pemthaler, A. and Amann, R. : Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.70, No.9, pp.5426-5433, 2004.
- 17) Eckert, K. A. and T. A. Kunkel, : High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, Vol.18, No.13, pp.3739-44, 1990.
- 18) Ludwig, W., Dom, S., Springer, N., Kirchhof, G. & Schleifer, K. H. : PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes, *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.60, No.9, pp.3236-3244, 1994.

(2006. 5. 26 受付)

Visual detection of chromosomal encoded methyl coenzyme M reductase gene of a methanogen by two-pass tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization (two-pass TSA-FISH) with polydeoxyribonucleotide probes

Shuji KAWAKMI¹, Kengo KUBOTA¹, Hiroyuki IMACHI^{1,2}, Hideki HARADA^{1,3} and Akiyoshi OHASHI¹

¹Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

²Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Research Scientist Extremobiosphere Research Center

³ Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

Applicability and reliability of two-pass tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization (two-pass TSA-FISH) with PCR generated polydeoxyribonucleotide probes, specific for chromosomal encoded gene, methyl coenzyme M reductase (*mcr*) in *Methanococcus vannielii*, was tested and evaluated. The probes were labeled with dinitrophenol (DNP) and the efficiency of probe-labeling was improved by optimizing the concentrations of DNP-labeled nucleotide and Mg²⁺ in PCR mixture. The target *mcr* gene was successfully detected, which was again verified by the disappearance of the signals after treating the target with DNase prior to hybridization or washing with high stringency buffer. However, a few nonspecific signals were observed when the method was applied to pure cultures of *Methanoculleus bourgensis* and *Escherichia coli*.