

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：55201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14514

研究課題名(和文)新規微生物イメージング技術を用いた未培養微生物の可視化とシングルセル解析への挑戦

研究課題名(英文) Visualization of uncultured microorganisms by using a novel imaging method and challenge of single cell genomics.

研究代表者

山口 剛士 (Yamaguchi, Tsuyoshi)

松江工業高等専門学校・環境・建設工学科・准教授

研究者番号：30759832

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、微生物の生態を明らかにするシングルセル解析に着目し、未培養微生物が回収可能な視覚的検出技術の開発を目指し、Hybridization chain reaction-fluorescence in situ hybridization (HCR-FISH)法とclick chemistryを組み合わせることで微生物の機能遺伝子の視覚的検出を行った。本手法を大腸菌に組み込んだ機能遺伝子に適用したところ、click chemistryの反応時間や試薬濃度を変更することで視覚的検出が可能であった。さらに、水処理装置内の微生物に適用させた結果、一部の微生物から蛍光が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、未培養微生物を視覚的に検出する手法開発を行った。この手法開発を用いて視覚的検出によって、微生物回収が容易になり、新たな微生物資源の発掘や微生物生態の解明につながると考えている。社会的意義としても、新たな微生物資源を発掘することで、新規の水処理装置や環境改善に利用することができることから貢献度は高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on single cell genomics, which can reveal the ecology of uncultured microorganism, and we developed a novel visualization technique for sorting of uncultured microorganism. Hybridization chain reaction-fluorescence in situ hybridization (HCR-FISH) was combined for detection of functional genes in microorganisms. When this method was applied to E.coli encoding partial functional genes, signal was obtained from E.coli by investigated reaction time and concentration of reagent of click chemistry. Moreover, some signal was obtained from microorganisms in bioreactor.

研究分野：環境微生物学

キーワード：click chemistry 高感度FISH法 機能遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、微生物内の塩基配列を容易かつ安価に解読できるようになり、環境中に生息し、これまで検出されてこなかった新たな微生物の塩基配列が報告されるようになった。環境中に生息する微生物の 99% は未知であることが報告されており、塩基配列解読が容易になったことで多くの未培養微生物の生態学的特徴が明らかにできるようになった。未培養微生物の全塩基配列を把握する方法としてシングルセル解析が報告されている。シングルセル解析は、特定の環境微生物を回収し、シングルセルで回収した微生物の塩基配列を網羅的に解析する方法である(Lasken 2007)。また、本解析における微生物の回収及び回収した微生物の塩基配列を網羅的に解析できる技術はある程度確立されている (Grieb, A. et al., 2020)。しかし、特定の微生物のみを検出する手法は未だ多くの手法が報告されている。一般的な微生物検出技術として fluorescence in situ hybridization (FISH) 法が報告されている。FISH 法は、標的部位 (rRNA や機能遺伝子) に蛍光標識させた人工 DNA を交雑させることで特定微生物のみを視覚的に検出することが可能である。しかし、微生物の代謝などを把握できる機能遺伝子を標的とした場合、微生物内における標的数が少数であるため、FISH 法での検出が困難である。近年、hybridization chain reaction (HCR) を用いた新規の高感度 FISH 法 (HCR-FISH) 法が報告された (yamaguchi et al., 2015)。HCR-FISH 法は、FISH 法よりも高感度な蛍光が得られるが、更なる蛍光増幅させることで微生物の機能遺伝子の視覚的検出としても利用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、HCR-FISH 法に着目し、azide と alkyne の特異的な結合が可能な click chemistry と組み合わせ、機能遺伝子を視覚的検出可能な視覚的検出技術の開発を行った。Click chemistry は、特異的な結合が可能であるがこれまでに FISH 法と組み合わせた報告は少なく、また機能遺伝子の視覚的検出に利用された事例はない。そこで、本研究では、click chemistry と HCR-FISH 法を組み合わせた微生物の機能遺伝子を視覚的に検出する新たな技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本手法の概要

本手法の概要図を図 1 に示す。本手法は、PCR 法を用いて alkyne 標識させたプローブを作成する。その後、菌体内もしくは菌体外で click chemistry を行い HCR 法に用いる伸長起点の塩基配列を結合させる。最終的に HCR 法による蛍光増幅を行い、蛍光顕微鏡で観察することで機能遺伝子の視覚的検出を行う。

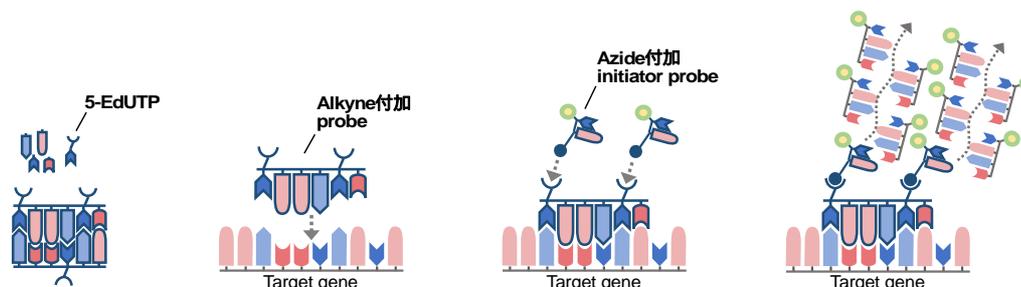


図 1 手法の概要図

(2) Alkyne 標識させたプローブの合成

本研究では、標的微生物として温室効果ガスを排出せず水処理が可能なアナモックス細菌に着目し、アナモックス細菌が有する機能遺伝子である *hzo* 遺伝子を標的とした。まず、*hzo* 遺伝子を標的とした PCR 法を行い、その際に alkyne 標識させた塩基 (5-Ethynyl-dUTP) を挿入させた。

(3) 菌体内における click chemistry の検討

まず、標的微生物である *hzo* 遺伝子をプラスミドに挿入した遺伝子組み換え体および、非標的微生物であるメタン生成アーキアをメンブレンフィルター (pore size: 0.2 μ m) に集菌し、low-melting point agarose (0.2% (v/v)) で包埋した。次に、RNase による RNA 消化、リゾチームによる細胞壁処理を行った。洗浄後、125pg/ μ l に調整した alkyne 付加プローブをサンプルに滴下し、熱変性および交雑させた。その後、azide を付加させたイニシエータープローブを click chemistry によって結合させ、HCR による蛍光増幅を行った。

(4) 菌体外における click chemistry の検討

まず、(3)と同様に RNA 消化、細胞壁処理を行った。次に、click chemistry の触媒に用いる銅イオンがサンプル中の生体分子に及ぼす影響を考慮し、alkyne 付加プローブと azide 付加イニシエ

タープローブをチューブ内（菌体外）で結合させた。そして、アガロースゲル電気泳動による銅イオン除去を行った。その後、精製したプローブを hzo 遺伝子に交雑させ、HCR による蛍光増幅を行った。

(5) 環境微生物への適用

標的微生物を遺伝子組み換え体から水処理リアクター内のアナモックス細菌に変更し、メタン生成アーキアと混合させ、(3)と同様の手順で検出した。

4. 研究成果

(1) 菌体内における click chemistry による視覚的検出

本手法を適用したところ、アーキアから非特異的な蛍光を検出した。これは蛍光増幅の起点となる click chemistry に原因があると考えられた。そこで、alkyne を標識していないプローブを用いた場合、azide を標識していないイニシエータープローブを用いた場合、イニシエータープローブを用いない場合でそれぞれ検出した。その結果、イニシエータープローブを用いない場合に限り、蛍光が検出されなかった。次に、click chemistry の触媒に用いる CuSO₄ の最終濃度を 0-5mM の範囲で変化させ検討した。その結果、濃度低下に伴って非特異的な蛍光が微弱になった。これより、非特異的な蛍光は銅 (I) イオンによってイニシエータープローブがサンプル中の生体分子に非特異的に交雑または結合したことが要因であると考えた。

そこで、非特異的な蛍光の改善を目指し、複数の方法でアプローチを行った。はじめに、イニシエータープローブが非特異的に交雑している場合を考え、click chemistry 中にホルムアミドを添加する方法を試みた。しかし、ホルムアミド濃度 10-40%のいずれにおいても改善することはできなかった。次に、イニシエータープローブが非特異的に結合する場合を考え、click chemistry に使用する THPTA (トリス(3-ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル)アミン) 濃度に着目した。既報の研究 (Hong, V., et al., 2012) を参考にし、THPTA 濃度を CuSO₄ 濃度の 5 倍に上昇させたところ、非特異的な蛍光の抑制に成功した。その一方で、標的微生物からも蛍光が検出されなかった。これは、azide 付加イニシエータープローブが alkyne 付加プローブまで到達できていないことが考えられた。そこで、click chemistry の反応時間を 1 時間から 2 時間、4 時間に变化させた。その結果、反応時間が 4 時間のとき、特異性を維持しながら標的微生物の一部から蛍光が検出された。

(2) 菌体外における click chemistry による視覚的検出

菌体内で click chemistry が起こさせることが困難であった際、菌体外における click chemistry の検討を行った。菌体外での click chemistry は、アガロースゲル電気泳動によるバンド位置によって click chemistry の成否を確認した。alkyne 付加プローブのみで泳動したバンドと比較したところ、click chemistry 適用後のバンド位置に差が見られなかった。また、バンド長が短い箇所からイニシエータープローブとみられるバンドが確認されたことから、click chemistry による結合が正常に行われていないと判断した。また、そのプローブを用いて HCR による蛍光増幅も行ったが蛍光が得られなかった。

(3) アナモックス細菌の視覚的検出

上述した結果から、菌体内で click chemistry を用いた視覚的検出が可能であった (1)の条件で環境中のアナモックス細菌に適用させた結果、混合させた非標的微生物であるアーキアから非特異的な蛍光が確認されず、アナモックス細菌と考えられる環境微生物の一部から蛍光が検出された。

参考文献

- Lasken R. S. Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 510–516, 2007
- Grieb, A., Bowers, R. M., Oggerin, M., Goudeau D., Lee, J., Malmstrom, R. R., Woyke, T. and Fuchs, B.M. A pipeline for targeted metagenomics of environmental bacteria. *Microbiome*, 8, 21, 2020.
- Yamaguchi, T., Fuchs, B. M., Amann, R., Kawakami, S., Kubota, K., Hatamoto, M. and Yamaguchi, T. Rapid and Sensitive Identification of Marine Bacteria by an Improved in situ DNA-Hybridization Chain Reaction (quickHCR-FISH). *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 400-405, 2015.
- Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C. and Finn, P. M. G. Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(52), 9879–9883, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永妻志問, 大野裕之, 山口 剛士
2. 発表標題 HCR-FISH法を用いた機能遺伝子の視覚的検出
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 漣, 山口 剛士
2. 発表標題 HCR-FISH法を用いた微生物回収技術の最適化
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 綾乃, 木村 圭佑, 武邊 勝道, 山口 剛士
2. 発表標題 アジド-アルキンの環化付加反応を用いた微生物の視覚的検出技術の最適化
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 綾乃, 木村 圭佑, 武邊 勝道, 山口 剛士
2. 発表標題 アジド・アルキンの環化付加反応を用いた大腸菌の視覚的検出
3. 学会等名 第72回土木学会中国支部研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎綾乃, 木村圭佑, Bernhard Fuchs, Rudolf Amann, Jorg Wulf, 武邊勝道, 山口剛士
2. 発表標題 アジド-アルキンの環化付加反応を用いた高感度FISH法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Mizuta, Tsuyoshi Yamaguchi and Kohdai Watari
2. 発表標題 Microbial community structure and diversity of animal husbandry effluent in intermittent aeration reactor
3. 学会等名 STI-Gigaku 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野裕之, 山口剛士, 武邊勝道
2. 発表標題 Click chemistryを用いた機能遺伝子の視覚的検出技術の開発
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山口剛士, 川上周司	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊 アグリバイオ 1月号	

1. 著者名 山口剛士, 川上周司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 月刊 細胞 11月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------