

B-26 ポリヌクレオチドプローブと

高感度 FISH 法による脱窒素細菌の *nirK* 遺伝子の検出

○前谷 広太^{1*}・川上 周司²・青木 仁孝¹
荒木 信夫¹・山口 隆司²

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)

²長岡技術科学大学 環境システム工学系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1)

* E-mail:ac22836b@st.nagaoka-ct.ac.jp

1. はじめに

現在、排水中に含まれる窒素化合物の除去には微生物を利用する硝化脱窒法が主に用いられている。この処理方法は薬品を利用する化学的処理に比べ省エネルギー、省コストである。しかしながら、環境の変化によって処理効率が変化する問題がある。効率よく安定して処理を行うためにはプロセス内の菌叢をモニタリングする技術を開発し、適切な運転条件を整えるが必要である。

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、形態的に識別困難な微生物を培養によらず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り、菌数の変遷をモニタリングするのに有効な手法である¹⁾。従来は 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、硝化脱窒法の脱窒段階を担う脱窒素細菌などの系統学的に多様性が大きい細菌群は網羅的な検出が出来なかった。そこで近年では、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に基づく解析が注目されている。この機能遺伝子に基づく解析は、系統学的に多様性の大きい微生物群を、微生物が保有する機能に基づいて網羅的に解析出来ると考えられている。しかし、機能遺伝子は通常の FISH 法の標的である rRNA に比べ、細胞内コピー数が著しく少ないため、プローブの結合量が少なく、十分な蛍光感度を得ることが困難であった。だが、in situ PCR 法²⁾などの技術によって蛍光感度の問題を克服し、微生物の保有する機能遺伝子や mRNA の検出に成功した例が報告されている。しかしながら、これらの技術はプローブ・プライマーの設計が複雑である、特異性のコントロールが難しいなどの問題がある。この問題を解決するため近年、川上らは高感度 FISH 法で

ある two-pass tyramide signal amplification(TSA)-FISH 法³⁾とハプテンを多数標識可能なポリヌクレオチドプローブ(以下、ポリプローブ)を組み合わせる検出手法を開発した⁴⁾。この手法はプローブの設計が容易であり、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り機能遺伝子の検出に非常に有効な手法である。また、ポリプローブを用いた場合、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ブの様に、1 塩基ミスマッチを識別することは困難となる。ただし、機能遺伝子を標的とした場合、遺伝子配列相同性が 80~90%あれば、アミノ酸の相同性は高い場合が多く、機能的に同一であることが予想されるため⁵⁾、ポリプローブは特定の機能を持つ微生物群の網羅的な検出に適していると考えられる。

そこで本研究では高感度 FISH 法とポリプローブを組み合わせた検出法を用いて、脱窒素細菌群が共通して保有する機能遺伝子である亜硝酸還元酵素遺伝子(nitrite reductase:nir)の検出を行い、環境サンプル中の脱窒素細菌群の定量技術の開発を目的とした。本研究では2種類ある nir 遺伝子のうち、銅含有型亜硝酸還元酵素(*nirK*)遺伝子を標的とし、純粋菌株を用いて基礎的な実験条件の検討を行い、*nirK* 遺伝子を保有する純粋菌株の検出を行った。

2. 実験方法

(1) サンプルの調整

Achromobacter cycloclastes (NBRC102459) , *Alcaligenes faecalis* (NBRC13111) , *Pseudomonas aureofaciens* (NBRC3521) , *Achromobacter denitrificans* (NBRC15125) , *Alcaligenes sp* (DSM30128) を NBRC,DSMZ が指定する培

地 (Medium802, Medium1) にて 30℃で培養した。各サンプルは 4%パラホルムアルデヒド溶液[w/v]で固定 (4℃,12h) を行った後、エタノールと PBS (phosphate-buffered saline ; 411mM NaCl, 24.33mM Na₂HPO₄, 8.04mM KCl, 4.41mM KH₂PO₄) を 1:1 で混合した溶液で-20℃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に準拠した。プローブ合成のためのテンプレート DNA は, Mag Extractor(TOYOBO)を用いて抽出したゲノム DNA を用いた。プローブ合成に使用したプライマーセットを table 1 に示す。PCR は, PCR 反応液 (1×PCR buffer, 200 μM dVTP, 0.025U/μl Taq polymerase, 0.5pmol/μl, dUTP-DNP 40 μM, dTTP 160 μM, Mg²⁺ 4mM) に適量の DNA を添加した。dUTP-DNP と Mg²⁺ の濃度はプローブの収量が多くなるように最適化した。PCR 条件は初期変性, 95℃ 10 分, 変性 95℃ 45 秒, アニーリング nirK1F-5R : 59℃, FlaCu-R3Cu : 57℃ 45 秒, 伸長 72℃ 3 分, の PCR 反応を 50 サイクル, 伸長反応を 72℃ 10 分, で行った。合成したプローブは Min Elute PCR Purification kit (QIAGEN) により精製した後, VersaFluor™ Fluorometer System (BIO-RAD) を使用してプローブの濃度を測定した。

(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。スライドをインキュベーターで乾燥させた後, 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。

次に菌体内の RNA を消化するために, Rnase 溶液 (0.5mg/ml in 10 mM Tris-HCl [pH 7.5] , 15mM NaCl) を各ウェルに 15 μl 滴下し, 37℃で 30 分反応させた。続いて, リゾチーム溶液 (1mg/ml in 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) を 15 μl 滴下し, 37℃で 60 分反応させ細胞壁を処理した⁹⁾。その後, TNT バッファー (100mM Tris-HCl [pH 7.5] 150mM NaCl, 0.05% Tween-20) に 10 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, 風乾させた。

(4) two-pass TSA-FISH 法

two-pass TSA-FISH 法は長谷川ら⁸⁾の方法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 (1×SSC [150mM NaCl

15mM Sodium citrate pH 7.0] , X%ホルムアミド, 10% Dextran sulphate, 1% Blocking reagent [Roche] , 0.1% SDS, 1×Denhardt's solution, 0.2mg/ml Salmon DNA) を各ウェルに 15 μl 滴下し, 46℃で 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。次に, 125pg/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 46℃で 30 分放置後, 95℃で 20 分間の熱変性を行い, さらに 46℃で 8 時間以上反応させた。その後, 48℃のウォッシュバッファー1 (0.5×SSC, X%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, プローブの洗浄を行った。

プローブの洗浄後, PBS:BR バッファー (1% Blocking reagent, 1% BSA, in PBS) 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 PBS:BR バッファーを 1:100 で混合したものを先に滴下してある PBS:BR バッファーと置換え室温で 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 (20 分×1 回, 10 分×1 回) 浸し, 余剰な抗体を洗浄した。

一回目の TSA 反応は, tyramide-DNP と amplification buffer (0.5×plus Amplification Diluent, 0.1% blocking reagent, 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℃で 15 分間反応させた。その後, TNT バッファーに計 20 分 (10 分×2 回) 浸した。

その後, ブロッキング反応と二回目の TSA 反応を行う。ブロッキング反応は上述の方法と同じ手順で行う。二回目の TSA 反応は, tyramide-DNP の代わりに 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℃で 15 分間反応させた。

3. 実験結果

(1) two-pass TSA-FISH 法による nirK 遺伝子の検出

Achromobacter cycloclastes のゲノム DNA をテンプレートとして FlaCu-R3Cu のプライマーセットで合成したプローブを用いて *Achromobacter cycloclastes* の nirK 遺伝子の検出を試みた。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。また, ネガティブコントロールとして nirK 遺伝子を持たない *E.coli* と, プローブとの相同性が 74.3%の nirK 遺伝子を持つ

table.1 プローブ合成に使用したプライマーセット

table.1 プローブ合成に使用したプライマーセット			
プライマー	プライマー結合部位*	塩基配列 (5' -3')	参考文献
nirK1F	526-542	GG(A/C) ATG GT(G/T) CC(C/G) TGG CA	7)
nirK5R	1023-1040	GCC TCG ATC AG(A/G) TT(A/G) TGG	
FlaCu	568-584	ATC ATG GT(C/G) CTG CCG CG	
R3Cu	1021-1040	GCC TCG ATC AG(A/G) TTG TGG TT	
*プライマー結合部位は <i>Alcaligenes faecalis</i> S-6 (Accession No. D13155) の遺伝子を基準			

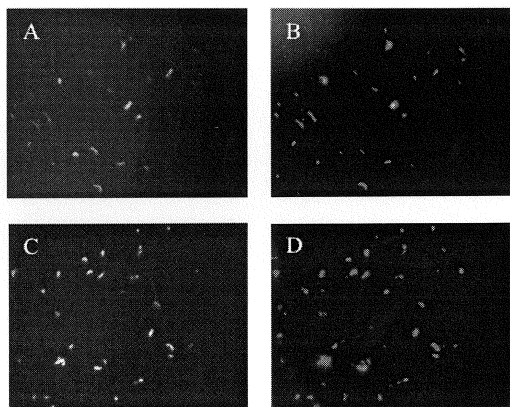


Fig.1 two-pass TSA-FISH 法による *nirK* 遺伝子の検出。プローブ長は514bp。(A), (B)は *Achromobacter cycloclastes*。(C), (D)は *Alcaligenes faecalis*。それぞれ同一視野。(A), (C)はDAPIによる全菌染色視野。(B), (D)はCy3による染色視野。露光時間は20ms

Alcaligenes faecalis 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、プローブの交雑条件を最適化することで *Achromobacter cycloclastes* のみの検出が可能であった (fig 1 A,B)。また、同様のプライマーセットを用いて *Alcaligenes faecalis* のゲノム DNA をテンプレートとしてプローブを合成し、*Alcaligenes faecalis* の *nirK* 遺伝子の検出を試みた。ネガティブコントロールとして *Achromobacter cycloclastes* と *E.coli* を用いて two-pass TSA-FISH 法を行った結果、菌体から極めて強い蛍光を得ることができ、ネガティブコントロールからは蛍光が得られなかった (fig 1 C,D)。この結果から、ポリヌクレオチドプローブと two-pass TSA-FISH 法を組み合わせることで脱窒素細菌の *nirK* 遺伝子が特異的に検出出来ることが示唆された。

(2) 本手法の特異性

本手法の特異性について、*Alcaligenes sp.* のゲノム DNA をテンプレートとして合成したプローブに対する塩基配列相同性が 100% *Alcaligenes sp.*、約 90% の *Achromobacter denitrificans*、約 80% の *Pseudomonas aureofaciens*、約 70% の *Alcaligenes faecalis* の四株を用いて検討を行った。実験の結果、*Alcaligenes sp.* 以外の純粋菌株からは蛍光を得られなかった (データ非表示)。長谷川らや Ludwig の報告ではポリヌクレオチドプローブでの検出の閾値は 85~75% とされている。今回の実験で相同性約 90% の純粋菌株から蛍光を得られなかった理由としてプローブの GC 含有量、二次構造などが影響している可能性がある。

4. 本研究の位置づけと展望

本研究では two-pass TSA-FISH 法とポリヌクレオチドプ

ローブを組み合わせることで、脱窒素細菌群が共通して保有する機能遺伝子である *nir* 遺伝子の一種である *nirK* 遺伝子を検出することに成功した。脱窒素細菌群は多様性が高いため従来バイオマーカーとして用いられていた 16S rRNA では網羅的に検出することが難しい。しかしながら、今回の研究結果から、*nir* 遺伝子を検出することで脱窒素細菌を網羅的に検出できる可能性が示唆された。今後、環境サンプルからプローブを合成し、環境中の脱窒素細菌を検出できるか検討していきたい。

参考文献

- 1) RI Amann, W Ludwig and KH Schleifer. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbiol. Rev., May 1995, Vol 59, pp.143-169,
- 2) RE Hodson, WA Dustman, RP Garg and MA Moran. In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities, Appl. Environ. Microbiol., Nov 1995, Vol 61, pp.4074-82,
- 3) Kengo Kubota, Akiyoshi Ohashi, Hiroyuki Imachi, Hideki 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 (2006) 521-528
- 4) 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹, Two-pass TSA-FISH 法によるメタン生成古細菌の *mcr* 遺伝子の検出, 環境工学論文集, Vol. 43, pp.143-148, 2006
- 5) Ulrike Purkhold, Andreas Pommerening-Roser, Stefan Juretschko, Markus C. Schmid, Hans-Peter Koops, Aad Michael Wagner. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. Appl. Environ. Microbiol., Dec 2000, Vol 66, pp. 5368-5382,
- 6) Tatsuhiko Hoshino, Andreas Schramm. Detection of denitrification genes by in situ rolling circle amplification-fluorescence in situ hybridization to link metabolic potential with identity inside bacterial cells
- 7) Ingela Noredal, Throback, Karin Enwall, Asa Jarvis, Sara Hallin, Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE, FEMS Microbiology Ecology 49, 401-417, 200
- 8) 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹 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生物の機能推定, 環境工学研究論文集, Vol.46, pp.537-543, 2009
- 9) Wolfgang Ludwig, Silvia Dom, Nina Springer, Gudrun Kirchhof, And Karl-Heinz Schleifer. PCR-Based Preparation of 23S rRNA-Targeted Group-Specific Polynucleotide Probes. Appl. Environ. Microbiol., Sept 1994, Vol 60, pp. 3226-3244,