

平成22年4月21日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19780067

研究課題名（和文） 環境微生物の機能を指標としたイメージング

研究課題名（英文） Analytical imaging of microbes in natural environments

研究代表者

野田 悟子（NODA SATOKO）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部 ・准教授

研究者番号：80342830

研究成果の概要（和文）：

近年の分子生物学的手法の進展により、環境中の微生物群の生態的な情報が蓄積しつつある。しかし、個々の微生物が環境中でどのような働きや代謝機能を行っているのかはあまり分かっていない。そこで本研究課題では、微生物の生理活性を細胞レベルで検出するために、環境中の微生物群が発現している機能遺伝子を局在と共に検出する手法の開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Molecular biological approaches have provided a wealth of information regarding the genetics and ecology of microbial populations. At the cellular level, however, information on the function of individual microorganisms in the natural environment is scarce. In this study, therefore, metabolic activities of individual cells and localization of expressed gene in microbial community were investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：環境微生物、共生微生物、シロアリ、in situ hybridization

1. 研究開始当初の背景

近年の自然環境微生物群のメタゲノム解析により、培養困難な新規微生物群の配列情報が蓄積しつつあり、新しい機能を有する微

生物の存在や環境に対する役割が明らかにされてきている。一方で、これら環境微生物の機能を実際に捉えることは、遺伝子配列から得られる情報が限られたものであること、

生物の機能発現には様々な環境因子の関与があることなどから、未だ多くのハードルがあるのが現状である。

これまでに自然環境中の微生物の生理活性を検出する方法として、安定同位体標識した化合物を用い、環境中で化合物を代謝・利用する微生物種を推定するという手法 (SIP) が考案、実施されている。この方法では主に炭素 13 で標識された化合物を用い、標識化合物を利用する微生物の核酸が重たくなることを利用し、利用できない微生物の核酸と超遠心により分離する。その後、PCR 法で 16S rRNA 遺伝子等のマーカー遺伝子の増幅、遺伝子配列の決定と分子系統解析により標識化合物の利用微生物を推定するというものである。この手法はマーカー遺伝子による群集構造解析から生物種を推定し、機能を間接的に予想するのみであり、また核酸の抽出が必要なために微生物の局在に対する情報が得られない等の問題があった。SIMS は試料にイオンビームを照射し、出てくる 2 次イオンを質量分析することで、試料に含まれる極微量元素の深さ方向への分布、定量分析を行う分析装置であるが、近年生物試料に対しての応用が期待されている。微生物生態学の分野に適用された例はほとんどないが、SIP 法の次のステップとして注目されている手法の一つである。この分析法は MAR-FISH (Microautoradiography -FISH) 等の放射性同位体を用いた方法が、窒素に適用できないのに対し、ほぼ全ての元素の分析が可能であること、高解像度でその局在についての解析が可能であるという点が特徴である。

FISH 法による微生物の検出については、すでに多くの報告がなされているが、その多くは 16S rRNA を標的としている。rRNA に比べ、機能遺伝子の mRNA は含量が少なく、通常の FISH 法ではその検出が難しい。しかし、環境微生物の個々の機能を局在とともに検出するには機能遺伝子 mRNA を標的とした FISH 法の改良が必須と考えられる。

2. 研究の目的

自然状態にある多くの微生物生態系は物理化学的、生物学的に均質ではなく、特異的な空間分布を持ち微生物間の相互関係を維持している。そのため、微生物の生理機能を局在とともに検出できる系の開発が強く望まれている。そこで、本研究課題では環境微

生物の“機能を指標としたイメージング”に向けて、二次イオン質量分析計 (SIMS) を用いた単一細胞での生理活性の検出系の構築並びに *in situ hybridization* (FISH) 法による機能遺伝子の発現の可視化について検討する。

3. 研究の方法

本研究では食材性昆虫のシロアリの腸内共生系をモデルとして開発を進めた。シロアリ腸内には真核単細胞生物である原生生物や原核生物が高密度に棲息している。原生生物の細胞内外にはさらに原核生物の共生が観察され、複雑な多重共生系を構築している。しかしながら、共生細菌の機能に関する報告はほとんどなく、どのような生理機能が共生系で働いているのかという知見は非常に少ない。

そこで、シロアリ共生微生物の持つ重要な役割の一つとして知られている窒素固定に着目し窒素固定遺伝子の mRNA を標的とした FISH 法を適用して、機能遺伝子の局在を検出する系の確立を行った。まず、食材性昆虫の腸内共生微生物から RT-PCR 法で実際に発現している窒素固定遺伝子の断片を増幅し、DNA 断片をクローン化した。このプラスミドベクター上の RNA ポリメラーゼ認識サイトから、*in vitro* transcription により 150mer 程度の RNA を合成した。合成された RNA は化学的に Cy5, Cy3 の蛍光色素でラベルし、未反応の色素を除いた後プローブとして使用した。また、酵素抗体法で検出するためにジゴキシゲニンでもラベルした。この場合にはジゴキシゲニンラベルされた NTP を使用して標識 RNA を合成した。Cy5, Cy3 標識プローブ使用時は蛍光顕微鏡で観察してシグナルを検出し、DIG ラベルしたプローブ使用時は酵素抗体法で基質に NBT (ニトロブルーテトラゾリウム塩) と BCIP (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェイト, トルイジニウム塩) を使用し、生成する不溶性の沈殿の生成を顕微鏡で観察する事によって行った。

ついで、安定同位体 (^{15}N ・重窒素) を用いた窒素固定活性の検出を試みた。サンプルは窒素固定活性測定用緩衝液に懸濁し、アセチレン還元活性及び、窒素取り込み活性を測定した。反応系に ^{14}N が存在していると同位体効果により ^{15}N の取込みが極端に低下するため、系内の窒素は脱気を行った後 ^{15}N を吹

き込む操作を数回繰り返す、完全に置換した。重窒素 (^{15}N) 存在下で反応させた後、遠心分離で回収した細胞の安定同位体自然存在比を質量分析で測定した。その後、二次イオン質量分析計(SIMS)等を用いて、安定同位体標識された細胞の検出系について検討した。

4. 研究成果

環境サンプルは自家蛍光物質のバックグラウンドが高く、さらに rRNA に比べ機能遺伝子の mRNA 含量が少ないことから、20mer 程度のオリゴヌクレオチドに 1 分子の蛍光色素を付加したプローブで行う通常の FISH 法ではその検出が難しい。そこで、150~300mer 程度の RNA プローブを合成して検出感度をあげてみることを試みた。プローブは Cy5, Cy3 の蛍光色素に加え、酵素抗体法で検出するためにジゴキシゲニンでもラベルした。Cy5, Cy3 ラベルしたプローブで FISH を行った所、自家蛍光との S/N 比が低く、シグナルを検出することが難しかった。ジゴキシゲニンでラベルしたプローブを発色法で検出した場合には、解像度が低下して小さいバクテリア等の識別が難しくなるが、蛍光色素でラベルしたものに比べ感度はかなり高くなった。

in situ hybridization 法では、シグナルを増感することで検出感度をあげることができたが、対象とする微生物の環境中での存在量が少ないため、活性を指標にして検出するためには個々の細胞の生物活性が高くなるような条件の設定が必要であると考えられた。食材性昆虫に共生する原生生物は培養が非常に難しいため、できるだけ長く生物活性を保ったまま維持ができるような培養条件の検討を行った。また、窒素固定細菌による窒素の取り込みが効率的に行われる反応条件についても検討した。窒素固定活性は他の利用可能な窒素源の存在により抑制されるので、アンモニア等の窒素源を与えたときの代謝活性についても比較するため、窒素源を宿主昆虫の餌や原生生物の培養液に添加し、生存率や窒素固定活性の変化等をアセチレン還元法によって評価した。営巣している木材から取ったシロアリと、その後濾紙で飼育したシロアリのアセチレン還元活性を比較した所、数日間の濾紙による飼育で 2~4 倍程度活性の上昇が見られた。次に、これらのシロアリサンプルから共生微生物が生息している後腸を取り出し、窒素固定活性測定

用緩衝液にてアセチレン還元活性及び、窒素取り込み活性を測定した。窒素の取り込み量は濾紙で飼育したシロアリサンプルを用いた方が多く、アセチレン還元活性と比例していた。また、遠心分離で細胞を分離し、窒素取り込み活性を測定した所、細胞の画分ごとに活性の違いが見られた。このことから、特定の微生物種が窒素を取り込み同化しているものと推定された。

Cs+イオンをサンプルに照射し、二次イオン質量分析計で元素分析を行った。検出器の感度やスリット幅を調整し、ある程度の大きさの細胞を用いることで $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$, $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ 等の各 cyanide ion の検出・分離が可能であった。

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 5 件)

- 1、**S. Noda**, Y. Hongoh, T. Sato, M. Ohkuma “Complex acquisition of symbiotic Bacteroidales bacteria by various protists in the gut of termites” BMC Evol. Biol. vol.9 no.158. **2009 年** 査読有り
- 2、**S. Noda**, C. Mantini, C. Bordereau, O. Kitade, M. F. Dolan, E. Viscogliosi, M. Ohkuma “Molecular phylogeny of parabasalids with emphasis on the order Cristamonadida and its complex morphological evolution” Mol. Phylogenet. Evol vol.52 pp. 217-224. **2009 年** 査読有り
- 3、T. Sato, Y. Hongoh, **S. Noda**, S. Hattori, S. Ui. M. Ohkuma “Candidatus Desulfovibrio trichonymphae, a novel intracellular symbiont of the flagellate Trichonympha agilis in termite gut” Environmental microbiology vol. 11 pp. 1007-1015 **2009 年** 査読有り
- 4、M. Ohkuma, **S. Noda**, Y. Hongoh, C. A. Nalepa, T. Inoue “Inheritance and diversification of symbiotic hypermastigid flagellates from a common ancestor of *Cryptocercus* cockroach and termite” Proceedings B. vol. 276 pp 239-245 **2008 年** 査読有り
- 5、J. Inoue, **S. Noda**, Y. Hongoh, S. Ui M. Ohkuma “Identification of Endosymbiotic Methanogen and Ectosymbiotic Spirochetes of Gut Protists of the Termite *Coptotermes formosanus*” Microbs Environ., vol. 21, pp.94-97.

2008年 査読有り

〔学会発表〕（計3件）

1、**S. Noda**, K. Kurokawa, S. Tatsumoto, Y. Sakaki, A. Toyoda, M. Ohkuma : meta-EST analysis of a symbiotic protistan community in the termite gut, International symposium on microbial ecology, Australia, **2008年8月18日**

2、**S. Noda**, Eric Viscogliosi, M. Ohkuma : Molecular phylogeny of parabasalid in the termite gut inferred from multi gene sequences, Protist 2008 Conference, Canada, **2008年7月23日**

3、**野田悟子**、工藤俊章、大熊盛也: Construction of a species-specific cDNA library from protists community without cultivation. 日本微生物生態学会、愛媛、**2007年9月16日**

〔図書〕（計1件）

大熊盛也、本郷裕一、**野田悟子**：蛋白質 核酸 酵素 “シロアリの腸内微生物 バイオマス資源を高効率に利用する多重共生”，vol. 53, p. 1841-1849 2008年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 悟子 (NODA SATOKO)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・
准教授
研究者番号：80342830

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし