

(75) *apsA* mRNA を標的とした FISH 法による 硫酸塩還元菌群の検出

大塚勇輝¹・橋本尚人¹・荒木信夫^{1*}
阿部憲一²・川上周司²・山口隆司²・珠坪一晃³

¹長岡工業高等専門学校 環境都市工学専攻 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町 888 番地)

²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 番地)

³独立行政法人国立環境研究所 水環境質研究室 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2 番地)

*E-mail: araki@nagaoka-ct.ac.jp

機能遺伝子の mRNA を標的とした FISH 法を汚泥サンプルに適用するために、高感度の検出システムである Tyramide signal amplification (TSA) -FISH 法と two-pass TSA-FISH 法を適用した。FISH 法の標的は硫酸塩還元菌が保有する Adenosine-5'-phosphosulfate リダクターゼ遺伝子 *apsA* の mRNA とした。内在性ペルオキシダーゼ活性による蛍光の消去は、メタノールで 1.5% に希釈した過酸化水素水による 30 分の処理で行ったところ、TSA-FISH 法では完全に消去したが、two-pass TSA-FISH 法では消去しきれなかった。細胞壁は、プロテアーゼ K とリゾチームによって処理したが、プロテアーゼ K は溶菌が顕著に見られたためリゾチームによる処理が最適であった。*apsA* mRNA に特異的な APS8R プローブを *Desulfovibrio vulgaris* にハイブリダイズしたところ、ほぼすべての細胞から蛍光シグナルが得られた。一方、RNase 処理した細胞ではシグナルは消失した。硫酸塩還元菌の集積を行った汚泥サンプルに対し、APS8R の TSA-FISH 法と硫酸塩還元菌の 16S rRNA を標的とするプローブ SRB385 との多重染色を試みた結果、APS8R と SRB385 の蛍光シグナルが一致した。

Key words: fluorescence in-situ hybridization, mRNA, adenosine-5'-phosphosulfate reductase gene, sulfate reducing bacteria, Tyramide signal amplification.

1. はじめに

複合微生物系内の微生物叢解析手法の一つに、微生物の 16S rRNA の塩基配列の違いから特定の微生物を検出し可視化する Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法¹⁾がある。この手法は、微生物の種や属といった系統的なレベルに応じてプローブを選択することで、系統的に近縁な微生物群を検出することが可能である。しかし、下廃水処理プロセス内で重要な役割を担う脱窒素細菌群や硫酸塩還元菌群などは、分子系統的に多様性が大きく、rRNA を標的とした FISH 法では網羅的に検出することは難しい。このような場合、あらかじめクローニング法や DGGE 法によって優占菌種を特定し、それらを個別に検出する手段を用いてきた。しかし、複合微生物系である下廃水処理プロセス内では優占菌種が変遷する可能性があり、同一機能を保有する細菌群を網羅して検出する方法が有効である。

近年、微生物の反応を触媒する酵素の遺伝情報である機能遺

伝子の塩基配列から微生物叢の解析が行われている。筆者らも亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirS* や Adenosine-5'-phosphosulfate (APS) リダクターゼ遺伝子 *apsA* の塩基配列情報を利用したクローニング解析から、排水処理装置内の脱窒素細菌群や硫酸塩還元菌群を網羅的に検出し、さらに Real-time PCR 法によりその菌数の変遷をモニタリングする技術を報告した^{2), 3)}。また、酵素が発現する際には、機能遺伝子の情報は mRNA に転写されることから、汚泥内の mRNA の転写量と *in-situ* における微生物活性との関連を Real-time PCR 法により調査してきた⁴⁾。こうした研究からも、機能遺伝子を対象とした解析が、下廃水処理プロセス内の微生物叢を解析する上で極めて有効な方法であるといえる。しかし、機能遺伝子を対象とした解析は、PCR 法を用いる手法が主であり、FISH 法を適用した例は少ない。これは、rRNA に比べ細胞内の存在数が極めて少ない mRNA を標的とすることから、既存の方法では感度が不足するという問題が理由の一つで

ある。

近年、メタン生成古細菌の mRNA を高感度に検出する two-pass TSA-FISH 法が報告された⁷⁾。two-pass TSA-FISH 法は、酵素触媒反応にシグナル増幅法の一つである TSA 法⁸⁾を二度繰り返すことで極めて高い検出感度を実現している。しかし、実験は純粋菌株での解析に留まっており、環境中の微生物群に適用可能であるかは不明である。この mRNA FISH を汚泥サンプルに適用することが可能となれば、多様性の大きい微生物群を系統分類の枠を超えて網羅的に検出することができるだけでなく、微生物の特定の機能から汚泥内の細胞を視覚化できることになる。

本研究では、機能遺伝子として硫酸塩還元菌群が共通して保有する *apsA* 遺伝子を選定した。硫酸塩還元菌は、有機物を分解する際に、硫酸塩を APS スルフィラーゼによりアデノシンホスホ硫酸 (APS) に、アデノシンホスホ硫酸を APS リダクターゼにより亜硫酸へ、亜硫酸を異化型硫酸還元酵素によって硫化水素に還元する^{9),10)}。*apsA* とはアデノシンホスホ硫酸を亜硫酸へ還元する酵素の一部をコードする遺伝子である。

本研究の目的は、硫酸塩還元菌の *apsA* mRNA を標的とした FISH 法を開発することである。さらに、硫酸塩還元菌群の 16S rRNA を標的とするプローブ SRB385¹¹⁾の多重染色を実施することにより、微生物の機能を基とした FISH 解析と分子系統を基とする従来の FISH 解析を同一視野で観察することを実現することである。

2. 実験方法

2.1 モデル微生物、汚泥サンプルの調整

モデル微生物は *Desulfovibrio vulgaris* (DSM644) を選定した。*D. vulgaris* は、Widdel 培地¹²⁾に主要有機源として乳酸を加えた培地にて 30°C で 3 日間培養した後、4%パラホルムアルデヒド [w/v] で固定した。

硫酸塩還元菌を含む汚泥サンプルとしては混合有機酸を主成分とする人工廃水 (COD/SO₄²⁻=20) を処理する UASB リアクターから採取したグラニュー汚泥を用いた。汚泥は採取後、硫酸塩と乳酸を主成分とした基質にて 37°C で 2 日間培養し、4%パラホルムアルデヒド [w/v] で固定を行った。

2.2 Clone-FISH 法

Clone-FISH 法は Schramm ら¹³⁾と Kubota ら⁷⁾の方法を組み合

わせて若干の変更を加えて行った。まず、菌体からビードビダ法¹⁴⁾を用いて DNA を抽出し、Gene Clean Kit (Q-BIO gene) を用いて精製を行った。次に *apsA* 遺伝子を標的とした APSdelta-F²⁾と APS *D. vulgaris* 1620R (表-1) を用いて PCR を行った。増幅した *apsA* 遺伝子断片は Gene Clean Kit で精製後、pCR 2.1 TOPO ベクター (Invitrogen) に挿入した。ライゲーション反応と NovaBlue (DE3) コンピテントセル (Novagen) の形質転換は、製造会社のプロトコールに準じて行った。インサートチェックは M13F と M13R (Gene Clean Kit に付属) プライマーペアにて行い、PCR 増幅産物のベクターへのインサート方向の確認は、M13F と APS *D. vulgaris* 1620R のプライマーペアを用いて行った。これらをさらに LB 液体培地にて一晩培養後、新しい培地 5 mL に培養産物 50 μL を加えて再培養した。O.D.₆₀₀ が 0.3~0.4 になったら、Isopropyl 4-D-thiogalactopyranoside (IPTG [TaKaRa]) を 1 mM になるように添加した。IPTG 添加 1 時間後に Chloramphenicol を 200 mg/L になるように加えた。その 5 時間後にサンプリングし、4%パラホルムアルデヒド [w/v] 固定を行った。

2.3 FISH 法

FISH 法は Sekiguchi ら¹⁵⁾の方法に準拠して行った。プローブには 5'末端に Cy3 を標識したものをを用いた。

2.4 TSA-FISH 法

TSA-FISH 法は、Kubota らの方法⁷⁾に若干の変更を加えて行った。プロトコールを表-2 に示す。まず、高撥水性印刷スライドガラス (松浪硝子) を 3%過酸化水素水に 10 分間浸して RNase-free にした。その後、サンプルを 1% 低融点アガロース (Invitrogen) にて包埋し、スライドガラスにマウントした。その後、60°C で急速に乾燥させ、50, 80, 96%エタノールにそれぞれ 3, 1, 1 分間浸して脱水を行った。細胞壁処理は、TE バッファー (10mM Tris-HCl [pH7.5], 1mM EDTA [pH8.0]) で 1mg/mL に調整したリゾチームを各ウェルに 10 μL ずつ滴下し、Double distilled water (以後 DDW と略す) の湿潤チャンバー内で 37°C、30 分で反応させた。

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 (10% Dextran sulphate [w/v], DDW, 20mM Tris-HCl [pH7.5], 900mM NaCl, 1% Blocking reagent (Rcche) [w/v], 40% Formamide [v/v], 0.01% SDS [w/v]) を各ウェルにマウントし、

表-1 本研究で用いたプライマー及びプローブ

名称	塩基配列 (5' - 3')	位置 (bp) *	参考文献
プライマー			
APSdelta-F	TGG CAG ATC ATG ATC AA	350-367	2
APS <i>D. vulgaris</i> 1620R	GCA TCA TGA AGT TCT TG	1603-1620	this study
プローブ			
SRB385	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	385-402	11
APS8R	GCA CAT GTC GAG GAA GTC TTC	1139-1159	16

* APSdelta-F, APS *D. vulgaris* 1620R, APS8R は、*D. vulgaris* の *apsA* 遺伝子を基準とした塩基配列位置。SRB385 は *E. coli* の 16S rRNA を基準とした塩基配列位置。

表-2 本研究で用いた TSA-FISH 法と two-pass TSA-FISH 法のプロトコール

実験工程	ステップ	実験内容
アガロース包埋	1	スライドを3%過酸化水素水に10分間浸す。
	2	サンプルに1%低融点アガロースを混合し、スライドにマウントする。
	3	エタノールシリーズ (50, 80, 96%) に3, 1, 1分間浸し脱水後、風乾させる。
細胞壁処理	4	リゾチーム (1 mg/mL) を滴下し、37°C で10分間反応させる。
	5	DDWに1分間、96%エタノールに1分間浸し、風乾させる。
内在性ペロオキダーゼ活性の処理	6	1. 5%の過酸化水素を加えたメタノールにスライドを浸し、30分間反応させる。
	7	DDWに1分間、96%エタノールに1分間浸し、風乾させる。
プローブの交雑	8	プローブとハイブリダイゼーションバッファーを1:100で混合したものをスライドに滴下する。湿潤チャンパー内で40°C、2時間反応させる。
	9	42°C の洗浄バッファーに20分間浸し、プローブの洗浄を行う。
	10	TNTバッファーに15分浸す。(TSA-FISH法の場合、ステップ16へ)
TSA反応 (DNP標識チラミド)	11	DNP標識チラミドとAmplificationバッファーを1:50で混合したものをスライドに滴下し、室温で10分間反応させる。
	(11+)	Amplificationバッファーに10% Dextran sulphate, 1% Blocking reagentを加え、シグナルの向上を試みた。(実験結果は3.3参照。)
抗原抗体反応	12	TNTバッファーに室温で15分間浸す。
	13	TNBバッファーをスライドにマウントし、室温で30分間反応させブロッキングを行う。
	(13+)	TNBバッファーに20% Dextran sulphateを加えて抗原抗体反応の反応効率の上昇を試みた。(実験結果は3.2参照。)
	14	anti-DNP HRPとTNBバッファーを1:100で混合したものをスライドに滴下し、室温で30分間反応させる。
TSA反応 (FITC標識チラミド)	15	TNTバッファーに5分x3回浸し洗浄を行う。
	16	FITC標識チラミドとAmplificationバッファーを1:50で混合したものをスライドに滴下し、室温で10分間反応させる。
	(16+)	Amplificationバッファーに10% Dextran sulphate, 1% Blocking reagentを加え、シグナルの向上を試みた。(実験結果は3.3参照。)
	17	TNTバッファーに15分浸し洗浄する。その後、DDWに1分間、96%エタノールに1分間浸し、風乾させる。

+ : シグナル強度を高めるためにDextran sulphateをバッファーに加えた手順

ブロッキング反応を 40°C、1 時間で行った。次に、Horseradish peroxidase (HRP) 標識のプローブとハイブリダイゼーションバッファーを 1 : 100 の割合で混合したものを各ウェルに滴下し、湿潤チャンパー内で 40°C、2 時間で反応させた。その後、洗浄バッファーにスライドを浸し 42°C、20 分にてプローブの洗浄を行った。さらに、TNT バッファー (100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.05% Tween-20 [v/v]) に室温で 15 分間浸した。

FITC 標識の TSA 反応は、FITC 標識のチラミド溶液と Amplification バッファー (PerkinElmer) を 1 : 50 の割合で混合したものを滴下し、暗所で 10 分間反応させた。その後、スライド表面を DDW で軽く洗い流し、TNT バッファーに 15min, DDW に 1min, 96%エタノールに 1min 浸し、風乾させた。

2.5 two-pass TSA-FISH 法

two-pass TSA-FISH 法は、Kubota ら⁷⁾の方法に若干の変更を加えて行った。一回目の TSA 反応までを前述の TSA-FISH 法と同様の手順で行い、TSA 反応の際に FITC 標識のチラミドを DNP 標識のチラミドに置き換えて行った。反応後、TNT バッファーに 15 分浸して洗浄した。その後、各ウェルに TNB バッファー (20% Dextran sulphate [w/v], 0.1% Blocking reagent [w/v], 100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl) を 10 μ L 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 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 15 分間 (5 分 x 3) 浸し、余剰な抗体を洗浄した。二回目の TSA 反応は、FITC 標識のチラミドと Amplification バッファーを 1:50 で混合したものを各ウェルに 10 μ L 滴下し、室温で 10 分間反応させた。その後 TNT バッファーに計 15 分間浸して洗浄した後、DDW に室温で 1 分、96% エタノールに 1 分間浸し風乾させた。

本研究では、TSA 反応及び抗原抗体反応時のバッファーに Dextran sulphate と Blocking reagent を加えることでシグナル強度を向上させるための検討を行っている (後述)。詳細については、結果および表-2 に示した。

2.6 顕微鏡観察

FISH 法、TSA-FISH 法および two-pass TSA-FISH 法後には、4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) による対比染色を行い、褪色防止剤 (SlowFade Gold antifade reagent [Invitrogen]) で封入後、顕微鏡観察に供した。

顕微鏡には、落射蛍光顕微鏡 BX-60 (OLYMPUS) を使い、写真の撮影には CCD カメラ DP71 (OLYMPUS) を用いた。

3. 実験結果と考察

3.1 プローブの有効性の確認

apsA mRNA を可視化するために、機能遺伝子を標的とするプライマー-APS8R¹⁶ (表-1) を選定した。選定したプローブの特異性は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) の BLAST サーチにより調査した結果、APS8R とマッチする塩基配列は *apsA* 遺伝子だけであった。さらに、APS8R プローブと 1 ミスマッチを有するすべての塩基配列を用いて、NCBI に登録されている塩基配列情報との比較を行った結果、APS8R と 2 ミスマッチ以内で検出される塩基配列は存在しなかった。したがって、実験条件を十分に検討すれば APS8R の特異性は確保できると判断し、プローブとして用いることとした。

Kubota ら⁷ は、mRNA を標的とした FISH 法を行う際に、機能遺伝子を標的とするプライマーが *in situ* hybridization (ISH) 法に適用可能であるかを Clone-FISH 法により評価している。本研究でも同様に APS8R プローブの有効性について検討した。

まず、Cy3 標識の APS8R プローブを用い、順方向にインサートされたプラスミドを有する大腸菌に対し FISH 法を行った。ハイブリダイゼーションバッファー中のホルムアミド (FA) 濃度を段階的に変えることで交雑のストリンジエンシーを変化させ、最適 FA 濃度を検討したところ、十分な感度をもって検出可能であった FA 濃度 40% を最適条件と判断した。また、逆方向にインサートされたプラスミドを有する大腸菌からは、シグナルは得られなかった。このことから、APS8R プローブは標的遺伝子から発現した RNA に特異的に結合していると思われる。

次に、HRP 標識の APS8R プローブについて検討を行った。両大腸菌サンプルに対し TSA-FISH 法を適用したところ、先と同様の結果が得られ、最適 FA 濃度は 40% であった。

これらの結果から、HRP 標識の APS8R プローブも ISH 法に適用可能であり、*apsA* mRNA を検出できる可能性が示唆された。

3.2 *D. vulgaris* の *apsA* mRNA の検出

Clone-FISH 法により、APS8R プローブの有効性を確認した。次にモデル微生物である *D. vulgaris* を用い、細胞内の *apsA* mRNA が検出可能であるかを検討した。まず、内在性ペルオキシダーゼ活性の有無を確認した。プローブをハイブリダイズさせずに TSA 反応のみを行い顕微鏡観察を行ったところ、シグナルは全く観察されず、内在性ペルオキシダーゼ活性は確認されなかった。

次に、細胞壁処理の検討を行った。細胞壁処理の有効性は、Clone-FISH 法から得られた最適 FA 濃度を参考に、十分に *apsA* mRNA が検出可能と思われる FA 濃度 30% を用いて評価した。まず、プロテアーゼ K (1 mg/mL, 室温, 10 分) を用いたところ、溶菌が顕著にみられた。これについては、他の研究者も指摘している¹⁷⁾。そこで、リゾチーム処理 (1 mg/mL, 37°C, 30 分) に変更したところ、溶菌も観察されず、菌体からシグナルが得られた (データ非表示)。したがって、本研究ではリゾチーム処理を

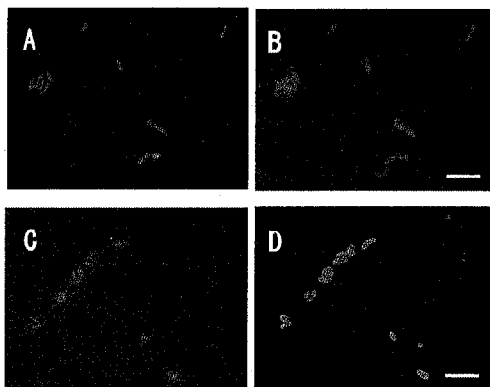


図-1 *D. vulgaris* に対して TSA-FISH 法, two-pass TSA-FISH 法を適用した顕微鏡写真。A,B:TSA-FISH 法。C,D:two-pass TSA-FISH 法。A,C は DAPI 染色観察視野。B,D は B 励起視野 (FITC) でそれぞれ同一視野。B,D における露光時間はそれぞれ 8sec, 4sec。スケールバーは 5 μ m。

適用することとした。

図-1 に *D. vulgaris* に対して TSA-FISH 法と two-pass TSA-FISH 法を適用した結果を示す。通常の FISH 法よりも高感度な TSA-FISH 法を用いたにも係らず、CCD カメラの露光時間が 8 sec と極めて微弱であった (図-1 B)。そこで、さらに高感度な two-pass TSA-FISH 法の適用を試みたが、得られた蛍光は TSA-FISH 法とほとんど変わらなかった (データ非表示)。TSA 反応を二回繰り返したにも係らずシグナル強度に差がみられないことから、抗原抗体反応の反応効率に問題があると考え、反応効率を上昇させるために抗原抗体反応のバッファーに 20% の Dextran sulphate を加えた (表-2 手順 13+)。その結果、シグナル強度が向上し、露光時間は 4 sec となった (図-1 D)。また、RNase で細胞内の RNA を消失させた *D. vulgaris* に対して APS8R プローブを用いた同様の操作を行ったところ、蛍光シグナルは全く観察されなかった (データ非表示)。これらの結果より、APS8R プローブにより細胞内の *apsA* mRNA の可視化が可能であることが確認できた。また、Clone-FISH 法と同様の方法で最適 FA 濃度の検討を行ったところ 40% であった。

TSA-FISH 法または two-pass TSA-FISH 法を適用する場合、細胞壁処理が重要な課題である。本研究では、前述したようにリゾチームによる処理を選定した。しかし、本研究でモデル微生物として選定した *D. vulgaris* はグラム陰性細菌であり、リゾチームによる処理が *Desulfotomaculum* 属のようなグラム陽性細菌¹⁸⁾ に対して有効であるかどうかは確認していない。汚泥サンプル内にはグラム陰性と陽性の細菌が混在していると思われるため、汚泥サンプルに対して mRNA FISH を適用する際には、細胞壁処理について更なる検討を行う必要がある。

3.3 汚泥サンプルの内在性ペルオキシダーゼ活性の消失

汚泥サンプル内には多種の微生物が混在しているため、内在性ペルオキシダーゼ活性による蛍光が確認された。この内在性

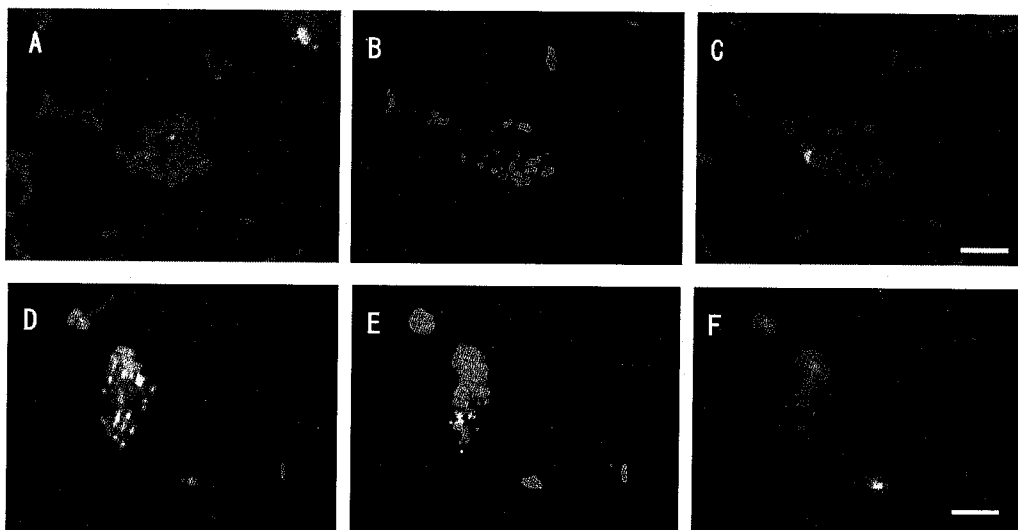


図-3 汚泥サンプルに対して TSA-FISH 法, two-pass TSA-FISH 法を適用した顕微鏡写真. A,B,C:TSA-FISH 法. D,E,F:two-pass TSA-FISH 法. A,D : DAPI 染色観察視野, B,E : B 励起視野 (FITC), C,F : G 励起視野 (Cy3) で A,B,C と D,E,F はそれぞれ同一視野. B,E における露光時間はそれぞれ 500msec, 140msec. C,F における露光時間はそれぞれ 1sec, 500msec. スケールバーは $5\mu\text{m}$.

ペルオキシダーゼ活性は、過酸化水素水を加えたメタノール処理¹⁹⁾によって取り除く事が出来た。しかし、同時に TSA 反応による蛍光シグナルも確認できなくなった。そこで、シグナル強度を高めるために TSA 反応時のバッファー (表-2 手順 11+, 16+) にも Dextran sulphate を添加した。図-2 に汚泥サンプルの two-pass TSA-FISH 法で観察された内在性ペルオキシダーゼ活性による非特異的な蛍光シグナルを示す。プローブをハイブリダイズさせずに TSA 反応を 2 回実施したところ、内在性ペルオキシダーゼ活性による蛍光強度も同時に増強され、蛍光シグナルが散見された。

一方、TSA-FISH 法において同様の操作で TSA 反応時のバッファーに Dextran sulphate を添加したところ、感度の向上がみられ、且つ内在性ペルオキシダーゼ活性による非特異的な蛍光を抑えることができた(データ非表示)。したがって、汚泥サンプルに対して mRNA FISH を適用する場合、TSA-FISH 法が有効であると判断した。

3.4 汚泥サンプルからの *apsA* mRNA の可視化と 16S rRNA との多重染色

mRNA を標的とした FISH 法は純粋菌株での報告例はあるが、実サンプルへの適用例は僅かである^{20,21)}。本研究では硫酸塩還元菌の増殖を促した汚泥サンプルから *apsA* mRNA の検出を試みた。図-3 B,E に汚泥サンプルに対して TSA-FISH 法と two-pass TSA-FISH 法を適用した結果を示す。D. *vulgaris* で得られた最適条件で APS8R をハイブリダイズし、前述したように TSA 反応時のバッファーに Dextran sulphate を添加したところ、両手法ともに APS8R の蛍光シグナルが十分な強度で得ることができた。また、RNase で細胞内の RNA を消失させた D. *vulgaris*

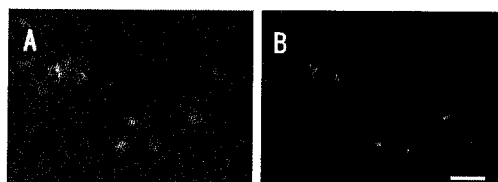


図-2 汚泥サンプルの two-pass TSA-FISH 法で観察された内在性ペルオキシダーゼ活性による非特異的な蛍光シグナル. A:DAPI 染色観察視野, B:B 励起の同一視野. B の露光時間は 500msec. スケールバーは $5\mu\text{m}$.

に対して APS8R プローブを用いた同様の操作を行ったところ、蛍光シグナルは全く観察されなかった(データ非表示)。しかし、two-pass TSA-FISH 法では内在性ペルオキシダーゼ活性による蛍光が十分に消失できていないため過大評価する可能性がある(図-3 E)。

汚泥サンプルから内在性ペルオキシダーゼ活性を消失させながら *apsA* mRNA の可視化が可能であった。これは、微生物の種に依らず *apsA* を転写している細胞を検出しており、言い換えれば微生物の機能の発現を視覚化したものである。FISH 法では従来の 16S rRNA を標的とした分子系統を基にした細胞の視覚化技術が普及している。そこで、微生物の機能の発現と分子系統による解析を蛍光顕微鏡の同一視野内で融合すべく、*apsA* mRNA を検出する APS8R プローブと硫酸塩還元菌の 16S rRNA を標的とする SRB385 プローブを用いた多重染色を試みた。まず、D. *vulgaris* を用いて多重染色が可能であるかを検討した。その結果、同じ細胞から APS8R と SRB385 のシグナルが得られ、多重染色が可能であることを確認した(データ非表示)。

図-3 C,F に汚泥サンプルへの SRB385 プローブの多重染色を

実施し、SRB385 プローブの Cy3 由来の蛍光シグナルを観察した結果を示す。この多重染色は、*apsA* mRNA に APS8R プローブをハイブリダイズし、TSA 反応を実施した後に Cy3 標識した SRB385 プローブを硫酸塩還元菌の 16S rRNA にハイブリダイズさせた。最後に DAPI による対比染色を行った(図-3 A,E)。硫酸塩還元菌の 16S rRNA を検出する SRB385 プローブの蛍光シグナルは検出された細胞によって強度の違いが大きい(図-3 C,F)。これは、検出された細胞内の 16S rRNA 量の違いが原因と考えられる。一方、APS8R プローブでは蛍光強度の違いは比較的小さい(図-3 B,E)。また、両者の蛍光シグナルはほぼ一致しており、*apsA* mRNA が転写されている細胞は硫酸塩還元菌由来の 16S rRNA を保持しているものと判断できる。再現性を確認するために同様の実験を 4 回行ったところすべてにおいて同様の結果が得られた。また、両プローブで検出した細胞の形態は多様であり、数種の硫酸塩還元菌が存在しているものと推定される。全体の菌数に対する硫酸塩還元菌の割合が非常に高いが、これは、採取してきた汚泥に対し硫酸塩還元菌の集積培養を行ったためと考えられる。

4. まとめ

mRNA を標的とした FISH 法の開発のため、硫酸還元機能遺伝子 *apsA* の mRNA を標的とした APS8R プローブを用いた TSA-FISH 法および two-pass TSA-FISH 法を適用し、以下の知見が得られた。

- 1) 汚泥サンプルからの *apsA* mRNA の可視化には、1mg/mL のリゾチームによる 30 min の細胞壁処理、メタノールで 5% に希釈した過酸化水素水による 30min の処理による内在性ペルオキシダーゼ活性の失活が有効であった。
- 2) APS8R プローブの TSA-FISH 法において FITC 標識のチラミド沈着反応時に Dextran sulphate と Blocking reagent を添加したバッファーを用いることにより、十分な感度で *apsA* mRNA を可視化することが可能であった。
- 3) two-pass TSA-FISH 法を汚泥サンプルに適用した場合、内在性ペルオキシダーゼ由来の非特異的な蛍光シグナルが観察された。
- 4) *apsA* mRNA を検出する APS8R プローブと硫酸塩還元菌の 16S rRNA を標的とする SRB385 プローブを用いた多重染色を汚泥サンプルに実施したところ両者の蛍光シグナルはほぼ一致した。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費(基盤研究(C)、課題番号 18560538)の助成を受けて遂行したものである。ここに記して、感謝の意を表する。

参考文献

- 1) Amann, R. I. : In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes,

Molecular Microbial Ecology Manual 3.3.6, pp. 1-15

- 2) 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, 28 (8), pp. 501-507, 2005
- 3) 塚本雄介, 荒木信夫, 長野晃弘, 山口隆司, 原田秀樹 : 都市下水処理流動床型脱窒素リアクターにおける優占脱窒素細菌の特定と機能遺伝子の定量, 水環境学会誌, 27, pp. 791-796, 2004
- 4) 押木守, 荒木信夫, 竹林賢, 長野晃弘 : 溶存酸素濃度および基質の C/N 比が脱窒素汚泥内の *nirS* mRNA 転写量に及ぼす影響, 水環境学会誌, 28 (11), pp. 683-687, 2005
- 5) A. Pernthaler, R. Amann : Simultaneous Fluorescence In Situ Hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 70, pp. 5426-5433, 2004
- 6) C. Bakermans, E. L. Madsen : Detection in coal tar waste-contaminated groundwater of mRNA transcripts related to naphthalene dioxygenase by fluorescent in situ hybridization with tyramide signal amplification, Journal of Microbiological Methods, 50, pp. 75-84, 2002
- 7) K. Kubota, A. Ohashi, H. Imachi, H. Harada : 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) , Journal of Microbiological Methods, 66, pp. 521-528, 2006
- 8) A. Pernthaler, J. Pernthaler, R. Amann : Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, 68 (6), pp. 3094-3101, 2002
- 9) G. Fritz, T. Buchert, H. Huber, K. O. Stetter, P. M. H. Kroneck : Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1 α β -heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes-high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism, FEBS Letters, 473, pp. 63-66, 2000
- 10) U. Kappler, C. Dahl : Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfate oxidation, FEMS Microbiology letters, 203, pp. 1-9, 2001
- 11) R. I. Amann, J. Stromley, R. Devereux, R. Key, D. A. Stahl : Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-Reducing Bacteria in Multispecies Biofilms, Applied and Environmental Microbiology, 58 (2), pp. 614-623, 1992
- 12) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, H. Harada : *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, pp. 771-779, 2000
- 13) A. Schramm, B. M. Fuchs, J. L. Nielsen, M. Tonolla, D. A.

- Stahl : Fluorescence in situ hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries, *Environmental Microbiology*, **4** (11), pp. 713-720, 2002
- 14) 中村明靖, 荒木信夫, 山口隆司, 山崎慎一, 大橋晶良, 原田秀樹 : Real-Time PCR 法と Competitive PCR 法を用いた *Nitrosomonas* 属の 16S rDNA 遺伝子及び *amoA* 遺伝子の定量, *環境工学研究論文集*, **39**, pp. 365-373, 2002
- 15) Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Sytsubo, A. Ohashi, H. Harada, K. Nakamura : Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology*, **144**, pp. 2655-2665, 1998
- 16) M. W. Friedrich : Phylogenetic Analysis Reveals Multiple Lateral Transfers of Adenosine-5'-Phosphosulfate Reductase Genes among Sulfate-Reducing Microorganisms, *Journal of Bacteriology*, **184** (1), pp. 278-289, 2002
- 17) S. Fazi, S. Amalfitano, I. Pizzetti, J. Pernthaler : Efficiency of fluorescence in situ hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content, *Systematic and Applied Microbiology*, **30**, pp. 463-470, 2007
- 18) K. Ishii, M. Mußmann, B. J. MacGregor, R. Amann : An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments, *FEMS Microbiology letters*, **50**, pp. 203-212
- 19) A. Norqvist, R. Roffey : Biochemical and Immunological Study of Cell Envelope Proteins in Sulfate-Reducing Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **50** (1), pp. 31-37, 1985

Development of Fluorescence *in-situ* Hybridization for Targeting *apsA* mRNA in Sulfate Reducing Bacteria

¹Yuki OHTSUKA, ¹Naoto HASHIMOTO, ¹Nobuo ARAKI,
²Kenichi ABE, ²Shuji KAWAKAMI, ²Takashi YAMAGUCHI, ³Kazuaki SYUTSUBO

¹Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology

²Dept. of Environmental System Engineering, Nagaoka University of Technology

³Water and Soil Environmental Division, National Institute for Environmental Studies

Fluorescence in situ hybridization (FISH) of intracellular mRNA in sulfate reducing bacteria was carried out with high sensitive detection systems such as tyramide signal amplification (TSA) and two-pass TSA. In addition Oligonucleotide probes of APS8R and SRB385 were used for detecting adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase gene (*apsA*) mRNA transcripts and 16S rRNA, respectively, derived from sulfate reducing bacteria. *Desulfovibrio vulgaris*, a model sulfate reducing bacterium, was chosen to refine the protocol. Specificity of APS8R and optimal hybridization stringency were tested with expression clones. To inhibit endogenous peroxidases, sludge sample taken from an UASB reactor was treated 30 min with 5% of hydrogen peroxide in methanol. The sample was also incubated 30min in 1 mg/mL lysozyme solution at 37°C for optimal cell permeabilization. Addition of dextran sulphate and blocking reagent to buffer solution in TSA step greatly enhanced fluorescence signal intensity of mRNA FISH. TSA-FISH was the more appropriate for visualizing *apsA* mRNA in sulfate reducing bacteria in the sludge sample.