

B-32 *nirK*遺伝子を標的としたtwo-pass TSA-FISH法による脱窒素細菌群の検出

○ 前谷 広太^{1*}・青木 仁孝²・川上 周司³
高橋 竜司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 環境システム工学科 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

³阿南工業高等専門学校 建設システム工学科 (〒774-0017 徳島県阿南市見能林町青木265)

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

1. はじめに

脱窒素反応は、窒素サイクルの最終ステップであり、低酸素条件下において窒素化合物を電子受容体として用いる微生物の嫌気呼吸の1つである。この微生物による脱窒素反応は、硝酸イオン (NO₃)、亜硝酸イオン (NO₂)、一酸化窒素 (NO)、亜酸化窒素 (N₂O)、窒素ガス (N₂)の順で4つのステップに区別できる。現在では、脱窒素反応を利用した生物学的排水処理プロセスの開発が盛んに行われており、それらのプロセス中での脱窒素細菌の挙動を把握することは、システムの安定化・高効率化において重要と考えられる。

脱窒素反応のうち、亜硝酸還元 (NO₂⁻→NO)を触媒する亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase; NIR)は、*nirK*遺伝子にコードされる銅含有型あるいは、*nirS*遺伝子にコードされるシトクロム*cd*₁含有型の2種類のタイプが存在することが報告されている。そして、この*nirK*遺伝子と*nirS*遺伝子のどちらか一方の遺伝子を脱窒素細菌は保有しているため²、系統的に多様な脱窒素細菌の定量や群集構造解析に利用されている。

環境中微生物の定量には、fluorescence in situ hybridization (FISH)法¹が広く用いられている。FISH法は、主にrRNAを標的とするが、系統的に多様性の大きい脱窒素細菌を網羅的に検出することは難しい。従って機能遺伝子を標的としたFISH法の適用が望まれるが、機能遺伝子の多くは細胞内に10⁰~10¹コピー程度で存在するため、従来のFISH法では、検出感度が不足する。この問題に対し、近年では機能遺伝子を検出するための様々な高感度遺伝子検出技術が報告されている。本研究では、検出率が極めて高いことと、特異的検出が可能な手法という観点から、ポリヌクレオチドプローブを用いたtwo-pass

TSA-FISH法²を採用し、脱窒素細菌群の網羅的な検出を試みた。

本研究では、*nirK*、*nirS* 遺伝子のうち、より系統的に多様な脱窒素細菌群が保有する *nirK* 遺伝子¹⁹を標的とし、two-pass TSA-FISH 法による網羅的検出のための詳細な検討を行った。さらに活性汚泥中に生息する脱窒素細菌の *nirK* 遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法を行い、脱窒素細菌の網羅的検出を行った。

2. 実験方法

(1) サンプルの調整

本研究では、*nirK* 遺伝子を保有する純粋菌株 *Achromobacter cycloclastes* (NBRC102459), *Alcaligenes faecalis* (NBRC13111), *Pseudomonas aureofaciens* (NBRC3521), *Achromobacter denitrificans* (NBRC15125), *Alcaligenes* sp. (DSM30128)および*nirK*遺伝子を保有しない純粋菌株 *Escherichia coli* K-12 (ATCC700926)を使用した。各純粋菌株は、Luria-Bertani (LB) 培地に於て30℃で一晩培養した。また、汚泥サンプルは、都市下水を処理している活性汚泥を使用した。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℃; 16時間) し、エタノールとPBS (phosphate-buffered saline; 41 mM NaCl, 24.33 mM Na₂HPO₄, 8.04 mM KCl, 4.41 mM KH₂PO₄)を1:1で混合した溶液に-20℃で保存した。

(2) プローブ合成

プローブ合成はPCR法を用いた長谷川らの方法²を参考に行った。プライマーは*nirK*遺伝子に特異的な*nirK*1F-*nirK*5Rを用いた³。PCR法は、PCR反応液 (1×PCR buffer [Applied Biosystems], 4 mM Mg²⁺, 200 μM dVTP, 0.025 U/μl Taq polymerase, 0.5 pmol/μl of each primer, 160 μM dITP, 40

μM dUTP-11-DNP [PerkinElmer])に適量のDNAを添加して行った。dUTP-DNPと Mg^{2+} 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°C 10分に続き、変性 95°C 45秒、アニーリング $55\text{--}60^\circ\text{C}$ 45秒、伸長 72°C 3分のPCR反応を50サイクル、そして最終伸長反応 72°C 10分で行った。

(3) サンプルの前処理

サンプルの前処理は長谷川ら²⁾の方法に若干の変更を加えて行った。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0.4% Metaphor Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME)で包埋して固着させた。続いて、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。次にリゾチーム溶液(10 mg/ml in 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA [pH8.0])を各ウェルに15 μl 滴下し、モイストチャンパー内で 37°C 、60分間反応させた。続いて、菌体内のRNAを消化するために、RNase 溶液(0.5 mg/ml in 10mM Tris-HCl [pH7.5], 15 mM NaCl)を各ウェルに15 μl 滴下し、 37°C で30分間反応させた。その後、TNTバッファー(100mM Tris-HCl [pH7.5], 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²⁾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 \times SSC [150mM NaCl 15mM Sodium citrate pH 7.0], 50-60%ホルムアミド, 10% Dextran sulphate, 1% Blocking reagent [Roche], 0.01% SDS, 1 \times Denhardt's solution, 0.2 mg/ml Salmon DNA)を各ウェルに15 μl 滴下し、 46°C 60分間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、125 pg/ μl のプローブを含むハイブリダイゼーションバッファーを20 μl 滴下し、 95°C 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 \times SSC, X%ホルムアミド)に30分 \times 2回、ウォッシュバッファー2(0.5 \times SSC, 0.01% SDS)に15分 \times 2回浸し、余剰プローブの洗浄を行った。余剰プローブの洗浄後、PBS:BR バッファー(1% Blocking reagent, 1% BSA, in PBS)を15 μl 滴下し、室温で30分間のブロッキング反応を行った。次に、anti-DNP-horseradish peroxidase (HRP) (PerkinElmer)とPBS:BR バッファーを1:500で混合したものを先に滴下してあるPBS:BR バッファーと置換し、室温で30分間の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 \times 1回, 10分 \times 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

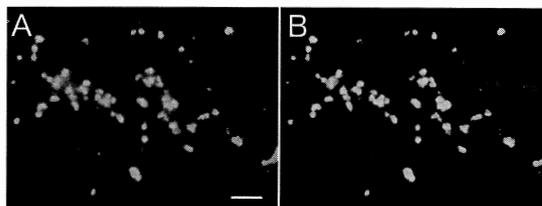


図-1 Two-pass TSA-FISH 法による *Acycloclastes* の *nirK* 遺伝子の検出。U 励起 (DAPI 染色; A) と G 励起 (Cy3; B) は同一視野。露光時間は 20 ms。スケールバーは 20 μm 。

amplification buffer (0.5 \times 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°C 10分間反応させた。その後、TNT バッファーに計20分(10分 \times 2回)浸した。続いて、ブロッキング反応と二回目のTSA反応を行った。ブロッキング反応は上述の方法と同じ手順で行った。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°C で15分間反応させた。その後、TNT バッファーに計20分(10分 \times 2回)浸し洗浄した。さらに超純水に室温で1分、エタノールに1分浸し風乾させた。

3. 実験結果及び考察

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

A. cycloclastes が保有する *nirK* 遺伝子を *nirK1F-5R* のプライマーを用いて合成したプローブを用いて標的遺伝子が検出可能か検討を行った。図-1に実験結果を示す。*A. cycloclastes* に対して two-pass TSA-FISH法を行ったところ、菌体から極めて強い蛍光を得ることができた。一方で、*nirK* 遺伝子を保有しない *E. coli* K-12 から蛍光は得られなかった(データ非表示)。従って、two-pass TSA-FISH法を用いることで、*nirK* 遺伝子を保有する脱窒素細菌を検出することが可能と判断した。また、*Alcaligenes* sp.のゲノムDNAをテンプレートとして *nirK1F-nirK5R* のプライマーセットで合成したプローブに対する塩基配列相同性が100%の *Alcaligenes* sp., 89.9%の *A. denitrificans*, 79.3%の *P. aureofaciens*, 約70%の *A. faecalis* の4株を用いて特異性の検討を行った。実験の結果、*Alcaligenes* sp.以外の純粋菌株からは蛍光は得られなかった(データ非表示)。したがって、本手法はプローブと標的遺伝子の相同性が、約90%以下の *nirK* 遺伝子を識別して検出可能であり、既報²⁾と同等あるいはそれ以上の特異性で遺伝子検出が可能であった。

(2) 複数種のプローブを混合した場合の検討

環境中の脱窒素細菌群を網羅的に検出するには2つの方法が考えられる。一つは各標的微生物の標的遺伝子から合成したプローブを等濃度で混合する場合であり、一

つは対象サンプルから抽出した DNA をテンプレートとして保存領域から作成したプライマーを用いて合成したプローブを用いる場合がある。本研究ではまず、前者の方法について脱窒素細菌の網羅的な検出が可能であるかの検討を行った。検討は、*nirK* 遺伝子を標的とし、*Alcaligenes* sp., *A. cycloclastes*, および *P. aureofaciens* のゲノム DNA をテンプレートとして *nirK1F-nirK5R* のプライマーセットで合成したポリプローブを用いて行った。各プローブは等濃度で混合し、プローブ溶液濃度が 125 pg/μl になるように調整した。その結果、*nirK* 遺伝子を保有する上述の3種類の純粋菌株から強い蛍光を得ることが出来た。また、ネガティブコントロールの *E. coli* K-12 から蛍光は得られなかった(データ非表示)。以上の結果より、複数種のプローブを同時に適用した場合でも、脱窒素細菌を網羅的に検出できる可能性が示された。

(3) 混合 DNA からポリプローブを合成した場合

本手法を環境サンプルに適用する場合、環境サンプルから抽出した DNA をテンプレートとして合成した複数のプローブを適用する方法が、その環境中に生息している脱窒素細菌の網羅的な検出に有効であると考えられる。そこで、環境サンプルから抽出した DNA を想定し、等濃度で混合させたゲノム DNA をテンプレートにして合成したプローブで各々の純粋菌株の検出が可能かどうかを検討した。プローブの合成には *nirK1F-nirK5R* を用い、テンプレートには、*nirK* 遺伝子を保有する *A. cycloclastes*, *P. aureofaciens*, *A. denitrificans* および *Alcaligenes* sp. の4種類のゲノム DNA を PCR 反応液中に各 20 ng/μl になるように等濃度で混合したものをを用いた。合成したプローブは最終的に 125 pg/μl になるよう混合し調整した。実験の結果、*A. cycloclastes*, *P. aureofaciens*, *A. denitrificans* および *Alcaligenes* sp. のそれぞれから蛍光を得ることに成功し、検出率も 100% 近くを達成できた。一方で、*nirK* 遺伝子を保有しない *E. coli* K-12 からはシグナルは得られなかった(データ非表示)。したがって、環境サンプルから抽出した DNA からポリプローブを合成し、PCR 増幅可能な機能遺伝子を有する細菌群を本手法で検出可能であると判断した。

(5) 環境サンプルへの適用

活性汚泥中に存在する *nirK* 遺伝子保有脱窒素細菌の網羅的検出を行った。まず、内在性ペルオキシダーゼ活性の有無を調べるためにプローブを滴下せずに two-pass TSA 反応だけを行ったところ、蛍光は得られなかった(データ非表示)。そのため内在性 HRP 活性の処理は不要であると判断した。次に、活性汚泥サンプルから抽出した DNA から合成したプローブを用いて two-pass TSA-

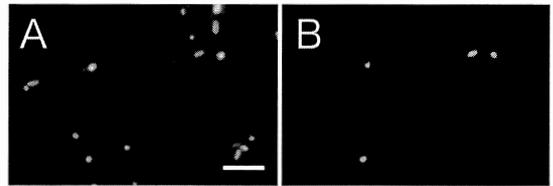


図2 Two-pass TSA-FISH 法による活性汚泥中に存在する *nirK* 遺伝子保有微生物の検出。U 励起 (DAPI 染色;A) と G 励起 (Cy3;B) は同一視野。露光時間は 50 ms。スケールバーは 10 μm。

FISH 法を適用したところ一部の菌体からシグナルを得ることができた(図-2)。また、それらの菌体は異なる形態を示しており、複数の *nirK* 遺伝子を保有する脱窒素細菌群を検出している可能性が示唆された。今後、リアルタイム PCR 法の定量結果と two-pass TSA-FISH 法での定量結果を比較し、より詳細な検討を行っていく。

4. まとめ

本研究では、two-pass TSA-FISH 法とポリプローブを組み合わせた脱窒素細菌群を検出する手法の開発を行った。現在、遺伝子定量に広く用いられる Q-PCR 法のような抽出 DNA ベースの定量法は、遺伝子コピー数として定量結果が算出される上、ゲノム DNA 上のコピー数の違い、検量線のスタンダード DNA の選択の違い、PCR 阻害物質の存在等で定量値に大きなバイアスが生じる可能性が報告されている。従って、遺伝子ベースで細胞数を定量可能な本手法は、多様性の大きい微生物群を定量する際に有効な手法であると考えている。加えて、本手法は機能遺伝子を標的としているため、土壌や深海底の様な低活性な微生物が多く生育するサンプル³⁾においても窒素サイクルに関与する脱窒素細菌の検出・定量が可能と思われる。また、セルソーターや whole genome amplification などの single cell 解析が進展する中、本手法の重要性はさらに高まると思われる。

参考文献

- 1) Amann, R. I.: In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.3.6, pp. 1-15, 1995.
- 2) 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微生物の機能推定, *環境工学研究論文集*, Vol. 46, pp. 537-543, 2009.
- 3) Braker, G., Fesefeldt, A. and Witzel, K. P.: Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, No. 10, pp. 3769-3775, 1998.