

(64) 機能遺伝子を標的としたtwo-pass TSA-FISH法 による環境中未培養微生物の機能推定

長谷川 拓也¹・川上 周司^{1,2}・久保田 健吾^{1*}

井町 寛之³・大橋 晶良⁴・原田 秀樹¹

¹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)

²長岡技術科学大学大学院 エネルギー・環境工学専攻 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

³海洋研究開発機構 極限環境生物圏研究センター (〒237-0061 横浜賀市夏島町2-15)

⁴広島大学大学院工学研究科 社会環境システム専攻 (〒739-8527 東広島市鏡山1-4-1)

* E-mail: kengok@ep11.civil.tohoku.ac.jp

未培養微生物の機能を遺伝子レベルで推定するために、シングルセルレベルで機能遺伝子の視覚的検出が可能なポリヌクレオチドプローブを用いたtwo-pass TSA-FISH法を開発した。硫黄呼吸に関わるadenosine-5'-phosphosulfate reductase (*aps*) 遺伝子を標的とし、三株の硫酸還元能を有する純粋菌株を用いた系により、手法の感度、特異性およびプローブの長さによる影響について検討を行った。その結果、本手法はプローブ配列との相同性が65%程度以下の遺伝子は識別可能であり、また環境中の未培養微生物の機能遺伝子を高い信頼性で検出するためには、805 bpのプローブを用い、かつサンプルの適切な分散処理が必要であることが分かった。これらの知見を基に、嫌気性废水处理リアクターの汚泥から抽出したDNAをテンプレートとして合成したプローブを用いることで、汚泥中から*aps*遺伝子をもつ未培養微生物群を網羅的に検出し、それらの機能を、遺伝子情報を基に推定する事に成功した。

Key Words : polynucleotide probes, two-pass TSA-FISH, adenosine-5'-phosphosulfate reductase gene

1. はじめに

微生物機能の遺伝子レベルでの推定は、微生物の大部分が現在の我々の技術では分離・培養できていない現実を踏まえると、有効な方法の一つである¹⁾。環境メタゲノム解析などはその一例であり、微生物コミュニティそのものから未培養微生物の遺伝子を網羅的に解析することで、そこに存在する微生物コミュニティの機能を遺伝子レベルで解明するだけでなく、分離・培養によらず有用遺伝子の取得を行わんとするものである²⁾³⁾。しかし、このメタゲノム解析ではサンプルの全体像は掴めても、その中の個々の微生物がどんな役割・機能を持っているかを推定出来るのは極めて稀である⁴⁾。

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法は、微生物を遺伝子情報に基づき、シングルセルレベルで視覚的に検出可能な技術である⁵⁾⁶⁾。検出感度の問題からrRNAを標的とした分子系統学的分類に基づいた検出が主な用途であったが、近年では、感度の問題を克服し、細胞内コピー数の少ないmRNA⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾やゲノムに保存されている遺伝子そのものを検出する技術が報告されている。中でも遺伝子を検出する方法は、DNAがRNAに比べ安定である

こと、mRNAと異なり機能発現に依存しないことなどから、微生物の機能ポテンシャルを推定する上では、有用である。今日までに*in situ* PCR法¹¹⁾、*in situ* RCA法¹²⁾、*in situ* LAMP法¹³⁾、RING-FISH法¹⁴⁾など様々な技術が開発されてきた。これらの技術を用いれば、メタゲノム解析などで得られた遺伝子情報からシングルセルレベルで微生物の機能推定が可能になると考えられる。しかしながらこれらの技術にもプローブ設計が複雑である、特異性のコントロールが難しいなど、一長一短がある。

我々の研究グループでは、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⁷⁾とハブテンを多数標識可能なポリプローブを組み合わせることで、シングルコピー遺伝子が検出可能な技術を開発した¹⁵⁾。このtwo-pass TSA-FISH法は、原理的にはプローブ設計が容易であり、特異性をコントロールしやすく、シグナル増幅の操作がシンプルであるといった利点がある。しかし、先行研究では遺伝子相同性の低い非標的微生物からの非特異な蛍光を完全に消すことができず、実用的な技術には至っていないのが現状である。

そこで本研究では、two-pass TSA-FISH法とポリプローブを用いた微生物の機能遺伝子検出技術を微生物機能推定のための実用レベルにまで引き上げることを目的とした。検出感度を落とさずに特異的な検出を行うために、実験プロトコルの見直しに加え、プローブ長の短縮やレポーター基の標識数の高効率化などについて検討を行った。純粋菌株およびそれらを混合した系を用いて基礎的検討を行った後、嫌気性排水処理リアクター汚泥中に存在する*aps*遺伝子保持微生物の検出を行い、環境中に存在する未培養微生物の機能推定を行った。

2. 実験方法

(1) サンプルの調整

Desulfobulbus propionicus (DSM6523), *Desulfobulbus elongates* (DSM2908), *Desulfovibrio vulgaris* (DSM644) は Widdel 培地¹⁶⁾に DSMZ の指示する基質を加え 37°C で培養した。*Escherichia coli* K12 (ATCC700296) 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た。環境サンプルには、硫酸根を含む工場廃水を処理しているラボスケールの中温嫌気性リアクターから採取した汚泥を用いた。各サンプルは、4%パラホルムアルデヒドで固定後 (4°C, 12 h), エタノールと PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ [pH 7.4]) を 1:1 で混合した溶液中で -20°C で保存した。

(2) プローブ合成

プローブ合成は PCR 法を用いた川上らの方法¹⁵⁾に準拠した。PCR 反応液に添加するテンプレート DNA 及びプライマーセットを変えることで、プローブ配列および長さを調整した。プローブ合成のためのテンプレート DNA は、MagExtractor (TOYOBO) を用いて *Dsb. propionicus* (純菌株を用いた検討用) もしくは汚泥サンプルから抽出したゲノム DNA を用いた。純菌株を用いた検討においては、プライマーセットに RH3-RH2 (増幅塩基長: 137 bp), RH3-APS-RV (512 bp), RH3-APS8-R_pro (805 bp) を用い、長さの異なる三種類のプローブを合成し、さらに汚泥サンプルには RH3-APS8-R (増幅塩基長: 805 bp) を用いた (表-1)。

PCR は、PCR 反応液 (1×PCR バッファー, 200 μM dVTP [V = A, C, G], 0.025 U/μl Taq polymerase, 0.5 pmol/μl の各プライマー, dUTP-11-DNP [40–60 μM], dTTP [dUTP-11-DNP との合計が 200 μM になるように 140–160 μM], Mg²⁺ 溶液 [1.5–4.5 mM]) 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、50–55°C-30 秒、72°C-5 分、45 サイクルの条件で行った。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 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies) を用いて dUTP-11-DNP の取り込みを確認した。また、精製したプローブの濃度は分光光度計 Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) にて測定した。プローブ合成の際には、添加する dUTP-11-DNP 濃度、Mg²⁺ 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¹⁵⁾。

(3) サンプルの前処理

サンプルは 10 穴の高撥水性印刷スライドガラス (松浪硝子) にアガロースで包埋して固着させた²⁰⁾。サンプルを分散させてスライドガラスに固着させる時は、まずポリカーボネートフィルターに菌体を集菌し、菌体補足面がスライドガラスに接するように乗せ、室温で乾燥させた。乾燥後、フィルターを緩やかに剥がし、フィルター上に補足された菌体をスライドガラスに転写した。なお汚泥サンプルについては、スライドに固着もしくはフィルターに集菌する前に超音波処理を行った。その後、50, 80, 96% のエタノールにそれぞれ 3, 1, 1 分間浸して脱水を行った。

続いて菌体内の RNA を消化するために、RNase 溶液 (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 滴下し、37°C で 30 分間反応させた。次に、リゾチーム溶液 (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) を 15 μl 滴下し 37°C で 30 分間反応させ細胞壁を処理した¹⁰⁾。その後、TNT バッファー (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) に 10 分間、超純水に 1 分間浸して洗浄し、最後に 96% エタノールに 1 分間浸して脱水、乾燥させた。

表-1 プローブ合成に使用したプライマー

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
RH3-aps-F_S	CTG TTY GAR GAG TGG GG	17	355-371	17) を一部変更
APS-RV_D	GGG CCG TAW CCG TCY TTG AA	20	847-866	18)
RH2-aps-R_S	CCG TTG ATC ATG ATC TGC CA	20	472-491	17) を一部変更
APS8-R_pro	GAA CAT ATC CAG GAA ATC TTC	21	1139-1159	19) を一部変更
APS8-R	GCA CAT GTC GAG GAA GTC TTC	21	1139-1159	19)

^a Y (C, T); R (A, G); W (A, T) ^b プライマー結合部位は *Dsb. propionicus* の *aps* 遺伝子を基準

(4) TSA-FISH 法

TSA-FISH法は、川上らの方法¹⁵⁾に若干の変更を加えて行った。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 (0.5×SSC [1×SSCは150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0], 60%ホルムアミド, 10% Dextran sulphate, 1% Blocking reagent [Roche], 0.1% SDS, 1×Denhardt's solution, 0.2 mg/ml Salmon DNA) を各ウェルに15 µl滴下し、46°Cで30分間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、125 pg/µlのプロープ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46°Cで30分間放置後、95°Cで20分間の熱変性を行い、さらに46°Cで8時間以上反応させた。その後、48°Cのウォッシュバッファー1 (0.5×SSC, 60%ホルムアミド) に30分×2回、ウォッシュバッファー2 (0.5×SSC, 0.01% SDS) に15分×2回浸し、プロープの洗浄を行った。

プロープの洗浄後、TNBバッファー (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.5% Blocking Reagent [PerkinElmer]) 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で混合したものを、先に滴下してあるTNBバッファーと置換し室温で30分間抗原抗体反応を行った。反応後、スライドをTNTバッファーに計30分間 (20分×1回, 10分×1回) 浸し、余剰な抗体を洗浄した。

TSA反応は、tyramide-Cy3とamplification buffer (0.5× plus Amplification Diluent, 0.1% blocking reagent (Roche), 20% dextran sulphate) を1: 50で混合したものを各ウェルに15 µl滴下し、37°Cで15分間反応させた。その後、スライドを48°CのTNTバッファーに計20分間 (10分×2回) 浸した。さらに、超純水に室温で1分間、エタノールに1分間浸し風乾させた。

(5) Two-pass TSA-FISH法

Two-pass TSA-FISH法は、川上らの方法¹⁵⁾に若干の変更を加えて行った。一回目のTSA反応までをTSA-FISH法と同様の操作で行い、tyramide-Cy3をtyramide-DNPに置き換えて行った。

スライド洗浄後、TNBバッファーを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で混合したものを、先に滴下してあるTNBバッファーと置換し室温で30分間、抗原抗体反応を行った。反応後、スライドをTNTバッファーに計20分間 (10分×2回) 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15 µl滴下し、37°Cで15分間反応させた。その後、48°CのTNTバッファーに計

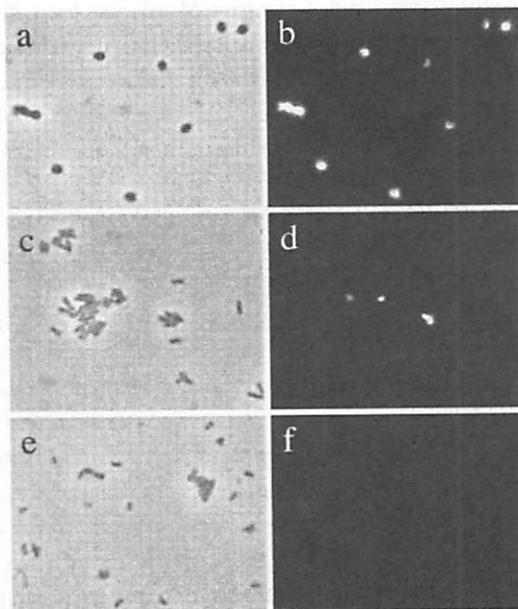


図-1 Two-pass TSA-FISH 法による *aps* 遺伝子の検出。プロープは 805 bp で *aps* 遺伝子を標的。(a), (b)は *Dsb. propionicus*, (c), (d) は *Dsb. elongates*, (e), (f) は *Dsv. vulgaris*。(a), (c), (e) は位相差視野, (b), (d), (f) は G 励起視野で両者はそれぞれ同一視野。露光時間は 20 ms。

20分間 (10分×2回) 浸し洗浄した。さらに超純水に室温で1分間、エタノールに1分間浸し風乾させた。

3. 実験結果及び考察

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

Dsb. propionicus のゲノムDNAをテンプレートとして合成したプロープを用いて *Dsb. propionicus* の *aps* 遺伝子の検出を試みた。まず、805 bp のプロープを用いて two-pass TSA-FISH法を行ったところ、菌体全体から極めて強い蛍光を得ることができた (図-1 a, b)。また、ネガティブコントロールとして *aps* 遺伝子を持たない *E. coli* を用い、識別を試みた。ハイブリダイゼーションバッファー中のホルムアミド濃度を変え、プロープの交雑条件を最適化することで両者の識別が可能であった (データ非表示)。

次にプロープの長さが遺伝子検出に及ぼす影響について検討した。512 bp, 137 bp のプロープを用いて *Dsb. propionicus* の検出を試みたところ、菌体から蛍光を得ることができた。しかし、検出率はプロープが短くなるにつれて低下する傾向が見られた (表-2)。また、得られた蛍光にも違いが見られた。805 bp のプロープを用いた場合は菌体全体から得られていた蛍光が、プロープが短くなるにつれて菌体の一部分のみの蛍光に変わっていった。このような現象は *aps* 遺伝子以外の機能遺伝子 (メタ

ン生成古細菌の methyl coenzyme M reductase [*mcr*] 遺伝子, 大腸菌の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*GAPDH*] 遺伝子など) を標的とした際にも同様に見られた。しかし, 検出率に関しては遺伝子の種類によっては状況が異なり, 中には150 bpのプロープを用いた際でも80%近い検出率を達成できるものもある(データ非表示)。検出率の低下や蛍光が菌体の一部分から得られる原因について詳細は不明であるが, その因子として標的遺伝子領域のGC含量, 熱変性後のハイブリダイゼーション時におけるプロープの高次構造の影響などが考えられる。

Two-pass TSA-FISH法で得られる蛍光が極めて強かったため, TSA反応を一度しか行わないTSA-FISH法でも *aps* 遺伝子の検出が可能か検討した。まず, 805 bpのプロープを用いて *Dsb. propionicus* に対しTSA-FISH法を行ったところ, two-pass TSA-FISH法に比べ微弱ながらも, 十分な感度をもって検出することができた(図-2)。しかし, 得られた蛍光は菌体の一部分からのみであった。さらに短いプロープに対しても同様の検討を行ったが, two-pass TSA-FISH法を用いた際に比べ検出率, 蛍光強度はさらに低下した。川上らは, TSA-FISH法では遺伝子を検出することが出来なかったと報告しているが, 本研究でこれと異なる結果が得られた理由として, 交雑前の熱変性の温度を従来の80°C¹⁵⁾から95°Cに上昇させたこと, ハイブリダイゼーション時の温度を変化させたことによりプロープが菌体内でネットワークを形成する可能性があること²¹⁾, またプロープ合成の際に添加する dUTP-11-DNP濃度, Mg²⁺濃度, アニール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¹⁵⁾ことで, より多くのハプテンを取り込んだプロープが合成できたことなどが挙げられる。これら結果より遺伝子検出におけるTSA-FISH法の適用可能性が示されたが, 菌体全体から蛍光が得られること, 検出率が低いこと, TSA-FISH法とtwo-pass TSA-FISH法の特異性が殆ど変わらないこと(後述)を踏まえると,

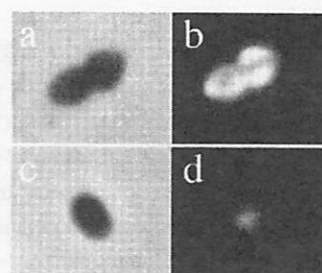


図-2 Two-pass TSA-FISH 法と TSA-FISH 法で得られる蛍光の形状の違い。(a), (b)は two-pass TSA-FISH 法, (c), (d) は TSA-FISH 法による検出。(a), (c) は位相差視野, (b), (d) は G 励起視野で両者はそれぞれ同一視野。露光時間は (b)20 ms, (d)67 ms。

two-pass TSA-FISH法の方が適切であると言える。

(2) 本手法の特異性

本技術の特異性について, *Dsb. propionicus*, *Dsb. elongatus* (*Dsb. propionicus*のゲノムDNAをテンプレートとして合成したプロープに対する塩基配列相溶性が90%程度), *Dsv. vulgaris* (同65%程度)の三株を用いて検討を行った。まず, 805 bpのプロープを用いるところ, *Dsb. propionicus*と*Dsv. vulgaris*の識別は可能であったが, *Dsb. elongatus*との識別は困難であった(図-1及び表-2)。そこで, より近縁種でも識別できる可能性がある短いプロープ(512, 157 bp)での識別を試みたが, これらのプロープを用いてもやはり*Dsb. propionicus*と*Dsb. elongatus*の識別は困難であった。なおTSA-FISH法でも同様の結果が得られた。Ludwigらも150-400 bpのポリプロープで識別可能な相溶性の閾値は85-75%であるという報告をしている²²⁾。ポリプロープを用いると, 1塩基ミスマッチあたりの交雑エネルギー変化量が小さくなる。従ってオリゴヌクレオチドプロープの様に, 1塩基ミスマッチを識別することは困難になる。しかしながら機能遺伝子を標的とした場合, 遺伝子配列相溶性が80-90%あれば, タンパク質の相溶性は高い場合が多く, 機能的に同一であることが

表-2 本手法の検出レンジと検出率^{a)}

用いた微生物の遺伝子配列 (accession number)	モデル微生物の <i>apsA</i> 遺伝子 との相溶性 (%) ^{b)}	プロープ長の違いによる検出の可否 ^{c)}		
		805 bp	512 bp	137bp
<i>Dsb. propionicus</i> (EF442935)	100	+++	++	+
<i>Dsb. elongatus</i> (AF418146)	90.1	++	+	+
<i>Dsv. vulgaris</i> (Z69372)	65.4	-	-	-
<i>E. coli</i>	<<60	-	-	-

^{a)} 検出率とは, 全細胞に占める蛍光が得られた細胞の割合を指す。

^{b)} 本研究で用いた *Dsb. propionicus* と同一菌株の遺伝子配列はNCBI のデータベースになかったため近縁種のものを用いた。
E. coli は *apsA* 遺伝子をもたず, また相溶性の高い配列領域は存在しなかった。

^{c)} 図中の '+++' は検出率95%以上, '++' は50%以上, '+' は50%以下, '-' は1%以下を示している。

予想されるため²³⁾、遺伝子配列情報から微生物機能を推定する上では十分な特異性を有していると考えられる。

次に、環境サンプルを想定し微生物を混合した系においても同様の検討を行った。*Dsb. propionicus*, *Dsv. vulgaris*を混合させて両者の識別を試みたところ、ほぼ両者を識別可能であったが、*Dsb. propionicus*に隣接する*Dsv. vulgaris*からのみ非特異な蛍光が得られた。我々はこの原因が、ポリプローブのネットワーク形成が菌体の外側まで広がり、そのプローブを起点としてTSA反応が起き、tyramideが*Dsb. propionicus*と隣接する*Dsv. vulgaris*にも沈着したためであると考えた。Zwirgmaierらは高濃度のプローブを長時間交雑させるとポリプローブ同士がネットワークを形成することを報告している²¹⁾。そこで、プローブ濃度を下げ、交雑時間を短くすることで問題の解決を試みたが、非特異な蛍光を完全に消すことはできなかった。そこで、菌体同士を分散させることが重要であると考え、ポリカーボネートフィルターに集菌してから菌体をスライドに転写させたところ、菌体の隣接を避けてスライドに固着させることができ、*Dsb. propionicus*のみを特異的に検出できた(図-3)。従って、本手法を用いて検出を行う場合、菌体を適切に分散させる前処理が必要である。

(3) *aps*遺伝子保持微生物の網羅的検出による環境中未培養微生物の機能推定

純粋菌株を用いた実験から得られた知見を基に、嫌気性汚泥サンプルに本手法を適用し、*aps*遺伝子を保持する微生物の網羅的検出を試みた。高い信頼性で検出するために、1) サンプルを十分に分散させ、2) 汚泥サンプルから抽出したDNAをテンプレートして合成した805 bpのプローブを用い、3) 菌体全体から蛍光を得るためにtwo-pass TSA-FISH法を適用した。

汚泥サンプルに本手法を適用する前に、サンプル中に内在性ペルオキシダーゼ活性を有する微生物が存在しないか確認する必要がある。プローブの交雑反応を行わずtwo-pass TSA反応のみを行ったところ、蛍光は得られなかった。このことから、このサンプルには手法を適用するに当たり障壁となるほどの内在性ペルオキシダーゼ活性を有する微生物が存在しないことが確認できた。そこで上述の条件を満足する実験を行ったところ、一部の菌体から蛍光を得ることができた(図-4)。プローブが存在しない状態では菌体から蛍光は得られなかったこと、交雑条件を厳しくすると蛍光が消えたことから、得られた蛍光は標的遺伝子にプローブが交雑したことによるものであると考えられた。これにより、汚泥サンプル中から検出された微生物は*aps*遺伝子を保有していると推察され、それらは硫黄呼吸に関わっている微生物群である可能性が示唆された。

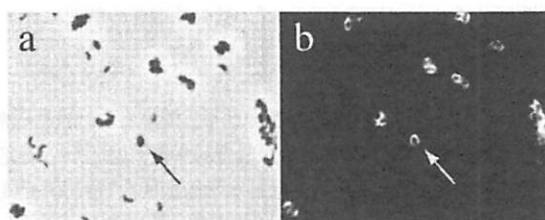


図-3 Two-pass TSA-FISH法による混合系での*aps*遺伝子の検出。*Dsb. propionicus*(球菌、矢印)、*Dsv. vulgaris*(桿菌)を混合している。(a)は位相差視野、(b)はG励起視野で同一視野。露光時間は5 ms。

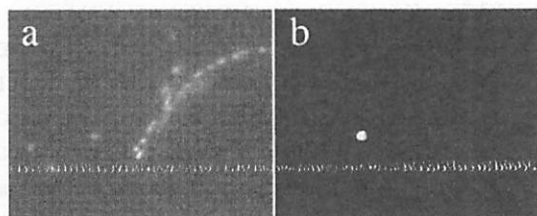


図-4 Two-pass TSA-FISH法による環境中*aps*遺伝子の検出。環境サンプルには嫌気性排水処理リアクターの汚泥を使用。プローブは805 bpで*aps*遺伝子を標的。(a)はDAPI染色視野、(b)はG励起視野で同一視野。露光時間は20 ms。

(4) 本研究の位置付けと展望

本研究ではtwo-pass TSA-FISH法を用いることで、環境中から遺伝子情報に基づき微生物を検出することに成功した。これまでも微生物の機能遺伝子を検出することで機能を推定する技術がいくつか報告されているが、それらは標的遺伝子を増幅するか¹¹⁾¹²⁾¹³⁾、しないか¹⁴⁾で大別され、本手法は後者のグループに含まれる。前者は細胞内で標的遺伝子を特異的に増幅するため、増幅効率の他、増幅産物を検出するためのプローブ設計が複雑になる場合がある(増幅部分の遺伝子情報が必要など)。後者の代表的な方法にRING-FISH法¹⁴⁾²⁴⁾があるが、RNaseの混入を防ぐための実験環境が要求され、かつ特異性のコントロールが難しい。一方、本手法は、PCRで合成したプローブの特異性はハイブリダイゼーション時に容易にコントロール可能であり、またDNAプローブを用いているため取り扱いが容易である。蛍光増幅反応も本研究により最適化されており、プローブの交雑条件さえ決定すればどのような遺伝子にも適用可能である(メタン生成古細菌の*mcr*遺伝子、大腸菌の*GAPDH*遺伝子などに確認済み、データ非表示)。またプライマーペアにより増幅される遺伝子配列情報は、検出プロセスに限れば必要ない。

本手法は特定の機能ポテンシャルを有すると思われる微生物を視覚的に同定することができ、未培養微生物の機能を推定する際の強力な手法になると思われる。今後rRNAを標的としたFISH法との同時染色などを行うことにより、rRNA遺伝子に基づく分子系統学的分類と関

連付けることが可能となれば、微生物機能の解明に大きく貢献しうる技術になると言える。

謝辞：本研究は、科学研究費補助金、環境省 環境技術開発等推進費、(財) クリタ水・環境科学振興財団から研究費補助を受けた。また川上は日本学術振興会 特別研究員奨励費を受けた。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- 1) Hugenholtz, P.: Exploring prokaryotic diversity in the genomic era, *Genome Biol*, vol. 3, pp.REVIEWS0003, 2002.
- 2) Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers, and H. O. Smith. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, vol. 304, pp.66-74, 2004.
- 3) Tyson, G. W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E. E. Allen, R. J. Ram, P. M. Richardson, V. V. Solovyev, E. M. Rubin, D. S. Rokhsar, and J. F. Banfield. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment, *Nature*, vol. 428, pp.37-43, 2004.
- 4) Frigaard, N. U., A. Martinez, T. J. Mincer, and E. F. DeLong. Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea, *Nature*, vol. 439, pp.847-50, 2006.
- 5) Amann, R. L., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol Rev*, vol. 59, pp.143-69, 1995.
- 6) Amann, R., and B. M. Fuchs. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques, *Nat Rev Microbiol*, vol. 6, pp.339-48, 2008.
- 7) Kubota, K., A. Ohashi, H. Imachi, and 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), *J Microbiol Methods*, vol. 66, pp.521-8, 2006.
- 8) Pentthal, A., and R. Amann. Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria, *Appl Environ Microbiol*, vol. 70, pp.5426-33, 2004.
- 9) Coleman, J. R., D. E. Culley, W. B. Chrisler, and F. J. Brockman. mRNA-targeted fluorescent in situ hybridization (FISH) of Gram-negative bacteria without template amplification or tyramide signal amplification, *J Microbiol Methods*, vol. 71, pp.246-55, 2007.
- 10) 大塚勇輝, 橋本尚人, 荒木信夫, 阿部憲一, 川上周司, 山口隆司, 珠 坪一晃. apsA mRNA を標的とした FISH 法による硫酸還元菌群の検出, *環境工学研究論文集*, vol. 44, pp.633-639, 2007.
- 11) Hodson, R. E., W. A. Dustman, R. P. Garg, and M. A. Moran. In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities, *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, pp.4074-82, 1995.
- 12) Maruyama, F., T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. Visualization and enumeration of bacteria carrying a specific gene sequence by in situ rolling circle amplification, *Appl Environ Microbiol*, vol. 71, pp.7933-40, 2005.
- 13) Maruyama, F., T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification, *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, pp.5023-8, 2003.
- 14) Zwirgmaier, K., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization-RING-FISH, *Mol Microbiol*, vol. 51, pp.89-96, 2004.
- 15) 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 原田秀樹, 大橋晶良. Two-pass TSA-FISH 法によるメタン生成古細菌の mcr 遺伝子の検出, *環境工学研究論文集*, vol. 43, pp.143-148, 2006.
- 16) Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 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*, vol. 65, pp.1280-8, 1999.
- 17) Ben-Dov, E., A. Brenner, and A. Kushmaro. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using dsrA and apsA genes, *Microb Ecol*, vol. 54, pp.439-51, 2007.
- 18) Deplancke, B., K. R. Hristova, H. A. Oakley, V. J. McCracken, R. Aminov, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract, *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, pp.2166-74, 2000.
- 19) Friedrich, M. W.: Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms, *J Bacteriol*, vol. 184, pp.278-89, 2002.
- 20) Kubota, K., H. Imachi, S. Kawakami, K. Nakamura, H. Harada, and A. Ohashi. Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens, *J Microbiol Methods*, vol. 72, pp.54-9, 2008.
- 21) Zwirgmaier, K., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. Improved fluorescence in situ hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis, *Syst Appl Microbiol*, vol. 26, pp.327-37, 2003.
- 22) Ludwig, W., S. Dom, N. Springer, G. Kirchhof, and K. H.

- Schleifer. PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes, *Appl Environ Microbiol*, vol. 60, pp.3236-44, 1994.
- 23) Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H. -P. Koops, and M. Wagner. Phylogeneity of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys, *Appl Environ Microbiol*, vol. 66, pp.5368-82, 2000.
- 24) Pratscher, J., C. Stichtemoth, K. Fichtl, K. H. Schleifer, and G. Braker. Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (nirK) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples, *Appl Environ Microbiol*, vol. 75, pp.802-10, 2009.

(2009.5.22 受付)

Deciphering Uncultured Microorganism's Functions by Two-pass TSA-FISH targeting Functional Genes

Takuya HASEGAWA¹, Shuji KAWAKAMI^{1,2}, Kengo KUBOTA²
Hiroyuki IMACHI³, Akiyoshi OHASHI⁴ and Hideki HARADA¹

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

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

³Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

⁴Dept. of Social and Environmental Engineering, Hiroshima University

Two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes targeting functional genes for deciphering uncultured microorganism's functions was developed. The method was evaluated in terms of sensitivity, specificity, and the effects of the probe length using three sulfate reducing bacteria and the adenosine-5'-phosphosulfate reductase (*aps*) gene as a target. The use of longer probes showed reliable and strong signals. Appropriate sample preparation protocols, especially cell dispersion on the glass slide, were important for specific detection. Based on the findings using pure cultures, a protocol was developed for the application of the technique to environmental samples. Uncultured microorganisms having *aps* gene in sludge sample from anaerobic bioreactor were successfully detected and they were, thus, expected to be involved in sulfate respiration.