

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650138

研究課題名(和文) 超高感度FISH法を利用した未知メタン菌の生理・遺伝学的特徴の解明

研究課題名(英文) Physiological and genetic characterization of uncultured methanogenic archaea via an ultra-high sensitive fluorescence in situ hybridization technique

研究代表者

井町 寛之 (IMACHI, Hiroyuki)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任研究員

研究者番号：20361933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では系統分類学的に目や綱レベルで未知のメタン菌の生理・遺伝学的な特徴を明らかにするため、超高感度FISH法を利用した方法論を用いて、未知メタン菌細胞を特異的に回収し、最終的にはゲノム配列の決定ならびに分離株の取得を目指すことを目的とした。

mcrA遺伝子に基づいたクローン解析により嫌気性廃水処理汚泥に目レベルで未培養なメタン菌群を発見した。このメタン菌細胞を視覚的に検出するためにDNAポリプローブを利用した超高感度FISH法を行った。様々な細胞壁処理と組み合わせを行ったが、最終的に標的とするメタン菌細胞の視覚的な検出をすることができなかった。

研究成果の概要(英文)：The investigation of uncultured methanogens is a significant challenge in comprehensive understanding global carbon cycle. In this study, we aimed to gain physiological and genetic information of taxonomically new methanogens by obtaining genomic sequences and isolate. For this purpose, we first performed mcrA and 16S rRNA gene-based clone analyses on methanogenic sludges to explore taxonomically novel methanogens. Through the analyses, we found a novel methanogen group, which may represent the eighth order of methanogen. To obtain genetic information of the methanogen, we tried to do specific sorting of the methanogen cells using a combination of an ultra-high sensitive fluorescence in situ hybridization (FISH) technique (i.e., two-pass tyramide signal amplification FISH with polynucleotide probes) and fluorescence-activated cell sorting. However, unfortunately, the targeted methanogen cells could not be detected by the FISH technique even after several cell wall treatments.

研究分野：環境微生物学

キーワード：FISH法 メタン菌 mcrA遺伝子 生態

## 1. 研究開始当初の背景

メタン菌とは嫌気条件 (=無酸素) でメタンを生成する微生物の総称であり、分類学上では古細菌ドメインに属する。メタンを生成する特徴から、メタン菌は温室効果ガス発生の原因微生物であると同時に、天然ガスを生成する有用微生物でもある。従って、メタン菌は人間社会が抱える環境とエネルギー問題に関わる重要な微生物群である。このような背景から、現在までメタン菌については多くの研究がなされてきた。現在までにメタン菌の分離株は 100 種以上が記載され、メタン生成経路等の詳細な生化学的特徴も調べられている。

では、我々はメタン菌についてすべてを理解しているのだろうか？実は、環境中には未知のメタン菌が多く存在することが指摘されている。それはメタン生成経路の最終反応を担う酵素 *methyl-coenzyme M reductase* をコードする *mcrA* 遺伝子に基づいた解析結果が示している。詳しく説明すると、土壌等の環境サンプルから DNA を抽出し、*mcrA* 遺伝子を検出する PCR プライマーを用いた環境クローン解析を行うと既知のメタン菌と同じ配列が見つかる一方で、既知のメタン菌とは大きく異なる未知な *mcrA* 遺伝子が見つかる場合がある。この未知のメタン菌は系統分類学的に目や綱といった高い階層で既知のメタン菌と異なる。現在までに環境中のメタン菌の多様性を調べるために *mcrA* 遺伝子に基づいた解析を行った報告は多数あるが、既知のメタン菌と異なる *mcrA* 遺伝子も検出されたという記載に留まっており、それ以上の解析は全くなされていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

この分類学上で目や綱のレベルで既知のメタン菌と異なる *mcrA* 遺伝子を持つメタン菌の詳細に迫るために、微生物細胞内のゲノム DNA 上にある 1 遺伝子を検出できる超高感度 FISH 法 (Kawakami *et al.*, 2012) を利用する方法を思いついた。この方法を用いれば、理論的には未知メタン菌細胞のみを微生物群集から特異的に回収し全ゲノム情報を得ることができるはずである。そしてそのゲノム情報から未知メタン菌の遺伝学的な情報の獲得、さらには培養の手がかりを得ることができるのではないかと考えた。本研究では、超高感度 FISH 法を利用することで、未知メタン菌の生理・遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。本目的の達成のために、以下に挙げる方法論を進めて行くこととした。(1) *mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析をメタン菌が生息するようなサンプルに適用することで既知のメタン菌と目あるいは綱レベルで違いがある *mcrA* 遺伝子 (未知 *mcrA* 遺伝子) を探索し、解析対象を決める。(2) 標的 *mcrA* 遺伝子を有するメタン菌細胞を可視化させるために *mcrA* 遺伝子を標的とした超

高感度 FISH 法を適用する。(3) 超高感度 FISH 法によって光ったメタン菌細胞をフローサイトメーターにより分取・回収する。(4) 回収した細胞の 16S rRNA 遺伝子配列およびゲノム配列を解読し、詳細な遺伝学的な特徴を明らかにする。(5) ゲノム情報に基づいて培養条件をデザインし、標的とした未知メタン菌を分離・培養を試みる。分離株を得ることができたならば、その詳細な生理学的な特徴を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 嫌気性廃水処理汚泥サンプル

4 種類の嫌気性廃水処理グラニュール汚泥を準備した。1 つは都市下水を処理している upflow anaerobic sludge blanket (UASB) リアクターから採取したグラニュール汚泥、2 つは海水魚飼育水を処理している UASB リアクターから得た。もう 1 つの汚泥は海水魚の飼育水の処理を目的とした upflow sludge blanket リアクターの種汚泥の培養を行っている脱窒菌群の培養器から得た。

### (2) *mcrA* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローン解析

DNA 抽出はビーズビーター法による物理的細胞破碎法により行った。抽出した DNA を鋳型にして *mcrA* 遺伝子およびアーキアの 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。*mcrA* 遺伝子の PCR 増幅には MLf/MLr のプライマーセットを、アーキアの 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅には Arc9F/1492R のプライマーセットを用いた。得られた PCR 産物は大腸菌を介してクローン化した。得られた *mcrA* 遺伝子配列および 16S rRNA 遺伝子のクローン配列のうち、97%以上の相同性を示すクローン配列は 1 つの *phylo*type として扱った。得られた配列のアライメントおよび系統解析は分子系統解析ソフトウェア ARB プログラムにより行った。その後、ARB プログラム内で系統樹の作成を行った。16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹は Jukes-Cantor モデルに従った距離補正を用いた近隣結合法により作成した。*mcrA* 遺伝子に基づく系統樹の作成には、得られた遺伝子配列を ARB プログラム内でアミノ酸配列に変換後、167 アミノ酸配列を用いて percentage of acceptance of mutations モデルによる距離補正を用いた近隣結合法により作成した。これら 2 つの系統樹の作成には *Methanopyrus kandleri* の遺伝子配列を外群に用いた。系統樹作成後には得られた樹形の確からしさを確認するために、MEGA version 6.06 package にて 1,000 回のブートストラップ解析を行った。

### (3) *mcrA* 遺伝子を標的とした超高感度 FISH 法

*mcrA* 遺伝子に特異的な DNA ポリヌクレオチドプローブ (以下、ポリプローブ) の作成は Kawakami *et al.* (2012) の方法に若干の変

更を加え、PCRにより合成した。ポリプローブ合成に使用した鋳型DNAは、*mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析で得たクローンを用いた。PCR反応は以下の反応液組成で行った。濃度は終濃度を示す。GeneAmp 1×PCR Gold buffer [-MgCl<sub>2</sub>] (Life Technologies), 200 μM dVTP [V=A, C, G] (Roche Applied Science), 0.025 U/μl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Life Technologies), 0.5 pmol/μl プライマー, 1.5~4.5 mM Mg<sup>2+</sup>溶液, 40 μM DNP-11-dUTP (Perkin Elmer) と dTTP (Roche Applied Science)。なお、dTTPの濃度はDNP-11-dUTPとの合計濃度が200 μMになるように140~160 μMの範囲で調整した。これらをPCR反応液とし、そこに調整した鋳型DNAを加え、95°C-7分のホットスタートを行った後、95°C-40秒、50°C-30秒、72°C-3分、40サイクルの条件で行った。合成したプローブは、MiniElute PCR Purification kit (QIAGEN)により生成した後、キャピラリー電気泳動 Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies) もしくは従来型のアガロースゲル電気泳動を用いて dUTP-11-DNP の取り込みを確認した。合成されたプローブの濃度は、バイオアナライザーによる解析で得たバンドの輝度から算出した。

作成したポリプローブを用いて tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法および two-pass TSA-FISH 法を行った。これらの高感度 FISH 法は Kawakami *et al.* (2012) の報告に準拠して行った。プローブを浸透させるための細胞壁処理は次の3種類を行った。① Proteinase K 処理: Proteinase K 溶液 (1.5, 5.0, 10, 20, 100, 1000 μg/ml の濃度で 100 mM Tris-HCl [pH 7.5] と 50 mM EDTA [pH 8.0] 溶液に混合した Proteinase K 溶液) を室温で 10 分間反応させた。② HCl 処理: HCl 溶液 (1, 5, 100, 300, 600, 1000 mM) を室温で 1 分間反応させた。③ 細胞壁処理を行わない。また、Clone-FISH 用の大腸菌に対しては、1 mg/ml lysozyme /TE buffer [pH 8.0] で 37°C-30 分間反応させた。内在性ペルオキシダーゼ活性の不活性化には、0.3% [v/v] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液/メタノールにより 30 分間、室温で処理を行った。また、tyramide は Alexa Fluor 488 もしくは Cy3 が標識されたものを使用した。作成したポリプローブの有効性は、標的とした MCR-2b グループに属する *mcrA* クローン配列を組み込んだ大腸菌細胞を用いて確認した。

#### (4) 16S rRNA を標的とした FISH 法

標準的な FISH 法に使用した DNA オリゴヌクレオチドプローブは、プローブ配列の 5' 末端に Alexa Fluor 488 が付加されたもの、もしくは、5' 末端および 3' 末端に Alexa Fluor 488 が付加されているものを使用した。Arc864 プローブの至適 FA 濃度は、Clone-FISH により求めた。また、Catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法は、(Kubota *et al.*, 2008) を参考に行った。

## 4. 研究成果

### (1) 未知 *mcrA* 遺伝子の探索と 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析

目あるいは綱レベルで分類学的に新規なメタン菌を環境中から探し出すために4種類の嫌気性廃水処理グラニュー汚泥に対して *mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析を行った。各サンプルに対して約 90 クローンずつコロニーを採取し、配列解析を行った。検出された *mcrA* 遺伝子配列の大半は、既に系統分類学的位置が特定されている既知のメタン菌である *Methanomicrobiales* 目、*Methanosarcinales* 目、*Methanobacteriales* 目と *Methanomassiliicoccales* 目に属する配列であった。一方で、既知のメタン菌とは大きく異なる未知 *mcrA* 遺伝子は、1つの汚泥サンプルを除く全てのサンプルにおいて検出された。各サンプルで検出されてきた未知 *mcrA* 遺伝子は、全て、MCR-2b と呼ばれている未培養グループに属する配列であり、全クローン配列中の 1.2% から 4.3% の割合で検出された。

未培養グループ MCR-2b に属する *mcrA* 遺伝子配列を持つメタン菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統分類学的位置を推定するために、同時にアーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析も行った。解析には MCR-2b *mcrA* クローンの検出率が最も高かった都市下水を処理していた嫌気性廃水処理汚泥サンプルを用いた。クローニングで得られた 77 クローンの配列解析の結果、合計で 5 つの phylotypes が検出され、*Methanomicrobiales* 目、*Methanosarcinales* 目および分離株が存在しない未培養アーキアグループ WCHA1-57 に属する配列が検出された。*mcrA* 遺伝子に基づくクローン解析結果と同様に、アーキアの 16S rRNA 遺伝子の解析においても、未培養グループが 1 つだけ検出された。未培養アーキアグループ WCHA1-57 (WSA2 や ARC I と呼ばれている) は、*Euryarchaeota* 門に属し、目あるいは綱のレベルで括られ、分離株が存在しない未培養アーキアグループである。

続いて、本解析で得られたクローン配列を含む *mcrA* 遺伝子およびアーキアの 16S rRNA 遺伝子配列で構築した系統樹の比較を行った。既知のメタン菌においては *mcrA* 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹には強い相互関係があることが知られている。その事実を踏まえると、構築した系統樹では MCR-2b *McrA* clade と WCHA1-57 アーキア clade は一致し、相互関係を有していることが示唆された。つまり、MCR-2b と WCHA1-57 は同一のアーキア細胞由来である可能性が示唆された。WCHA1-57 アーキア clade と MCR-2b *McrA* clade の相互関係を有することの直接的な証拠を得るために MCR-2b *mcrA* 遺伝子もしくは、WCHA1-57 16S rRNA を対象とした FISH 法で細胞を回収し、遺伝子配列の解読を試みることにした。

(2) 標的 *mcrA* 遺伝子に特異的なポリプローブの合成

2012 年の Kawakami *et al.* の報告では two-pass TSA-FISH 法とポリプローブを組み合わせた方法でゲノム上に 1 コピーしか存在しない *mcrA* 遺伝子を標的としてメタン菌細胞の特異的な検出に成功している。このポリプローブには two-pass TSA-FISH の酵素触媒反応に必要な HRP ラベルが数百箇所にわたり修飾されることから、ゲノム DNA 上の 1 遺伝子を検出することができる。本研究課題ではポリプローブを使った two-pass TSA-FISH を用いることとした。

この FISH 法の感度は、ポリプローブをいかに合成するかに依存すると考えてもよい。標的とする細胞の検出率を高めるためには、合成されたポリプローブに、より多くの DNP-11-dUTP が取り込まれている必要がある。その取り込み効率は、プローブを合成する際の PCR 反応液組成や PCR 反応条件で変化する。そこで、プローブの合成過程における次の試薬の添加濃度を中心に検討実験を行った。検討項目 1 点目は、添加する DNP-11-dUTP 濃度である。多くの DNP-11-dUTP を取り込ませるためには、高濃度の DNP-11-dUTP を添加することが望ましいと原理的には考えられているが、過度の添加はプローブの収量を極端に減少させると言われている。従って、必要最低限のプローブ収量を確保した上で DNP-11-dUTP の取り込み量が最大となる PCR 反応液組成を検討した。2 点目は  $Mg^{2+}$  濃度である。一般的に、PCR 法では反応液中の  $Mg^{2+}$  濃度を高くすることで増幅産物の収量が増加することが知られている。また、dUTP を用いた PCR 法では dTTP を用いた時に比べ高い  $Mg^{2+}$  濃度が必要であることが報告されている。これら 2 項目に加え、非特異的増幅が起きないように PCR 反応のサイクル数やアニーリング温度の条件検討も行った。

最初の条件検討として、 $Mg^{2+}$  濃度の検討を行った。dTTP を最大濃度である 200  $\mu M$  添加し、DNP-11-dUTP を添加しない通常の PCR 反応液組成での至適  $Mg^{2+}$  濃度を調べた。 $Mg^{2+}$  濃度は、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mM で PCR 反応を行った。その結果、2.5 mM ではほぼ非特異的な増幅は見られなかった。また、3.0 mM および 3.5 mM では僅かに非特異的な増幅が起きていたが、目的の配列部分が有意に増幅されていた。一方で 4.0 mM および 4.5 mM では特異的な増幅と非特異的な増幅が同程度生じていた。前述したように、DNP-11-dUTP を添加すると至適  $Mg^{2+}$  濃度が上昇する。このことを勘案すると少なくとも 3.0、3.5 mM 以上の  $Mg^{2+}$  濃度が必要である可能性が考えられた。そこで、非特異的な増幅が見られ始めた  $Mg^{2+}$  濃度 3.0 mM および 3.5 mM の濃度条件下において DNP-11-dUTP と dTTP の添加濃度の検討を行った。DNP-11-dUTP の添加濃度は Kawakami *et al.*

(2012) の報告を参考に 50  $\mu M$  と 60  $\mu M$  の 2 種類で検討を行った。DNP-11-dUTP の取り込み量は電気泳動の泳動距離によって判断した。DNP-11-dUTP の分子量は dTTP に比べて大きいので、DNP が取り込まれると増幅産物の分子量が大きくなり、泳動距離が短くなることが知られている。このことから、泳動距離が短いほどより多くの DNP-11-dUTP を取り込んでいると判断できる。なお、MLf/MLr プライマーセットの増幅長は約 500 bp であるため、DNP-11-dUTP を取り込んでいない時は 500 bp 付近にバンドが検出される。 $Mg^{2+}$  濃度 3.0 mM と 3.5 mM 条件下で DNP-11-dUTP 濃度 50  $\mu M$  と 60  $\mu M$  の計 4 条件でプローブ合成の検討を行ったところ、 $Mg^{2+}$  濃度が 3.5 mM、DNP-11-dUTP 濃度が 60  $\mu M$  の時に泳動距離が最も短くなった。それ以外の条件では泳動距離にほぼ違いは見られなかった。また、DNP-11-dUTP 濃度が 50  $\mu M$  の条件下では  $Mg^{2+}$  濃度による差は見られなかったが、DNP-11-dUTP 濃度が 60  $\mu M$  では、 $Mg^{2+}$  濃度が 3.0 mM と 3.5 mM の時では DNP-11-dUTP の取り込み量に明確な違いが出ており、DNP-11-dUTP 濃度が 60  $\mu M$  の時は、少なくとも 3.5 mM の  $Mg^{2+}$  濃度が必要であることが明らかになった。一方で条件ごとにポリプローブの収量に比較的大きな差が見られなかったことに加え、十分量のプローブが合成されていた。そこで、DNP-11-dUTP の取り込み量をさらに増加させるために DNP-11-dUTP の添加濃度をさらに上げた条件でも追加検討すべきであると判断した。そこで、DNP-11-dUTP 濃度を 70 および 80  $\mu M$  でポリプローブの合成検討を行った。添加 DNP-11-dUTP 濃度を高くすることから、 $Mg^{2+}$  濃度は 3.5 mM の条件に加え、4 および 4.5 mM での検討も同時に行った。その結果、これまでに行った条件の中で  $Mg^{2+}$  濃度 4.0 mM、DNP-11-dUTP 濃度 80  $\mu M$  の条件において DNP-11-dUTP の取り込み量は最も高くなった。その一方で、プローブの収量は他の条件と比較して大幅に減少した。一方で、 $Mg^{2+}$  濃度 4.5 mM、DNP-11-dUTP 濃度 80  $\mu M$  では、逆に DNP-11-dUTP の取り込み量は減少した。この結果から、DNP-11-dUTP の最大添加濃度は 80  $\mu M$  であり、最大  $Mg^{2+}$  濃度は 4.0 mM であることが明らかになった。各条件における DNP-11-dUTP の取り込み量の差が、どの程度検出感度に影響を及ぼすかは明らかではない。しかし、プローブの収量の面で考えると  $Mg^{2+}$  濃度 3.5 mM、DNP-11-dUTP 濃度 60  $\mu M$  が最も理想的である。なぜならば、two-pass TSA FISH を行うには、スライドガラス上の 1 穴あたり 20  $\mu l$  のハイブリダイゼーション buffer に対して 2.5 ng/ $\mu l$  のプローブを 1  $\mu l$  添加する必要がある。さらに、1 反応あたりで得られるプローブ溶液量は 10  $\mu l$  未満と少量であることから、現実的なプローブ収量の中で、最も DNP-11-dUTP の取り込み量が多い条件がこの条件であると考えた。以上の結果か

ら、DNP-11-dUTP と dTTP の割合が 60  $\mu\text{M}$  : 140  $\mu\text{M}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 濃度が 3.5 mM の条件で作成したポリプローブを使用することとした。

### (3) ポリプローブを用いた two-pass TSA FISH による未知メタン菌の検出の試み

まず初めに、合成したポリプローブが機能するかを確かめるために MCR2-b *mcrA* 遺伝子が組み込まれた大腸菌クローンを用いて two-pass TSA-FISH を行った。同時に至適 formamide (FA) 濃度の検討を行った。FA 濃度は 40、50、60、70 % の条件で行った。その結果、60%が至適 FA 濃度であることが示され、蛍光が得られなかった細胞も数細胞存在したが、ほぼ全ての細胞において有意な蛍光を得ることが出来た。この結果から、合成したポリプローブは機能することが強く示唆された。

続いて本手法を環境サンプルに適用した。分子量の大きい HRP を細胞内に浸透させるために細胞壁処理を行う必要があるが、MCR-2b *mcrA* 遺伝子を保有するアーキア細胞の細胞壁処理方法の報告はない。そこで、細胞壁処理の検討を行うこととした。Proteinase K、HCl および細胞壁処理無し の 3 条件でプローブ浸透性の効果を調べた。Kubota *et al.* (2008) によると細胞壁処理無し、Proteinase K および pseudomurein endoisopeptidase (PeiW) の 3 条件のうち、いずれかの方法を適用することで既知のメタン菌細胞を検出できたことが報告されている。そのうちの 1 つである PeiW は *Methanothermobacter wolfei* の自己溶菌酵素を遺伝子組み換え体により作成した酵素であり、市販されていないことから、本研究で PeiW を用いた細胞壁処理は行わなかった。Proteinase K による細胞壁処理では HRP の透過性が向上しなかったメタン菌も存在することから、HCl による処理も検討項目に取り入れた。なお、細胞壁処理における各試薬濃度の至適条件範囲は、ある特定の狭い濃度域であることが指摘されており、特に Proteinase K の至適濃度を定めることは難しいと報告されている。従って、それぞれの試薬濃度の条件検討には、より細かい濃度幅を設けた。

都市下水を処理していた嫌気性グラニューール汚泥サンプルに対して細胞壁処理無し、Proteinase K、HCl による細胞壁処理を行った後、two-pass TSA FISH を行った。その結果、全ての細胞壁処理条件において細胞を検出することができなかった。この要因として考えられることが 3 点ある。1 点目は、細胞壁処理が適切ではなかった可能性がある。2 点目は、実際には標的細胞から蛍光は得られているが、グラニューール汚泥中の MCR-2b 細胞の存在割合が低く、標的のアーキア細胞を目視で確認できなかった可能性があることである。2006 年の本嫌気性処理リアクター内のアーキアとバクテリアの定量データではバクテリアとアーキアの比率は 99:1 であるこ

とが示されている。あくまでも参考値ではあるが、2006 年当時の定量値と今回のアーキアの 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析で得られた結果を基に計算すると WCHA1-57 細胞は汚泥中に約 0.08% の割合で存在することが推定された。これは、10000 細胞存在する中に約 1 細胞存在する程度の割合である。このことから、目視で蛍光細胞を確認できなかった可能性も十分に考えられた。3 点目は、合成したポリプローブではシングルコピーレベルで細胞の検出ができていない可能性が考えられることである。ポリプローブの機能性確認には pUC 由来のプラスミドで作成した大腸菌クローンを用いた。pUC 由来のプラスミドは、変異導入された ColE1 複製起点が含まれていることから細胞中のコピー数が高くなり、1 細胞あたり 500-700 コピーのプラスミドが存在する特性を有している。ハイコピーのプラスミドが存在しているクローン化した大腸菌細胞を使ってポリプローブの有効性を確認したことから、シングルコピーレベルでの細胞検出ができていない可能性も考えられた。Moraru *et al.* (2010) の報告でも、1 細胞あたり 200 コピーのプラスミドが含まれたクローンを対象に gene TSA-FISH を行った場合には検出率が 99% だったにも関わらず、シングルコピーの細胞に適用させた場合は 40% 前後にまで検出率が減少したという報告もなされている。しかしながら、仮にシングルコピーレベルで細胞を検出できていたとしても、汚泥中に存在する細胞の割合の低さや細胞壁処理に問題があっては細胞の検出率は、かなり低くなることが予想される。したがって、細胞の存在割合や細胞壁処理に問題が無いことを判断するために、それらの疑問点を取り除くことができる手法を用いることにした。先の系統樹の比較により MCR-2b *mcrA* 遺伝子を有する細胞と同一細胞由来の可能性が示唆された WCHA1-57 アーキアの 16S rRNA を標的とした FISH 法で細胞を検出させることにした。検出には細胞壁処理を必要としない 16S rRNA を標的とした標準的な FISH 法を用いた。16S rRNA は通常、1 細胞あたり数百から数千コピー存在するため、高感度 FISH に頼らずに細胞を検出できる可能性があることから細胞壁処理を行う必要がなく、過剰・不十分な細胞壁処理により、細胞が検出できないという問題を解決できる。さらに、16S rRNA の発現量が低かった場合に備え、16S rRNA を標的とした CARD-FISH 法も行った。CARD-FISH の検出限界と細胞中に存在する 16S rRNA のコピー数を考えると、細胞壁処理さえ至適化することが出来れば原理的には高確率で CARD-FISH で WCHA1-57 アーキア細胞を検出することが出来ることが考えられた。

### (4) 標的アーキア細胞の 16S rRNA を標的とした FISH 法および CARD-FISH 法

WCHA1-57 アーキアに特異的な Arc864 プロンプを用いて 16S rRNA を標的とした FISH を行った。16S rRNA を標的とした FISH での細胞の検出率は、細胞の固定方法や固定した時の代謝活性の状態によって大きく左右される。従って、サンプルのポジティブコントロールとしてアーキアに特異的なプロンプ ARC915 およびバクテリアに特異的なプロンプ EUB338 を用いた FISH も併せて行った。その結果、ARC915 および EUB338 プロンプでは強い輝度で細胞を検出することができ、形態の異なるアーキアおよびバクテリア細胞を複数種検出することができたが、WCHA1-57 アーキア細胞に特異的な Arc864 プロンプでは、どのサンプルからも有意な蛍光を得ることができなかつた。代謝活性が弱く、発現している 16S rRNA 含量が FISH の検出限界以下である可能性が考えられたため、次に細胞壁処理を行った都市下水処理していた汚泥サンプルに CARD-FISH を適用した。しかしながら、有意な蛍光を得ることはできなかつた。

結果的に MCR-2b *mcrA* 遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH、WCHA1-57 16S rRNA を標的とした FISH と CARD-FISH の 3 種類の FISH を行ったが有意な蛍光を得ることができなかつた。これらの結果を総合すると、細胞を検出できなかつた原因として標的細胞の存在率が低く目視で確認できなかつた可能性、標的としたメタン菌細胞に含まれる rRNA の含量が低かつた可能性が考えられた。また、CARD-FISH を行っても細胞を検出できなかつたことから、HRP を浸透させにくい細胞壁 (S-layer 以外) を標的としたメタン菌細胞が有している可能性も考えられた。

#### (5) おわりに

残念なことに超高感度 FISH 法による標的としたメタン菌細胞の可視化は出来なかつた。そのため、WCHA1-57 と MCR-2b グループの相互関係について直接的な証拠を得ることはできなかつた。しかしながら、その一方で、今までに WCHA1-57 と MCR-2b の相互関係について言及した報告は無かつたこと、WCHA1-57 アーキア細胞と MCR-2b *mcrA* 遺伝子を保有するアーキア細胞を FISH 法で検出させるための細胞壁処理検討に関する知見も今までに報告されていなことから、それらの結果をまとめて *Journal of Water and Environmental Technology* 誌に学術論文として報告した。今後、これらのアーキア細胞に分子生物学的手法を適用する際の有用な知見と成り得ると考えている。

追記: 本研究課題の終了月である 2016 年 3 月に本研究課題で標的としていたメタン菌グループについての遺伝学的特徴がアメリカ合衆国の研究チームにより報告された (Nobu *et al.*, 2016)。メタゲノム解析によりゲノム配列が決定され、本メタン菌は水素を酸化し、メチル基が付いたチオール (例えばメ

タンチオール) を還元することでメタンを生成することが示唆されている。

#### <引用文献>

- ① Kawakami, S., Hasegawa, T., Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H., Ohashi, A. & Kubota, K. (2012). Detection of single-copy functional genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes. *J. Microbiol. Methods* 88: 218–223.
- ② Kubota, K., Imachi, H., Kawakami, S., Nakamura, K., Harada, H. & Ohashi, A. (2008). Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J. Microbiol. Methods* 72: 54–59.
- ③ Moraru, C., Lam, P., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M. M. & Amann, R. (2010). GeneFISH—an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environ. Microbiol.* 12: 3057–3073.
- ④ Nobu, M. K., Narihiro, T., Kuroda, K., Mei, R. & Liu, W.-T. (2016). Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen. *ISME J.* in press.

#### 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 Saito Y, Aoki M, Hatamoto M, Yamaguchi T, Takai K and Imachi H. 2015. Presence of a novel methanogenic archaeal lineage in anaerobic digesters inferred from *mcrA* and 16S rRNA gene phylogenetic analyses. *Journal of Water and Environmental Technology*. 13: 279-289. 査読有, <http://doi.org/10.2965/jwet.2015.279>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井町 寛之 (IMACHI, Hiroyuki)  
国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任研究員  
研究者番号: 20361933

##### (2) 連携研究者

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

##### (3) 研究協力者

斎藤 弥生 (SAITO, Yayoi)