

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630221

研究課題名(和文) 金粒子を用いた新規微生物検出法の開発:nanoSIMSを用いた微生物代謝機能解明

研究課題名(英文) Development of a novel in situ hybridization method using gold nano particle for nanoSIMS analysis

研究代表者

久保田 健吾 (Kubota, Kengo)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80455807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NanoSIMSを用いた微生物解析時の微生物同定法として、ナノサイズの超微金粒子を用いて微生物を検出する方法の開発を試みた。その結果、金ナノ粒子を直接オリゴヌクレオチドに標識したプローブを用いてISHを行ったのち、NanoSIMS解析を行う一連の技術を開発することが出来、Gold-ISH法として提案した。本技術を用いて、嫌気性処理プロセスにおいて乳酸を資化する硫酸還元菌群を同定することが出来た。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel in situ hybridization method using ultra-small gold nano-particle-labeled oligonucleotide probe for phylogenetic identification of environmental microorganisms during nanoSIMS analysis, and proposed as Gold-ISH. Lactate-assimilating sulfate reducing bacteria in an anaerobic wastewater treatment reactor were identified by using the proposed method.

研究分野：環境分子生態学

キーワード：金粒子 NanoSIMS

### 1. 研究開始当初の背景

生物学的廃水処理技術では排水中の有機物や窒素分、有害物質を複合微生物群集を用いて分解・除去している。しかしながらその微生物群集の機能については未だ殆ど分かっていない。微生物機能を解明することは、プロセスを有機的かつ効率的にプロセスを開発する上では、欠かすことはできない。機能遺伝子などに基づく解析の他に、微生物の代謝機能をシングルセルレベルで解析する方法がある。放射性同位体を基質として用い、微生物による基質取り込みを解析する Microautoradiography (MAR) は、微生物を培養によらず検出できる Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法と組み合わせることで (MAR-FISH)、微生物の代謝機能を解明してきた。しかしながら MAR-FISH 法では、放射性同位体を用いることや窒素を直接検出できない (放射性同位体がない) など、様々な問題を抱えていた。

近年、secondary ion mass spectrometry (SIMS) の技術革新が進み、解像度が 50 nm と微生物をシングルセルレベルで解析するのに十分な nanoSIMS 50L が開発された。SIMS では、一次イオンをサンプルに照射し、発生する二次イオンを定量的に捉えることができるため、放射性あるいは安定同位体を測定することができる。NanoSIMS による微生物の同定には、FISH 法による微生物同定を落射蛍光顕微鏡を用いて行う事ができないため、これまでに、ハロゲン族の元素 (F, I, Br) を含む物質で標的とする微生物をプロービングする方法が開発されてきた (SIMSISH, EL-FISH, HISH など)。しかしながらこれらの方法には、1. 十分な感度を得るために CARD 増幅を行う必要があり、horseradish peroxidase (HRP) を菌体内に浸透させるための細胞壁処理が必要である、2. CARD (Catalyzed Reporter Deposition)-FISH 法をベースとした方法では、大量の tyramide の細胞内沈着により、炭素などの細胞内同位体比などが変化してしまう、3. 堆積物などハロゲン族元素を多く含む環境のサンプルには、バックグラウンドが高く、適用できない、などの問題があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ハロゲン族元素の代わりに、「金 (Au)」に着目した。金はイオン化効率も高く、高感度な検出が可能な他、生体内の存在率も少ないためバックグラウンドを低く抑えることができる。また、ハロゲン族元素が豊富にある環境のサンプルも解析できるようになる。更に、例えば undecagold は直径が 0.8 nm 程度で、有機シエルを入れても 2 nm 以下であり、5-6 nm もある HRP よりも小さく、細胞壁処理が容易になる事が考えられる。また、gold enhancement などを行う事でシグナルを更に増幅することができる。しかしながら金を用いた検出系は、undecagold をオリ

ゴヌクレオチドあるいは tyramine に標識する技術が開発されていないため、用いられていない。そこで本研究では、これらの技術を開発し、nanoSIMS による微生物の代謝機能を解明するための微生物のプロービング法として、金粒子を用いた新規微生物検出法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 金粒子チラミドを用いた CARD-GoldISH 法

CARD-GoldISH 法は CARD-FISH を応用した手法で TSA (Tyramide Signal Amplification) 反応を利用する。TSA 反応とは過酸化水素の存在下で HRP の酵素触媒反応によりラジカル化したチラミドを菌体内に多量に沈着させる反応である。そこで CARD-GoldISH 法では HRP を標識したプローブを用意し、標的微生物に特異的にハイブリダイゼーションした後、TSA 反応をおこなう。TSA 反応に用いるチラミドは通常蛍光物質の代わりに金粒子を用いる。金粒子チラミドを TSA 反応で菌体内に沈着させた後、Gold Enhancement を行った。Gold Enhancement は沈着させた金粒子を核として金粒子の周りに金イオンを付着させることで金粒子そのものを巨大化させる反応であり、それを行うことで NanoSIMS 解析においての高感度化を図った。

サンプルは *Escherichia coli* K12 株と古細菌の *Methanococcus vannielii*、*Methanoseta cocillii* を用いた。*E. coli* は LB 培地で培養した。*M. vannielii*、*M. cocillii* は Widdel 培地に必要な基質を加え培養した。培養した菌体は対数増殖期に回収し、4%パラホルムアルデヒドで 4°C、4 時間反応させ固定した。固定後、エタノールと PBS を 1 : 1 で混合した溶液中で -20°C で保存した。また、顕微鏡観察時に観察を容易にするため、超音波で菌体を分散させた。

サンプルを 10 穴高撥水性印刷スライドガラス (松浪硝子) に 0.1 %LMPA (Low-melting Point Agarose) によりスライドガラス上にエンベツトした後、50%、80%、96%エタノールに 3、1、1 分間浸すことで脱水を行った。次にプローブの浸透性を確保するために細胞壁処理を行った。サンプルにリゾチーム溶液 (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、1mM EDTA) を滴下し 37°C で 30 分間反応させ細胞壁を処理した。その後 TNT バッファー (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.05 % Tween-20) に 10 分間、超純水に 1 分間浸し洗浄を行い、96%エタノールに 1 分間浸し、脱水・乾燥した。

金粒子チラミドの合成は、Nanogold、Undecagold - NHS ester (Nanoprobes) と tyramine-HCl をアミド結合させることで行った。合成反応は Nanogold、Undecagold - NHS (N-hydroxysuccinimide) ester を DMF (Dimethylformamide) に 10 mg/ml の濃度になるように溶解し stock A を作る。次に

tyramine-HCl を DMF に 10 mg/ml になるように溶解させ、tyramine の 1.25 倍量の TEA(Triethylamine) (Thermo)を加え stock B を作る。この時 stock B の pH が 7-8 になるように調整した。Stock A の溶液に Stock A と stock B の物質量の比が 1 : 1.1 になるように stock B の溶液を加え室温で 2 時間反応させ合成を行った。反応後、最終濃度が 1 mg/ml になるようにエタノールで希釈した。

ハイブリダイゼーションは以下の様に行った。プローブは *E. coli* を標的とした EUB338-HRP (5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3') と *M. vanielii* を標的とした ARC915-HRP (5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT -3') を用いた。ハイブリダイゼーションバッファー (900 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、0.01% SDS) 中のホルムアミドは EUB338 が 60%、ARC915 が 40%とした。ハイブリダイゼーションバッファーと 10 pmol/μl のプローブを 100 : 1 で混合した溶液を 15 μl 滴下し、湿潤状態を保ちながら 40°C で 2-3 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、42°C のウォッシングバッファー (40 or 60% FA、900 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、0.01% SDS) で 15 分間洗浄を行った。

TSA 反応は TSA 反応溶液 (0.0015 % 過酸化水素水、0.1 % Blocking Reagent (Roche))に金粒子チラミドの濃度が 5 - 50 μg/ml となるように加え、15 μl 滴下した後 37 °C で 15 分間反応させた。その後 TNT バッファーに計 20 分間 (10 分×2 回) 浸すことで余剰な金粒子チラミドを洗浄した。さらに超純水に 1 分間、エタノールに 1 分間浸し、脱水・乾燥を行った。

Gold Enhancement の反応は GoldEnhance™ LM (Nanoprobes)を用いて行った。キット中の Solution A と Solution B を同量まぜ 5 分反応させたあと、Solution C と Solution D も同量加える。この溶液を 15 μl 滴下し 5 - 20 分間反応させ金増感を行った。Gold Enhancement の反応終了後、超純水に 1 分間浸し洗浄を行った。

## (2) 金粒子を用いた Gold-ISH 法

Undecagold 標識プローブは、3'末端に Cy3 を 5'末端にチオール基を修飾したオリゴヌクレオチドとマレイミド修飾 undecagold を反応させて作成した (図 1)。

Proof-of-concept には、<sup>13</sup>C 標識した *Escherichia coli* と、<sup>13</sup>C 標識していない *Methanococcus maripaludis* の混合系を用いた。プローブには Eub338 を用いた。汚泥サンプルへの適用として、硫酸還元を行っている UASB グラニュール汚泥を <sup>13</sup>C 標識乳酸と硫酸根で培養したものをを用いた。プローブには *Desulfovibrionales* などの硫酸還元菌を検出できる SRB385 とした。

サンプルをカーボンコーティングしたポリカーボネートフィルターに濾過した後、undecagold 標識プローブの交雑を行った。交

雑後、余剰プローブの洗浄を行った後、フィルターの一部をカットし、蛍光顕微鏡で Cy3 由来のシグナルを確認し、残りを NanoSIMS による解析に供した。

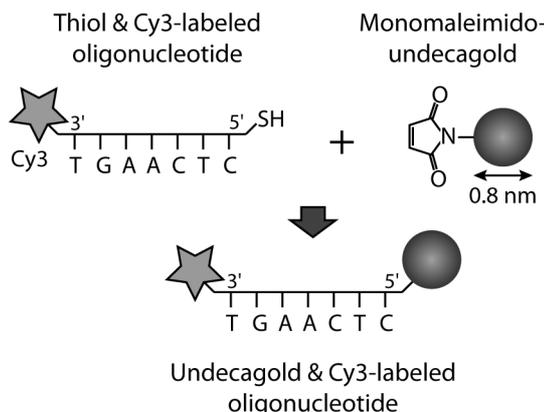


図 1 金ナノ粒子標識オリゴヌクレオチド合成方法 (refer from Kubota et al., 2015, SYAPM)

## (3) Enzmet による銀標識 ISH 法

CARD-GoldISH 法と同様に HRP が標識されたプローブを標的微生物にハイブリダイゼーション後 Enzmet を用いて銀標識を行った。キット中の EnzMet™ Detect A を 12 μl 滴下し 2 分間浸透させ、EnzMet™ Detect B を 4 μl 加えさらに 2 分間反応させる。EnzMet™ Detect C を 4 μl 滴下し 10-15 分間反応させた後、超純水で 3×5 分間洗浄し、96 %エタノールに 1 分間スライドガラスを浸し脱水・乾燥を行った。

次に機能遺伝子検出のための gene-ISH による標識を試みた。gene-ISH に用いるプローブの合成には PCR 法を用いた。PCR 反応は PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche)を用いて行った。プローブ合成のためのテンプレート DNA は *Escherichia coli* の純菌株から抽出したゲノム DNA を用いた。PCR に用いるプライマーセットは GAP-F: フォワードプライマー-GAP-F-V 5'-CTA ACA AAT AGC TGG TGG-3' リバースプライマー-GAP-F-RT3 5'-ATA GGT ATT AAC CAC TAA AGG G CA GTT TCG TCA GTC AGG A-3'; (増幅塩基長: 338bp) とした。GAP-F プライマーが標的とする遺伝子は大腸菌が持つハウスキーピング遺伝子である GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) である。Kit 中の dNTP は dNTP と dUTP-11-DIG を混ぜたものになっており、PCR の伸長反応時に DIG の標識された dUTP が複数個とりこまれることによりプローブを DIG 標識する (図-3)。PCR 産物は High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche) で精製した後、キャピラリー電気泳動 Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies)を用いて dUTP-11-DIG の取り込みを確認した。また、精製したプローブの濃度は Qubit (Invitrogen) にて測定した。

サンプルの調整及び前処理は 16S rRNA 標的 ISH 法と同様である。ハイブリダイゼーションは、まずハイブリダイゼーションバッファを滴下し 46°C で 30 分間プリハイブリダイゼーションを行った。その後 125pg/μl の合成したプローブを含むハイブリダイゼーションバッファを滴下し、46°C で 30 分間放置後、95°C で 20 分間の熱変成を行い、さらに 46°C で 8 時間以上反応させた。その後 48°C のウォッシングバッファに浸すことでプローブの洗浄を行った。プローブ洗浄後、TNB バッファ (100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.5% Blockin Reagent) を滴下し室温で 30 分間ブロッキング反応を行った。次に anti-DIG-HRP-conjugated antibody (Fab fragments) (Roche) と TNB バッファを混合したものを滴下し、抗原抗体反応を行うことで菌体内に特異的に HRP を取り込ませた。その後、16S rRNA 標的 ISH と同様に TSA 反応により Tyramide-OrxonGreen X-488 を沈着させフッ素標識する系と Enzmet による銀標識する系の 2 つを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 金粒子チラミドを用いた CARD-GoldISH 法

CARD-FISH 法によるチラミドの濃度は、一般的に 4-10 μg/ml で行われる。そこでまず、合成した Tyramide-Nanogold, Undecagold を 5 μg/ml の濃度で用いて TSA 反応を行った。その結果、明視野による観察において金粒子の沈着は観察されなかった。一般的に標識されている蛍光物質に比べ Nanogold や Undecagold は分子量が大きいため、モル数で考えると、蛍光物質に比べ少なくなる。そこで、Tyramide-Nanogold および Tyramide-Undecagold の TSA 反応液中の濃度を上げ、再度検出を試みた。その結果、Tyramide-Undecagold の系からはチラミドの濃度を上げ、さらに Gold Enhancement してもシグナルは全く得られ無かった。一方、Nanogold はチラミド濃度を高くしただけでは確認出来なかったが、チラミド濃度 10μg/ml 以上とし Gold Enhancement を行ったところ、金由来のシグナルを確認することが出来た。しかし、そのシグナルは特異的ではなく非標的微生物からもシグナルが得られた。この原因として、Nanogold は Undecagold よりも大きいため、細胞内に浸透し、TSA 反応により沈着されなかった Nanogold が、洗浄時に十分洗い流されず、残存してしまったことが考えられる。一方、大きさの小さい Undecagold は、細胞内に浸透するが洗浄時には細胞外へ流れるため、Gold Enhancement により非特異的な増幅が行われないと考えられる。これらの事は、Gold Enhancement により得られたシグナルは、TSA 反応により沈着した金粒子によるものではなく、非特異的に菌体内に残存した金粒子によるものであることを示唆しており、

Nanogold あるいは Undecagold を標識したチラミドによる TSA 反応が行われていない事を意味する。

##### (2) 金粒子を用いた Gold-ISH 法

Proof-of-concept として <sup>13</sup>C 標識した *E. coli* と <sup>13</sup>C 標識していない *M. maripaludis* の混合系から Eub338 プローブにより *E. coli* のみの検出を試みた。蛍光顕微鏡による観察では、形態的に *E. coli* と思われる微生物からのみ蛍光が得られていた。そこで同サンプルを NanoSIMS により解析したところ、<sup>13</sup>C シグナルが得られた細胞と <sup>197</sup>Au シグナルが得られた細胞が一致した。これより undecagold を標識したプローブが特異的に交雑し、<sup>197</sup>Au シグナルを NanoSIMS により検出できることが証明された。本手法でのシグナル-ノイズ比は 10.8 と CARD 反応によるシグナル増幅を伴わない SIMSISH 法に比べて高かったが、これは undecagold が 11 個の Au を含むため、1 つのプローブに標識される Au 原子の数が多くなったためであると考えられる。

次に、本手法を用いて <sup>13</sup>C 乳酸と硫酸根で培養したグラニュール汚泥中に存在する硫酸還元菌の同定を試みた。すると SRB385 プローブ由来の <sup>197</sup>Au シグナルと <sup>13</sup>C シグナルが一致した。このことは、SRB385 プローブが標的とする *Desulfovibrionales* が、乳酸の硫酸還元に関わっていることを示すと共に、本手法が汚泥中に存在する微生物を NanoSIMS で検出するのに十分な感度を有していることを示している。この *Desulfovibrionales* の C の取り込み速度を計算すると 34.8-45 fg-C/日となった。*Desulfovibrio* の細胞あたりの炭素量が 40 fg との報告から、この細胞の当該環境における細胞分裂時間はおよそ 1 日であると考えられる。このようなデータは、リアクターの負荷や SRT など考える時に重要な指標となり得ると考えられる。これらの結果から、本研究では NanoSIMS を用いた微生物解析のため、undecagold 標識プローブを用いる手法を Gold-ISH 法として提案した (図 2)。

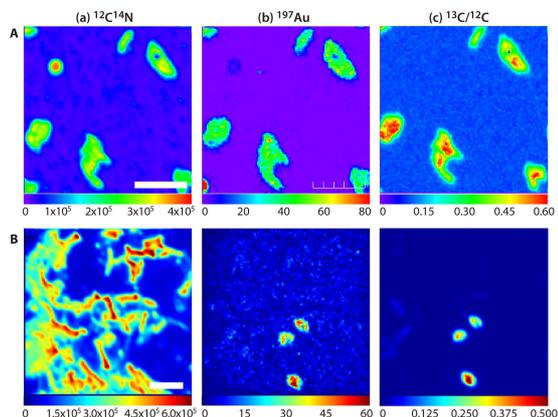


図 2 Gold-ISH 法による検出 (refer from Kubota et al., 2015, SYAPM)

### (3) Enzmet による銀標識 ISH 法

HRP の触媒反応を利用して銀イオンを還元し銀を沈着させる方法による銀標識を試みた。この反応は HRP Detection kit for IHC/ISH, Enzmet (Nanoprobes) (以下 Enzmet) というキットを用いて行い、HRP 周辺にのみ特異的に銀イオン(可溶)を銀粒子(不溶)として沈着させ、検出する方法である。そのため、*in situ* hybridization 法により HRP を特異的に標的微生物に取り込ませたあと、Enzmet を用いて銀標識を試みた。

EUB338-HRP 及び ARC915-HRP を用いてそれぞれ *E.coli*, *M.vannielii* を標的とする CARD-GoldISH 法を行った。顕微鏡観察の結果、標的微生物から特異的な銀の沈着が確認出来た。そこで 16S rRNA よりもコピー数の少ないゲノム DNA を標的とし、本手法ができるかどうかを検証した。プローブの合成は PCR 反応物をキャピラリー電気泳動で観察したところ目的のバンドが得られたことを確認した。DIG 標識プローブは 1 つのプローブにつきランダムに複数個 DIG-11-dUTP が取り込まれて合成されるため、PCR 反応物には標識された DIG の数が異なるプローブが存在する。また、DIG そのものが大きい分子量を持つために未標識プローブより上側に幅広いバンドが得られる。合成したプローブで gene-ISH を行い、銀標識を試みたが顕微鏡の明視野観察の結果、銀の沈着は確認出来なかった。そこで抗原抗体反応で HRP を標的微生物に結合させた後 TSA 反応により Tyramide-Alexa 488 を沈着させ蛍光顕微鏡による観察を行った。観察の結果、標的微生物からの特異的な蛍光が得られた。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 久保田健吾. 2015. 総論 水処理分野における顕微鏡観察. 水環境学会誌. 38: 360-364. 査読なし
2. Kengo Kubota, Yuki Morono, Motoo Ito, Takeshi Terada, Shogo Itezono, Hideki Harada and Fumio Inagaki. 2014. Gold-ISH: A nano-size gold particle-based phylogenetic identification compatible with NanoSIMS. *Systematic and Applied Microbiology*. 37: 261-266. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 久保田健吾, 諸野祐樹, 伊藤元雄. NanoSIMS を用いた微生物解析のための新規同定法. 第 17 回日本水環境学会シンポジウム. 滋賀県立大学 (滋賀県・彦根市). 2014.9.9.
2. 塚越大祐, 久保田健吾, 諸野祐樹, 伊藤元雄, 原田秀樹, 稲垣史生. NanoSIMS による微生物の系統学的同定と機能解明のための ISH 法の開発. 第 48 回日本水環境学会年会. 東北大学 (宮城県・仙台市). 2014.3.19.

### 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・准教授  
研究者番号 : 8 0 4 5 5 8 0 7

#### (2)連携研究者

諸野 祐樹 (MORONO YUKI)  
海洋研究開発機構・主任研究員  
研究者番号 : 3 0 4 2 1 8 4 5