アジド-アルキンの環化付加反応を用いた大腸菌の視覚的検出

松江工業高等専門学校　非会員　○山崎　綾乃
松江工業高等専門学校　非会員　木村　圭佑
松江工業高等専門学校　正会員　武邊　勝道
松江工業高等専門学校　正会員　山口　剛士

１．目的

土木工学において、微生物は主に活性汚泥法を代表とする水処理技術に用いられている．近年ではコンクリートのひび割れ修復を行う微生物や微生物が生み出す新たな構造材料の研究も報告されており，注目すべき重要な資源である．また，地球上に存在する微生物の総数は 2.9×10^{29} と見積もられており [1]，その生態の多くは未だ解明されていない．従って，工学的価値のある微生物が存在している可能性がある．微生物の働きを利用するにはその生態を解明することが必要となるが，一般的な微生物生態解析方法における分離・培養は困難であることが知られている．標的微生物ごとに最適な生息環境を整えなければならず，共生関係を持つ微生物や生育速度が非常に遅い微生物なども存在し，全ての微生物に対して最適な方法が確立されていない．そこで分離・培養を介さず原位置で視覚的に検出できる技術である Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法が報告され，特定の微生物のみを検出できることから環境中の微生物に対しても広く用いられている [2]．しかしながら，FISH 法の蛍光強度が標的の rRNA 含有量に依存することから，貧栄養環境に生息するような rRNA 含有量の少ない微生物の検出が困難となる．そこで今日までに，蛍光強度を改善した高感度 FISH 法として長鎖のプローブを用いる Recognition of individual genes (RING) -FISH 法 [3] や酵素触媒反応を用いた Catalyzed reporter deposition (CARD) -FISH 法 [4] が報告されている．しかしながら，高感度 FISH 法に用いるプローブは酵素などの分子量が大きいことから細胞浸透性が低い．そこで，細胞壁処理を行っているが多くの微生物に対して有効な方法が存在していない．近年，細胞壁処理を必要としない高感度 FISH 法として Quick hybridization chain reaction (HCR) -FISH 法 [5] が報告された．しかしながら，その蛍光強度は従来の高感度 FISH 法と比較すると弱いことが報告されている．本研究では，HCR-FISH 法に click chemistry の代表的な反応である一価の銅イオンを触媒としたアジドとアルキンによる環化付加反応を組み合わせることで蛍光強度を増幅させ，大腸菌を視覚的に検出することを目的とした．

２．実験方法

(1) FISH 法

比較対象として用いた FISH 法は Sekiguchi らの方法に準拠し行った [6]．

(2) 新規高感度 FISH 法

本研究で開発する手法の原理を以下に示す．また，概略図を図 1 に示す．まず，アルキンを標識したオリゴプローブを FISH 法と同条件で rRNA に交雑させる (STAGE1)．本研究では大腸菌を標的微生物として，EUB338 プローブに 3 つのアルキンを標識させたプローブを用いた．次に，菌体内のアルキンとイニシエーター

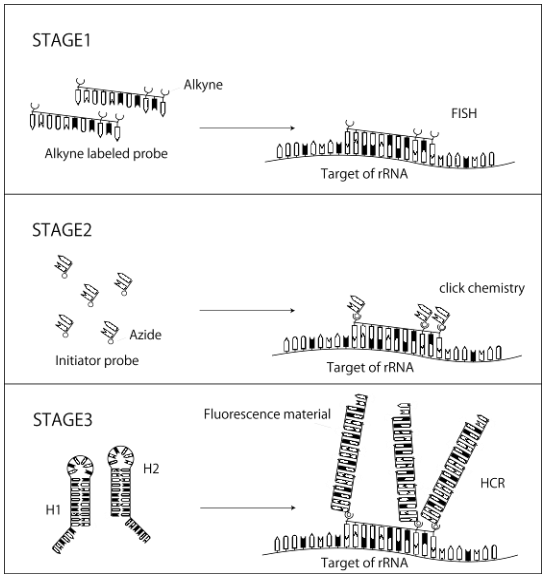

図 1 新規高感度 FISH 法の原理

キーワード　視覚的検出，FISH 法，高感度 FISH 法，click chemistry
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　生産・建設システム工学専攻
ＴＥＬ0852-36-5261

プローブに標識したアジドを一価の銅イオンの触媒下で結合させる (STAGE2). 最後に, 菌体内のイニシエータープローブの伸長起点から, 蛍光標識させた 2 つのヘアピンプローブ(H1, H2)を用いて HCR 法により蛍光増幅を行う (STAGE3).

(3)click chemistry の最適化

本研究では, アルキン及び Alexa Flour 555 (A555) を標識させた EUB338 プローブ, アルキンのみを標識させた EUB338 プローブ, アジド及び Alexa Flour 488 (A488) を標識させたイニシエータープローブを用い, 反応の最適化を行った.

(4) 蛍光強度の算出方法

蛍光強度は, 実験により得た蛍光顕微鏡画像から, デジタル画像解析及び視覚化プログラム DAIME[7] によって, FISH 法における蛍光強度を 1 として算出した.

３．実験結果及び考察

(1) アルキンを標識したプローブの評価

はじめに, *in situ* における click chemistry の反応を確認するため, アルキンのみを標識した EUB338 プローブ, アジド及び A488 を標識させたイニシエータープローブを用いて大腸菌の視覚的検出を行った. しかしながら A488 由来の蛍光は得られなかった (データ非表示) . その要因として click chemistry の反応が進行していない, あるいは EUB338 プローブの交雑が不十分であると考えた. そこで, EUB338 プローブにアルキン及び A555 を標識して実験を行ったところ, STAGE1 の操作終了時点で観察したサンプルでは A555 による蛍光が得られた. しかしながら, STAGE2 の操作終了時点で観察したサンプルからは A555 及び A488 による蛍光どちらも得られなかった (データ非表示). この結果から, click chemistry 反応時に EUB338 プローブが解離していると判断し, 反応溶液中に STAGE1 の交雑時と同等の塩濃度となるよう NaCl を加えたところ, STAGE2 操作終了後において A555 由来の蛍光が得られ, プローブの解離の抑制に成功した (データ非表示) .

(2) Click chemistry の最適化

上述した最適化を行い, EUB338 プローブからの蛍光は得られるようになったが, click chemistry 反応による A488 由来の蛍光は得られなかった. そこで, 菌体内には様々な高分子が存在していることを考慮し, 生体外での click chemistry の最適化を試みた. PCR チューブ内でアルキン及び A555 を標識したプローブとアジド及び A488 を標識したプローブを混合させた後に, 標的の rRNA に交雑させる手法を用いた. その結果, 反応の触媒となる一価の銅イオンの供給源である硫酸銅の濃度を向上させたところ, 菌体からの蛍光が得られた. (データ非表示). また, 触媒の濃度を向上させ, 反応促進されたと考え反応時間の検討を行ったところ, STAGE2 における反応時間の短縮が可能となった.

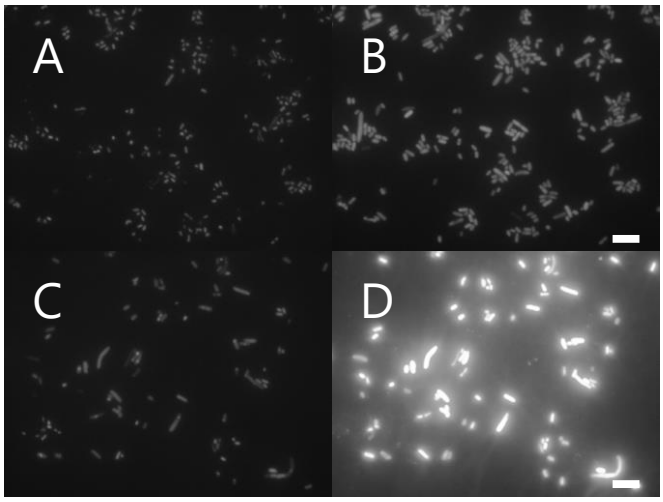

図 2 HCR 法による蛍光増幅

A, C : DAPI による全菌検出, B : FISH 法, D : 新規高感度 FISH 法

(3) HCR 法による蛍光増幅

硫酸銅の濃度を最適化することで, 理論と同程度の蛍光が得られたため, 蛍光標識を行った H1 および H2 を用いた蛍光増幅を行った (図 2). その結果, click chemistry の反応由来の蛍光に比べて高い強度の蛍光が得られたため, HCR 法による蛍光増幅が成功したと判断した.

４．まとめ

本研究により, *in situ* における click chemistry を最適化し, HCR-FISH 法にアジドとアルキンの環化付加反応を組み合わせ大腸菌から蛍光が得られた. 今後は本手法の特異性, 蛍光強度を評価するとともに, 環境中の微生物への適用可能性を検討する.

謝辞 : 本研究は, 科研費 若手研究 [課題番号 : 18K14514]の助成を受け, 実施いたしました.

参考文献

(1) Kallmeyer, J., *et al., PNAS, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 109, 16213-16216, 2012. (2) Amann, R. *et al., J. Bacteriol.*, 172, 762-770, 1990. (3) Zwirglmaier, K., *et al., Mol. Microbiol.*, 51, 89-96, 2004. (4) Pernthaler, A. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3094-3101, 2002. (5)Yamaguchi, T. *et al., Syst. Appl. Microbiol.,* 38, 400-405, 2015. (6) Sekiguchi, Y., *et al., Applied Microbiology,* 65, 1280-1288, 1999. (7) Daims, H. *et al. Environ. Microbiol,* 8, 200-213, 2006.