

## Copper-free click chemistry を組み合わせた高感度 FISH 法における特異性評価

松江工業高等専門学校 学生会員 ○樋口 ひなた  
松江工業高等専門学校 正会員 山口 剛士

## 1. はじめに

環境中に生息する微生物の 99%は、未知・未培養微生物であり、工学的利用価値のある微生物を発見するために多様な解析が行われている。個々の微生物の生態を把握する方法として、環境中から標的微生物のみを回収し全ゲノム解析を行うシングルセル解析<sup>2)</sup>が報告されている。この方法は、標的微生物を特異的に蛍光させる必要がある。特異的な蛍光標識方法としては視覚的検出技術である fluorescence in situ hybridization (FISH) 法<sup>3)</sup>が用いられている。しかし、FISH 法による蛍光強度は、標的微生物の活性に依存するため、環境中に生息する低 rRNA 含有量の微生物の検出が困難である。そこで、本研究では FISH 法よりも高感度な蛍光が得られる hybridization chain reaction (HCR)-FISH 法に、azide-BCN の特異的な結合である copper-free click chemistry を組み合わせた高感度 FISH 法の蛍光強度及び特異性を評価することを目的とした。

## 2. 実験方法

### (1) 本手法の適用条件

本手法は、山田らの方法<sup>4)</sup>に準拠し行った。HCR 法におけるプローブは、既往のプローブ<sup>5)</sup>に BCN を標識させたものを用いた。

### (2) 蛍光増幅の確認

細胞壁処理を行うことで蛍光が上昇すると考え、リゾチーム (final conc. 1mg/ml) を用いて行った。また、蛍光強度向上を目的として、FISH プローブの azide 標識数を複数標識させた。

### (3) 本手法による特性評価

まず、バクテリアとアーキアが認識できるのか大腸菌及びメタン生成アーキアを選定し、実験を行った。本研究では FISH プローブとして大腸菌の 16S rRNA に交雑する EUB338 に azide を標識させたプ

ローブを用いた。次に、本手法に用いるプローブが近縁種の認識が可能であるか評価するために、EUB 338 プローブのミスマッチプローブとして 2 塩基ミスマッチ、1 塩基ミスマッチのものを用意し、本手法を適用させた。最後に、プローブの標的部位への交雑を確認するため、EUB338 プローブに交雑する際のホルムアミド (FA) 濃度を 10, 20, 40%に変化させ実験を行った。

### (4) 顕微鏡と蛍光強度解析

微生物の観察には、偏光顕微鏡 (OLYMPUS BX51) およびデジタルカメラ (OLYMPUS DP73) を用いた。蛍光強度は、デジタルカメラで取り込んだ画像を画像解析ソフト DAIME software によって解析して評価した。

## 3. 実験結果

### (1) 本手法による蛍光増幅の影響

本手法で得られる蛍光強度を向上させるため、細胞壁処理を 15 分間行った。その結果、細胞壁処理を行っていない場合と比較して高い蛍光強度が得られた (データ非表示)。したがって、細胞壁処理を行いプローブの細胞浸透率が上昇したことで、より多くのプローブが標的部位に交雑したと考えた。次に、EUB338 に標識させる azide 標識数を増加させることで蛍光増幅が可能か確認した。HCR 法の伸長起点が増加するほど蛍光増幅すると考えたが、HCR 法の伸長起点に標識した BCN が結合する azide が 2 つ標識した時が最も高い蛍光強度を示した (図 1)。この理由としては、EUB338 プローブ中の azide 標識数が 2 つ以上になると標識箇所が近くなることが考えられる。本研究で対象としている 16S rRNA は、高次構造を有していることからそれぞれの起点からの HCR 法による伸長が互いに干渉しあい、十分な伸張反応が起こらなかったことが原因だと考えられる。

キーワード FISH 法, HCR-FISH 法, Copper-free 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 TEL0852-36-5261

また、EUB338 プローブの azide 標識数が 2 つでも azide 数が 1 つの時と比較して蛍光強度が 1.5 倍程度であった（図 1）。この理由については azide 標識数の増加に対して、azide に結合する BCN と HCR 法における濃度の検討を行っていなかったことが原因だと考えている。

## (2) 特異性評価

本手法の特異性評価を行うために、まず標的微生物である大腸菌および非標的微生物であるメタン生成アーキアを用いて実験を行った。その結果、標的微生物の大腸菌から蛍光が得られ、矢印で示すメタン生成アーキアから蛍光が得られなかった（図 2）。したがって、本手法は、アーキアとバクテリアに関して特異性があると判断した。さらに、本手法が近縁種と識別可能であるか確認するために、EUB338 プローブのミスマッチプローブを用いて実験を行った。本研究では、EUB338 プローブの塩基配列を 1 塩基、2 塩基異なるミスマッチプローブを用いた。同一ホルムアミド濃度でミスマッチプローブを用いた実験を行った結果、1 塩基よりも 2 塩基ミスマッチの方が蛍光強度の低下がみられた（図 3）。この結果は、通常の FISH 法と同様の傾向であるため、本手法は従来の FISH 法と同程度の特異性を有していると考えられる。さらに、EUB338 プローブを交雑させる FA 濃度を変化させ、実験を行った。その結果、FA 濃度を上昇させることでより蛍光強度が低下した。この結果においても FISH プローブと同様の結果であったため、本手法においても標的 rRNA に交雑していると考えた。

## 4. まとめ

本研究により、細胞壁処理と azide 標識数の増加させることで本手法の蛍光強度が向上することが明らかになった。しかし、azide 標識数の増加に伴う蛍光強度の向上は、BCN と HCR 法におけるプローブの濃度を再検討することで更なる蛍光増幅の可能性が考えられる。また、本手法の特異性を評価した結果、標的微生物の大腸菌と非標的微生物のメタン生成アーキアについて視覚検出による識別が可能であっただけでなく、ミスマッチプローブにおける近縁種の識別についても従来の FISH 法と同程度であることが示唆された。今後はホルムアミド濃度を変化させて、本手法のホルムアミド曲線を作成して従来の FISH 法のホルムアミド曲線との比較を行う。本手法を環境微生物に適用することで、シングルセル解析を発展させることができるだけでなく、未培養微生物の新たな知見の取得が可能となると期待している。

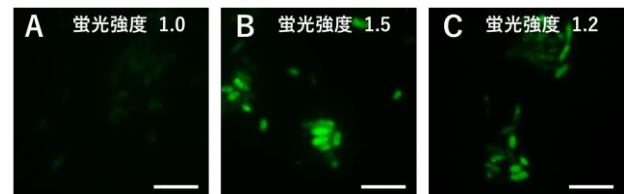


図 1 EUB338 プローブの azide 数増加による蛍光増幅。

A : azide 標識数 1 つ. B : azide 標識数 2 つ. C : azide 標識数 3 つ. 蛍光強度は azide 標識数 1 つの値を 1 とした. スケールバー : 10 $\mu$ m

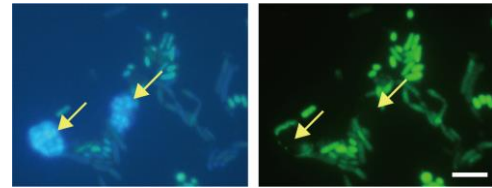


図 2 本手法を用いた大腸菌の視覚的検出。

左 : DAPI による全菌検出. 右 : プローブによる特異的な検出. 矢印はメタン生成アーキアを示す. スケールバー : 10 $\mu$ m

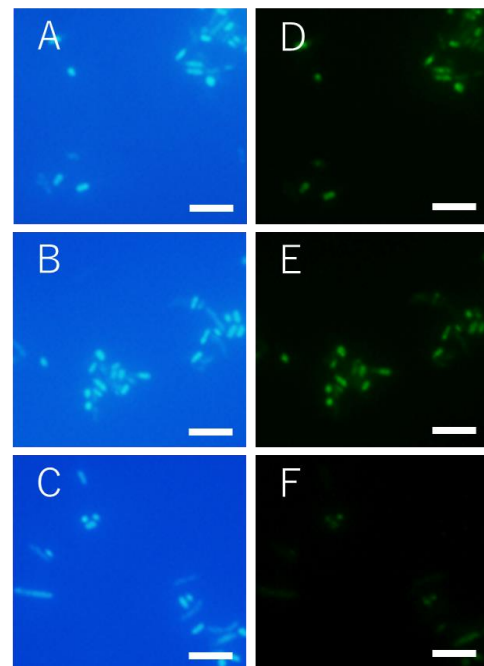


図 3 ミスマッチプローブにおける視覚検出。

左は DAPI による全菌検出. 右はプローブによる特異的検出. D : マッチプローブ. E : 1 塩基ミスマッチプローブ. F : 2 塩基ミスマッチプローブ. スケールバー : 10 $\mu$ m

## 参考文献

- 1) Kyrpides, N.C. *Biotechnol.*, 27, pp.627–632. 2009.
- 2) Lasken, R.S. *Microbiol.*, 10(5), pp.510–516, 2007.
- 3) DeLong, E. et al., *Science*, 243(4896), pp.1360–1363, 1989.
- 4) 山田ら, 第 55 回日本水環境学会年会講演集, p502
- 5) Yamaguchi, T. et al., *Syst. Appl. Microbiol.*, 38(6), 2015.4. pp.400-405