

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：56101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760437

研究課題名(和文) 未培養微生物の機能推定技術の開発—細胞壁処理不要の高感度FISH法の開発—

研究課題名(英文) Development of novel high sensitive FISH for revealing the microbial ecology of uncultured microorganisms

研究代表者

川上 周司 (Kawakami, Shuji)

阿南工業高等専門学校・その他部局等・助教

研究者番号：00610461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未培養の原核生物の生態解明を後押しするシングルセル解析を進展させるために従来法よりもさらに感度の高いin situ HCR法の開発を行った。またアプタマーを用いた微生物可視化技術の適用可能性についても示した。これら方法は、これまで低活性かつ細胞浸透性が低いことで可視化が難しかった原核生物にも適用することができ、環境微生物の分野に新たな知見をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we present a non-enzymatic, hybridization chain reaction (HCR)-based signal amplified in situ whole-cell detection technique (in situ DNA-HCR), and aptamer-based live-cell detection technique for revealing the microbial ecology of uncultured microorganisms. They are a simple and easy technique for detecting single microbial cells and enhancing understanding of the ecology and behaviour of environmental microorganisms in situ.

研究分野：環境微生物学

キーワード：高感度FISH法 シングルセル解析 環境微生物学

## 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、今日の我々の生活の中で欠かすことのできない技術である。下排水処理においては、我々が微生物を有効利用できた代表的な技術であろう。また、近年ではバイオマスの有効利用に必要な不可欠なセルロース分解酵素や環境衛生の保全に有用なウイルス吸着タンパク質などの微生物由来の有用遺伝子が環境中から見つかっており、環境中にはまだまだ未利用遺伝子資源が多数存在すると思われる。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。

現在のところ、「環境中にどのような微生物がいるのか」を知る方法としては、rRNA アプローチが用いられている。微生物を rRNA 遺伝子に基づく系統分類学的な視点から捉え、どのような微生物が、どのような場所に、どの程度存在しているかといった情報を得る事ができる。しかしながら、標的微生物が「何をしているのか」という情報を得ようとした場合、標的微生物に近縁な分離株の情報に頼らざるを得ないのが現状である。また、これまでに分離培養された微生物は、微生物種全体の 1% にすぎないと報告もあり、標的微生物が未培養微生物群に分類された場合、その機能解明はほとんど不可能である。

「何をしているのか」を知る方法としては、タンパク質の構成情報をコードする機能遺伝子を標的とした解析がある。しかし、機能遺伝子を標的とした微生物群集構造解析では菌種を特定することは難しい。これは、既に分離培養された微生物を用いたゲノム解析からしか rRNA 遺伝子情報 (すなわち菌種) を含む機能遺伝子情報が得られないためである。また、近年進展が著しいメタゲノム解析により、膨大な数の機能遺伝子情報が遺伝子配列データベースに登録されているが、有用遺伝子配列のみの探求が先行しているメタゲノム解析において、それら個々の遺伝子情報がどの微生物由来であるかという論点は後回しにされているのが現状である。こうしたことが重なり、機能遺伝子解析により得られた遺伝子配列がジーンバンク (遺伝子情報バンク) のものと高い類似性を示すにも関わらず菌種の同定ができない場合が極めて多い。すなわち既存の方法では機能と系統が

独立した解析によって行われているために両者が全くリンクしていない。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* (原位置) 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。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、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 1) 機能遺伝子を検出できる新規高感度 FISH 法 (*in situ* dual DNA-HCR 法) の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 標的微生物の選定及び汚泥サンプルの調整

*In situ* dual DNA-HCR 法のプロトコルの最適化には、標的微生物として *Escherichia coli* K12 を用いた。また、非標的微生物として *Methanococcus maripaludis* S2 を用いた。各微生物は、LB 培地もしくは Japan Collection of Microorganisms が指示する培地で培養した後、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、エ

タノール/PBS 溶液中にて、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。バイオリアクター内の汚泥は、リアクター内のスポンジから汚泥を採取し、直ちに 4%パラホルムアルデヒド溶液で 3 時間固定した後、エタノール/PBS 溶液中にて、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (2) 本研究に用いたプローブ

本研究では以下のプローブを使用した。rRNA を標的とした connector プローブは EUB338 領域に交雑する配列及び伸長起点の配列を有したプローブである。mRNA の検出には *tmoA* mRNA 塩基配列に特異的に交雑する配列及び伸長起点の配列の両者を有した *tmoA*-connector プローブを設計した。さらに、*tmoA*-connector プローブの特異性を確認するために、1-3 塩基ミスマッチプローブを設計した。また、in situ dual DNA-HCR 法の伸長反応に用いる D1, D2, D3 及び D4 プローブに関して本研究で設計を行った。

#### (3) In situ DNA-HCR 法

In situ DNA-HCR 法は山口らの方法 (山口ら, 2011) に準拠し行った。

#### (4) In situ dual DNA-HCR 法

In situ dual DNA-HCR 法は、in situ DNA-HCR 法における HCR を菌体内で 2 回行う方法である。まず、D1 及び D2 の伸長起点を有する connector プローブと hybridization buffer を混合させ、 $46^{\circ}\text{C}$  で標的部位と交雑させた。その後、 $48^{\circ}\text{C}$  で 30 分間の洗浄を行った。次に、connector プローブから伸長反応を示す D3 及び D4 の伸長起点を有している D1 及び D2 と amplification buffer を混合して一回目の伸長を  $46^{\circ}\text{C}$  で 2 時間行った。最後に、D1 及び D2 から伸長反応を示す D3 及び D4 と amplification buffer を混合して二回目の伸長を  $46^{\circ}\text{C}$  で 2 時間行い、枝分かれのように蛍光増幅させた。

#### (5) Clone-FISH 法

Clone-FISH 法は Kubota らの方法 (Kubota et al., 2006) に準拠し行った。

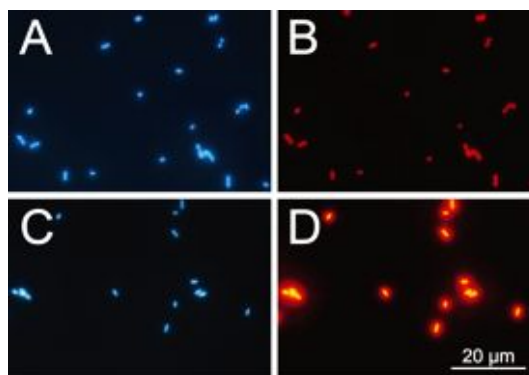
#### (6) 蛍光強度の算出

蛍光強度は画像解析ソフトウェアの daime を用いて算出した。

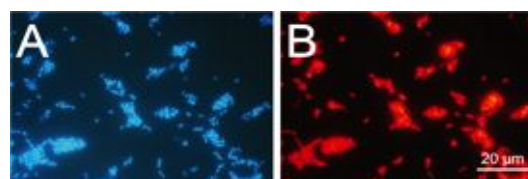
### 4. 研究成果

#### (1) In situ dual DNA-HCR 法のプロトコル確立

まず、in situ DNA-HCR 法により適用が可能であった 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 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



**Fig. 1** In situ HCR 法 (A, B) と in situ dual HCR 法 (C, D) による *E. coli* の検出。露光時間は同一。



**Fig. 2** In situ dual HCR 法による *tmoA* mRNA の検出。露光時間は同一。

トコルの最適化を行った結果、*E. coli* のみから蛍光が得られ、非標的微生物である *M. maripaludis* 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。

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。

#### (2) Clone-FISH 法によるプローブの有用性の確認

Clone-FISH 法を行った結果、*tmoA* 遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌から蛍光が得られた (Fig. 2)。一方で、ネガティブコントロールとした *tmoA* 遺伝子以外の機能遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌では蛍光が得られなかった。この結果より、*tmoA*-connector プローブは、プラスミド上の *tmoA* 遺伝子から発現した RNA に特異的に交雑したと判断した。さらに 1-3 塩基ミスマッチプローブを用いてプローブの特異性を確認した結果、2-3 塩基ミスマッチのプローブでは菌体から蛍光が得られなかった。しかし、1 塩基ミスマッチプローブでは非特異的な蛍光が得られたため、非特異的な蛍光を抑制するために競合プローブを用いる必要があると考えられる。

(3) 環境微生物中の *tmoA* mRNA への適用  
バイオリアクター内のスポンジから採取したサンプルに in situ dual DNA-HCR 法を適用し, *tmoA* mRNA を保持する微生物の検出を試みた結果, 一部の菌体から蛍光を得ることに成功した。

#### (4) まとめ

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。また, 本研究で設計した *tmoA*-connector プローブは, 標的微生物を特異的に検出することが可能であった。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 3 件)

Tsuyoshi Yamaguchi, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Hiroyuki Imachi, Masanobu Takahashi, Nobuo Araki, Takashi Yamaguchi and Kengo Kubota. In situ DNA-HCR: A facilitated in situ hybridization chain reaction system for the detection of environmental microorganisms, *Environmental Microbiology*, DOI: 10.1111/1462-2920.12745, 2015.

M. Aoki, Ehara M, Saito Y, Yoshioka H, Miyazaki M, Saito Y, Miyashita A, Kawakami S, Yamaguchi T, Ohashi A, Nunoura T, Takai K, Imachi H. A Long-term cultivation of an anaerobic methane-oxidizing microbial community from deep-sea methane-seep sediment using a continuous-flow bioreactor. *PLoS One*, Vol. 9 (8), e105356. 2014.

高橋竜司, 荒木信夫, 川上周司, 青木仁孝, 山口隆司. 高感度 FISH 法を用いた機能と系統を結びつけるシングルセル解析による脱窒素細菌の同定, 土木学会論文集 G (環境), Vol. 68, pp \_531-538, 2013.

[学会発表](計 6 件)

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.

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.

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.

大宮恭平, 山口剛士, 幡本将史, 山口隆司, 久保田健吾, 川上周司, 荒木信夫. 酵素反応を必要としない蛍光増幅技術 (HCR 法) を用いた環境微生物の mRNA の視覚的検出方法の開発. 平成 26 年度全国大会第 69 回年次学術講演会, 2014.9.10~12, 大阪大学豊中キャンパス.

柿内涼太, 川上周司, 山口剛士, 山田剛史, 山口隆司 (2014). アプタマーを用いた微生物の酵素の検出, 第 48 回日本水環境学会年会, p339, 2014.3, 東北大学.

山口剛士, 川上周司, 幡本将史, 久保田健吾, 高橋優信, 井町寛之, 荒木信夫, 山口隆司. 新規蛍光増幅技術 (HCR) 法を用いた高感度 FISH 法の開発, 第 16 回日本水環境学会シンポジウム, pp.437-442, 2013.

### 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・助教

研究者番号：00610461