

東京大学大学院工学系研究科	○栗栖 太
同 上	佐藤 弘泰
同 上	味埜 俊
同 上	松尾 友矩

1. はじめに

蛍光DNAプローブとは、rRNAの塩基配列の中、標的とする種類の微生物にのみ特異的に存在する部分をターゲットとしたオリゴヌクレオチドに、蛍光標識をしたものである。このプローブを、アルデヒドなどで固定したサンプルに加え、蛍光顕微鏡で観察するのが、蛍光DNAプローブ法である。この方法は、複合微生物系における特定菌種の検出手法として、様々な系において応用が試みられている。しかしながら、本法を用いる際に常に注意しなければならない点として、サンプル自身をもつ蛍光（＝自家蛍光）があげられる。自家蛍光が誤陽性を引き起こす危険性があるからである。また生物学的水処理法や環境サンプルの解析に用いる場合、1）生物膜・活性汚泥フロック等におけるin situでの存在位置を知る、2）サンプル中の種の存在割合を知る、の2つの方向性が考えられる。このうち、2）の存在割合について調べる場合、蛍光DNAプローブ法で得られる画像の定量処理が問題となる。

本研究では、複数の励起光をサンプルにあてることにより、自家蛍光の判別を試みた。加えてこの自家蛍光の判別法を用いて、コンポストにおける微生物動態の解析を行った。またこれらの作業を、コンピュータの画像解析ソフトを用いて行うことによって、迅速化・客観化を図った。

2. 実験方法

サンプルには自家蛍光の大きいものとしてコンポスト（原料：下水汚泥・厨芥、準好気性処理）を選んだ。コンポストに20倍量の除菌水を加え、10Wで5分間超音波分散処理後、No.1のろ紙でろ過したものを蛍光プローブ法のサンプルとした。蛍光プローブ法については、Amannらの方法¹⁾によった。プローブに用いた標識は、XRITC (X-rhodamine isothiocyanate)及びCy5である。顕微鏡は、共焦点レーザースキャン顕微鏡（Leica社製、TCS-NT, Ar/Kr laser）を用いた。励起波長－蛍光側フィルター色指定の組み合わせは、488-BF530/30-緑（B励起に対応）、568-LP590-赤（G励起に対応・XRITC用）、647-LP665-青（Cy5用）（単位nm, BF: bandpass, LP: lowpass）である。

蛍光DNAプローブ法で得られる画像の解析および定量操作には、画像解析システム（Leica社製、Q600HR）を用いた。共焦点レーザースキャン顕微鏡により得られる画像ファイルにおいて、ある条件を満たす明るさを持つ範囲のみを選択し、プローブ由来の蛍光とみなした。通常の単励起光による観察の場合、画像はグレースケールとなるため、ある閾値以上の明るさを持つピクセルを選択した。このときの閾値設定には、Q600HRの自動検出機能、すなわちコントラストを基準にした自動的な閾値設定を用いた。また二重励起による観察の場合は、本研究の3.において閾値設定の方法を検討している。このようにして選択された範囲の定量方法には、面積と個数の両方が考えられる。ただし、個数を計数する場合、菌体が十分に分散されている必要があり、強固なクラスターを作るサンプルには不向きである。このため、本研究においては、面積による定量法を用いた。なお、実際の画像解析においては、スクリプトを書くことによって複数の画像を自動的に処理した。

3. 蛍光の二重励起による自家蛍光の判別

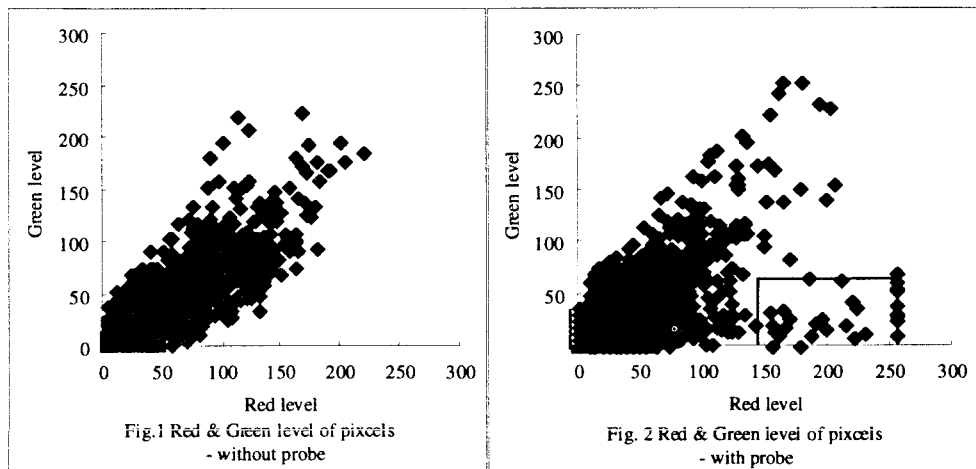
3.1 原理および定性的観察

多くの場合、自家蛍光は励起及び蛍光の波長帯域が広い²⁾。たとえば、B励起（緑色の蛍光に対応）とG励起（赤色の蛍光に対応）両方で同時に励起させた場合、自家蛍光のほとんどは両方で蛍光を発するため、緑+赤=黄の蛍光となって現れる。ここで、どちらか一方でしか蛍光を発しない蛍光物質をプローブの標識に用いれば、色の上でプローブ由来の蛍光と自家蛍光の判別が可能になる。そこで、実際にコンポストをサンプルとして実験を行った。

まず、サンプルにプローブを加えずにB,G二重励起をして観察した。赤及び緑にはっきりと蛍光持つものではなく全体的に黄色の蛍光画像を得ることができた。つぎに、XRITC標識したプローブを加えたものでは、ところどころにはっきりとした赤色の蛍光が菌体様の形状にみられた。これらの観察結果より、二重励起法においてもプローブによる特異的な菌体検出が可能であることが示唆された。

3.2 プローブ由来の蛍光の判別および定量

自家蛍光とプローブの標識由来の蛍光を定量的に判別するため、B,G二重励起の画像について解析した。Fig. 2とFig. 3は、得られた画像のうち約3600ピクセルについて、緑及び赤成分を256段階で表示し、プロットしたものである。蛍光標識プローブを加えていないものについては、画像は黄色系であり、Fig. 2では $y=x$ 付近に集中してくる。これに対して、XRITCで標識したプローブを加えたものでは、XRITC由来の蛍光を持つピクセルが赤色のレベルのみ大きくなって現れる。よって、緑色・赤色それぞれにある閾値 g, r を定め、閾値 r 以上に赤色が強く閾値 g より緑色が弱いピクセルのみを選択し、選択されたピクセル数を計数することによって、プローブ由来の蛍光を面積で定量できた。よって同様の操作を、比較対象となるようなプローブを用いて行うことによって、標的菌種の存在割合を面積比で求めることができる。



4. 蛍光DNAプローブ法を用いた微生物群集の定量解析例³⁾

4.1 サンプル

10gのコンポストをバイアル瓶に入れ、実験室で馴養された嫌気好気式活性汚泥(MLSS: 4000mg/L)を10ml加えた。バイアル瓶は密栓し、30℃に保った。好気性を保つため、サンプリングの都度瓶内の空気を外気と交換した。含水率は実験を通して55%前後で変化はなかった。このバイアル瓶から、適当な時間間隔でサンプルを取り、解析に供した。

4.2 解析手法

微生物群集の存在比として、全真正細菌数に対する各グループの割合を求めた。すなわち、比較対象としてEub338⁴⁾を用い、群特異的プローブとしてALF1b (Proteobacteria α 群)⁵⁾、BET42a (同 β 群)⁵⁾、GAM42a (同 γ 群)⁵⁾、CF319a (Cytophaga群)⁶⁾、HGC (グラム陽性高G+C群)⁷⁾を用いた。また、存在比は面積比で求めた。

群特異的プローブの標識には、すべてXRITCを用い、3.と同様二重励起をして赤色成分のみを検出した。自家蛍光を拾わないように閾値を設定し、赤140以上・緑63以下とした (Fig. 2 の四角で囲まれた部分)。

また、Eub338については、Cy5標識とした。Cy5の検出に用いるフィルターセットでは、XRITCに用いるものに比べ、サンプルの自家蛍光をかなり抑えることができた (Fig. 3)。よって、Eub338の検出には通常の単励起光による画像取り込みを用い、2.で示した自動検出により閾値を設定した。

4.3 結果

CO₂発生速度がピークとなる100時間後までと、それ以降では群集構造に大きな変化が見られた (Fig. 4, Fig. 5)。100時間後までは、植種した活性汚泥の菌相に近いものであった。しかし100時間後以降では、上記5種類のプローブでは検出できない細菌が優占となっていた。この細菌は、1 μ m程度の球菌であった。

5. おわりに

蛍光DNAプローブ法は、in situでの細菌種の同定のみならず、微生物群集における構成集団の存在割合を定量するためにも優れた方法である。本研究で用いた方法により、客観的に自家蛍光を判別でき、菌体量の計測が行えれば、より一層信頼性のある定量方法として用いることができる。また本手法は、落射蛍光顕微鏡や一般の画像解析ソフトウェアにおいても応用可能であろう。

<参考文献>

- 1) R. Amann, *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6, 1-15, 1995
- 2) R. Amann et al., *Microbial Rev.*, 59(1), 143-169, 1995
- 3) 栗栖 太ほか, 第13回日本微生物生態学会講要旨集, 76, 1997
- 4) R. Amann et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6), 1919-1925, 1990
- 5) W. Manz et al., *System. Appl. Microbiol.*, 15(4), 593-600, 1992
- 6) W. Manz et al., *Microbiology*, 142, 1097-1106, 1996
- 7) C. Roller et al., *Microbiology*, 140, 2849-2858, 1994

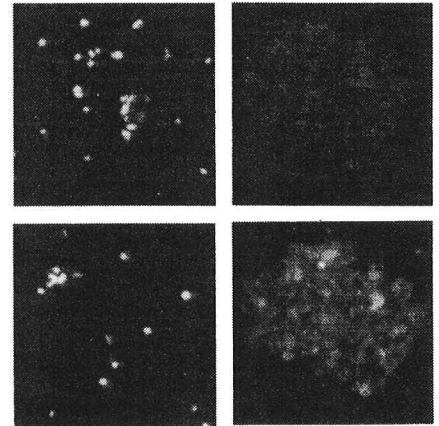


Fig. 3 Difference of autofluorescence depending on excitation wavelength.

upper: filter set for Cy5, photomultiplier voltage (PMT) 704V. lower: filter set for XRITC, PMT 584V.

left: fluorescence of Eub 338 labeled with Cy5 and XRITC, respectively. right: sample without probe, i.e. autofluorescence (Right-upper and right-lower are the same field).

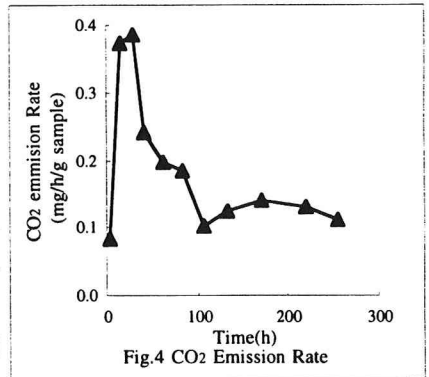


Fig.4 CO₂ Emission Rate

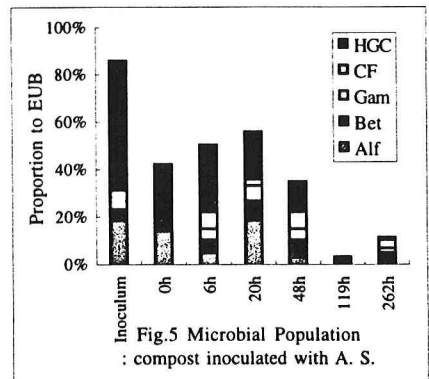


Fig.5 Microbial Population : compost inoculated with A. S.