

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：55201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06814

研究課題名(和文) 微生物資源を活用する視覚的検出技術の開発-未培養微生物の機能推定技術への適用-

研究課題名(英文) Development of a visualization method by using HCR-FISH and Click Chemistry

研究代表者

山口 剛士 (Yamaguchi, Tsuyoshi)

松江工業高等専門学校・環境・建設工学科・助教

研究者番号：30759832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵素を用いない高感度FISH法であるin situ DNA-hybridization chain reaction (HCR) 法の蛍光感度を向上させるために、click chemistryを組み合わせた新規高感度FISH法の開発を試みた。また、16S rRNAだけでなく機能遺伝子への視覚的検出も試みた。その結果、click chemistryに用いる銅イオンが交雑条件に影響を及ぼし、菌体内における最適化が困難であった。しかし、今後、click chemistryの最適化が可能になれば、環境微生物の分野への貢献が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, combination with in situ DNA-hybridization chain reaction (HCR) and click chemistry was developed for successfully detecting microorganisms in oligotrophic. Although it high specificity by using Escherichia coli was revealed, click chemistry was not successful. It may be applicable for detection of an environmental microorganism after optimization of click chemistry in situ.

研究分野：環境微生物学

キーワード：高感度FISH法 HCR法 click chemistry

1. 研究開始当初の背景

微生物を用いたバイオテクノロジーは、急速に発展している分野である。また、近年では環境中に生息する微生物からバイオマスの有効利用に必要なセルロース分解酵素や環境衛生保全に有用なウイルス吸着タンパク質等、微生物由来の多くの有用遺伝子が報告されている。また、環境微生物の約 99%が未知微生物であることを考慮すると、環境中には我々が出会っていない微生物が存在し、未利用有用遺伝子資源が多く存在すると考えられる。さらに地球規模の物質循環にも微生物活動が大きく関わっているが、特に地殻や深海に生息する微生物の詳細な機能は明らかになっていない。こうした現状から、我々が新たな微生物資源を獲得する、または環境動態を理解するために微生物をより深く理解することが今後必要であり、求められている。しかしながら、標的とした微生物がその場所で「何をしているのか」を把握しようとした場合、rRNA 遺伝子に基づく解析では、標的微生物に近縁な分離株の情報に頼らなければならない。また、その分離株は、微生物種全体の約 1%と報告されており、標的微生物が分離株と系統分類学的に離れている場合、その微生物の機能を理解することは、ほとんど不可能である。近年では、微生物内の rRNA を標的として視覚的検出を行った後、検出した微生物をシングルセルで回収し、全ゲノム配列を解析する方法も報告されている。しかしながら、蛍光感度の問題や細胞壁処理の問題など、未だ確立された手法が存在していない。

2. 研究の目的

このような背景から、本研究では、従来の高感度 FISH 法である細胞壁処理を必要としない hybridization chain reaction-fluorescence in situ hybridization (HCR-FISH) 法よりも高感度な蛍光が得られる手法の開発を行った。本研究では、抗原抗体反応の代替技術として click chemistry に着目し、click chemistry と HCR-FISH 法を組み合わせた高感度 FISH 法の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FISH 法

FISH 法は sekiguchi らの方法に準拠し行った。

(2) quickHCR-FISH 法

quickHCR-FISH 法は、Yamaguchi らの方法に準拠し行った

(3) Click chemistry 反応の最適化

Click chemistry 反応の有無は以下の方法で判断した。まず、Alkyne を標識させた細菌を標的とした EUB338 を用いて 16S rRNA に交雑させた。その後、HCR 法の伸長起点に azide (3'末端に標識) 及び AlexaFluor488 (5'末端に標識) を標識したプローブを用いて、click chemistry 反応を行った。最後に、顕微鏡観察を用いて菌体から蛍光の有無で判断した。

4. 研究成果

(1) 16SrRNA 標的部位への交雑の確認

まず、Alkyne を標識したプローブが 16S rRNA に交雑するのか確認するために、Alkyne と AlexaFluor555 を標識した EUB338 プローブを用いて、交雑の有無で判断した。その結果、標的微生物から蛍光を得ることに成功した (Fig.1)。また、非標的微生物からは蛍光が得られなかったことから、本研究で用いたプローブが標的部位のみへ交雑しているが明らかとなった。

(2) Click chemistry 反応の最適化の検討

Baseclick GmbH 社の BaseClick™-Kit Fluorescein のプロトコルを考慮し、プロトコルの変更を行った。変更点は、触媒を CuSO₄ から CuBr にしたことである。本研究では、click chemistry を行う順序を 2 種類の方法で行った。1 つ目の方法は BaseClick™-Kit Fluorescein のプロトコル通りに 1.5mL チューブ内で click chemistry 反応を行い、その後、スライドガラス上で標的部位との交雑を試みた。しかしながら、菌体から蛍光が得られなかった。この要因としては、click chemistry 反応が起こっていない可能性、作成したプローブが細胞内に浸透しなかった可能性が考えられる。次に、2 つ目の方法として、FISH 法と同様な操作で alkyne を標識した EUB338 プ

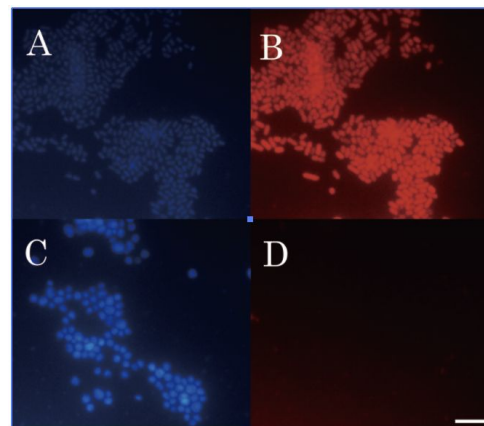


Fig.1 Alkyne を標識させたプローブによる大腸菌の検出。A,B: 大腸菌, C,D: メタン菌。A,C: 全菌, B,D: プローブによる蛍光。両写真とも同露光時間で撮影した。

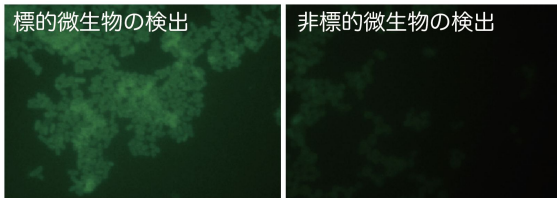


Fig.2 Click chemistry を用いた FISH 法による標的微生物の検出。両写真とも同露光時間で撮影した。

プローブを標的部位と交雑させた後、スライドガラス上で click chemistry 反応を行った。その結果、標的微生物から蛍光を得ることに成功した。しかし、ネガティブコントロールである古細菌からも微弱な蛍光が得られたため、click chemistry がうまく進行していない可能性が考えられた。また、スライドガラス上からも非特異的な蛍光が得られた。これは適切な洗浄が行われておらず、余剰な蛍光物質等を取り除けていない可能性が考えられた。さらに、click chemistry 時の交雑条件をホルムアミドにより厳しくした結果、蛍光が得られなくなった。この結果から、触媒である銅イオンが非特異的に交雑している可能性も考えられた。現在、銅イオン濃度とホルムアミド濃度など最適な交雑条件を模索している段階である。

(3) 今後の展望

本研究では、Alkyne を標識させたプローブが特異的に微生物を検出できることが明らかとなった。しかし、click chemistry 反応がうまく進行していない可能性が高く、今後も click chemistry 反応における実験条件の最適化が必要である。また、一価の銅を触媒として用いない click chemistry 反応も報告されていることから、銅を用いない手法開発も視野に入れている。本手法を開発できれば、近年の急速な技術発展を遂げているシングルセルゲノミクス、メタゲノム解析と組み合わせることも可能であり、数多くの未知未培養微生物の微生物機能の解明に貢献できるのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Tsuyoshi Yamaguchi, Bernhard M. Fuchs, Rudolf Amann, Shuji Kawakami, Kengo Kubota, Masashi Hatamoto and Takashi Yamaguchi. Rapid and Sensitive Identification of Marine Bacteria by an Improved in situ DNA-Hybridization Chain Reaction (quickHCR-FISH). *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 400-405, 2015.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Tsuyoshi Yamaguchi, Bernhard M. Fuchs, Rudolf Amann, Shuji Kawakami, Kengo Kubota, Masashi Hatamoto and Takashi Yamaguchi. A rapid in situ DNA-hybridization chain reaction protocol (quickHCR-FISH) for detection of marine bacteria. 16 th International Symposium on Microbial Ecology (ISME16), 87B. 2016 年 8 月 22-27 日, カナダ.
2. Hiroyuki Oono, Keisuke Kimura, Tsuyoshi Yamaguchi and Takashi Yamaguchi. Development of a novel sensitive FISH by using click chemistry, STI-Gigaku2017, p119, 2017 年 1 月 4-7 日, 新潟.
3. Keisuke Kimura, Tsuyoshi Yamaguchi, Katsumichi Takebe and Takashi Yamaguchi. A new sensitive FISH: Fluorescence amplification using click chemistry for detection of microorganisms, The 4th Gigaku conference, 2016 年 10 月 6-7 日, 新潟.
4. 大野裕之, 武邊勝道, 山口剛土. 新規高感度 FISH 法における hzo 遺伝子を標的としたプローブの選定, 第 51 回日本水環境学会年会, P662. 2017 年 3 月 15-17 日, 熊本.
5. 橋田一輝, 山口剛土, 武邊勝道, 加藤季晋. 中海に生息するアナモックス細菌の微生物群集構造解析, 第 51 回日本水環境学会年会, p612. 2017 年 3 月 15-17 日, 熊本.
6. 木村圭祐, 川上周司, 山口隆司, 山口剛土 (2017). Click chemistry を利用した高感度 FISH 法の開発, 第 51 回日本水環境学会年会, p693. 2017 年 3 月 15-17 日, 熊本.
7. 庄司和希, 山口剛土, 川上周司, 嘉藤健二, 崎幸子, 山口隆司. 宍道湖における主要微生物の生息状況と水質との相関の考察. 第 50 回日本水環境学会年会, L-20. 2016 年 3 月 16-18 日, 徳島.
8. 木村圭祐, 山口剛土, 川上周司, 山口隆司. Click chemistry を用いた新規高感度 FISH 法の開発. 第 50 回日本水環境学会年会, L-80. 2016 年 3 月 16-18 日, 徳島.

〔図書〕(計0件)
〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 剛士 (YAMAGUCHI Tsuyoshi)
松江工業高等専門学校 環境・建設工学科
助教
研究者番号：30759832

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()