

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：56101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14807

研究課題名(和文) シングルセル解析を進展させる環境微生物の機能推定技術の開発

研究課題名(英文) Development of high sensitive FISH for revealing functions of uncultured microorganisms

研究代表者

川上 周司 (Kawakami, Shuji)

阿南工業高等専門学校・創造技術工学科・講師

研究者番号：00610461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：汚染物質の浄化、地球温暖化ガスの固定、持続可能なエネルギーの創出に大きく関わる微生物資源を有効に利用するためには、さらなる微生物の理解が必要不可欠である。多くの微生物が人為的に分離培養できない現状において、近年発展著しい分子生物学的アプローチは有効である。さらに微生物細胞を遺伝子の運び屋として捉え、細胞のまま解析を行うシングルセル解析は、培養を伴わない解析手法として近年注目を集めている。本研究ではシングルセル解析のさらなる発展を目指し、細胞壁処理不要の新規な高感度FISH法であるin situ DNA HCR法を改変し、mRNAの検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we introduced an improved in situ DNA-HCR protocol (quickHCR-FISH) with higher sensitivity, and the amplification time was accelerated to only 15 min by using a dextran sulfate and blocking reagent containing amplification buffer, compared with 2 h in the original protocol. Finally, quickHCR-FISH was applied to marine bacteria in seawater and sediment samples for checking applicability of environmental microorganisms. The detection rates of marine bacteria after quickHCR-FISH were almost the same as after CARD-FISH. This newly developed protocol can be an attractive alternative to CARD-FISH for the detection of microorganisms in environmental context.

研究分野：環境微生物学

キーワード：環境微生物 シングルセル解析 FISH法

1. 研究開始当初の背景

環境中にはまだまだ未利用遺伝子資源が多数存在する。さらに地球規模の物質循環の多くは微生物活動が深く関わっており、特に地殻や深海などの極限環境下では未だその詳細な機構は分かっていない。こうした現状から、我々が新たな微生物資源を獲得する、あるいは環境動態を把握するには、微生物をより深く理解することが求められている。しかしながら、我々が未だ微生物を完全に理解できていないことは明白あり、それら微生物の生態や機能を解明する技術に限界があることも大きな課題となっている。研究代表者は、この問題を解決する方法の一つとして、細胞を破壊しないシングルセルでの解析が有効であると考えている。中でも Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法は、雑多な微生物群の中から特定の微生物のみを標的分子の塩基配列の違いにより識別し、*in situ* (原位) で視覚的に検出することが可能な技術である。現在、主に rRNA を標的とした解析に用いられている。2007 年には、視覚的に検出した微生物をシングルセルレベルで回収し、回収した細胞から全ゲノム配列を決定する技術が報告された (Lasken, 2007)。この報告により FISH 法の利用価値は飛躍的に高まり、微生物学者の注目を集めている。本研究では、この FISH 法を機能遺伝子の検出に応用することを目的としている。微生物の機能遺伝子をシングルセルで検出するためには、極めて高い検出感度をもつ技術が必要不可欠である。これは FISH 法の蛍光感度が標的の存在数に依存するためである。通常標的として用いられる rRNA の存在数(10^5 コピー/cell) に対し機能遺伝子の存在数は (主にシングルコピー/cell) 極めて少ない。これまでに報告されている機能遺伝子検出技術には、標的核酸を増幅する nucleic acid amplification 法や研究代表者が報告した tyramide signal amplification 法を用いた方法がある (長谷川ら, 2010)。し

かし、これら技術は各々の反応に必要な酵素を細胞内に浸透させる必要があり、分子量の大きな酵素 (40,000Da 程度) を浸透させるには適切な細胞壁処理が必要である。また、微生物の細胞壁は極めて多様であり、どの微生物にも万能に機能する細胞壁処理技術は確立されていない。また、我々も細胞壁処理技術の開発を行ってきたが (Kubota *et al.*, 2008)、今後よほどのブレイクスルーが起きない限りこの問題を克服することは難しいと考えている。

2. 研究の目的

このような背景を受け、本研究では微生物をより深く理解するための方法の一つであるシングルセル解析を大きく前進させるために、細胞壁処理を必要としないという観点から機能遺伝子を検出できる新規高感度 FISH 法の開発を目的とした。具体的には、Hybridization chain reaction (HCR) 法を用いた遺伝子検出技術の開発を行った。これらの方法は数十塩基の DNA プローブを用いることから細胞壁処理を必要とせず、FISH 法と同程度の前処理での適用が期待できる。研究代表者はこれまでに *in situ* HCR 法と呼ばれる技術の開発に成功し、細胞壁処理なしで海洋性細菌の rRNA を高感度に検出することに成功している (山口剛士ら, 2011)。本研究では、後述する新しいアイデアを用いさらなる高感度化を行い、機能遺伝子の検出を目指した。

3. 研究の方法

HCR 法とは、酵素を用いない DNA、RNA の検出技術として 2004 年に報告された方法である (Robert *et al.* PNAS)。原理としては、ステムループ構造を有したプローブを二種類用いることで、標的遺伝子配列を起点として伸長反応がおこり、結果標的分子を検出するものである。HCR 法は *in vitro* での研究は

盛んに行われているものの in situ あるいは微生物に適用された報告はなかった。研究代表者は、2011年に in situ HCR 法と呼ばれる新規高感度を開発し、rRNA を標的とし海洋性細菌を細胞壁処理を施さず高感度に検出することに成功した(山口剛士ら, 2011)。また既報の高感度 FISH 法一つである CARD-FISH 法と比較するために、CARD-FISH 法の適用には適切な細胞壁処理を有する *Methanosata* に対し in situ HCR 法を適用したところ、細胞壁処理なしで高感度化が可能であった。本研究では、この in situ HCR 法を mRNA、機能遺伝子の検出に適用すべく、さらなる高感度化を検討した。そこで、ブランチャーと呼ばれる分岐点を設けた。HCR 反応は比例的な増幅であることから分岐点を設けることで指数関数的な増幅に変わることが期待できる。本研究では、ブランチャーを用いた方法を in situ dual DNA-HCR 法と呼ぶことにする。

4. 研究成果

まず、in situ DNA-HCR 法にブランチャーを設けることを目指し、EUB338 領域に対し in situ dual DNA-HCR 法を適用させ、プロトコルの確立を行った。蛍光増幅させる amplification buffer の組成を検討した結果、50 mM Na₂HPO₄, 0.9 M NaCl, 1 % blocking reagent, 10 % dextran sulfate, 0.01 % SDS で最も蛍光強度が強かった。この要因としてプローブの実効濃度を向上させる dextran sulfate の存在が蛍光強度に影響を及ぼしていると考えられる。また、スライドから得られた非特異的な蛍光を抑制するため、洗浄方法の検討を行った結果、界面活性剤として Tween 20 を添加することが有効であった。In situ dual DNA-HCR 法のプロトコルの最適化を行った結果、標的微生物のみから蛍光が得られ、非標的微生物からは蛍光が得られなかった。従って、標的微生物のみを特異的に検出できたと判断した。

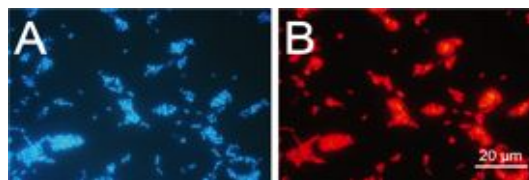


Fig. 1 In situ dual HCR 法による細菌の mRNA の検出. 右図が DAPI 視野、左が蛍光視野.

次に、プロトコルの最適化を行った in situ dual DNA-HCR 法と in situ DNA-HCR 法の蛍光強度を算出した。その結果、in situ dual DNA-HCR 法で得られる蛍光強度は、in situ DNA-HCR 法と比較して約 2 倍程度高かった (Fig. 1)。また、in situ dual DNA-HCR 法による 2 回の HCR による伸長で得られる蛍光強度は、in situ dual DNA-HCR 法に用いる D1 及び D2 を用いた 1 回のみ HCR による伸長よりも約 4 倍程度高かった。この結果より、HCR による伸長が、菌体内で複数回できることが明らかとなった。

以上の検討により、In situ dual DNA-HCR 法は、in situ DNA-HCR 法よりも高い蛍光強度が得られ、菌体内で複数回の HCR による伸長反応が起こっていると考えられた。今後、in situ dual DNA-HCR 法を用いることでこれまで高感度 FISH 法の適用が難しかった未培養微生物への適用が可能になり、これら微生物の mRNA や機能遺伝子の解析が進展すると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tsuyoshi Yamaguchi, Bernhard Maximilian 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*, Vol. 38 (6), pp. 400-405, 2015.

Kengo Kubota & Shuji Kawakami.

Protocol for In Situ Detection of Functional Genes of Microorganisms by Two-Pass TSA-FISH. Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols, Springer Protocols Handbooks, DOI 10.1007/8623_2015_71, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.

[学会発表](計 8件)

大宮 恭平, 山口 剛士, 幡本 将史, 中村 明靖, 山口 隆司, 川上周司, 久保田 健吾, 荒木 信夫. 酵素反応を必要としない新規高感度 FISH 法による環境微生物の mRNA の視覚的検出. 第 49 回水環境学会年会講演集. p.371, 2015.3.16~18 金沢大学.

山口剛士, Bernhard M. Fuchs, 川上周司, 幡本将史, 久保田健吾, Rudolf Amann, 山口隆司. Modification of in situ DNA-HCR protocol for speedy detecting environmental microorganisms. 第 49 回水環境学会年会講演集. P. 506, 2015.3.16~18, 金沢大学.

宮崎優治, 川上周司, 西岡卓馬, 幸泉有里, 黒田恭平, 中原望, 山口隆司. 次世代シーケンサーを用いた浄化槽の微生物群集構造解析. 第 49 回水環境学会年会講演集, P.704, 2015.3.16~18, 金沢大学.

柿内涼太, 今出圭哉, 川上周司, 山田剛史, 山口剛士, 山口隆司. 環境微生物の細胞壁タンパク質を検出するアプタマーの開発. 第 49 回水環境学会年会講演集, P.728, 2015.3.16~18, 金沢大学.

庄司和希, 山口剛士, 川上周司, 嘉藤健二, 山口隆司. 穴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. L20. p.640, 2016. 3.16.アステイ徳島.

木村圭佑, 山口剛士, 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. L60. p.699, 2016. 3.16.アステイ徳島.

木村圭佑, 山口剛士, 山口隆司, 川上周司. Click_chemistry を利用した新規高感度 FISH 法の開発. 第 51 回水環境学会年会講演集, p.693, 2017.

川上周司, 山口剛士, 山田剛史, 山口隆司. 蛍光標識 aptamer による *E. coli* の視覚的検出~高感度化と蛍光の均一化の検討~, 第 51 回水環境学会年会講演集, p.338, 2017..

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 周司 (KAWAKAMI Shuji)
阿南工業高等専門学校・創造技術工学科・建設コース・講師
研究者番号：00610461