

Two-pass TSA-FISH 法を用いた微生物機能遺伝子の視覚的検出技術

Development of Two-pass TSA-FISH for Detection of Functional Genes in Environmental Microorganisms

長谷川拓也¹, 川上 周司², 井町 寛之³, 大橋 晶良⁴, 原田 秀樹¹, 久保田健吾^{1*}
TAKUYA HASEGAWA, SHUJI KAWAKAMI, HIROYUKI IMACHI, AKIYOSHI OHASHI, HIDEKI HARADA and KENGO KUBOTA

¹ 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06

² 長岡技術科学大学工学部環境・建設系 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

³ 海洋研究開発機構海洋・極限環境生物圏領域 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15

⁴ 広島大学大学院工学研究院社会環境空間部門 〒739-8527 広島県東広島市鏡山 1-4-1

* TEL: 022-795-7466 FAX: 022-795-7465

* E-mail: kengok@ep11.civil.tohoku.ac.jp

¹ Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University,
6-6-06 Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan

² Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology,
1603-1 Kamitomiokamachi, Nagaoka, Niigata 940-2188, Japan

³ Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology,
2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan

⁴ Dept. of Civil and Environmental Engineering, Hiroshima University,
1-4-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8527, Japan

キーワード: 機能遺伝子, two-pass TSA-FISH 法, ポリヌクレオチドプローブ

Key words: functional genes, two-pass TSA-FISH, polynucleotide probes

(原稿受付 2010年10月14日/原稿受理 2010年11月11日)

1. はじめに

標的微生物を分離・培養せずに原位置 (*in situ*) で検出可能な fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法は、標的微生物の形態学的特徴の把握、細胞レベルでの定量解析およびニッチにおける空間分布の把握が可能な技術である^{1,2)}。加えて、FISH 法は放射性あるいは安定同位体ラベルされた基質を用いて微生物の機能推定を行う microautoradiography (MAR)-FISH 法^{19,25)} や secondary ion mass spectrometry (SIMS)-FISH 法^{20,24)} としても利用されている。さらに、近年では培養困難な微生物のゲノム配列を決定するために、FISH 法で標的細胞を光らせ、セルソーターで回収しゲノム配列の決定を行うシングルセルゲノム解析にも用いられている¹⁸⁾。すなわち、FISH 法は今日の微生物生態解析において必須の技術であると言える。

FISH 法は、蛍光標識プローブを標的微生物の核酸 (主に rRNA) に特異的に結合させ、落射蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、標的微生物のみを特異的に検出する技術である。従って、蛍光標識プローブを用いる場合、FISH 法で得られる蛍光強度は標的分子に交雑するプローブの数と相関関係にあるため⁷⁾、細

胞内に数多く存在する分子である rRNA は標的として適している。しかしながら、海洋や土壌など貧栄養環境下で代謝活性の低い微生物については、細胞内に FISH 法で検出できる十分な rRNA が発現されていない場合が多く、検出が困難であるという問題を抱えている^{5,28)}。また rRNA 以外の核酸で、極めて存在量の少ない mRNA ($10^0 \sim 10^2$ copies/cell) や機能遺伝子 (1~数 copies/cell) の検出は、微生物機能の推定につながるため、それらを検出することの重要性は FISH 法の登場直後から認識されていたものの、FISH 法の感度不足のために困難であった^{2,26,37)}。従って FISH 法の高感度化は、FISH 法を用いて微生物の系統 (rRNA) から機能 (mRNA, 機能遺伝子) まで解析するための重要な課題であった。

2. 高感度 FISH 法の現状

今日までに低 rRNA 含量の細胞、mRNA や機能遺伝子を検出可能な高感度 FISH 法が幾つか開発されている。これまでに報告されている高感度 FISH 法は、大きく分けて標的の数を増やす方法と増やさない方法に大別される (表 1)。しかしながらこれらの高感度 FISH 法には、実験系の構築や実験操作により高度なスキルが要

表 1. 遺伝子を検出可能な高感度 FISH 法の特徴と問題点

感度を高める方法	手法名	プライマーあるいはプローブの種類	検出レンジの柔軟性	得られる蛍光	検出率	主な問題点	参考文献
標的分子を増幅する方法	<i>in situ</i> PCR 法	複数のプライマー	○	菌体全体	高い	熱変性の繰り返しにより細胞が損傷し、菌体形状が維持できない。増幅産物が菌体外に漏れだすことで高いバックグラウンドを伴う。	11)
	cPRINS-FISH 法	複数のプライマー及びプローブ	○	菌体全体	低い場合もあり	熱変性の繰り返しにより細胞が損傷し、菌体形状が維持できない。標的産物の増幅効率が低く、高い検出率が得られない場合がある。	15)
	<i>in situ</i> RCA 法	複数のプライマー及びプローブ	×	菌体全体	低い場合もあり	プローブ設計が複雑であり、任意の検出レンジの設定が困難な場合がある。検出率が 15% 程度しか達成できなかった報告もある。	12), 22)
	<i>in situ</i> LAMP 法	複数のプライマー	×	菌体全体	高い	プローブ設計が複雑であり、任意の検出レンジの設定が困難な場合がある。	21)
プローブのネットワークを用いる方法	RING-FISH 法	ポリヌクレオチドプローブ	△	菌体を囲うように	高い	プローブにより交雑条件の最適化が必要。蛍光の形状から有効性を判断する必要がある。プローブ合成に標的遺伝子断片が必要である。	30), 38)
	TSA-FISH 法	ポリヌクレオチドプローブ	△	菌体の一部分	低い	検出率が 40% 程度と低い。得られる蛍光は菌体の一部分である。プローブ合成に標的遺伝子断片が必要である。	23)
酵素反応応によるシグナル増幅法を用いる方法	Two-pass TSA-FISH 法	オリゴヌクレオチドプローブ	○	菌体の一部分	低い	検出率が 15% 程度と低い。得られる蛍光は菌体の一部分である。	14)
		ポリヌクレオチドプローブ	△	菌体全体	高い	プローブ合成に標的遺伝子断片が必要である。	39), 40)

求され、更に検出率が低い技術が多いのも事実である(検出率とは標的配列を有している細胞数を 100%とした場合に、FISH 法で検出される細胞の割合のこと)。本項では高感度 FISH 法の中でも、特に遺伝子の検出が可能なものについて取り上げ、それらの特徴と問題点について述べる。

標的の数を増やす方法として、*in situ* polymerase chain reaction (PCR) 法¹¹⁾、*cycling primed in situ amplification* (cPRINS)-FISH 法¹⁵⁾、*in situ rolling circle amplification* (RCA) 法^{12,22)} と *in situ loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) 法²¹⁾ がある。*In situ* PCR 法と cPRINS-FISH 法は、標的遺伝子に特異的に結合するプライマーやプローブを合計で最低 2 つ選定するだけよく、その組み合わせによって標的遺伝子を保有する微生物群を網羅的に、あるいは種特異的に検出することが可能である。また、これら上記 2 つの方法ではオリゴヌクレオチドプローブ (20 mer 程度の鎖長の短いプローブ) があれば標的遺伝子の検出は可能であり、後述するポリヌクレオチドプローブ (一般的には 150–200 mer 以上の鎖長のプローブ) を用いる方法と違い、標的遺伝子断片を入手しなくても実験系を確立することができる。しかし、これらの方法では増幅反応に伴う熱変性の繰り返しにより細胞が損傷を受けること、増幅産物が短鎖であるために細胞外に流出することで高いバックグラウンドや偽陽性を伴う可能性があることが知られている²²⁾。その後、等温で増幅反応が進行し、比較的長鎖の増幅産物を生成する LAMP 法や RCA 法を用いた検出技術が開発されたが、これら方法を適用するには複雑なプライマーの設計などが要求される。このため、網羅的な検出というよりは遺伝学的に近縁な範囲のグループを標的とするのに適している。またこれら標的の数を増やす方法は、増幅反応前に RNase 処理の必要がある場合¹²⁾ や、増幅反応中に rRNA が消化されてしまう等の理由から rRNA を標的とした FISH 法との同時染色が難しいことが知られている。そこで、シングルセルレベルで視覚的に微生物の系統と機能を結びつける方法として、1) 先ず rRNA を標的とした FISH 法を行い、特定の視野をカメラで撮影する、2) 次に遺伝子を標的とした FISH 法による検出を行い、再度 rRNA を標的とした FISH 法で撮影したときと同一視野を探して、カメラで撮影する、3) それらの画像を用いて解析する、というステップを踏む方法が報告されている¹²⁾。この他、蛍光物質を細胞内に沈着可能な tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法を用いて rRNA を標的とした FISH を行った後、上述の遺伝子検出法を適用するなどが考えられるが、これまでにそのような報告はない。

標的の数を増やさずに検出する方法には recognition of individual genes (RING)-FISH 法がある^{30,38)}。RING-FISH 法は、RNA ポリヌクレオチドプローブを用いた方法であり、その検出原理はプローブの標的遺伝子との交雑反応中にプローブ同士が交雑し、プローブネットワークを形成することで感度が高まることによるものであると考察されている³⁸⁾。そのため RING-FISH 法では、菌体を覆うようなハロ状の蛍光が得られる特徴を有する。これまでに rRNA との二重染色や環境サンプルへの適用も報告されている。RING-FISH 法における問題点は

シグナルを得るためにプローブが標的遺伝子と特異的に結合し、かつネットワークを形成可能な条件下で交雑反応を行わなければならないため、特異性のコントロールが難しいことである。この他、ハロ状の蛍光ではないものの非特異的蛍光が見られること、プローブ合成には標的遺伝子の DNA 断片が必要であることなどが挙げられる。

西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) を利用した TSA 反応を用いる TSA-FISH 法も、標的の数を増やさない高感度 FISH 法の 1 つである。TSA 反応は、過酸化水素存在下で HRP の酵素触媒作用によりラジカル化したチラミド化合物が、菌体内のチロシンやトリプトファンといった芳香族アミノ酸と非特異的に共有結合する反応である。チラミドには様々な蛍光物質 (FITC や Cy3, Alexa 系色素など) が標識可能であり、二重染色なども可能である²⁹⁾。TSA-FISH 法は、rRNA^{28,32)}、mRNA^{17,26,37)}、tmRNA³³⁾ そして遺伝子^{14,23,39,40)} の検出と段階的にその適用範囲を拡大してきた。TSA-FISH 法の最大の特徴は、シグナル増幅反応がシンプルであり、反応条件が他の実験系にも容易に適用可能であることである。我々の研究グループはこの TSA 法に着目して研究を進め、2006 年に発表した two-pass TSA-FISH 法は、抗原抗体反応を組み合わせ TSA 反応を二度繰り返すことでシグナル強度を飛躍的に向上させた¹⁷⁾。また非特異的増幅を抑制することで、オリゴヌクレオチドプローブにて mRNA¹⁷⁾ や機能遺伝子¹⁴⁾ を検出することに成功している。しかしながら、機能遺伝子を標的とした際の検出率は、1 塩基ミスマッチを識別可能な交雑条件下で 15% 程度と低かった。我々の研究と平行するように 2010 年に、Moraru らによって TSA-FISH 法とポリヌクレオチドプローブを組み合わせた遺伝子検出技術が報告された²³⁾。しかし、得られる蛍光は菌体の一部分のみであり、検出率は 40% 程度であったと報告している。遺伝子を標的とした TSA-FISH 法において高い検出率を達成できないことは、大きな課題となっている。この他 TSA-FISH 法を適用する場合、サンプルによっては内在性ペルオキシダーゼ活性を有するものもあり、適切に処理する必要がある^{13,26,28)}。

また、高感度 FISH 法の多くは、シグナル増幅のために分子量の大きい酵素 (例えば DNA ポリメラーゼや HRP) やポリヌクレオチドプローブを細胞内に浸透さ

せる必要があり、適切な細胞壁処理を施す必要がある。しかし、全ての微生物に様に効果のある細胞壁処理の方法はなく、標的微生物ごとに最適な方法を検討しているのが現状である^{10,13,16,28,34)}。

以上、本項では遺伝子検出が可能な高感度 FISH 法を紹介したが、1) 柔軟な検出レンジを達成し、2) 十分な蛍光が得られ、3) 高い検出率が達成でき、4) rRNA との二重染色が可能な手法と限定すると、この条件を十分に達成可能な手法は今のところない。すなわち、高感度 FISH 法ごとに一長一短があり、目的に合わせて適切な方法を選択して用いているのが現状である。

3. Two-pass TSA-FISH 法

Two-pass TSA-FISH 法は Kubota らが 2006 年に報告した、TSA 反応を 2 回行うことで蛍光強度を著しく上げる方法である¹⁷⁾。図 1 に two-pass TSA-FISH 法による遺伝子検出の原理を示す。まずプローブと染色体を熱変性により一本鎖 DNA にした後、プローブと標的遺伝子を交雑させる。次に HRP 標識抗 dinitrophenyl (DNP) 抗体がプローブに標識された DNP と抗原抗体反応により結合する。続いて DNP 標識チラミドを用いた TSA 反応により、菌体内に DNP を大量に沈着させる。続いて再び HRP 標識抗 DNP 抗体を用いた 2 回目の抗原抗体反応を行った後、2 回目の TSA 反応により Cy3 標識チラミドを沈着させ標的微生物を可視化する。菌体内に沈着したチラミド化合物は菌対外に漏出することはないため、*in situ* PCR 法などのように増幅産物が菌対外に漏出することに伴うバックグラウンドは生じない。

プローブには、二本鎖 DNA ポリヌクレオチドプローブを用いる。RING-FISH 法や mRNA を検出した TSA-FISH 法など、ポリヌクレオチドプローブを用いる高感度 FISH 法のほとんどは、一本鎖 RNA ポリヌクレオチドプローブを採用している。しかし RNA プローブを用いると、RNase の混入を防ぐために実験が煩雑になる。また mRNA FISH と異なり遺伝子検出の場合、標的配列はセンス・アンチセンス鎖の両方で構わないことから、プローブの交雑確率を上げるためにも二本鎖 DNA プローブは有効である。プローブの合成には PCR 法を用い、プローブへの DNP の標識は PCR 反応液中に dUTP-11-DNP を添加することで行った。これまでの検討から、

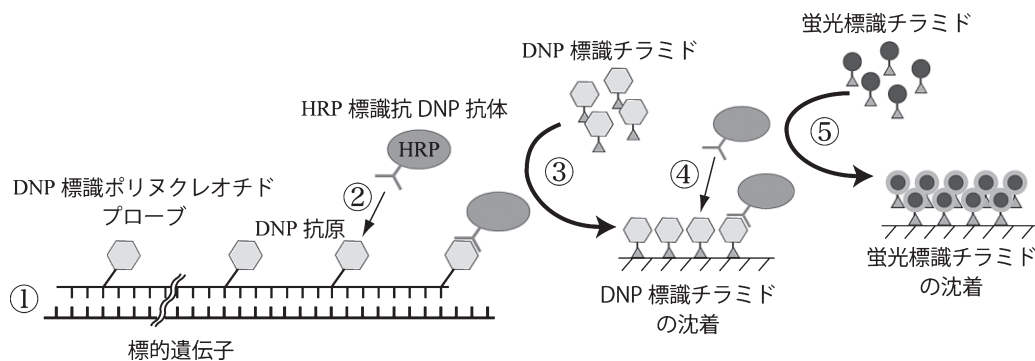


図 1. Two-pass TSA-FISH 法の原理。

- ①標的遺伝子とプローブの交雑 ② HRP 標識抗 DNP 抗体と DNP 抗原の結合 ③ TSA 反応による DNP 標識チラミドの沈着
④ HRP 標識抗 DNP 抗体と DNP 抗原の結合 ⑤ TSA 反応による蛍光標識チラミドの沈着

dUTP-11-DNP の濃度を高くすると標識効率は上がるが得られる PCR 産物の収量が減り、濃度を高くしすぎると PCR 増幅しなくなることが分かっている。また PCR 反応液の Mg^{2+} 濃度を高くする事で DNA の増幅効率が上がることから、より高い dUTP-11-DNP 濃度でプローブ合成が行えることを報告している³⁹⁾。

Two-pass TSA-FISH 法は、Kubota ら、Kawakami らの方法^{14,17)}を引用し、適宜最適化を行った。抗体がスライドに非特異的に結合することでみられる非特異的蛍光が問題になることがあるが、新鮮な抗体を使用することや最適化された抗体の洗浄方法を用いた two-pass TSA-FISH 法を用いることで、十分なシグナル-ノイズ比を達成することが可能である。

4. Two-pass TSA-FISH 法を用いた遺伝子検出

4.1. 適用可能性と特異性の検討

Two-pass TSA-FISH 法の遺伝子検出技術としての適用可能性及び特異性を確認するために、純粋菌株を用いた検討を行った。モデル微生物は *Desulfobulbus propionicus* (DSM6523) とした。標的遺伝子は硫黄の酸化・還元サイクルにおいて、アデニリル硫酸の亜硫酸への還元反応、あるいはその逆の酸化反応を触媒する酵素 adenosine-5'-phosphosulfate reductase のアルファサブユニットをコードする遺伝子 (*apsA* 遺伝子) とした。この *apsA* 遺伝子は、マーカー遺伝子として広く用いられている^{4,8)}。プローブはそのゲノム DNA をテンプレートとして、この *apsA* 遺伝子に特異的なプライマーペアを用いて合成した。まず 805 bp のプローブを合成し、標的遺伝子の検出を試みたところ、極めて強い蛍光を得ることができた。検出率は 99% を超えており、高い検出率を達成した。ネガティブコントロールとして *apsA* 遺伝子を持たない *Escherichia coli* を選定し同様の条件で実験を行ったが、*E. coli* からは蛍光が得られなかったため、標的遺伝子の特異的検出が可能であったと判断した。

次に、プローブの長さが検出にどのような影響を及ぼすかを確認するために、プローブ合成時のプライマーを変更することで 512 bp、137 bp のプローブを合成し、先ほどと同様の実験を行った。プローブが短くなると検出率は低下する傾向を示し、137 bp では検出率は 20% 程度となった (表 2)。プローブと標的遺伝子の交雑を促すことを考え、ストリンジェンシーを低くする、プローブ濃度を上げる等の検討を行ったが検出率の向上は見られなかった。これら結果から、高い検出率を達成するた

めにはある程度のプローブ長が必要であることが示唆された。

次に、本手法が相同性の高い遺伝子をどの程度識別可能であるかを検討するために、*Dsb. propionicus* に近縁な硫酸塩還元細菌 2 種 *Desulfobulbus elongatus* (DSM2908, プローブに対する塩基配列相同性が約 90%)、*Desulfovibrio vulgaris* (DSM644, 同約 65%) を用意し、*Dsb. propionicus* のみを検出可能な条件の検討を行った。まず、805 bp のプローブを用いたところ、*Dsb. propionicus* と *Dsv. vulgaris* の識別は可能であったが、*Dsb. elongatus* を完全に識別することは困難であった (図 2)。より短いプローブの方が特異性が高いと考えられたが、512 bp、157 bp いずれのプローブでも同様の結果が得られた (表 2)。川上らがメタン生成古細菌の methylo-enzyme M reductase のアルファサブユニットをコードする遺伝子 (*mcrA* 遺伝子) を標的に同様の検討を行った

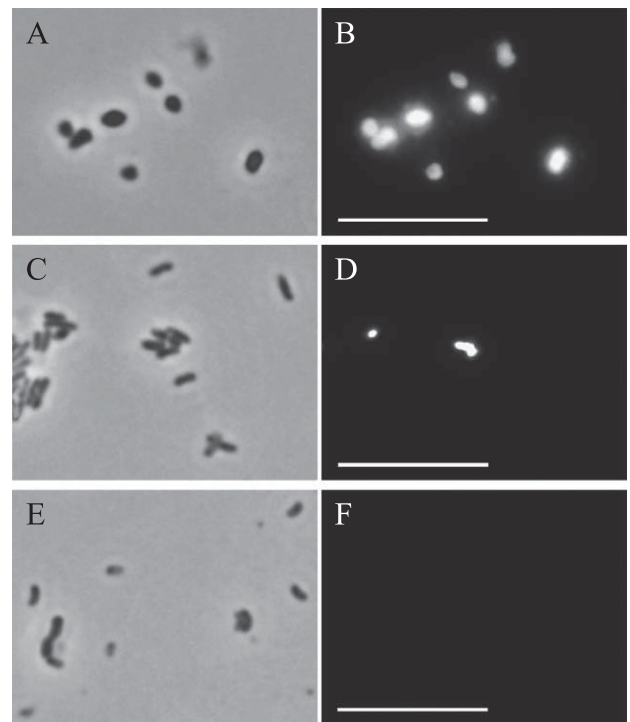


図 2. Two-pass TSA-FISH 法による硫酸還元菌の *apsA* 遺伝子の検出。

プローブは 805 bp のものを用いた。(A) (B) は *Dsb. propionicus*, (C) (D) は *Dsb. elongates*, (E) (F) は *Dsv. Vulgaris*。位相差視野 (A, C, E) と G 励起視野 (B, D, F) はそれぞれ同一視野。露光時間は 20 ms。棒線は 10 μ m。

表 2. 本手法の特異性と検出率

用いた微生物の遺伝子配列 (accession number)	モデル微生物の <i>apsA</i> 遺伝子 との相同性 (%)	プローブ長の違いによる検出の可否		
		805 bp	512 bp	137 bp
<i>Dsb. propionicus</i> (EF442935)	100	+++	++	+
<i>Dsb. elongatus</i> (AF418146)	90	++	+	+
<i>Dsv. Vulgaris</i> (Z69372)	65	N.D.	N.D.	N.D.
<i>E. coli</i>	<<60	N.D.	N.D.	N.D.

図中の ‘+++’ は検出率 99% 以上, ‘++’ は 50% 以上, ‘+’ は 20% 以下, ‘N.D.’ は検出されない (not detected) を表す。

ところ、遺伝子相同性で 85% の遺伝子の識別に成功していることから（データ非表示）、本手法による識別能は塩基配列相同性で 89–85% 程度であると考えられる。機能遺伝子の場合、遺伝子配列相同性が 80–90% あればアミノ酸配列上での相同性は高い場合が多く、機能的に同一であることが予想される³¹⁾。従って、配列情報から微生物機能を推定する上では、十分な特異性を有していると考えられる。また、機能遺伝子と rRNA 遺伝子に基づく系統学的分類との関係は遺伝子ごとに異なるが、*mcrA* 遺伝子などは属間で 89% 程度という報告もあり³⁵⁾、本手法は属から科レベルは十分に識別可能であることが示唆された。

4.2. 嫌気性廃水処理汚泥サンプルへの適用

微生物コミュニティへの適用例として、嫌気性廃水処理汚泥サンプルに本手法を適用し、*apsA* 遺伝子を保持する微生物の網羅的検出を試みた。高い検出率をもって微生物を検出するためには長鎖のプロープが有効であったことから、汚泥サンプルから抽出した DNA をテンプレートとして約 800 bp のプロープを合成した。汚泥サンプルから抽出したバルク DNA をテンプレートとすることで、使用したプライマーセットで増幅される複数種の遺伝子断片をプロープとして用いることが出来る。この様にして合成されたプロープを用いれば、このサンプル中に存在する *apsA* 遺伝子を保有する微生物群を網羅的に検出することが可能となる。このプロープを用いて検出を試みたところ、一部の菌体から蛍光を得ることができた（図 3）。得られた蛍光は、プロープ交雑時及び洗浄時のストリンジエンシーを高めることで得られなくなったことから、標的遺伝子を特異的に検出していると判断した。得られた蛍光から検出された菌体は様々な形状をしており、このことから複数種の *apsA* 遺伝子保有微生物が存在していると思われ、これらは硫酸還元に関わっている微生物群である可能性が示唆された。

4.3. 本手法が高い検出率を達成した理由

2010 年に我々が報告した two-pass TSA-FISH 法とオリゴヌクレオチドプロープを組み合わせた方法は、特異的検出条件下でシングルコピー遺伝子の検出率が 15% 程度と低かった¹⁴⁾。同年 Hoshino らが報告している *in situ* RCA 法を用いた方法でも、シングルコピー遺伝子の場合、その検出率は 15% 程であったと報告してい

る¹²⁾。更に 2 つの報告において一致しているのは、マルチコピーである rRNA 遺伝子を標的とした場合、検出率が 50% 前後まで上昇することである。このように検出率が低い理由は、ヌクレオチドの交雑・乖離の挙動から説明できる。Tm (melting temperature) は、50% のヌクレオチドが乖離し、残り 50% のヌクレオチドが交雑しているときの温度を指す。二本鎖ヌクレオチドの乖離は、AT 結合の方が GC 結合に比べ結合力が弱いため、昇温に伴いヌクレオチドの AT を多く含む領域から進行すると考えられている。オリゴヌクレオチドの場合、部分的に交雑した状態は不安定であり、Tm においては、乖離したオリゴヌクレオチドが半数、交雑したオリゴヌクレオチドが半数となる³⁶⁾。すなわちオリゴヌクレオチドプロープは、標的分子に交雑しているか、していないかということになる。このことは、特異性を上げるためにストリンジエンシーを上げると、交雑するプロープの数が減少することを意味する。従って、rRNA のように菌体内に大量に標的分子が存在する場合、ストリンジエンシーを上げると、1 菌体内で交雑するプロープ数が減少し、得られる蛍光強度が減少する。しかしながらシングルコピー遺伝子を標的とした場合、1 菌体内で 1 コピーしか存在しないため、交雑しているプロープの数が検出率に直結する。例えば Tm 条件下では、理論的に検出率は最大でも 50% となる。rRNA 遺伝子のように数コピー存在する場合は、1 菌体内でプロープが交雑する確率はシングルコピー遺伝子を標的とした場合よりも高くなるため、検出率も高くなる。このように、特異的条件下で極めて存在数の少ない分子を標的とした場合、高い検出率を達成することは困難であると考えられる。

一方、ポリヌクレオチドの場合は、塩基数が多いため部分的に交雑した状態でも比較的安定であり、その Tm は、乖離領域 (AT を多く含む領域など) と交雑領域 (GC を多く含む領域など) のヌクレオチド数が同じ時を言う³⁶⁾。よって、高いストリンジエンシー条件下でもプロープと標的分子との交雑塩基数は減少するものの、交雑しているプロープそのものの数は減少しない。このため、オリゴヌクレオチドに比べ特異性は低下するものの、存在数の少ない機能遺伝子が高い検出率で検出するには、ポリヌクレオチドプロープを用いることに利があると言える。

しかし、我々と同様にポリヌクレオチドプロープを用いている Moraru らの方法では高い検出率を達成できていない²³⁾。両者の違いを整理すると、1) 感度が不足している（プロープ長や TSA 反応の回数）、2) プロープ及び染色体の熱変性が不十分である、などが挙げられる。我々も短いプロープの時には検出率が低下したことから（表 2）、ポリヌクレオチドプロープの長さは重要なファクターであると言える。また、長いプロープを用いても TSA-FISH 法では低い検出率しか得られなかったことから（データ非表示）、TSA 反応を 2 回行い、高感度化することも重要なファクターであると言える。本研究においては比較的長いプロープを使い、また two-pass TSA-FISH 法のプロトコールも、非特異的なシグナルの増幅を抑え、特異的なシグナルのみを増幅する様に最適化したことで、シグナルの高感度化が達成でき、それが高い検出率に繋がったと言える。

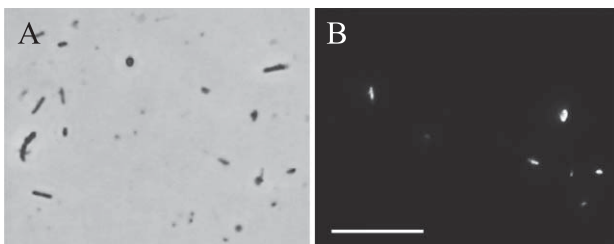


図 3. Two-pass TSA-FISH 法による嫌気性廃水処理汚泥中に存在する *apsA* 遺伝子を保持する微生物の検出。プロープは汚泥サンプルから抽出した DNA をテンプレートとして合成した約 800 bp のプロープを用いた。位相差視野 (A) と G 励起視野 (B) は同一視野。露光時間は 20 ms。棒線は 10 μ m。

5. 本手法の位置づけと今後の展望

我々の開発した two-pass TSA-FISH 法とポリヌクレオチドプローブを組み合わせた方法は、高い検出率を達成し、菌全体から強い蛍光で検出することが可能であった。本報で報告した方法は、TSA 法の検出率が低いという問題を克服し、TSA 法を汎用性の高い機能遺伝子の検出技術にまで引き上げることに成功した。

また、本手法は遺伝子相同性で 89–85% 程度のものを識別できる可能性がある。これまでに報告されているポリヌクレオチドプローブを用いた遺伝子検出技術では、特異性について詳細な検討がなされておらず、また個々の遺伝子を検出するよりも相同性の近い遺伝子を網羅的に検出することに主眼が置かれていた^{23,30)}。本手法では、比較的近縁な遺伝子でも識別でき、また複数のプローブを混ぜ合わせて用いることで広いグループを網羅的に検出することも可能である。これらから、メタゲノム解析等で得られた標的遺伝子配列からその遺伝子を保有する微生物を特異的に検出したい、あるいは、あるタンパク質のモチーフ部位から設計したプライマーを用い、同一機能を持った微生物群を網羅的に検出したい、といったニーズにも柔軟な検出レンジをもって対応できると思われる。

最後に、現在我々が取り組んでいる課題の 1 つに、まず TSA-FISH 法により rRNA を標的とした FISH 法を行った後に本技術を適用して、機能遺伝子と rRNA を二重染色することにより微生物の機能と系統を結びつける技術の開発がある。この他に、MAR-FISH 法^{19,25)} や SIMS-FISH 法^{20,24)} などの機能推定技術、フローサイトメーター⁶⁾ やマイクロマニピレーター^{3,9)}、magneto-FISH 法²⁷⁾ などの微生物回収技術への適用も考えられる。これらの技術との組み合わせた微生物生態解析への応用研究はまだ行われていないが、その可能性は十分に秘めていると思われる。今後はそれらへの適用のための技術的課題をクリアしていき、本手法の機能遺伝子検出技術としての可能性を広げていくことが重要であると考えている。

謝 辞

本研究は、科学研究費補助金、環境省環境研究総合推進費 (S2-03)、(財)クリタ水・環境科学振興財団から研究費補助を受けた。ここに記して感謝いたします。

文 献

- Amann, R. and B.M. Fuchs. 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 339–348.
- Amann, R.I., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- Ashkin, A. and J.M. Dziejic. 1987. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science.* 235: 1517–1520.
- Ben-Dov, E., A. Brenner, and A. Kushmaro. 2007. Quantification of sulfate-reducing bacteria in industrial wastewater, by real-time polymerase chain reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* genes. *Microb. Ecol.* 54: 439–451.
- Chen, A.C., K. Ueda, Y. Sekiguchi, A. Ohashi, and H. Harada. 2003. Molecular detection and direct enumeration of methanogenic Archaea and methanotrophic Bacteria in domestic solid waste landfill soils. *Biotechnol. Lett.* 25: 1563–1569.
- Davey, H.M. and D.B. Kell. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60: 641–696.
- DeLong, E.F., G.S. Wickham, and N.R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science.* 243: 1360–1363.
- Friedrich, M.W. 2002. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J. Bacteriol.* 184: 278–289.
- Frohlich, J. and H. Konig. 2000. New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 567–572.
- Furukawa, K., T. Hoshino, S. Tsuneda, and Y. Inamori. 2006. Comprehensive Analysis of Cell Wall-Permeabilizing Conditions for Highly Sensitive Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Microbes Environ.* 21: 227–234.
- Hodson, R.E., W.A. Dustman, R.P. Garg, and M.A. Moran. 1995. *In situ* PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4074–4082.
- Hoshino, T. and A. Schramm. 2010. Detection of denitrification genes by *in situ* rolling circle amplification-fluorescence *in situ* hybridization to link metabolic potential with identity inside bacterial cells. *Environ. Microbiol.* 12: 2508–2517.
- Ishii, K., M. Mussmann, B.J. MacGregor, and R. Amann. 2004. An improved fluorescence *in situ* hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50: 203–213.
- Kawakami, S., K. Kubota, H. Imachi, T. Yamaguchi, H. Harada, and A. Ohashi. 2010. Detection of Single Copy Genes by Two-Pass Tyramide Signal Amplification Fluorescence *in situ* Hybridization (Two-Pass TSA-FISH) with Single Oligonucleotide Probes. *Microbes Environ.* 25: 15–21.
- Kenzaka, T., S. Tamaki, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. 2005. Recognition of individual genes in diverse microorganisms by cycling primed *in situ* amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7236–7244.
- Kubota, K., H. Imachi, S. Kawakami, K. Nakamura, H. Harada, and A. Ohashi. 2008. Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J. Microbiol. Methods.* 72: 54–59.
- Kubota, K., A. Ohashi, H. Imachi, and H. Harada. 2006. Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence *in situ* hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH). *J. Microbiol. Methods.* 66: 521–528.
- Lasken, R.S. 2007. Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 510–516.
- Lee, N., P.H. Nielsen, K.H. Andreasen, S. Juretschko, J.L. Nielsen, K.H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1289–1297.
- Li, T., T.D. Wu, L. Mazeas, L. Toffin, J.L. Guerquin-Kern, G. Leblon, and T. Bouchez. 2008. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environ. Microbiol.* 10: 580–588.
- Maruyama, F., T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. 2003. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by *in situ* loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5023–5028.
- Maruyama, F., T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. 2005. Visualization and enumeration of bacteria carrying a specific gene sequence by *in situ* rolling circle amplification.

- Appl. Environ. Microbiol. 71: 7933–7940.
- 23) Moraru, C., P. Lam, B.M. Fuchs, M.M. Kuypers, and R. Amann. 2010. GeneFISH—an *in situ* technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environ Microbiol.* doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02281.x.
 - 24) Orphan, V.J., C.H. House, K.U. Hinrichs, K.D. McKeegan, and E.F. DeLong. 2001. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*. 293: 484–487.
 - 25) Ouverney, C.C. and J.A. Fuhrman. 1999. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types *in situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1746–1752.
 - 26) Pernthaler, A. and R. Amann. 2004. Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5426–5433.
 - 27) Pernthaler, A., A.E. Dekas, C.T. Brown, S.K. Goffredi, T. Embaye, and V.J. Orphan. 2008. Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105: 7052–7057.
 - 28) Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann. 2002. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3094–3101.
 - 29) Pernthaler, A., J. Pernthaler, M. Schattner, and R. Amann. 2002. Identification of DNA-synthesizing bacterial cells in coastal North Sea plankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5728–5736.
 - 30) Pratscher, J., C. Stichternoth, K. Fichtl, K.H. Schleifer, and G. Braker. 2009. Application of recognition of individual genes—fluorescence *in situ* hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (*nirK*) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 802–810.
 - 31) Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, S. Juretschko, M.C. Schmid, H.P. Koops, and M. Wagner. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5368–5382.
 - 32) Schonhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko, and R. Amann. 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3268–3273.
 - 33) Schonhuber, W., G. Le Bourhis, J. Tremblay, R. Amann, and S. Kulakauskas. 2001. Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. *BMC Microbiol.* 1: 20.
 - 34) Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, and R. Amann. 2003. An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2928–2935.
 - 35) Steinberg, L.M. and J.M. Regan. 2008. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 6663–6671.
 - 36) Tijssen, P. 1993. Hybridization with nucleic acid probes. In P. C. van der VLIET (ed.), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. North-Holland Pub. Co., Amsterdam, Netherlands.
 - 37) Wagner, M., M. Schmid, S. Juretschko, K.H. Trebesius, A. Bubert, W. Goebel, and K.H. Schleifer. 1998. *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160: 159–168.
 - 38) Zwirgmaier, K., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 2004. Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence *in situ* hybridization—RING-FISH. *Mol. Microbiol.* 51: 89–96.
 - 39) 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 原田秀樹, 大橋晶良. 2006. Two-pass TSA-FISH 法によるメタン生成古細菌の *mcr* 遺伝子の検出. *環境工学研究論文集*. 43: 143–148.
 - 40) 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹. 2009. 機能遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法による環境中未培養微生物の機能推定. *環境工学研究論文集*. 46: 537–543.