

機能遺伝子を標的とした酵素反応を用いない高感度 FISH 法の開発

松江高専 学生会員 ○永妻 志問
松江高専 正会員 山口 剛士

1. はじめに

微生物の機能を有効利用したバイオテクノロジーは、土木分野においても多く適用されている。したがって、環境中に生息する微生物の機能を個々に把握することは、新たな産業、工業に利用可能な微生物を見つけることに繋がる。個々の微生物の生態学的特徴を把握するには、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法¹⁾による標的微生物の検出、回収及びゲノム解析を行うシングルセル解析が有効である。環境微生物を視覚的に検出できる技術として horseradish peroxidase (HRP) を用いる catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法²⁾が挙げられる。一方、HRP に類似した peroxidase を内在する微生物を標的とする場合、非特異的な蛍光を検出する恐れがある。そこで、シングルセル解析を行う上で peroxidase を内在する微生物に対しても有効な新規視覚的検出技術の開発を行っている。

2. 研究の着想

本研究では、高感度 FISH 法として *in situ* DNA-hybridization chain reaction (HCR)-FISH 法³⁾に着目した。概要を Fig.1 に示す。本手法は、initiator probe (Fig.1-I) を伸長起点とし、蛍光標識した二種類の amplifier probe (H1, H2: Fig.1-II) が伸長反応を示すことで蛍光増幅する高感度 FISH 法である。これは酵素を触媒としないため、本研究との相性が良いといえる。一方、機能遺伝子を標的とするには更なる高感度化が望まれる。そこで、機能遺伝子に交雑する probe に複数の initiator probe を取り付けることで高感度化する方法を考え、azide と alkyne を用いた click chemistry に着目した。これは、簡便かつ特異的な結合を可能とする反応であり、initiator probe の接続に利用できると考えられる。そこで、HCR-FISH 法と click chemistry を組み合わせた高感度 FISH 法の検討を行った。

3. 実験方法および結果

3.1 HCR-FISH 法と click chemistry による検出

本手法は、①標的遺伝子に特異的に交雑する alkyne 付加 probe の作製、②標的遺伝子に alkyne 付加 probe を交雑、③一価銅を触媒として azide 付加 initiator probe を alkyne 付加 probe に結合 (click chemistry)、④HCR による蛍光増幅の四段階で構成される (Fig.2)。標的微生物は、アナモックス細菌の *hzo* 遺伝子をプラスミドに挿入した遺伝子組み換え体を用いた。また、非標的微生物としてアーキアを用いた。これらのサンプルをメンブレンフィルター (pore size: 0.2 μ m) に集菌し、low-melting point agarose (0.2% (v/v)) で包埋した。

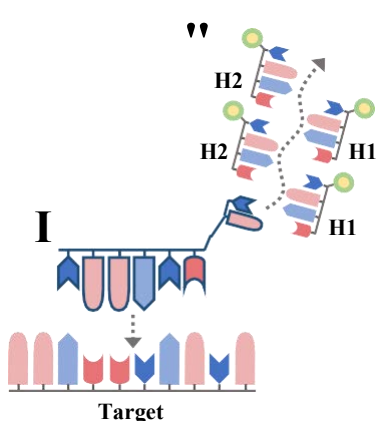


Fig.1 Overview of HCR-FISH

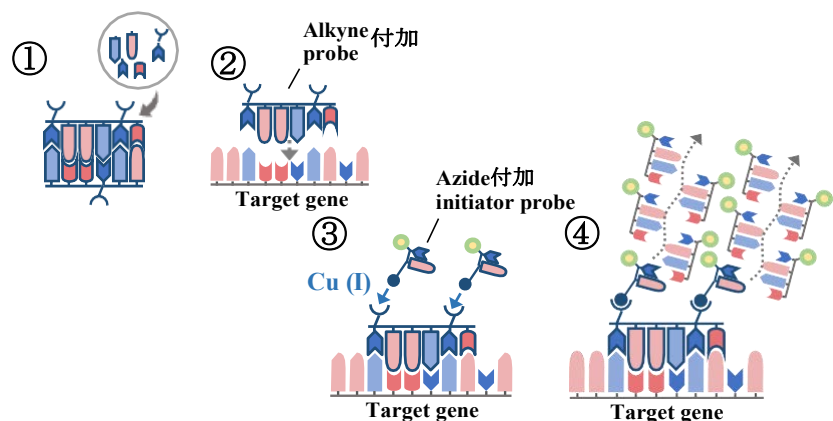


Fig.2 Procedure of new method

キーワード 高感度 FISH 法, HCR-FISH 法, click chemistry, 機能遺伝子

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 山口研究室 TEL 0852-36-5261

3.2 非特異的な蛍光の検討

本手法を適用したところ、アーキアから非特異的な蛍光が検出された(データ非表示)。これは、蛍光増幅の起点となるclick chemistryに原因があると考えた。そこで、alkyne-free probeを用いた場合(A)、azide-free initiator probe(B)を用いた場合、initiator probe(C)を用いない場合でそれぞれ検出した(Fig.3)。その結果、initiator probeを用いない場合に限り、非特異的な蛍光が検出されなかった。次に、click chemistryの触媒に用いるCuSO₄の最終濃度を0-5mMの範囲で変化させ実験を行った(Fig.4)。その結果、濃度低下に伴って非特異的な蛍光が検出されなかった。

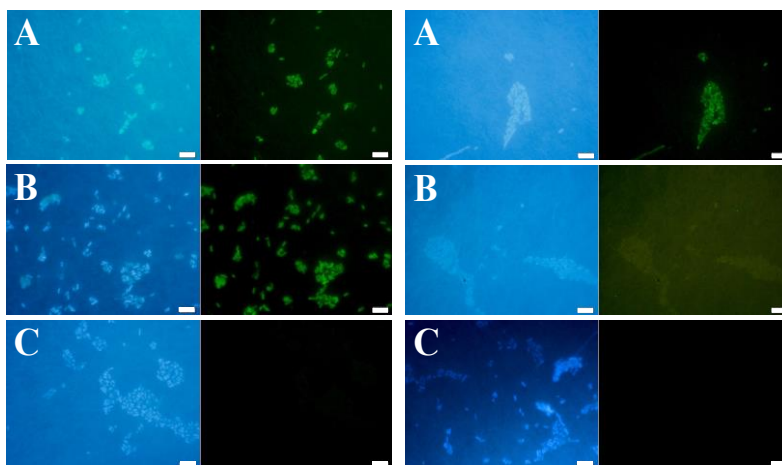


Fig.3 Detection of recombinant *E.coli* by using alkyne-free (A) or azide-free (B) or initiator-free (C). Scale bars represent 10 μ m.

3.3 非特異的な蛍光の改善および特異的な検出の実現

非特異的な蛍光の原因は、HCRの伸長起点を有しているinitiator probeとサンプル中の生体分子の非特異的な結合である可能性を考えた。そこで、Hongらの研究⁴⁾を参考にし、THPTA濃度をCuSO₄濃度の5倍に上昇させたところ、非特異的な蛍光の抑制に成功した。一方、標的微生物からは蛍光が得られなかった。この原因としてazide付加initiator probeがalkyne付加probeまで到達できていないことが考えられた。そこで、click chemistryの反応時間を1-4時間の範囲で変化させた。反応時間が4時間のとき、特異性を維持しながら標的微生物の一部から蛍光が検出された(Fig.5)。

3.4 環境サンプルへの適用

標的微生物を遺伝子組み換え体から水処理リアクター内のアナモックス細菌に変更し、メタン生成アーキアと混合させ、本手法を適用した。その結果、アーキアから非特異的な蛍光は検出されず、環境サンプルの一部から蛍光が検出された(Fig.6)。

4. まとめおよび今後の展望

本研究では、HCR-FISH法とclick chemistryを組み合わせた高感度FISH法の開発を試みた。本手法を適用したところ、非特異的な蛍光が検出された。これは、銅イオンとinitiator probeが原因と考えられる。そこで、THPTA濃度をCuSO₄濃度の5倍に上昇させたところ、非特異的な蛍光の改善に成功した。一方、標的微生物から蛍光が検出されなかったため、click chemistryの反応時間を4時間に延長したところ、特異性を維持した蛍光が部分的に検出された。同一条件で環境サンプルに適用したところ、環境サンプルの一部から蛍光が検出された。今後は、検出率の向上を図るため、交雑条件について検討を行う。また、特異性を確認するため、洗浄条件の再検討によるノイズの抑制、検出した微生物を回収・解析による確認を行う予定である。

参考文献 1) Amann, R. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56** (6), pp.1919-1925. 1990. 2) Moraru, C. *et al.*, *Environ. Microbiol.*, **12** (11), pp.3057-3073. 2010. 3) Yamaguchi, T. *et al.*, *Syst. Appl. Microbiol.*, **38** (6), 2015. 4) Hong, V. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48** (52) pp.9879-9883. 2009.

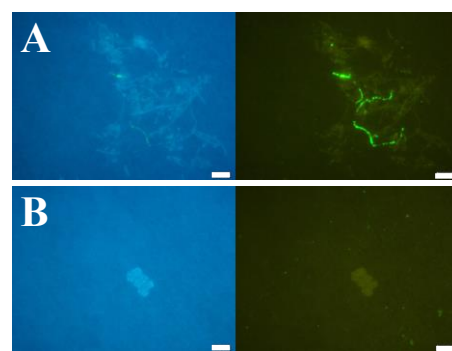


Fig.5 Detection of recombinant *E.coli* (A) or archaea (B) with a reaction time of 4hours. Scale bars represent 10 μ m.

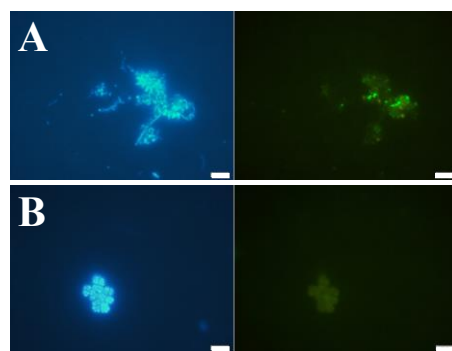


Fig.6 Detection of *hzo* gene in environment sample (A) or archaea (B). Scale bars represent 10 μ m.