

Copper-free click chemistryによるFISH法の高感度化

松江工業高等専門学校 非会員 ○山田 光陽
 松江工業高等専門学校 正会員 山口 剛士

1. はじめに

環境微生物の分離・培養を必要としない生態解明方法として、シングルセルでのゲノム解析が報告されている¹⁾。これは、特定の微生物を視覚的に検出した後に回収し、ゲノム解析を行う方法であり、これにより検出した微生物の代謝経路や生態を把握することができる。したがって、その初期段階である微生物の視覚的検出技術は、全ゲノム解析を行う上で重要である。

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法²⁾は、微生物を視覚的かつ特異的に検出できる手法であるが、その蛍光強度は菌体の活性に依存することが報告されている。そのため、深海や土壌などの貧栄養環境下に生息している活性の低い微生物の検出は困難である。これまでに、蛍光強度の問題を克服した高感度FISH法の研究が行われており、細胞浸透性に優れ従来のFISH法と比較して約8倍の蛍光強度を有するquick hybridization chain reaction (HCR)-FISH法³⁾や、酵素を用いることで26倍から41倍の蛍光強度を有するcatalyzed reporter deposition (CARD)-FISH法⁴⁾などが報告されている。しかし、これらの高感度FISH法は、用いる試薬がDNAを損傷させることや蛍光強度の問題から、環境微生物への全ゲノム解析に応用された事例はない。

そこで本研究では、全ゲノム解析への応用が可能である高感度FISH法の開発を行うことを目的として、容易な操作かつDNAに損傷を与えない試薬で特異的な結合反応を示すcopper-free click chemistryに着目し、HCR-FISH法に適用させた。本研究におけるcopper-free click chemistryはazide-BCN結合を用いているが、主に*in vitro*で用いられている手法であり*in situ*に適用させた報告がない。そのため、copper-free click chemistryをFISH法に適用するためには実験条件の最適化が必要である。本発表では、開発中の手法を大腸菌に適用することで得られた知見及び今後の展望について報告する。

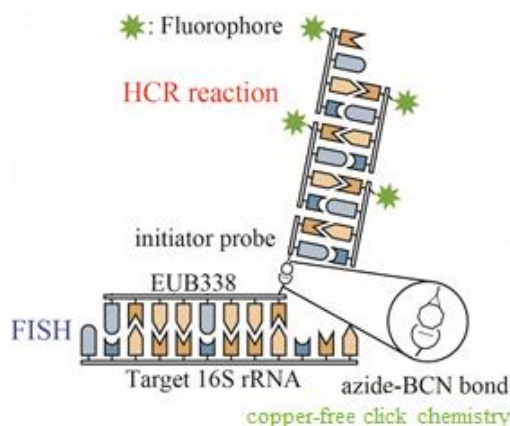


Fig.1 The method developed in this research is a schematic diag

2. 手法の概要

本研究で開発する手法の概要図をFig.1に示す。本手法は3つのStepで構成されている。Step1では、EUB338プローブを16S rRNA配列へ交雑させる。Step2では、*in vitro*, あるいは*in situ*で copper-free click chemistryの反応によってazideとEUB338プローブとイニシエータープローブを結合させる。Step3では、イニシエータープローブを起点としたHCRによる蛍光増幅を行う。

3. 実験方法

3.1 *In vitro*におけるcopper-free click chemistryの適用

まず、本研究の初期段階として、BCNとazideの接触効率を考慮するためにプローブの修飾物の選定を行った。BCN付加EUB338プローブとazide-蛍光標識付加イニシエータープローブ (プローブ対A) を用意し、さらに、azide付加EUB338プローブとBCN-蛍光標識付加イニシエータープローブ (プローブ対B) も用意した。この2種類のプローブ修飾で*in vitro*における実験条件の検討を行った。

実験工程としては以下の通りである。まず、PCRチューブ内でEUB338プローブとイニシエータープローブを混合し反応させた。その後、反応時間を経過した結合済みプローブをスライド上の大腸菌に対して滴下し、

キーワード FISH, copper-free click chemistry, 大腸菌, HCR-FISH

連絡先 〒690-8518 島根県松江市西生馬町 14-4 松江工業高等専門学校 環境・建設工学科

TEL 0852-36-5261

3時間交雑させた。PCRチューブにおける混合比率と反応時間の条件はそれぞれ既報の論文を参考にし⁵⁾, azide: BCN比を1: 10から1: 100及び反応時間を一晚としてazideとBCNを結合させた。Copper-free click chemistryの結合反応は、菌体から得られた蛍光の有無によって判断した。

3.2 *In situ*におけるcopper-free click chemistryの適用

*In situ*におけるcopper-free click chemistryの適用は、プローブ対Bを用いて行った(考察を4.1に後述)。FISH法は、Sekiguchiらの方法に準拠して行った¹⁾。 *In situ*におけるcopper-free click chemistryは、*in vitro*と同様にE. O. Blenkeらの条件を参考にして行った⁵⁾。 反応の確認は、*in vitro*と同様に菌体から得られた特異的な蛍光の有無によって判断した。また、蛍光強度の算出はDAIMEを用いて行い、従来のFISH法で得られた蛍光強度を1として本手法における蛍光強度を評価した。

4. 実験結果及び考察

4.1 *In vitro*におけるcopper-free click chemistryの適用及びプローブ修飾の検討

まず、プローブ対Aを用いて実験を行った。しかしながら、全ての実験条件で菌体から蛍光が得られなかった(データ非表示)。一方で、プローブ対Bを用いて実験を行った結果、azide: BCN = 1: 100の比率において菌体から非常に微弱な蛍光を得ることに成功した(データ非表示)。プローブ対Aの実験において蛍光が得られなかった原因として、蛍光標識が付加されたプローブが菌体内に存在していなかったことが考えられる。菌体から強い蛍光を得るためには、菌体内に蛍光標識が付加されたプローブが多く存在している必要がある。しかしながら、プローブ対Aの場合は、実験条件のazide: BCN比の関係から蛍光標識しているazideがBCNよりも少ないため、蛍光標識付加プローブが菌体内に少なかったのではないかと考察している。従って、以降の実験ではプローブ対Bを用いて行った。また、プローブ対BにおいてPCRチューブ内のプローブ濃度を従来のFISH法の最終濃度になるように試薬組成の調製を行った結果、比率がazide: BCN = 1: 10においても菌体から微弱ではあるが特異的な蛍光が得られた(データ非表示)。さらに、高濃度のプローブを使用することにより、得られる蛍光強度は増加し、バックグラウンドとの差が十分であると判断した(データ非表示)。この結果よ

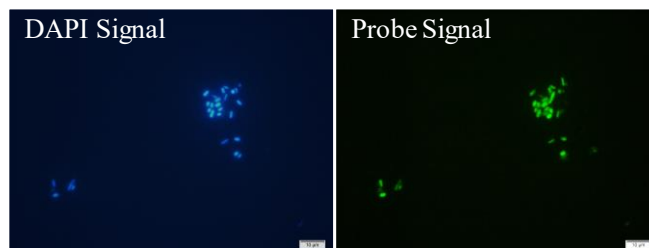


Fig.2 Detection of *E.coli* (16S rRNA) by HCR-FISH and copper-free click chemistry in *in situ*. The bar represents 10 μ m.

り、プローブ対Bを用いた*in vitro*におけるcopper-free click chemistryの適用に成功したと判断した。

4.2 *In situ*におけるcopper-free click chemistryの適用

*In vitro*において蛍光が得られた実験条件を*in situ*に適用しStep2までの実験を行った。その結果、菌体から特異的な蛍光が得られた(データ非表示)。この結果より、copper-free click chemistryを*in situ*で適用できることが明らかとなった。そこで、DAIMEによって蛍光強度を算出し、本手法と従来のFISH法との比較を行った。その結果、従来のFISH法の蛍光強度を1としたときの本手法の蛍光強度は 1.08 ± 0.02 であった。現在、EUB338プローブにazideを1つのみ修飾させて確認しているため、copper-free click chemistryの結合が全てのプローブで成功していると判断した。この結果を受けて、Step3で行うHCR法による蛍光増幅を試みたところ、菌体から蛍光を得ることに成功した(Fig.2)。従って、菌体内でcopper-free click chemistryをHCR-FISH法に適用することに成功した。

5. まとめ

本研究では、copper-free click chemistryをHCR-FISH法に適用した。その結果、*in vitro*及び*in situ*においてcopper-free click chemistryの結合反応が確認され、その後のHCR法による蛍光増幅も生じることが明らかとなった。今後はEUB338プローブに修飾するazideの数を増加させ、更なる蛍光強度の増幅を行う。その後、従来のFISH法に対する蛍光強度や検出率の比較、非特異的交雑の有無について確認を行い、最終的に環境サンプルに対する適用可能性について評価を行う。

謝辞: 本研究は、高専一長岡技科大共同研究助成による助成を受け、実施いたしました。

参考文献

- 1) Lasken, 2007. 2) Sekiguchi, et al, 1999. 3) Yamaguchi, et al., 2015. 4) Hoshino, et al., 2008. 5) E. Oude Blenke et al., 2015.