

平成22年4月2日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20860009
 研究課題名(和文) 環境微生物の機能解明に不可欠なシングルセルレベルでの視覚的な遺伝子検出技術の開発
 研究課題名(英文) Development of gene FISH for environmental microbiology

研究代表者
 久保田 健吾 (KUBOTA KENGO)
 東北大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：80455807

研究成果の概要(和文)：

微生物の機能遺伝子を細胞を破壊せず視覚的に検出可能な技術を開発することを目的とした。その結果、我々が開発した two-pass TSA-FISH 法とオリゴヌクレオチドプローブあるいはポリヌクレオチドプローブを用いて、検出可能な技術を開発した。技術の特異性など様々な特徴を調査した。また環境サンプルに適用することで、技術の将来性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：

In this study, gene FISH is developed for environmental microbiology. Two-pass TSA-FISH with oligonucleotide or polynucleotide probes successfully developed for detection of single copy genes in prokaryotic cells. Application of the technique to environmental samples was also successful; further application of this technique for environmental microbial autecology is possible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,370,000	411,000	1,781,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,570,000	771,000	3,341,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：FISH法、遺伝子、環境微生物

1. 研究開始当初の背景

最先端の遺伝子解析などから、微生物の可能性は我々の予想を遥かに超えるものである事が分かってきた。しかしながらメタゲノム解析に代表される塩基配列を読み、その配列情報からシステムを理解するという考え

だけでは、微生物に関する理解は不十分であることが知られており、微生物をシングルセルレベルで解析すること (microbial autecology) が不可欠である。rRNA 遺伝子配列に基づいた rRNA を標的とした分子系統学的な microbial autecology は 20 年近い時と多

くの研究者による改善・改良を経て、多くのラボで実用化されている。しかしながら機能遺伝子を標的とした微生物機能に基づく microbial autecology は、ようやく幾つかの研究グループが実現したものの、世界中でルーチンとして用いられるだけのツールがなく、実用化にはほど遠い。

2. 研究の目的

本研究ではこのようなツールを提供し、microbial autecology の確立に貢献すべく、実験系の構築が容易かつ特異性の高いオリゴヌクレオチドプローブを用いた微生物の染色体に保存されている遺伝子を視覚的に検出可能な技術の開発を世界に先駆けて行う。

3. 研究の方法

本研究におけるメインテーマはシングルコピー遺伝子の視覚的検出技術の開発である。そこで私は Two-pass TSA-FISH 法に着目して研究を遂行する。Two-pass TSA-FISH 法は、申請者らが世界に先駆けて報告した技術であり、その特徴を十分に理解している。Two-pass TSA-FISH 法では酵素標識プローブを標的分子に交雑させた後、TSA 反応によりハプテンを菌体内に沈着させる。続いてこのハプテンに特異的な酵素標識抗体を反応させ、その後、再度 TSA 反応を行う。2 回目の TSA 反応では蛍光基質を用いるため、反応後は落射蛍光顕微鏡にて視覚的に検出可能となる。

4. 研究成果

本研究は microbial autecology (微生物をシングルセルレベルで解析すること) の確立に貢献すべく、微生物の機能遺伝子を細胞を破壊せず視覚的に検出可能な技術を提供することを目的として行われた。そこで我々の研究グループが開発した two-pass TSA-FISH 法を用いた遺伝子検出技術の開発を行った。プローブにはオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドプローブを用い、モデル微生物系としてメタン生成古細菌 (*Methanococcus maripaludis*, *Methanococcus vannileii*, *Methanothermococcus okinawensis*, *Methanoculleus chikugoensis*) および硫酸還元菌 (*Desulfobulbus propionicus*, *Desulfobulbus elongates*, *Desulfovibrio vulgaris*) を用いた。標的遺伝子にはメタン生成反応を触媒する Methyl co-enzyme M reductase のアルファサブユニットをコードする *mcrA* 遺伝子および硫酸呼吸反応を触媒する

adenosine-5'-phosphosulfate kinase のアルファサブユニットをコードする *apsA* 遺伝子とした。オリゴヌクレオチドプローブは、*mcrA* に特異的な PCR プライマーの両末端に DIG を標識したものをプローブとして用いた。ポリヌクレオチドプローブは標的微生物のゲノム DNA をテンプレートとした PCR 法により、プローブ中に DNP 標識 dUTP を取り込ませたものを合成して用いた。その結果、オリゴヌクレオチドプローブを用いた場合、two-pass TSA-FISH 法を用いてメタン生成古細菌の *mcrA* 遺伝子を可視化することが可能であった。ポリヌクレオチドプローブを用いた場合は、メタン生成古細菌については TSA-FISH 法で、硫酸還元菌については two-pass TSA-FISH 法を用いて可視化可能であった。シグナルノイズ比で見るとポリヌクレオチドプローブを用いた方が明らかに高かった事から、より実用的なのはポリヌクレオチドプローブであると判断した。

本技術の特異性について、*Dsb. propionicus*、*Dsb. elongates* (*Dsb. propionicus* のゲノム DNA をテンプレートとして合成したプローブに対する塩基配列相同性が 90% 程度)、*Dsv. vulgaris* (同 65% 程度) の三株を用いて検討を行った。まず、805 bp のプローブを用いるところ、*Dsb. propionicus* と *Dsv. vulgaris* の識別は可能であったが、*Dsb. elongatus* との識別は困難であった。そこで、より近縁種でも識別できる可能性がある短いプローブ (512, 157 bp) での識別を試みたが、これらのプローブを用いてもやはり *Dsb. propionicus* と *Dsb. elongatus* の識別は困難であった。なお TSA-FISH 法でも同様の結果が得られた。Ludwig らも 150~400 bp のポリプローブで識別可能な相同性の閾値は 85~75% であるという報告をしている。ポリプローブを用いると、1塩基ミスマッチあたりの交雑エネルギー変化量が小さくなる。従ってオリゴヌクレオチドプローブの様に、1塩基ミスマッチを識別することは困難になる。しかしながら機能遺伝子を標的とした場合、遺伝子配列相同性が 80-90% あれば、タンパク質の相同性は高い場合が多く、機能的に同一であることが予想されるため、遺伝子配列情報から微生物機能を推定する上では十分な特異性を有していると考えられる。

次に、環境サンプルを想定し微生物を混合した系においても同様の検討を行った。*Dsb. propionicus*、*Dsv. vulgaris* を混合させて両者の識別を試みたところ、ほぼ両者を識別可能であったが、*Dsb. propionicus* に隣接する *Dsv.*

vulgaris からのみ非特異な蛍光が得られた。我々はこの原因が、ポリプローブのネットワーク形成が菌体の外側まで広がり、そのプローブを起点として TSA 反応が起き、tyramide が *Dsb. propionicus* と隣接する *Dsv. vulgaris* にも沈着したためであると考えた。Zwirgmaierらは高濃度のプローブを長時間交雑させるとポリプローブ同士がネットワークを形成することを報告している。そこで、プローブ濃度を下げ、交雑時間を短くすることで問題の解決を試みたが、非特異な蛍光を完全に消すことはできなかった。そこで、菌体同士を分散させることが重要であると考え、ポリカーボネートフィルターに集菌してから菌体をスライドに転写させたところ、菌体の隣接を避けてスライドに固着させることができ、*Dsb. propionicus* のみを特異的に検出できた。従って、本手法を用いて検出を行う場合、菌体を適切に分散させる前処理が必要である。

最後に本技術の環境サンプルへの適用性を評価した。まず *mcrA* 遺伝子については、環境サンプルから抽出した DNA から *mcrA* 遺伝子特異的なプライマーセットを用いてクローンライブラリーを構築し、その際に作成したプラスミドを用いてプローブを合成した。*apsA* 遺伝子については環境サンプルから抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてプローブを合成し、*aps* 遺伝子を保持する微生物の網羅的検出を試みた。高い信頼性で検出するために、サンプルを十分に分散させ two-pass TSA-FISH 法を適用した。

汚泥サンプルに本手法を適用する前に、サンプル中に内在性ペルオキシダーゼ活性を有する微生物が存在しないか確認する必要がある。プローブの交雑反応を行わず two-pass TSA 反応のみを行ったところ、蛍光は得られなかった。このことから、このサンプルには手法を適用するに当たり障壁となるほどの内在性ペルオキシダーゼ活性を有する微生物が存在しないことが確認できた。そこで上述の条件を満足する実験を行ったところ、一部の菌体から蛍光を得ることができた。プローブが存在しない状態では菌体から蛍光は得られなかったこと、交雑条件を厳しくすると蛍光が消えたことから、得られた蛍光は標的遺伝子にプローブが交雑したことに由来するものであると考えられた。これにより、汚泥サンプル中から検出された微生物は *aps* 遺伝子を保有していると推察され、それらは硫黄呼吸に関わっている微生物群である可能性が示唆された。一連の研究を通して、機能遺伝子を視覚的に検出可能

な技術が開発できたと言える。

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 2 件)

1. Kawakami, S., K. Kubota, H. Imachi, T. Yamaguchi, H. Harada, and A. Ohashi. 2010. Detection of single copy genes by two-pass tyramide signal amplification fluorescence in situ hybridization (two-pass TSA-FISH) with single oligonucleotide probes. *Microbes and Environments*. 25: 15-21. (査読有)
2. 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹. 2009. 機能遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法による環境中未培養微生物の機能推定. *環境工学研究論文集*. 46: 537-544. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 川上周司, 久保田健吾, 長谷川拓也, 松浦哲久, 大矢明子, 井町寛之, 山口隆司, 原田秀樹, 大橋晶良. TSA-FISH 法を用いた機能遺伝子に基づいた微生物の視覚的検出技術の開発と適用. 第44回日本水環境学会. 2010年3月17日. 福岡大学.
2. 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹. 機能遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法による環境中未培養微生物の機能推定. 第46回環境工学研究フォーラム. 2009年11月29日. 新島学園短期大学.
3. 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹. 機能遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法による環境中未培養微生物の検出. 第25回日本微生物生態学会大会. 2009年11月21日. 広島大学.
4. 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹. Gene FISH による環境中未培養微生物の機能同定. 平成21年度土木学会全国大会. 2009年9月4日. 福岡大学.
5. 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 山口隆司, 大橋晶良, 原田秀樹. ポリプローブを用いた two-pass TSA-FISH 法による微生物の機能遺伝子の特異的検出. 水環境学会. 2009年3月16日. 山口大学.
6. 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 山口隆司, 大橋晶良, 原田秀樹. シングルセルレベルでの微

生物の機能遺伝子の特異的検出. 土木学会 東北支部. 2009年3月7日. 東北学院大学.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 健吾 (KUBOTA KENGO)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80455807

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：