

B-18 脱窒素細菌の *nirS* mRNA を標的とした FISH 法の開発

○ 橋本 尚人¹・荒木 信夫^{1*}・山口 隆司²・山崎 慎一³・長野 晃弘⁴

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高知工業高等専門学校 建築システム工学専攻 (〒783-8508 高知県南国市物部 200-1)

⁴三機工業 (〒242-0001 神奈川県大和市下鶴間 1742-7)

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

1. はじめに

近年、排水中に含まれる窒素化合物を除去するために、硝化脱窒法による生物学的窒素除去が行われている。しかし、このプロセスを担う脱窒素細菌は極めて多様性が大きいので、どの細菌群が処理に関与しているのかがブラックボックス化している。また、従来バイオマーカーとして用いられる 16S rRNA 遺伝子情報に基づいた脱窒素細菌叢を解析する場合、検出に多大な労力を要する。そこで近年では、多くの細菌群を一度に検出するために、その細菌群が共通して保有する機能遺伝子が注目されている¹⁾²⁾。酵素が発現する際、機能遺伝子部位から mRNA が転写される。この機能遺伝子の mRNA を可視化することができれば、多様性の大きい細菌群のうち実際に処理を行っている細菌群だけを網羅的に検出する事が可能となる。しかしながら、mRNA は 16S rRNA に比べ菌体内での存在量が少ないため、通常の FISH 法での検出は困難を極める。そこで、本研究では、脱窒素細菌が共通して保有する亜硝酸還元酵素遺伝子から転写される *nirS* mRNA を標的とした高感度 FISH 法の開発を試みた。

2. 研究方法

2.1 clustalX によるプローブの選定

プローブの選定は、これまでに開発された *nirS* 遺伝子部位を増幅する PCR プライマーから選定することとした。FISH プローブに用いることから混合塩基を含まずにできる限り多くの *nirS* 遺伝子にマッチするものを clustalX により検索した。また脱窒素細菌群を網羅的に検出可能か調べるため、現在 *nirS* 遺伝子部位が解読されている脱窒素細菌を標的とした。塩基情報は機能遺伝子部分が読まれている既知種の脱窒素細菌のシーケンスを NCBI から得た。

2.2 プローブの検証

選定したプローブが *nirS* mRNA の検出に有効であるかを検証する必要がある。しかしながら、mRNA は 16S rRNA と比べ存在量が少ないため Kubota ら³⁾は mRNA に対してプローブが有効に機能するかを確認するため Clone-FISH 法を適用した。*nirS* クローンの作成には純粋菌株 10 種のゲノムを用い、*nirS* 1F-6R のプライマーセットで *nirS* 遺伝子部位を増幅した。

2.3 Clone-FISH 法

Clone-FISH 法については Kubota ら³⁾の方法に若干の変更を加えて行った。TOPO TA cloning kit (Invitrogen) と NovaBlue(DE3)Competent cells (without E.coli) を用いて脱窒素細菌の *nirS* 遺伝子を持つ 9 種のポジティブコントロール細胞を作成した。PCR 産物を組み込んだ Competent cells を PCR 法により増幅させ、インサートチェックと方向性チェックで電気泳動によりバンドが確認できたものをポジティブコントロールとして用いた。また、インサートチェックはバンドが確認できたが、方向性チェックでバンドが確認できなかったものをネガティブコントロールとして用いた。

2.3 TSA-FISH 法

TSA(Tyramide Signal Amplification)-FISH 法は Kawakami ら⁴⁾の方法に準拠して行った。プローブは Clone-FISH 法に用いたプローブを Horseradish Peroxidase(HRP)標識オリゴヌクレオチドプローブに変更し、TSA 反応には tyramide-FITC を用いた。

3. 実験結果

3.1 ClustalX によるプローブの選定

ClustalX によるプローブの選定を行った結果、現在脱窒

素細菌の機能遺伝子を標的として作成された nirS-2F, nirS-6R 部位が多く既知種の nirS 脱窒素細菌を検出するのに最適であることがわかった。しかし、NCBI のデータベース内ではコンプリートゲノムが少なく、nirS-6R より先の塩基配列が不明な菌や、6R 部分の配列が読まれていない菌が多数存在した。そこで最も配列が読まれている nirS-2F の配列部分をプローブとした。しかしながら、nirS-2F は混合塩基を2つ含んでおり、nirS-2F の計4通りの配列の中から最も多くの脱窒素細菌を検出できると考えられるプローブを選定した。また Arb を用いて確認を行った所、ミスマッチなしで選定したプローブと結合する 16S rRNA は存在しなかった。プローブ塩基配列を表1に示す。

表1. 脱窒素細菌群の nirS に特異的なプローブ

名前	塩基配列 (Sequence) 5'-3'
nirS-2F CG	TACCACCCGAGCGCGCGT

3.2 Clone-FISH 法

TOPO TA cloning kit (without E.coli) と NovaBlue(DE3)Competent cells を用いて9種のポジティブコントロール細胞を作成した所、1種類のみしかプラスミドの増幅が確認できなかった。しかし、nirS 遺伝子をインサートした状態で PCR 法を行ったところ増幅が確認できた。よって Competent cells を Transfamation する際に菌体内で不合成が起こった可能性が示唆される。菌体内でプラスミドの増幅が確認できた *Pseudomonas stutzeri* を用い、Clone-FISH 法によってプローブの有効性の確認を行った結果、本研究で選定したプローブによって nirS mRNA の可視化を行うことが可能であった。最適ハイブリダイズ条件は 46℃、FA 濃度は nirS-2F CG が 35% であることが判明した。

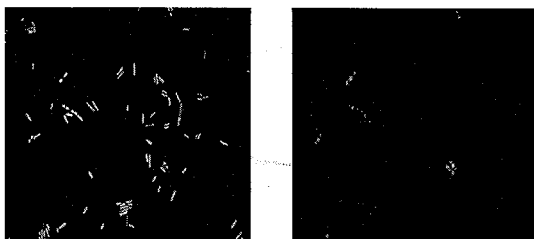


図1. Clone-FISH 法による Competent cells の DAPI 染色 (A)、cy3 標識のプローブによる nirS 遺伝子の染色

3.3 TSA-FISH 法

TSA-FISH 法を適用する際に大きな問題となるのが、HRP 標識プローブの浸透性である。HRP は蛍光分子に比べ非常に大きいため標的とする微生物に効果的な細胞壁処理による知見が必要となる。プロテアーゼ K (1 mg/ml,

室温 2min) を用いて細胞壁処理を行ったところ *Pseudomonas stutzeri* からシグナルを得ることができなかった。そこで、リゾチーム (1mg/ml, 室温 30min) で細胞壁処理を行ったところ菌体内からシグナルを得ることができた。よって Clone-FISH 法で nirS 遺伝子の可視化が確認できた *Pseudomonas stutzeri* と、同様に ClustalX 上ではパーフェクトマッチだった *Alcaligenes eutrophus* をこの条件を用いて TSA-FISH 法を行った結果、図2のようにシグナルを確認することができた。

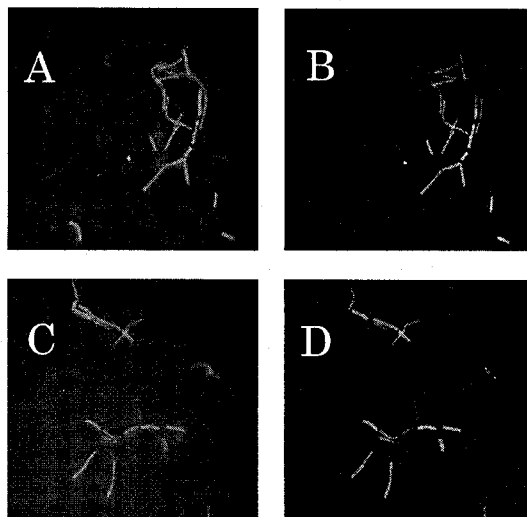


図2 TSA-FISH 法による *Pseudomonas stutzeri*(A)と *Alcaligenes eutrophus*(C) の DAPI 染色と tyramide-FITC による染色(B), (D)

しかし、TSA 反応を行ったところ HRP 標識のプローブをマウントしていないサンプルからも同様にシグナルが得られた。これは菌体内に存在する内在性ペルオキシターゼ活性による非特異的増幅であると強く示唆される。そこでメタノールで希釈した過酸化水素水 (終濃度 1.5%) に室温で 30min ひたしたところ、内在性ペルオキシターゼ活性を失活させることができた。今後は嫌気性状況下で培養し、nirS mRNA を転写した純粋菌株と *E.coli* を用いて TSA-FISH 法を行う予定である。

4. 参考文献

- 1) 塚本雄介 他, 水環境学会誌, 27, pp. 791-796, 2004
- 2) 押木守 他, 水環境学会誌, 28 (11), pp. 683-687, 2005
- 3) K. Kubota, et al, Journal of Microbiological Methods, 66, pp. 521-528, 2006
- 4) 川上周司 他, 環境工学論文集, 43, pp. 43-148, 2006