

長岡技術科学大学

博士論文

酵素反応を用いない蛍光増幅法 (hybridization chain reaction 法)

による微生物の視覚的検出技術の開発と環境微生物への適用

山口 剛士

2015年2月

主査：	長岡技術科学大学	山口 隆司 教授
副査：	長岡技術科学大学	小笠原 渉 准教授
	長岡技術科学大学	姫野 修司 准教授
	東北大学	久保田 健吾 准教授
	産業技術総合研究所	玉木 秀幸 主任研究員

## 目次

第1章 序論.....	1
1.1 研究背景及び目的.....	2
1.2 本論文の構成.....	4
第2章 既往の研究.....	8
2.1 FISH法の登場.....	9
2.2 FISH法の問題点.....	9
2.3 高感度FISH法の登場.....	11
2.4 微生物のrRNAを標的とした高感度FISH法.....	13
2.5 微生物のmRNAを標的とした高感度FISH法.....	14
2.6 FISH法を用いた多重染色方法.....	17
2.7 高感度FISH法の問題点.....	18
2.8 HCR法に関する基礎的知見.....	20
第3章 微生物のrRNAを標的としたin situ DNA-HCR法の開発及び特長.....	33
3.1 はじめに.....	34
3.2 実験方法.....	35
3.3 実験結果及び考察.....	38
3.4 本手法の特長と位置づけ.....	43
第4章 rRNAを標的としたin situ DNA-HCR法による環境微生物の検出.....	47
4.1 はじめに.....	48
4.2 実験方法.....	49
4.3 実験結果及び考察.....	52
4.4 まとめ.....	55
4.5 今後の展望.....	56
第5章 微生物のmRNAを標的としたin situ dual DNA-HCR法の 開発及び特長.....	59
5.1 はじめに.....	60
5.2 実験方法.....	61
5.3 実験結果及び考察.....	66
5.4 まとめ.....	71

第 6 章 In situ dual DNA-HCR 法による環境微生物中の mRNA の検出 .....	74
6.1 はじめに.....	75
6.2 実験方法.....	76
6.3 実験結果及び考察 .....	80
6.4 まとめ .....	84
第 7 章 総括.....	87
7.1 本研究で行ったこと .....	88
7.2 本研究に位置づけ .....	89

## 付録

プロトコル

熱力学による in situ DNA-HCR 法のプローブの交雑効率の算出方法

本論文の基礎となる学術論文

謝辞

## Abbreviations

ATCC	American Type Culture Collection
ANME	Anaerobic methanotrophic
ANAMMOX	Anaerobic ammonia oxidation
bp	Base pairs
BTEX	Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene
CLASI	Combinatorial Labeling And Spectral Imaging
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CARD	Catalyzed reporter deposition
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIG	Digoxigenin
DNP	Dinitrophenol
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DOPE	Double labeling of oligonucleotide probes
e.g.	Exempli Gratia
et. al.	et alii
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
°C	Degree celsius
GFP	Green Fluorescent Protein
HRP	Horseradish peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
JCM	Japan Collection of Microorganisms
KCl	Potassium chloride
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potassium dihydrogenphosphate
LNA	Locked Nucleic Acid
L	litter

LB	Lysogeny Broth
m	milli ( $10^{-3}$ )
min	Minutes
mRNA	messenger RNA
M	molar
MAR	Microautoradiography
MQ	MilliQ
NaCl	Sodium chloride
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Sodium phosphate dibasic
O.D.	Optical Density
OTU	Operational Taxonomic Unit
PNA	Peptide Nucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potential hydrogen
p	Pico
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
RING-FISH	Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization
sec	Second
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
SDS	sodium dodecyl sulfate
S/N	Signal / Noise
TSA	Tyramide signal amplification
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate
TOM	Toluene Ortho-Monooxygenase
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethane
$T_m$	Melting Temperature
$\mu$	Micro
n	Nano

# 第 1 章

## 序論

## 第1章 序論

## 1.1 研究背景及び目的

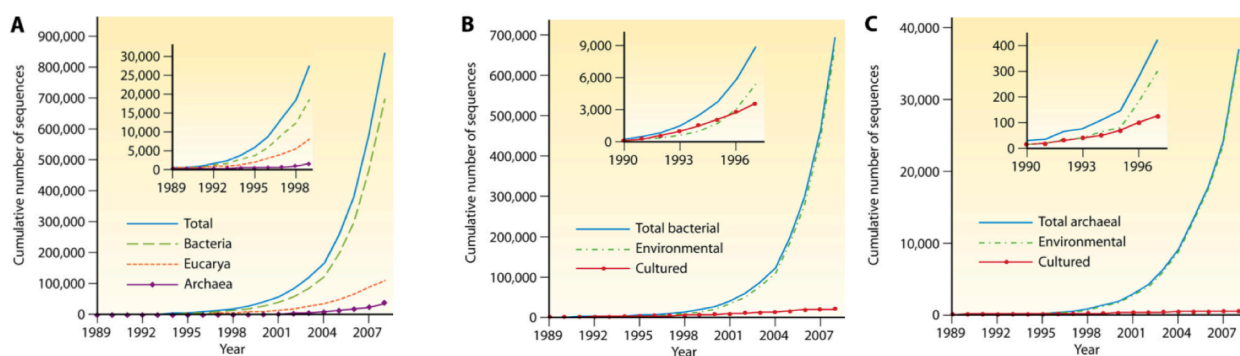
微生物学とは、普通肉眼ではその存在を認識することが困難な微小な生物を扱う学問である。従って、微生物の観察には微小な生物を観察するための顕微鏡が必須である。現在、地球上に生息する微生物の総数は約  $5 \times 10^{30}$  オーダーと見積もられており、地球上に生息する人間の総数 ( $6 \times 10^9$ ) と比較しても膨大な微生物が地球に生息していることが知られている (Table 1-1, Kyrpides, 2009)。それら微生物は地球規模での物質循環を担っているだけでなく、水処理技術や土壌環境改善等に利用され、現在の環境工学において重要な存在である。しかしながら、微生物は、微小の生物であり形態学的にも判別が困難な生物であるため、系統学的分類を考慮する上で大きな問題を抱えていた。

このような問題に対して Woese らは、微生物の分類を形態学的方法ではなく、微生物固有の rRNA アプローチにより微生物を識別する方法を報告した (Woese and Fox, 1977)。rRNA アプローチは、微生物固有の核酸 (DNA, RNA) である rRNA 遺伝子を標的とし、微生物固有の塩基配列の違いにより (原核生物 : 16S rRNA 遺伝子、真核生物 : 18S rRNA 遺伝子)、微生物を系統学的違いから解析を行う方法である。SSU 遺伝子に基づく系統学的分類は、地球上では3つの Domain (真核生物, 細菌, 古細菌) が存在していることが 1980 年に Fox らによって報告された (Fox *et al.*, 1980)。rRNA アプローチの普及により、培養を介さずとも微生物を同定することが可能となった。その一方で、微生物を単離できる微生物は全体の 1-3% にすぎないと言われている (kyrpides, 2009)。それは、共生関係が必要な微生物や、高温や高圧といった極限環境で生息している微生物も多く存在するため、生理学的特徴が未知である新規の微生物を分離することが困難であると考えられる。現在においても、*in situ cultivation* を目指し、Hallow-filer membrane chamber 法や Functional single dell isolation 法等の新たな培養方法も報告されているが (Aoi *et al.*, 2009; Ashida *et al.*, 2010)、ブレイクスルーがない限り多くの新規の微生物を分離することは困難と言える。そのような中、近年では、その生理学的特徴を分離培養を介さず次世代シーケンサーを用いることで、微生物のゲノム情報は莫大に増えつつある (Fig. 1-1, Pace, 2009)。さらに、シングルセルジェノミクス解析によって明らかにするプロジェクトも増え、現在では年間 500 本程

Table 1-1. Estimating the magnitude of microbial diversity

Number of bacteriophages on Earth	$10^{31}$
Number of microbes on Earth	$5 \times 10^{30}$
Number of stars in the universe	$7 \times 10^{21}$
Number of microbes in all humans	$6 \times 10^{23}$
Number of humans	$6 \times 10^9$
Number of microbial cells in one human gut	$10^{14}$
Number of human cells in one human	$10^{13}$
Number of microbial genes in one human gut	$3 \times 10^6$
Number of genes in the human genome	$2.5 \times 10^4$
Combined length of all bacteriophages on Earth	$10^8$ Ly
Diameter of the Milky Way	$10^5$ Ly

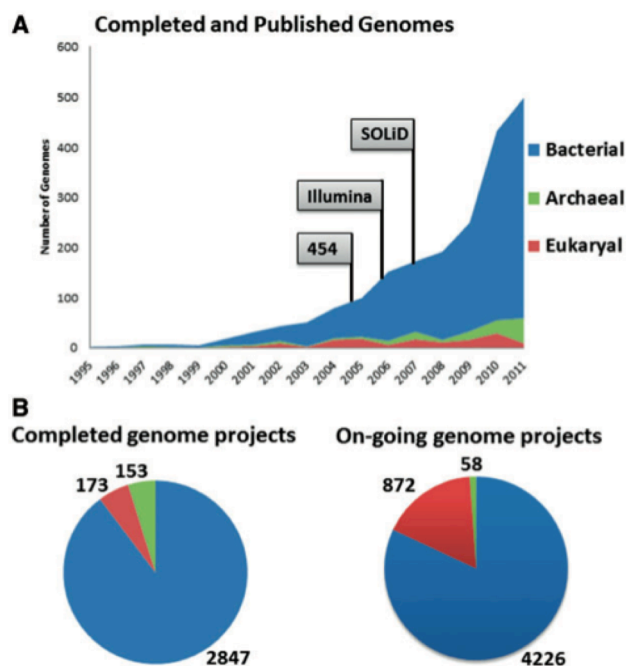
(Refer to Kyrpides, 2009)



**Fig. 1-1.** Cumulative number of sequence. (A) Total sequence. (B) Number of bacteria rRNA sequence (C) Number of Archaea rRNA sequence (Refer to Pace, 2009)

度の論文が報告されている (**Fig. 1-2**, Forde, 2013, Rinke *et al.*, 2013)。この方法により、培養を介さずシングルセルの全ゲノムを把握できるようになり、代謝経路が推定できるようになった。しかしながら、DNA や RNA を抽出する方法では、実際の環境において「何が」「どこで」「どのように」働いているかといった *in situ* における微生物の空間分布や形状等の情報を把握することが困難である。

環境中に生息している微生物を培養を介さず視覚的に標的微生物のみを検出できる方法として FISH 法がある。FISH 法は、1989 年に DeLong らによって初めて報告された (DeLong *et al.*, 1989)。また、1991 年には Amann らによって環境微生物に対して初めて FISH 法が適用され、環境微生物を培養することなく原位置で微生物生態を把握する手法として現在においても重要なツールとなっている (Amann *et al.*, 1991; Amann and Fuchs, 2008)。しかしながら、FISH 法は、得られる蛍光強度が rRNA 含有量に依存するため、rRNA 含有量が少ない微生物の検出が困難であることが知られている (Amann *et al.*, 1995)。特に、極限環境や貧栄養環境中に生息している微生物は成長速度が遅く、菌体内の rRNA 含有量が少



**Fig. 1-2.** Published genomes. (A) Published genome sequences for the three domains of life as of April 2012. (B) Distribution of completed and on-going genome projects amongst the three domains. (Refer to Forde, 2013)



なく FISH 法による検出が困難である。現在では、蛍光強度が FISH 法よりも強い高感度 FISH 法を用いてそれら微生物を検出している。例えば、Pernthaler らは海洋微生物に対して高感度 FISH 法を適応し FISH 法と比較して約 2 倍の検出率を示した報告もある (Pernthaler *et al.*, 2002)。この結果は、FISH 法では見落とされていた微生物がその環境中には存在していたことを示唆している。高感度 FISH 法が報告されてから約 20 年が経過し、今日においては、微生物の rRNA を標的とした同定方法として適用されているだけでなく微生物の機能を明らかにすることが可能な機能遺伝子や mRNA を視覚的に検出する技術としても適用されている。しかしながら、これまで報告されている高感度 FISH 法は、蛍光物質と比較して約 40 倍の大きさを有する酵素を用いるため細胞浸透性を向上させる細胞壁処理が必要であり、標的微生物により最適化が必要である。また、その細胞壁処理の最適な範囲は非常に狭く、菌体の溶菌や細胞壁処理の効果が弱い微生物の存在も報告されている。(Furukawa *et al.*, 2006; Schippers *et al.*, 2005; Kubota 2013)。従って、高感度 FISH 法の問題であるプローブの細胞浸透性を解決することは、視覚的検出技術において重要な項目である。そこで、本研究では、分子量が大きい酵素を用いない遺伝子検出技術である hybridization chain reaction (HCR) 法に着目し (Dicks *et al.*, 2004)、プローブの細胞浸透性が高い高感度 FISH 法を開発することを目的とした。また、本手法の適用可能性を評価するために、rRNA を標的とした本手法を貧栄養環境下に生息する微生物を適用させた。さらに、本手法の更なる高感度化を行い、系統解析では微生物の機能を把握できない微生物の mRNA の視覚的検出を試みた。

## 1.2 本論文の構成

本論文は、下記の全 7 章で構成されている。Fig. 1-3 に本論文構成の概要図を示す。

### 第 1 章 序論

本章では、研究背景及び研究目的、本論文の構成を記載した。

### 第 2 章 既往の研究

第 2 章では、FISH 法、高感度 FISH 法の既往の研究及び課題及び本論文で使用した HCR 法の既往の研究を記載した。

### 第 3 章 微生物の rRNA を標的とした in situ DNA-HCR 法の開発及び特長

第 3 章では、微生物の rRNA を標的とした in situ DNA-CHR 法の開発を目指し、本手法の蛍光強度、プローブの特異性及びプローブの細胞透過性を評価した。

#### 第4章 rRNA を標的とした in situ DNA-HCR 法による環境微生物の検出

第4章では、第3章で開発を行った in situ DNA-HCR 法を用いて環境微生物（海洋性細菌、嫌気性グラニュール汚泥内及び嫌気性消化汚泥内のアーキア）の検出を行った。さらに、in situ DNA-HCR 法を用いた環境微生物の多重染色を行った。

#### 第5章 微生物の mRNA を標的とした in situ dual DNA-HCR 法の開発及び特長

第5章では、微生物の機能を明らかにすることが可能な mRNA を標的とした in situ dual DNA-HCR 法の開発を目指し、本手法の蛍光強度、プローブの特異性を評価した。

#### 第6章 In situ dual DNA-HCR 法による環境微生物中の mRNA の検出

第6章では、第5章で開発を行った技術を適用するための標的微生物の選定及びその技術を用いて環境微生物中の標的微生物の mRNA の検出を試みた。

#### 第7章 総括

第7章では、本論文の総括として得られた知見をまとめ、本研究で開発した手法の位置づけや今後の展開について論じた。

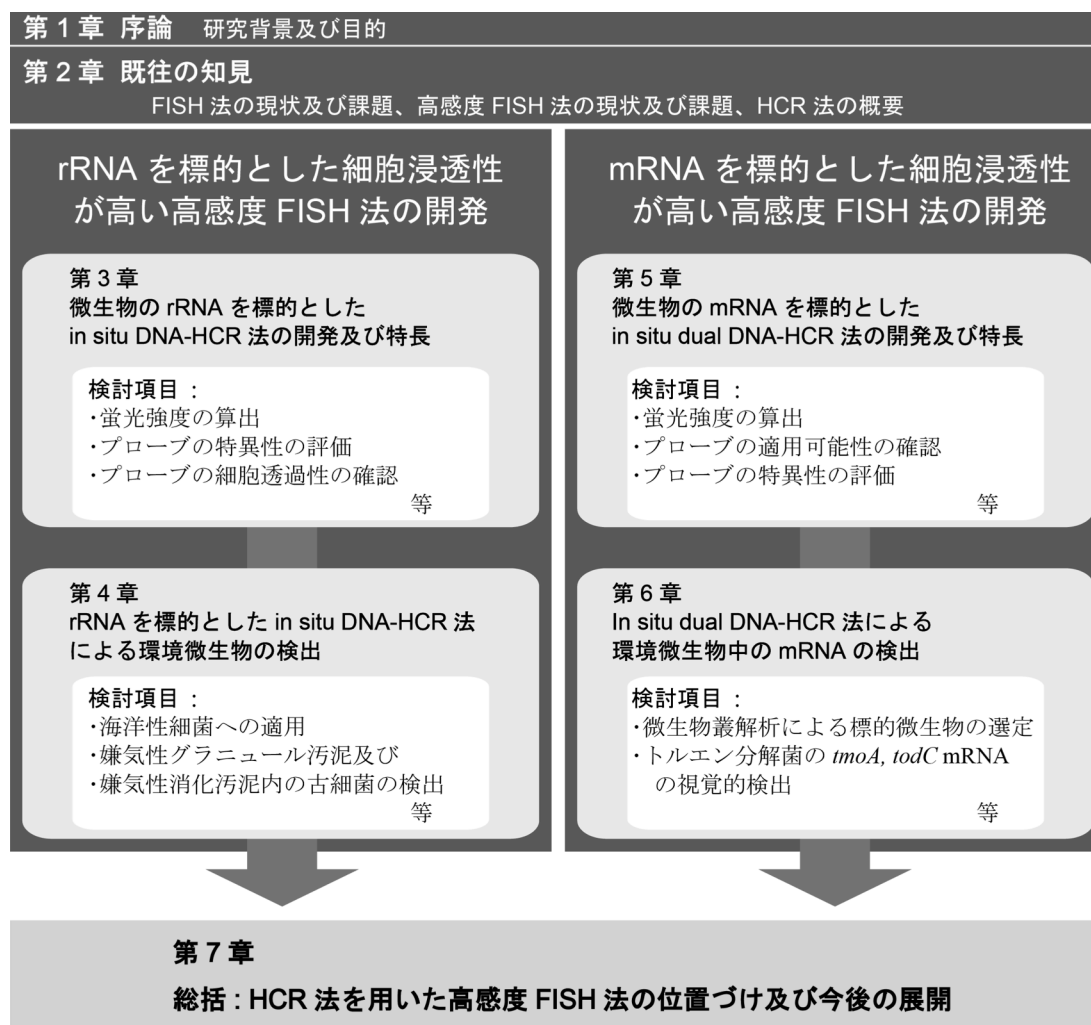


Fig. 1-3 Schematic diagram of the object for research and constitution in this thesis

## 参考文献

- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology. Review* **59**(1), 143-169.
- Amann, R. I. and Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews* **6**, 339-348.
- Amann, R. I., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H. D. and Schleifer, K. H. (1991). Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**, 161-164.
- Aoi, Y., Kinoshita, T., Hata, T., Dhta, H., Obokata, H. and Tsuneda, S. (2009). Hollow-fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation, *Applied and Environmental Microbiology* **75**(11), 3826-3833.
- Ashida, N., Shii, S., Hayano, S., Tago, K., Tsuji, T., Yoshimura, Y., Otsuka, S. and Senoo, K.

- 
- (2010). Isolation of functional single cells from environments using a micromanipulator: application to study denitrifying bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 1211-1217.
- Delong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R.** (1989) Phylogenetic stains : Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Signal Cells. *Science* **243**, 1360-1363.
- Dirks, R. M., and Pierce, N. A.** (2004). Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proceeding of the National Academy of Science* **101**, 15275-15278.
- Forde, B. M. and O'Toole, P. W.** (2013). Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. *Briefings in Functional Genomics* **12**, 440-453.
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S, Balch, W. E., Tanner, R. S. and Magrum. L. J.** (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science* **209**, 457-463.
- Furukawa, K., Hoshino, T., Tsuneda, A. and Inagaki, Y.** (2006) Comprehensive Analysis of Cell Wall-Permeabilizing Conditions for Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization. *Microbe and Environments* **21**, 225-234.
- Kubota, K.** (2013) CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications. *Microbe and Environment* **28**, 3-12.
- Kyrpides, N. C.** (2009) Fifteen years of microbial genomics : meeting the challenges and fulfilling the dream. *Nature biotechnology* **27**, 627-632.
- Pace, N. R.** (2009) Mapping the Tree of Life: Progress and Prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**, 565-576.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. I.** (2002) Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporer Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3094-3101.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A. and Ivanova, N. N.** (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**, 431-437.
- Schippers, A., Neretin, L. N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T. G., Cragg, B. A., Parkes, R. J. and Jørgensen B. B.** (2005) Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature* **433**, 861-864.
- Woese, C. R. and Fox, G. E.** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceeding of the National Academy of Science* **74**, 5088-5090.
-

## 第 2 章

### 既往の知見

## 第2章 既往の知見

### 2.1 FISH 法の登場

FISH法は、1989年にDeLongらによって初めて微生物に対して適用された (DeLong *et al.*, 1989)。現在において *in situ* かつ *whole-cell* で検出が可能である FISH 法は、近年の分子学的手法の代表的かつ重要な手法となっている (Amann and Fuchs 2008)。DeLnog らの報告以来、1塩基ミスマッチの検討や環境サンプルの適応、Flow-cytometry への適応が報告された (Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1991)。さらに、1991年には Amann らによって環境サンプル中から得られた DNA 情報からオリゴヌクレオチドプローブを作成し、未培養微生物に対して FISH 法を適応した報告がされた (Amann *et al.*, 1991)。この報告により、rRNA アプローチを用いて未培養微生物をも視覚的に検出する Full cycle rRNA approach が一つの円となった (Fig. 2-1, Hugenholtz *et al.*, 2002; Thiele *et al.*, 2011)。近年では、標的微生物のシングルセルジェノミクス解析のための特異的検出 (Lasken, 2007) や微生物代謝を推定することが可能な MAR-FISH 法 (Okabe, 2004) や Raman-FISH 法 (Huang *et al.*, 2007) や nano-SIMS を用いた FISH 法 (Orphan *et al.*, 2009; Kubota *et al.*, 2013) が報告されており、微生物を *in situ* かつ *whole-cell* で視覚的に検出することの重要性が今も広く認識されている。

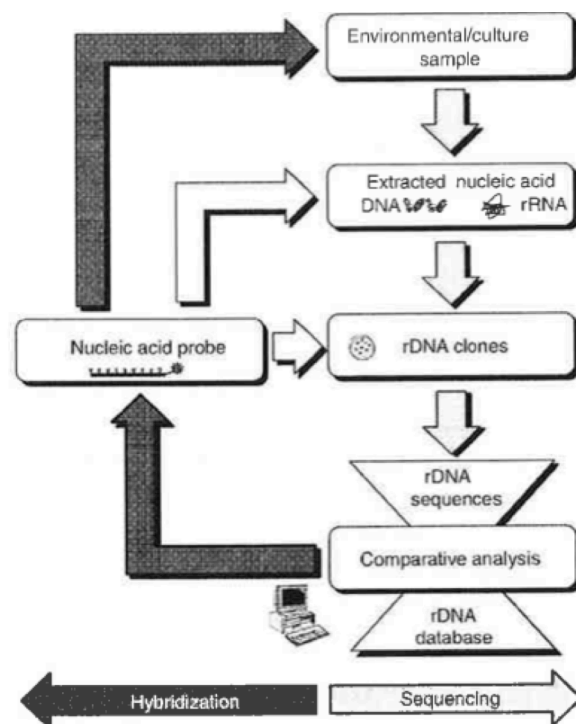


Fig.2-1 Flow scheme of the full-cycle rRNA approach. (Refer to Thiele *et al.*, 2011)

### 2.2 FISH 法の問題

#### 2.2.1 蛍光強度

FISH 法における問題はいくつか報告されている。その中でも一番大きな問題は、FISH 法で得られる蛍光強度の問題である。FISH 法の蛍光強度は、菌体内の rRNA 含有量に依存することが知られている。従って、FISH 法で得られる蛍光強度は、交雑する rRNA の数が少なければ少ないほど低下する。FISH 法が微生物に初めて適応された DeLong らの報告においてもすでにこの問題が懸念されていた (DeLong *et al.*, 1989)。また、菌体内の rRNA 含有量は、微生物の成長速度が関係していることが知られている (Kemp *et al.*, 1993; Wallner *et al.*, 1993)。Kramer らは *Vibrio spp.* に対し 15 日間飢餓状態にすると *in situ hybridization* で得られる蛍光強度の 10-26%程度しか rRNA を保持していなかったと報告している (Kramer *et al.*, 1992)。このことは、成長速度が遅い環境微生物は、FISH 法による検出が困難である

ことを示している。そのような微生物は、海洋中や深海底、土壌中や湖沼や地下水中等の貧栄養環境下に存在していることが知られている。そのような微生物を視覚的に検出するために、高感度 FISH 法が報告されている (2.3 参照)。

### 2.2.2 プローブの交雑効率

FISH 法が報告されて以来、遺伝子解析から得られた配列情報をもとにプローブ設計を行うことが出来る *arb software* が報告され (Ludwig *et al.*, 2004)、我々は容易に未培養微生物を標的としたプローブを設計できるようになった。プローブと rRNA との交雑効率は、新たにプローブ設計を行う際に重要である。プローブと標的部位との交雑効率が低い場合、微生物の検出がしばしば困難になることが報告されている。rRNA は、RNA と RNA の交雑、RNA とタンパク質の交雑による高次構造を有しており、プローブのアクセスが困難な場合がある (Woese *et al.*, 1990; Ban *et al.*, 1999; Clemon *et al.*, 1999)。この問題に対して、Fuchs らは *Escherichia coli* を用いて 16S rRNA、23S rRNA への交雑効率について 200 以上のオリゴヌクレオチドプローブ (18-25 bp) を用いて解析を行った (Fuchs *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 1998)。結果、rRNA の中で一番蛍光強度が強い場所を 100%とした場合、61%以上の輝度を有しているのは 16S rRNA でたった 18%、23S rRNA においても 24%であった。さらに、41%以上の輝度は、16S rRNA で 39%、23S rRNA で 59%にすぎなかった。さらに、16S rRNA を標的としたプローブで輝度が得られなかった場所の 1/3 は、rRNA がループを含む 2 次構造部位を有している場所であったと報告している (Fuchs *et al.*, 1998)。また、パラホルムアルデヒド固定時に懸念されていたプローブとの接触率は、SDS 等の強力な変性剤を加えることで無視できることや、標的の高次構造が 3 次構造よりも 2 次構造の方が交雑高率に与える影響が大きいという報告がされている (Behrens *et al.*, 2003)。これらの結果を元に Yilmaz らは、1. プローブの高次構造、2. 標的部位の高次構造、3. プローブと標的部位とのハイブリットの 3 つからなるモデルを提案し、この 3 つから得られる  $\Delta G^0_{\text{overall}}$  をプローブと標的部位との親和性と定義し、この値が -13 kcal/mol 以下になるようにプローブを設計することで、プローブと標的部位との交雑効率の問題を克服した (Yilmaz *et al.*, 2004)。そして、このモデルに従いプローブを設計することで 16S rRNA のいずれの場所から中程度もしくは強い蛍光を得ることに成功している (Yilmaz *et al.*, 2006)。近年では、この親和性を web 上 (<http://mathfish.cee.wisc.edu/>) で算出する mathFISH も報告もされ、我々は容易にプローブの適用可能性について評価できるようになった (Yilmaz *et al.*, 2011)。しかしながら、塩基配列の問題から親和性の高いプローブを設計することが困難な場合や同時に 2 つ以上のプローブを設計する際には適用が困難な場合がある。

それらのプローブの親和性を向上される方法として、ヘルパープローブを用いる方法が提案されている (Fuchs *et al.*, 2000)。この方法は、標的部位近辺に対してヘルパープローブを設計し、蛍光標識プローブと同時に交雑させることで標的部位の二次構造をヘルパープ

ローブで解離させ、蛍光標識プローブの交雑効率を向上させる。その他、プローブの交雑効率を向上させる方法として LNA や PNA の人工核酸を用いたプローブが報告されている (Almeida *et al.*, 2010; Cerqueira *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011; Kubota *et al.*, 2006)。LNA 及び PNA の概略図を Fig. 2-2 に示す。LNA は、1998 年に Wengel と Imanishi らによって初めて報告された (Singh *et al.*, 1998)。LNA は、リボース環の 2' と酸素の 4' の炭素がメチレンを介して連結していることから 3'-コンフォメーションの状態でロックしている。それにより、オリゴヌクレオチドの 1 塩基を LNA に置換するだけで LNA-DNA ハイブリットで 1-8°C、LNA-RNA ハイブリットで 2-10°C の Tm の上昇が確認されている (Albeak *et al.*, 2006)。LNA を挿入したオリゴヌクレオチドプローブを用いることで Fuchs らによって報告された蛍光強度が低いとされていた標的部位に対して適用した結果、蛍光強度を飛躍的に増幅させた報告もある (Kubota *et al.*, 2006)。この結果は、DNA プローブの設計を柔軟にさせるものだと言える。一方、PNA はバックボーンにペプチドを使用することで電気的な負荷を持たない人工プローブである。また、その結合力は低塩濃度下の方が強くなる (Tomac *et al.*, 1996)。この性質を用いて、低塩濃度下で交雑させ、標的 RNA の 2 次構造の結束力を低下させることで交雑効率の低い標的部位との交雑を可能にしている (Lehtola *et al.*, 2005; Perry-O'eefe *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011)。

### 2.3 高感度 FISH 法の登場

FISH 法は、環境微生物を *in situ* かつ whole-cell で視覚的に検出することが出来る手法である。しかしながら、2.2.1 で紹介したように、FISH 法は低 rRNA 含有量の微生物の検出が困難である。そんな中、1997 年に高感度 FISH 法として CARD-FISH 法 (もしくは TSA-FISH

#### Box 1 | Increasing probe affinity by nucleic acid modification

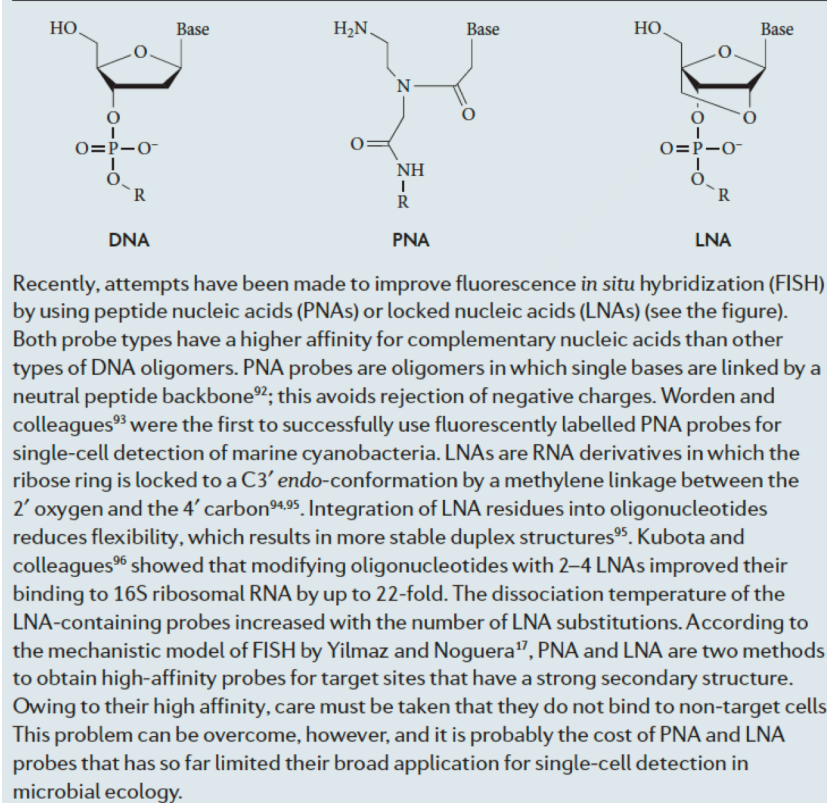


Fig. 2-2 Structures of DNA, PNA and LNA

(Refer to Amann and Fuchs, 2008)



法とも呼ばれている) が Schönhuber ら (Schönhuber *et al.*, 1997) と Lebaron (Lebaron *et al.*, 1997) らによって同時に報告された。CARD-FISH 法は、HRP を標識させたオリゴヌクレオチドプローブ及び蛍光標識した tyramide を用いて、HRP の触媒反応により蛍光強度を増幅させる手法である。CARD-FISH 法の概要を Fig. 2-3 に示す。プローブに標識した HRP は、過酸化水素存在下において酸化作用を示し水酸化ラジカルが生じる。その水酸化ラジカルは、チラミド分子の水酸基 (-OH) から水素を得て安定する一方、水素を失ったチラミド分子がラジカル化する。そしてラジカル化したチラミド分子が近傍の芳香族分子と共有結合する。この反応は 3-10 分間という短時間でほぼ終了し HRP の近傍に多数のチラミドが沈着する。この反応を活性化するためには過酸化窒素が必要である (Veitch, 2004)。チラミドにはビオチン、ジゴキシゲニンとジニトロフェニルなどのハプテンの他に FITC, TRITC, Cy3, Cy5 等の蛍光標識も可能ある (Hopman *et al.*, 1998)。

CARD-FISH 法が報告された当時の FISH 法との蛍光強度の違いは、Lebaron

(Lebaron *et al.*, 1997) らの報告によると TRITC 標識プローブと tyramide-FITC とで 7-12 倍の輝度の増加が得られ、Schönhuber らの報告によると FITC 標識プローブと tyramide-FITC とで 10-20 倍の輝度の増加を確認している (Schönhuber *et al.*, 1997)。現在では、プロトコールの改善により蛍光標識したチラミドを用いる CARD-FISH 法は、蛍光標識したプローブを用いる FISH 法と比較して 26-41 倍の蛍光強度を達成した報告もある (Hoshino *et al.*, 2008)。例えば、Pernthaler らは海洋プランクトンに対し高感度 FISH 法を適応することで検出率が FISH 法で得られる検出率と比較して飛躍的に向上したと報告している (Pernthaler *et al.*, 2002)。この結果はその環境中には多くの微生物が存在し地球上における物質循環に関与しているにもかかわらず、FISH 法ではそれら微生物を検出出来ず見落としていたこと

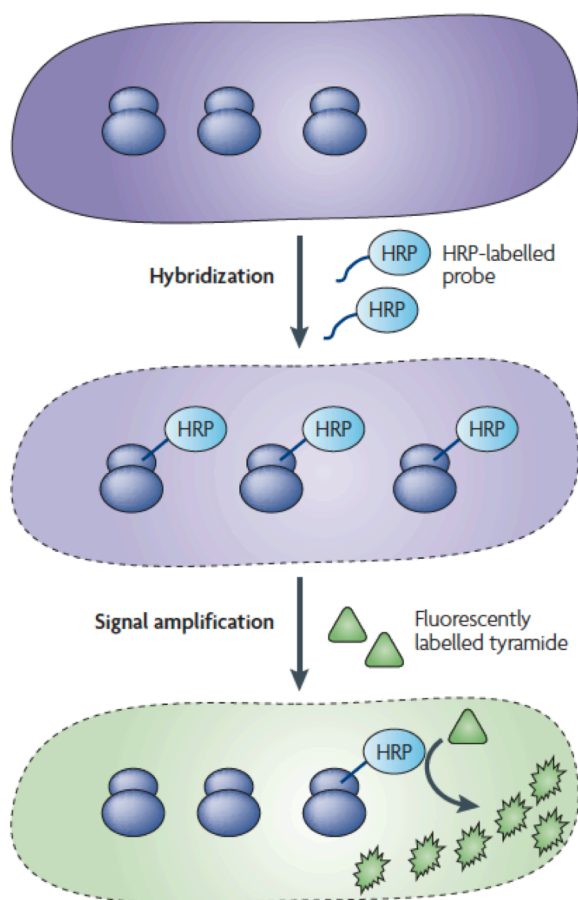


Figure 2 | The principle of CARD-FISH (catalysed reported deposition-fluorescence in situ hybridization). CARD-FISH combines CARD of fluorescently labelled tyramides with single-cell identification by FISH. The hybridization involves a single oligonucleotide that is covalently crosslinked to a horseradish peroxidase (HRP) label. Amplification of the signal relative to that achieved with probes that are labelled with a single fluorochrome is based on the radicalization of multiple tyramide molecules by a single horseradish peroxidase.

Fig. 2-3 Principle of CARD -FISH.  
(Refer to Amann and Fuchs, 2008)

を示している。

また、高感度 FISH 法は、低 rRNA 含有微生物の rRNA の検出のみに適用されるのではなく、微生物の機能を明らかにすることができる機能遺伝子 (Kawakami *et al.*, 2010; Kawakami *et al.*, 2011; Morau *et al.*, 2010; Zwirgmaier *et al.*, 2003; Lenk *et al.*, 2012, etc) やその転写物である mRNA (Kubota *et al.*, 2006; Pernthaler *et al.*, 2004; Pernthaler *et al.*, 2009; Bakermans and Madsen, 2002; Kofoed *et al.*, 2012, etc) の検出を行った報告もされている。従って、今日において CARD-FISH 法は、高感度 FISH 法の中でも一番報告数が多く様々な研究で用いられている代表的な高感度 FISH 法といえる。

## 2.4 微生物の rRNA を標的とした高感度 FISH 法

### 2.4.1 酵素反応を用いた高感度 FISH 法 (TSA-FISH 法, CARD-FISH 法)

低 rRNA 含有量の微生物を標的とした CARD-FISH 法は、主に貧栄養環境下に生息している微生物に適用されている。例えば、海洋 (Pernthaler *et al.*, 2002)、地下水 (Wilhartiz *et al.*, 2007)、バイオフィーム (Shiraishi *et al.*, 2008)、湖沼 (Jobard *et al.*, 2010)、深海 (Schreiber *et al.*, 2010) 等である。これは、CARD-FISH 法で得られる蛍光強度が、rRNA 含有量に直接関与せず、低 rRNA 含有量であっても強い蛍光強度を達成できるからである。例えば、貧栄養環境下である海洋中に生息している海洋プランクトンに CARD-FISH 法を適用させるとほぼすべての微生物 (85-100%) を検出することができるが、FISH 法を適用させると 19-66% の検出率にとどまることが知られている。このような結果は、淡水中に微生物や深海の堆積物でも同様の結果が報告されている (Herndl *et al.*, 2005; Sekar *et al.*, 2004)。一方で、CARD-FISH 法の検出率は、海洋中に生息している ANAMMOX 細菌や *Planctomycetes*、活性汚泥中の微生物や嫌気性グラニュール汚泥中のメタン菌等では FISH 法の検出率を下回ったと報告されている (Woebken *et al.*, 2007; Kubota *et al.*, 2008; Pizzetti *et al.*, 2011)。この結果は、後述する高感度 FISH 法の問題点である CARD-FISH 法に用いるプローブの細胞浸透性の低さに起因していると考えられる。

その他、CARD-FISH 法に用いるチラミドには、蛍光標識のみならず、ヨウ素やフッ素等のハロゲンを標識することも可能であり、nano-SIMS 及びフッ素を標識したチラミドを用いることで S/N 比が最大 180 倍になり飛躍的に向上したという報告もある (Behrens *et al.*, 2008)。さらに、チラミドにビオチンを標識し、抗原抗体反応によりマグネットを間接的に菌体に固着させ、微生物回収を行う方法も報告されている (Pernthaler *et al.*, 2008)。

### 2.4.2 マルチラベルドプローブを用いた方法

(DOPE-FISH 法, Click chemistry を使った FISH 法, ポリヌクレオチドプローブを用いた FISH 法)

上述した CARD-FISH 法以外に微生物の rRNA を標的とした高感度 FISH 法として

DOPE-FISH 法、click chemistry を用いた FISH 法及びポリヌクレオチドプローブを用いた FISH 法が報告されている。

DOPE-FISH 法は、オリゴヌクレオチドプローブの 3'末端及び 5'末端に蛍光標識を行う FISH 法である (Stoecker *et al.*, 2010)。この方法により、通常の FISH 法の蛍光強度よりも約 2 倍の蛍光強度を得られると報告されている (Stoecker *et al.*, 2010; Radax *et al.*, 2012)。これまでに海洋性海綿動物内の古細菌やバイオリクター内の脱窒菌に適用されている (Radax *et al.*, 2012; McIlroy *et al.*, 2014)。

クリックケミストリーを用いた FISH 法は、蛍光物質をクリックケミストリーで標識させた方法である。クリックケミストリーはアルキンとアジドの環状化を示す反応である。また、塩基部にアルキン及びアジドを導入することが可能であるため、オリゴヌクレオチドプローブに最大 6 個の蛍光物質を標識することが可能であると報告されている (Gierlich *et al.*, 2006)。従って、通常の FISH 法の蛍光強度と比較して原理上約 6 倍の蛍光強度が得られると考えられる。しかしながら、Wagner の総説でも紹介していたが現在においても私の知る限りこの手法を用いて環境サンプルに適用した報告はない (Wagner and Haider 2011)。

ポリヌクレオチドプローブを用いた FISH 法は、長鎖プローブを用いた手法である (e.g., 100 bp 以上)。ポリヌクレオチドプローブはオリゴヌクレオチドプローブ (e.g., 18-25 bp) と比較して長鎖であり、多数の蛍光標識を標識することが可能である。従って、通常の FISH 法の蛍光強度と比較して約 26 倍の蛍光強度が得られたと報告されている (Trebesius *et al.*, 1994)。しかし、ポリヌクレオチドプローブは長鎖であるためプローブの細胞浸透性の問題や特異性の問題等が報告されている。これらの問題については 2.7 で後述した。

## 2.5 微生物の mRNA を標的とした高感度 FISH 法

### 2.5.1 酵素反応を用いた高感度 FISH 法

(TSA-FISH 法, CARD-FISH 法, Two-pass TSA-FISH 法)

FISH 法の高感度化に伴い、近年では微生物内の 16S rRNA だけでなく微生物の機能を把握することが可能である mRNA や機能遺伝子を標的とした報告もされるようになってきた。mRNA や機能遺伝子は 16S rRNA と比較して細胞内の存在数が非常に少なく、通常の FISH 法では検出が困難である。従って、mRNA や機能遺伝子の視覚的検出は、高感度 FISH 法を用いている。これまでに酵素反応を用いた方法として、ポリヌクレオチドプローブを用いた CARD-FISH 法やオリゴヌクレオチドプローブを用いた CARD-FISH 法、オリゴヌクレオチドプローブを用いて TSA 反応を 2 回行う two-pass TSA-FISH 法が報告されている。mRNA を標的としたポリヌクレオチドプローブを用いた CARD-FISH 法は 1998 年に Wagner らによって初めて報告された (Wagner *et al.*, 1998)。彼らは、DIG を標識した RNA を用いたポリヌクレオチドプローブ及び HRP を標識した anti-DIG を用いて mRNA の検出に成功している (Wagner *et al.*, 1998)。近年においても、RNA を用いたポリヌクレオチドプローブ

による mRNA の検出は報告され続けている (Pernthaler *et al.*, 2004; Wendeberg *et al.*, 2011; Constant *et al.*, 2010; Pilhofer *et al.*, 2009)。しかしながら、ポリヌクレオチドプローブを用いた高感度 FISH 法の問題点として、低い特異性の問題やプローブの低い細胞浸透性が報告されている (後述 :2.7)。従って、それらの問題を克服するために、短鎖のプローブであるオリゴヌクレオチドプローブを用いた CARD-FISH 法による mRNA の検出も報告されている (Bakermans and Madsen, 2002; 大塚ら 2007; Mota *et al.*, 2012)。さらに、近年では、TSA 反応を 2 回行う two-pass TSA-FISH 法が報告され、CARD-FISH 法よりも高い感度で mRNA の検出に成功している (Fig.2-4; Kubota *et al.*, 2006)。このように酵素反応を用いた方法は、高感度 FISH 法の適用が必須である mRNA 検出において重要なツールとなっている。

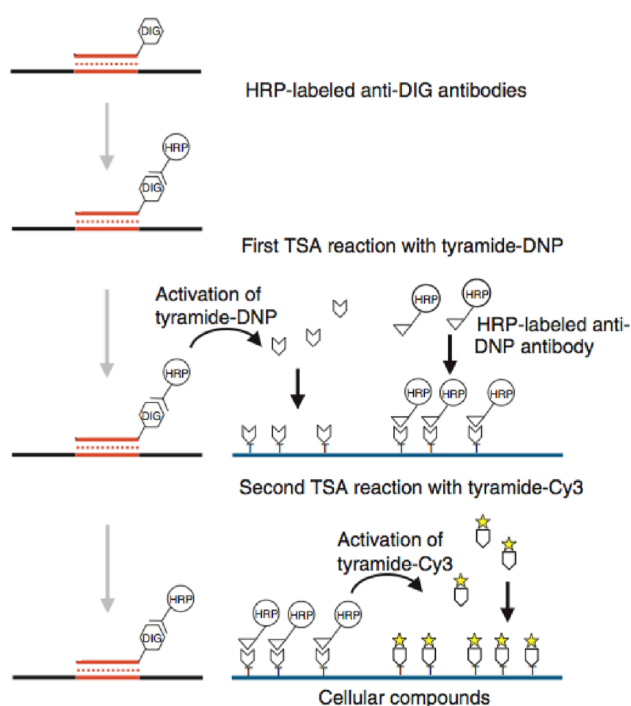


Fig. 2-4 Principle of Two-pass TSA-FISH. (Modified Wagner and Haider, 2011)

## 2.5.2 酵素反応を用いない mRNA 検出技術

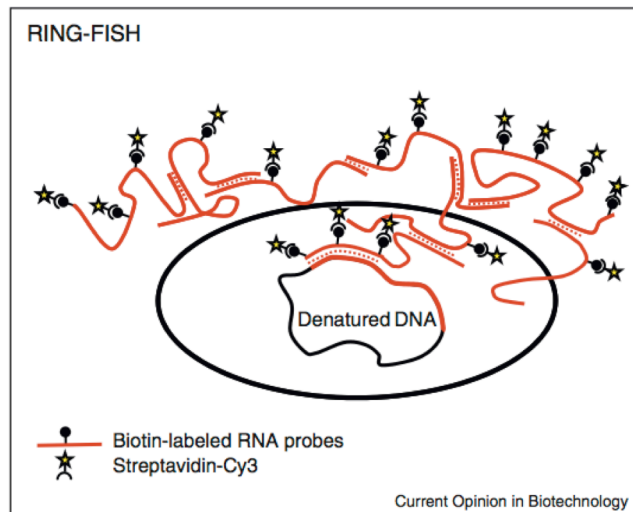
### (赤外領域の蛍光物質を用いた FISH 法, RING-FISH 法)

酵素反応を用いらず mRNA を視覚的に検出する方法として、長い露光時間を確保することが出来る赤外領域の蛍光物質を用いた FISH 法やプローブのネットワークを利用した高感度 FISH 法が報告されている。

Celeman らは、GFP 遺伝子を *E.coli* に挿入し、GFP 遺伝子から発現した mRNA に対して AlexaFluor647 を標識したオリゴヌクレオチドプローブのみで検出したと報告している (Coleman *et al.*, 2007)。彼らは赤外領域の蛍光物質を使用することで 60 秒という長い露光時間で撮影してもポジティブなシグナルを得ることに成功している。Wu らは落射蛍光顕

微鏡と比較して高い S/N 比を達成することが可能な CLSM 顕微鏡及び赤外領域の蛍光物質を用いることで *Pseudomonas putida* の *tom* 遺伝子から発現する mRNA の検出に成功している (Wu *et al.*, 2008)。

Zwirgmaier らはポリヌクレオチドプローブのネットワークを利用した高感度 FISH 法として RING-FISH 法を報告した (Zwirgmaier *et al.*, 2004)。RING-FISH 法は、高濃度の RNA ポリヌクレオチドプローブを微生物に滴下させ、プローブ同士でネットワークを形成させることで、蛍光感度を向上させる手法である (Fig.2-5)。ポリヌクレオチドプローブは、オリゴヌクレオチドプローブとは異なり長鎖のプローブであるため多数のレポータ基を標識させることが可能であり (通常、300-400 bp 程度のポリプローブならば 6-16 個のレポータ基 DIG を標識することが可能である (Yu *et al.*, 1994) )、多数の蛍光物質を標識することが可能である (Trebesius *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1994)。この方法は、当初、mRNA の検出ではなく機能遺伝子の検出技術として報告された (Zwirgmaier *et al.*, 2004)。RING-FISH 法による mRNA の検出は、2011 年に Dziallas らによって報告された (Dziallas *et al.*, 2011)。純粋菌株中の mRNA を標的とした RING-FISH 法は、高濃度の RNA ポリプローブを用いて高いストリエンジェンシー環境下 (80% ホルムアミド濃度) で 6 時間程度の交雑時間で行っている。しかしながら、長鎖のプローブを用いるため特異的な検出が困難であり、ネットワ



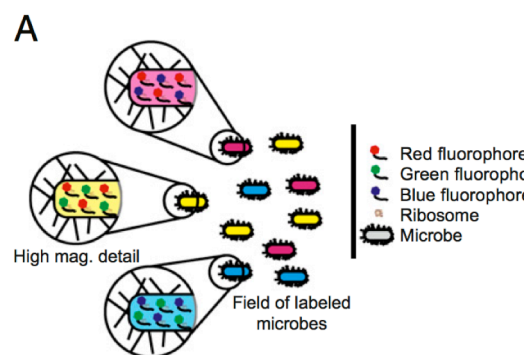
Schematic illustration of the proposed RING-FISH mechanism (modified from [31]). Single-stranded polyribonucleotide probes (red) labeled with multiple biotin molecules are produced by *in vitro* transcription of a PCR-amplified fragment from the gene of interest. After denaturation of the probes (added in excess) and the genomic DNA, a probe partially hybridizes to its target sequence, but some parts of the probe also hybridize with (partially) complementary regions of other probe molecules. Therefore, a complex network forms and this network formation occurs preferentially outside of the cell. Thus, after detection of the multiple biotin molecules with a Cy3-labeled streptavidin, typical halo-shaped fluorescent signals are observed.

**Fig. 2-5** Principle of RING-FISH. (Refer to Wagner and Haider, 2011)

ークを形成させるようなプローブの設計、大量のプローブコストなどが問題点として挙げられる。

## 2.6 FISH 法を用いた多重染色方法 (DOPE-FISH 法, CLASI-FISH 法)

FISH 法は、環境微生物を特異的かつ視覚的に検出することが可能である。また、複数のプローブを同時に用いることで、*in situ* における微生物群の空間分布を明らかにすることができる。例えば、ANME と硫酸還元菌の共生関係 (Schreiber *et al.*, 2010) や嫌気性グラニュール中の細菌と古細菌の共生関係 (Sekiguchi *et al.*, 1999) 等が報告されている。このように多数の微生物を同時に検出することは、*in situ* における微生物間の関係を明らかにする上で重要である。また、機能遺伝子や mRNA と rRNA を同時に検出することで、標的微生物の系統分類と機能を一度に把握することも可能である (Pernthaler *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2012; Kofoed *et al.*, 2012, etc)。一般的に適用されているのは 3 種類程度のプローブを用いた多重染色法である。それは、検出できるフィルターの数に限られていることや強い蛍光強度によるクロストークを引き起こすためである。しかしながら、蛍光物質の組み合わせにより多数の微生物を同時に検出する手法がいくつか報告された。まず、DOPE-FISH 法を用いた方法である。DOPE-FISH 法は、オリゴプローブの両端に蛍光物質を標識するため、蛍光色を組み合わせることができる。例えば、プローブの 3' 末端に AlexaFluor488 を標識し (蛍光 : 緑)、5' 末端に AlexaFluor555 を標識 (蛍光 : 赤) することで黄色に染色した菌が得られる。このようにしていくつかの蛍光物質を組み合わせ、同時に 6 種類の微生物を検出することに成功している (Behnam *et al.*, 2012)。次に、28 種類を同時に検出することが可能な CLASI-FISH 法がある (Valm *et al.*, 2011)。これは 1 つの標的部位に対して 2 種類の異なる蛍光物質を標識したプローブを同時に交雑させることで、様々な色を組み合わせることが可能である (Fig. 2-6)。しかしながら、これらの方法は未だ低 rRNA 含有量微生物に適用されておらず、FISH 法による検出が困難な微生物には適用が困難であると考えられる。また、高感度 FISH 法である CARD-FISH 法による多重染色もいくつか報告されているが、検出ごとにプローブに標識した HRP の活性を失活させる必要があり、非常に時間がかかり作業が煩雑なる (Pernthaler *et al.*, 2002)。また、CARD-FISH 法の蛍光強度は、非常に強いため蛍光がクロストークしないように設定する必要があり、2 つ以上の多重染色は困難であると考えられる。従って、高感度 FISH 法による多重染色は汎用性が高くないのが現状である。



**Fig. 2-6** Principle of CLASI-FISH.  
(Refer to Valm *et al.*, 2011)

## 2.7 高感度 FISH 法の問題点

### 2.7.1 プローブの特異性

複数の蛍光標識等を標識することが可能なポリヌクレオチドプローブを用いた FISH 法は、蛍光の高感度化に有効な手法である。しかしながら、ポリヌクレオチドプローブはオリゴヌクレオチドプローブと比較して、プローブの特異性が低いことが知られている。ポリヌクレオチドプローブによる検出の識別能力は、標的遺伝子との遺伝子相同性が78-85%であると報告されている (Ludwig *et al.*, 1994)。また、ポリヌクレオチドプローブを用いる two-pass TSA-FISH 法の識別能力は、85%であると報告されている (Kawakami *et al.*, 2011)。さらに、ポリヌクレオチドプローブを用いた RING-FISH 法の識別能力は、72-77%程度であると報告されている (Pratscher *et al.*, 2009)。この特異性の低さは、ポリヌクレオチドプローブのミスマッチあたりの  $T_m$  変化量がオリゴヌクレオチドプローブと比較して低いことに起因している (Stahl and Amann 1991)。また、その特異性は、ストリエンジェンシーを強くすることで向上することが報告されているが、それにより蛍光強度が著しく低下することが知られている (Zwirgmaier 2005; Ludwig *et al.*, 1994)。したがって、ポリヌクレオチドプローブを用いた FISH 法は、一塩基ミスマッチの識別が必要な rRNA の検出には不向きであると考えられる。

### 2.7.2 プローブの細胞浸透性

高感度 FISH 法は、主に酵素を用いた方法とポリヌクレオチドプローブを用いた方法が報告されている。通常、高感度 FISH 法による微生物検出にはプローブの細胞浸透性を向上させる細胞壁処理が必須である (Trebesius *et al.*, 1994; Amann and Fuchs, 2008; Kubota 2013)。これは、高感度 FISH 法に用いるプローブが細胞内に浸透しにくいことに起因している。CARD-FISH 法に用いる HRP の分子量は 40 kDa と報告されており、通常の蛍光物質 (e.g., AlexaFluor488 : 643 Da; Cy3 : 766 Da) と比較して約 40 倍大きいことが知られている (Amann and Fuchs, 2008; Thiele *et al.*, 2011)。これまでにプローブの細胞浸透性を向上させる方法としていくつかの方法が報告されている。まず、加水分解酵素を用いた処理方法である。加水分解酵素としては、リゾチーム、プロテイナーゼ K、アクロモペプチダーゼ等が報告されている (Kubota 2013)。その他、化学反応を用いた処理として SDS を用いた処理方法が報告されている。近年では、マイクロ波を用いた処理方法も報告されている (Tischer *et al.*, 2012)。代表的な細胞壁処理方法及び標的微生物を **Table 2-1** にまとめた。

**Table 2-1** が示すようにこれまでに多くの細胞壁処理方法が報告されているものの、すべての微生物に一樣に効果を示す処理方法は報告されていないのが現状である。また、*Flavobacterium columnare* や *Corynebacterium glutamicum* は、様々な細胞壁処理を施しても CARD-FISH 法による検出が困難であったと報告されている (Furukawa *et al.*, 2006)。さらに、培養条件によって同じ微生物であっても細胞壁の厚さが異なる場合も報告されており

Table 2-1 List of major permeabilization for sensitive FISH

Reference	Sample	Detection method	Type of treatment*	Method	Comments	
Amann <i>et al.</i> , 1992	Gram negative cell	HRP labeled probe, but it is not CARD-FISH	E	Lysozyme	1% SDS in hybridization buffer was effected for detecting <i>Methanococcus igneus</i> It is difficult to control	
			E	SDS		
Pernthaler <i>et al.</i> , 2002	Bacteria in seawater	CARD-FISH	E	Proteinase K	Detected	
			E	Lysozyme		
Sekar <i>et al.</i> , 2004	Actinobacteria in freshwater	CARD-FISH	E+E	Lysozyme+Achromopeptidase	Most effective	
			E	Lysozyme		
			C	HCl		Not effective
			E+E	Achromopeptidase+Lysozyme		
Ishi <i>et al.</i> , 2004	Bacteria in marine sediment	CARD-FISH	E	Lysozyme		
			E+E	Lysozyme+Achromopeptidase		
Teira <i>et al.</i> , 2004	Bacteria in marine sample	CARD-FISH	E	Lysozyme		
			E	Proteinase K		
Pernthaler <i>et al.</i> , 2004	Bacteria in marine sediment	CARD-FISH	E+E	Lysozyme + Proteinase K	<i>PmoA</i> mRNA targeted CARD-FISH.	
Schippers <i>et al.</i> , 2005	Bacteria in deep sub seafloor biosphere	CARD-FISH	E	Lysozyme+Achromopeptidase	Spore of bacillus licheniformis was not detect any permeabilization.	
Orcutt <i>et al.</i> , 2005	Archaea in deep sub seafloor biosphere	CARD-FISH	E	Proteinase K		
			E	Lysozyme		
Kubota <i>et al.</i> , 2006	Methanogen	Two-pass TSA-FISH	C+E	SDS+Lysozyme	Mcr mRNA targeted Two-pass TSA-FISH	
			E	Lysozyme		
Furukawa <i>et al.</i> , 2006	Bacteria	CARD-FISH	E	Lysozyme	It could not detected <i>Corynebacterium glutamicum</i> and <i>Flvobacterium colimnare</i> . <i>F. colimnare</i> was not detected by any permeabilization	
			E+E	Lysozyme+Achromopeptidase		Effect for <i>Corynebacterium glutamicum</i>
Pernthaler <i>et al.</i> , 2008	ANME in marine sediment	CARD-FISH	P	Microwave		
Kubota <i>et al.</i> , 2008	Methanogen	CARD-FISH	E	Proteinase K		
			E	Lysozyme		
Kawakami <i>et al.</i> , 2010	Bacteria	Two-pass TSA-FISH	E	Lysozyme	Oligonucleotide probe were used for two-pass TSA-FISH	
			E	Lysozyme		
Kawakami <i>et al.</i> , 2011	Bacteria in anaerobic granular sludge	Two-pass TSA-FISH	E	Lysozyme	Polynucleotide probe was used for two-pass TSA-FISH	
			E	PalW		
Kofoed <i>et al.</i> , 2012	Bacteria	CARD-FISH	P	Microwave	<i>NirS</i> mRNA targeted CARD-FISH	
Tischer <i>et al.</i> , 2012	Bacteria and Archaea in marine sediment	CARD-FISH	P	Microwave		
Ruff <i>et al.</i> , 2014	Bacteria in deep sea sediment	CARD-FISH	E	Lysozyme		
			E	SDS		
Ruff <i>et al.</i> , 2014	Archaea in deep sea sediment	CARD-FISH	E	Lysozyme	0.5% SDS for using permeabilization	
			E	SDS		

\* E: Enzymatic treatment, C: Chemical treatment, P: Physical treatment



(Nakamura *et al.*, 2006)、標的微生物が存在している環境下によって細胞壁の厚さが異なることが考えられる。従って、我々は実験毎に最適な細胞壁処理を検討し微生物の検出を行っている。しかし、その最適な細胞壁処理の適用範囲は狭くこれまでの方法では検出が困難な微生物が存在していることが考えられる。

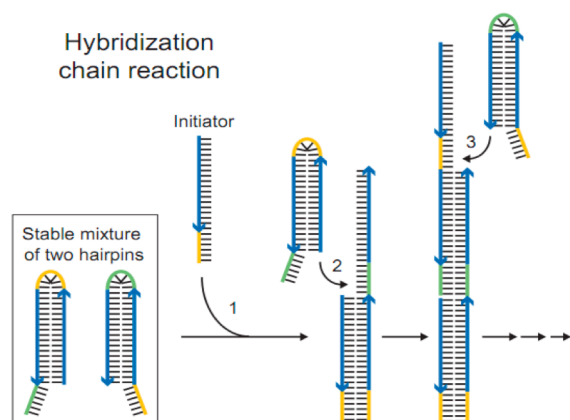
### 2.7.3 内在性 HRP 活性の失活

CARD-FISH 法に用いる CARD 反応は、過酸化水素存在下で HRP によりラジカル化したチラミドが HRP 近傍のチロシンやトリプトファン等の芳香族アミノ酸と結合する反応である。従って、菌体内に HRP のような効果を有する酵素が存在する場合、プローブの有無に関係なく蛍光が得られてしまうことが報告されている (Pavlekvic *et al.*, 2009)。我々は、CARD-FISH 法で特異的な検出を行うため、CARD-FISH 法を適用する前に内在性 HRP 活性を失活させる処理を行っている。内在性 HRP 活性の失活には  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いた処理方法や HCl を用いた処理方法が報告されている。Ishii らは、海洋堆積物の内在性 HRP 活性の失活させる方法として 0.15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanol が有効であったと報告している。また、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を使用することで菌数が減少することも報告している (Ishii *et al.*, 2004)。しかしながら、環境微生物には強い内在性 HRP 活性を有している場合がある。例えば、ANAMMOX 細菌である。ANAMMOX 細菌内の内在性 HRP 活性を失活させるには 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Woebken *et al.*, 2007) もしくは 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Pavlekvic *et al.*, 2009) が必要であったと報告されている。しかしながら、この内在性 HRP 活性の失活方法に関してもすべての微生物に効果を示す処理方法は報告されておらず、標的微生物により最適化が必要である。

## 2.6 HCR 法に関する基礎的知見

### 2.6.1 HCR 法の特長

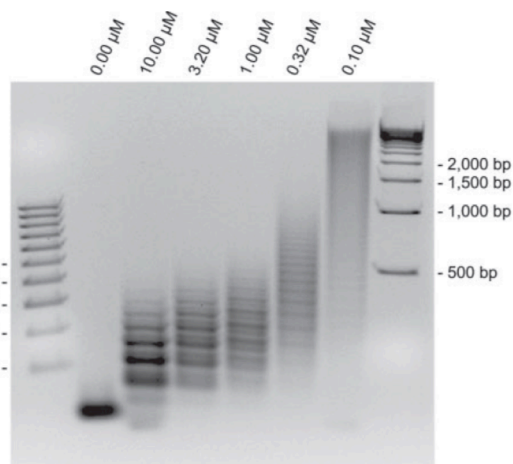
Hybridization chain reaction (HCR) 法は、2004 年に一本鎖 DNA を検出する手法として初めて報告された (Dirks *et al.*, 2004; Evanko, 2004)。HCR 法は、従来の遺伝子検出方法である PCR 法のような遺伝子増幅方法ではない。HCR 反応の概略図を Fig. 2-7 に示した。この反応は、2 種類のヘアピン構造を有している DNA プローブを用いる手法である。まず、1 本鎖の特定 DNA (initiator) に、プローブ 1 (H1) が交雑する (Fig. 2-7, 1)。その後、その際に交雑していない H1 の半分にプローブ 2 (H2) が交雑する (Fig. 2-7, 2)。さらに、交雑していない H2 の半分に H1 が交雑する。このように、2 種類のヘアピン構造を有したプローブが initiator から交互に交雑することで伸長反応を示す (Fig. 2-7, 3)。この反応で得られた伸長産物は、電気泳動を用いることで確認することができる (Fig. 2-8)。また、この HCR 法による伸長は、特定 DNA 存在下のみ反応が進行することが報告されている (Fig. 2-8)。Niu らは、1 塩基ミスマッチ及び 3 塩基ミスマッチの initiator を用意し HCR 法の特異性を明らかにした (Niu *et al.*, 2010)。その結果、標的 DNA に適応した HCR 法の蛍光強度を 100%と



**Figure 1** | Schematic of the basic hybridization chain reaction. Addition of an initiator strand of DNA to the stable mixture of two hairpin species triggers a chain reaction of hybridization events between the hairpins.

**Fig. 2-7** Principle of HCR.

(Refer to Evanko, 2004)



**Fig. 2-8.** Detection of initiator using HCR.

The initiator concentration shows in top of result of electrophoresis

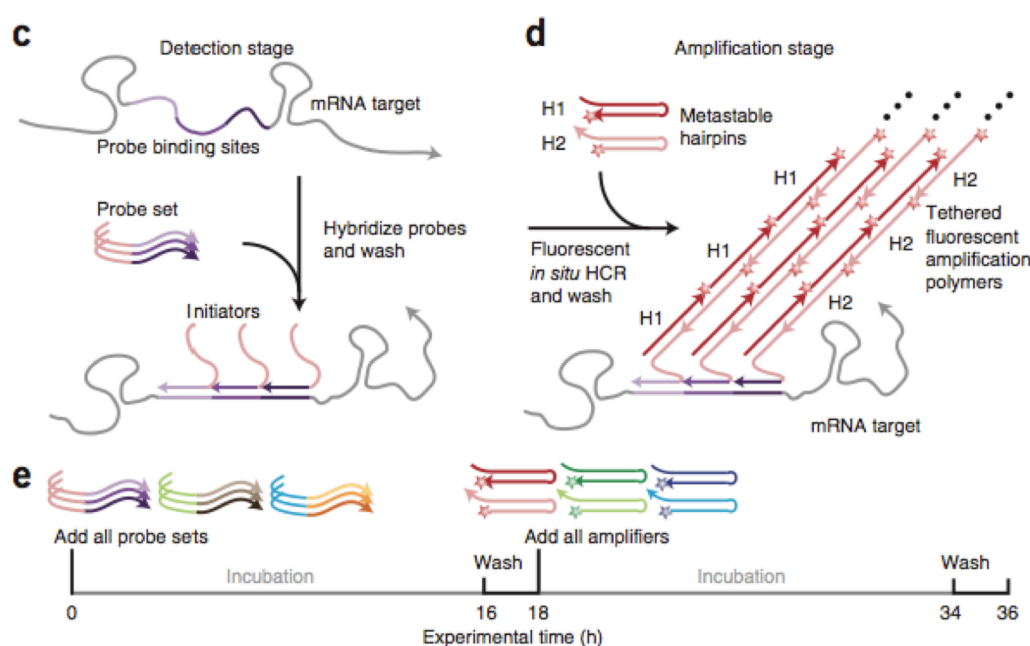
(Refer to Dirks *et al.*, 2004)

して、3塩基ミスマッチでは10%の蛍光強度が得られ、一塩基ミスマッチでは20%の蛍光強度が得られたと報告している。この結果は、H1とH2が特異的に伸長していることを示している。また、Chekerisらの報告によるとこの反応は、1時間程度で終了すると報告されている (Chemeris *et al.*, 2008)。さらに、HuangらはHCR法の反応時間がプローブ同士の交雑効率が伸長反応に影響しているため、10分間程度でほとんどの反応が終了すると報告している (Huang *et al.*, 2008)。近年、HCR法は、核酸やアプタマー等の様々な物質の検出に適用され注目されている手法である。

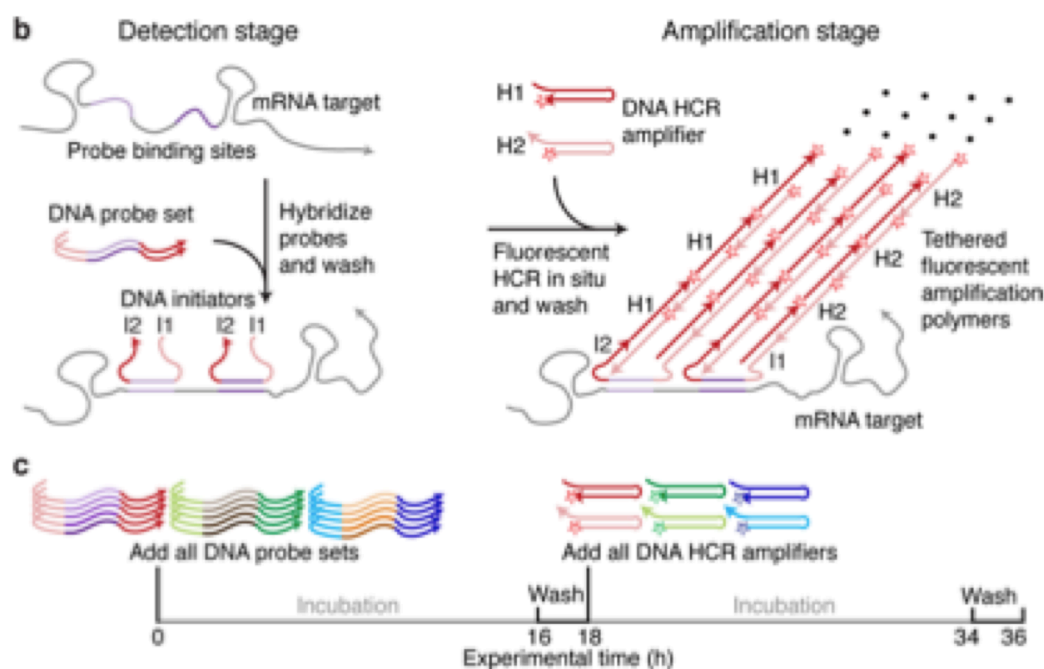
### 2.6.2 HCR法を用いたFSH法

HCR法を用いたFISH法は、2010年にChoiらによって初めて報告された (Choi *et al.*, 2010)。ChoiらはRNAプローブを用いてゼブラフィッシュ内のmRNAの検出を行った。RNAプローブを用いたHCR-FISH法の概要及びプロトコールを**Fig. 2-9**に示す。彼らは、ゼブラフィッシュのmRNAを検出するために、3箇所を標的とした3種類のコネクタプローブを用意し、そのコネクタプローブから伸長反応を示すH1及びH2を用いてmRNAの検出を行っている。この方法は、コネクタプローブの交雑に16時間、H1及びH2の伸長に16時間と長時間の交雑時間及び伸長時間を確保しmRNAの検出に成功している。さらに、近年、彼らのグループは同様の方法を用いてRNAプローブを用いてシロアリ腸内細菌の細菌に対してmRNAとrRNAの同時染色に成功している (Rosenthal *et al.*, 2013)。しかしながら、問題点としてDNAプローブと比較してRNAプローブは、高価であること、高いS/N比を達成することが困難であること、そして操作が煩雑であることが挙げられる。

そこで、我々の報告と同時期に彼らのグループは、真核生物の mRNA を対象とした DNA プロブを用いた HCR-FISH 法を報告した (Choi *et al.*, 2014)。彼らは、RNA プロブよりも 20 塩基長い H1 及び H2 を新たに設計し、ゼブラフィッシュの mRNA に成功している。DNA プロブを用いた方法を **Fig. 2-10** に示す。DNA プロブを用いた場合、彼らはコネクタプロブの両端にイニシエーター配列を組み合わせ、2 箇所に変換させることで高感度な蛍光を得ることに成功している。DNA プロブは、RNA プロブと比較して高い S/N 比を達成し、かつ RNA プロブよりも高い蛍光感度を示したと報告している (Choi *et al.*, 2014)。この方法もコネクタプロブの変換に 16 時間、H1 及び H2 の伸長に 16 時間と長時間の変換時間及び伸長時間を確保し mRNA の検出に成功している。



**Fig. 2-9** Principle of HCR-FISH using RNA-probes for detecting mRNA in zebrafish. (Refer to Choi *et al.*, 2010)



**Fig. 2-10** Principle of HCR-FISH using DNA-probes for detecting mRNA in zebrafish. (Refer to Choi *et al.*, 2014)

## 参考文献

- Albæk, N., Petersen, M. and Nielsen. (2006). Analogues of a Looked Nucleic Acid with Three-Carbon 2', 4'-Linkages: Synthesis by Ring-Closing Metathesis and Influence on Nucleic Acid Duplex Stability and Structure. *The Journal of Organic Chemistry* **71**, 7731-7740.
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Fernandes, R. M., Keevil, C. W. and Vieira, M. J. (2010). Fluorescence In Situ Hybridization Method Using a Peptide Nucleic Acid Probe for Identification of *Salmonella* spp. in a Broad Spectrum of Samples. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(13), 4476-4485.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. and Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* **56**(1), 919-1925.
- Amann, R. I. and Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews* **6**, 339-348.
- Amann, R. I., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H. D. and Schleifer, K. H. (1991). Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* **351**, 161-164.
- Choi, H. M. T., Amann, R. I., Zarda, B., Stahl, D. A. and Schleifer, K. H. (1992). Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and*

---

*Environmental Microbiology* **58**(9), 3007-3011.

**Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B. and Steitz, T. A.** (1999). Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**, 841-847.

**Bakermans C. and Madsen, E. L.** (2002). Detection in coal tar waste-contaminated groundwater of mRNA transcripts related to naphthalene dioxygenase by fluorescent in situ hybridization with tyramide signal amplification. *Journal of Microbiological Methods* **50**, 74–85.

**Beck, V. A. and Pierce, N. A.** (2014). Next-Generation in Situ Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. *ACS nano* **8**(5), 4284-4294.

**Behnam, F., Vilcinskas, A., Wagner, M. and Stoecker, K.** (2012). A Straightforward DOPE (Double Labeling of Oligonucleotide Probes)-FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) Method for Simultaneous Multicolor Detection of Six Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(15), 5138-5142.

**Behrens, S., Fuchs, B. M., Mueller, F. and Amann, R.** (2003). Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit? *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4935–4941.

**Behrens, S., Lösekann, T., Pett-Ridge, J., Weber, P. K., Ng, W.-O., Stevenson, B. S., Hutcheon, I. D., Relman, D. A. and Spormann, A. M.** (2008). Linking Microbial Phylogeny to Metabolic Activity at the Single-Cell Level By Using Enhanced Element Labeling-Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization (EL-FISH) and nanoSIMS. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(10), 3143-3150.

**Cerqueira, L., Fernandes, R. M., Ferreira, R. M., Carneiro, F., Dinis-Ribeiro, M., Figueiredo, C., Keevil, C. W., Azevedo, N. F. and Vietra, M. J.** (2011). PNA-FISH as a new diagnostic method for determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. *BioMed Central* **11**(101),

**Chemersis, D. A., Nikonorov, Y. M. and Vakhity, V. A.** (2008). Real-Time Hybridization Chain Reaction. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **419**, 53-55.

**Choi, H. M. T., Beck, V. A. and Pierce, N. A.** (2014). Next-Generation in Situ Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. *ACS Nano* **8**(5), pp 4284–4294.

**Choi, H. M. T., Chang, J. Y., Trinh, L. A., Padilla, J. E., Fraser, S. E. and Pierce, N. A.** (2010). Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nature biotechnology* **28**(11), 1208-1212.

**Clemons, Jr, W. M., May, J. L. C., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S. and Ramakrishnam, V.** (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution.

---

*Nature* **400**, 833-840.

**Coleman, J. R., Culley, D. E., Chrisler, W. B. and Brockman, F. J.** (2007). mRNA-targeted fluorescent in situ hybridization (FISH) of Gram-negative bacteria without template amplification or tyramide signal amplification. *Journal of Microbiological Methods* **71**(3), 246-255.

**Constant, P., Chowdhury, S. P., Pratscher, J. and Conrad, R.** (2010). Streptomycetes contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environmental Microbiology* **12**(3), 811-829.

**DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R.** (1989) Phylogenetic stains : Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Signal Cells. *Science* **243**, 1360-1363.

**Dirks, R. M., and Pierce, N. A.** (2004). Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proceeding of the National Academy of Science* **101**, 15275-15278.

**Dziallas, C., Pinnow, S. and Grossart H.-P.** (2011). Quantification of toxic and toxin-producing cyanobacterial cells by RING-FISH in combination with flow cytometry. *LIMNOLOGY and OCEANOGRAPHY: METHODS* **9**, 67-73.

**Evanko, D.** (2004). Hybridization Chain Reaction. *Nature Methods* **1**(3), 186-187.

**Fuchs, B. M., Glockner, F. O., Wulf, J. and Amann, R.** (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3603-3607.

**Fuchs, B. M., Stutsbo, K., Ludwig, W. and Amann, R.** (1998). In Situ Accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(2), 961-968.

**Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwiapl, I., Ludwig, W. and Amann, R.** (2001). Flow Cytometric Analysis of the In Situ Accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(12), 4973-4982.

**Furukawa, K., Hoshino, T., Tsuneda, S. and Inagaki, Y.** (2006). Comprehensive Analysis of Cell Wall-Permeabilizing Conditions for Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization. *Microbes and Environments* **21**(4), 227-234.

**Gierlich, J., Burley, G. A., Gramlich, P. M. E., Hammond, D. M. and Carell T.** (2006). Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA. *Organic Letter* **8**(17), 3639-3642.

**Herndl, G. J., Reinthaler, T., Teira, E., Aken, H., Veth, C., Pernthaler, A. and Pernthaler, J.** (2005). Contribution of Archaea to Total Prokaryotic Production in the Deep Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(5), 2303-2309.

**Hopman, A. H. N., Ramaekers, F. C. S. and Speel, E. J. M.** (1998). Rapid Synthesis of Biotin-,

---

Digoxigenin-, Trinitrophenyl-, and Fluorochole-labeled Tyramides and Their Application for In Situ Hybridization Using CARD Amplification. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **46**(6), 771-777.

**Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. and Wagner, M.** (2008) Quantification of Target Molecules Needed To Detect Microorganisms by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Catalyzed Reporter Deposition-FISH, *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5068-5077.

**Huang, Q., Baum, L. and Fu, W-L.** (2008). Enzyme-free signal amplification of analyte in a single closed tube by fluorescence chain reaction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **46**(10), 1384-1387.

**Hugenholtz, P.** (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* **3**(2), 0003.1-0003.8.

**Huang, W.E., Stoecker, K., Griffiths, R., Newbold, L., Daims, H., Whiteley, A. S. and Wagner, M.** (2007). Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environmental Microbiology* **9**(8), 1878-1889.

**Ishii, K., Mußmann, M., MacGregor, B. J. and Amann, R.** (2004). An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **50**(3), 203-213.

**Jobard, M., Rasconi, S. and Sime-Ngando, T.** (2010). Fluorescence in situ hybridization of uncultured zoospore fungi: testing with clone-FISH and application to freshwater samples using CARD-FISH. *Journal of Microbiology Methods* **83**, 236-243.

**Kawakami, S., Kubota, K., Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H. and Ohashi A.** (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 and Environments* **25**(1), 15-21.

**Kawakami, S., Hasegawa, T., Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H., Ohashi A. and Kubota, K.** (2011). Detection of single copy function genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes. *Journal of Microbiological Methods* **88**(2), 218-223.

**Kemp, P. F., Lee, S. and Laroche, J.** (1993). Estimating the Growth Rate of Slowly Growing Marine Bacteria from RNA Content. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(8), 2594-2601.

**Kofoed, M. V. W., Nielsen, D. Å., Revsbech, N. P. and Schramm A.** (2012). Fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of nitrite reductase transcripts (nirS mRNA) in *Pseudomonas stutzeri* biofilms relative to a microscale oxygen gradient. *Systematic and Applied Microbiology* **35**(8), 513-517.

- 
- Kramer, J. G. and Singleton, F. L.** (1992). Variations in rRNA Content of Marine *Vibrio* spp. during Starvation-Survival and Recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(1), 201-207.
- Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H. and Harada, H.** (2006). Improved In Situ Hybridization Efficiency with Locked-Nucleic-Acid-Incorporated DNA Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(8), 5311-5317.
- Kubota, K., Ohashi A., Imachi, H. and Harada, H.** (2006). Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probes and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH). *Journal of Microbiological Methods* **66**, 521-528.
- Kubota, K., Imachi, H., Kawakami, S., Nakamura, K., Harada, H. and Ohashi, A.** (2008). Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *Journal of Microbiological Methods* **72**(1), 54-59.
- Kubota, K.** (2013). CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes and Environments* **28**(1), 3-12.
- Lasken, R. S** (2007). Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. *Current Opinion in Microbiology* **10**(5), 510-516.
- Lebaron, P., Catala, P., Fajon, C., Joux, F., Baudart, J. and Bernard, L.** (1997). A new sensitive, Whole-Cell Hybridization Technique for Detection of Bacteria Involving a Biotinylated Oligonucleotide Probe Targeting rRNA and Tyramide Signal Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8), 3274-3278.
- Lehtola, M. J., Loades, C. J. and Keevil, C. W.** (2005). Advantage of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter lari. *Journal of Microbiological Methods* **62**, 211-219.
- Lenk, S., Moraru, C., Hahnke, S., Arnds, J., Richter, M., Kube, M., Reinhardt, R., Brinkhoff, T., Harder, J., Amann, R. and Mußmann, M.** (2012). Roseobacter clade bacteria are abundant in coastal sediments and encode a novel combination of sulfur oxidation genes. *The ISME Journal* **6**(12), 2178–2187.
- Ludwig, W., Dorn, S., Springer, N., Kirchhof, G. and Schleifer K-H.** (1994). PCR-Based Preparation of 23S rRNA –Targeted Group-Specific Polynucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(9), 3236-3244.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R.**
-



- 
- Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, and K. H. Schleifer.** (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**:1363–1371.
- McIlroy, S. J., Szyszka, A., Starnawski, P., Saunders, A. M., Nierychlo, M., Nielsen, P. H. and Nielsen, J. L.** (2014). Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems by application of stable-isotope probing, microautoradiography and FISH. *Environmental Microbiology Accepted*.
- Moraru, C., Lam, P., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M. M. and Amann, R.** (2010). Gene-FISH-an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environmental Microbiology* **12**(11), 3057-3073.
- Mota, C. R., So, M. J. and Reyes, F. L.** (2012). Identification of Nitrite-Reducing Bacteria Using Sequential mRNA Fluorescence In Situ Hybridization and Fluorescence-Assisted Cell Sorting. *Microbial Ecology* **64**(1), 256-267.
- Nakamura, K., Terada, T., Sekiguchi, Y., Shinzato, N., Meng, X.-Y., Enoki, M. and Kamagata, Y.** (2006). Application of pseudomurein endoisopeptidase to fluorescence in situ hybridization of methanogens within the family Methanobacteriaceae *Applied and Environmental Microbiology* **72**(11), 6907-6913.
- Niu, S., Jiang, Y. and Zhang, S.** (2010). Fluorescence detection for DNA using hybridization chain reaction with enzyme-amplification. *Chemical Communications* **46**, 3089-3091.
- Okabe, S.** (2004). MAR-FISH-An ecophysiological approach to link phylogenetic affiliation and in situ metabolic activity of microorganisms at a single cell resolution. *Microbe and Environments* **19**(2), 83-98.
- Orcutt, B., Boetius, A., Elvert, M., Samarkin, V. and Joye, S. B.** (2005). Molecular biogeochemistry of sulfate reduction, methanogenesis and the anaerobic oxidation of methane at Gulf of Mexico cold seeps. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69**(17), 4267-4281.
- Orphan, V. J., Turk, K. A., Green, A. M. and House, C. H.** (2009). Patterns of <sup>15</sup>N assimilation and growth of methanotrophic ANME-2 archaea and sulfate-reducing bacteria within structured syntrophic consortia revealed by FISH-SIMS. *Environmental Microbiology* **11**(7), 1777-1791.
- Pavlekovic, M., Schmid, M. C., Schmider-Poignee, N., Spring, S., Pilhofer, M., Gaul, T., Fiandaca, M., Löffler, F. E., Jetten, M., Schleifer, K. H. and Lee, N. M.** (2009). Optimization of three FISH procedures for in situ detection of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in biological wastewater treatment. *Journal of Microbiological Methods* **78**(2), 119-126.
- Perry-O'Keefe, H., Rigby, S., Oliveira, K., Sørensen, D., Stender, H., Coull, J. and Hyldig-Nielsen, J.J.** (2001). Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. *Journal of Microbiological Methods* **47**, 281-292.
-

- 
- Pernthaler, A. and Amann, R.** (2004). Simultaneous Fluorescence In Situ hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(9), 5426-5433.
- Pernthaler, A., Dekas, A. E., Brown, C. T., Goffredi, S. K., Embaye, T., and Orphan, V. J.** (2008). Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proceeding of the National Academy of Science* **105**(16), 7052-7057.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. I.** (2002) Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3094-3101.
- Pilhofer, M., Pavlekovic, M., Lee, N. M., Ludwig, W. and Schleifer K. H.** (2009). Fluorescence in situ hybridization for intracellular localization of *nifH* mRNA. *Systematic and Applied Microbiology* **32**(3), 186-192.
- Pizzetti, I., Gobet, A., Fuchs, B. M., Amann, R. and Fazi, S.** (2011). Abundance and diversity of Planctomycetes in a Tyrrhenian coastal system of central Italy. *Aquatic microbial ecology* **65**(2), 129-141.
- Pratscher, J., Stichternoth, C., Fichtl, K., Scheifer, K-H. and Braker, G.** (2009). Application of Recognition of Individual Genes-Fluorescence In Situ Hybridization (RING-FISH) To Detect Nitrite Reductatase Genes (*NirK*) of Denitrifiers in Pure Cultures and Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(3), 802-810.
- Radax, R., Hoffmann, F., Rapp, H. T., Leininger, S. and Schleper C.** (2012). Ammonia-oxidizing archaea as main drivers of nitrification in cold-water sponges. *Environmental Microbiology* **14**(4), 909-923.
- Ruff, S. E., Probandt, D., Zinkann, A.-C., Iversen, Morten, H. Klaas, C., Würzberg, L., Krombholz, N., Wolf-Gladrow, D., Amann, R. and Knittel, K.** (2014). Indications for algae-degrading benthic microbial communities in deep-sea sediments along the Antarctic Polar Front. *Deep Sea Research Part II* **108**, 6-16.
- Rosenthal, A. Z., Zhang, X., Lucey, K. S., Ottesen, E. A., Trivedi, V., Choi, H. M. T., Pierce, N. A. and Leadbetter, J. R.** (2013). Localizing transcripts to single cells suggests an important role of uncultured deltaproteobacteria in the termite gut hydrogen economy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(40), 16163-16168.
- Schrelber, L., Holler, T., Knlttel, K., Meyerdierks, A. and Amann, R. I.** (2010). Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environmental Microbiology* **12**(8), 2327-2340.
- Sekar, R., Fuchs, B. M., Amann, R. I. and Pernthaler, J.** (2004.). Flow Sorting of Marine Bacterioplankton after Fluorescence in situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(10), 6210-6219.
-

- 
- Schippers, A., Neretin, L. N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T. G., Cragg, B. A., Parkes, R. J. and Jørgensen, B. B.** (2005). Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature* **433**(7028), 861-864.
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. & Amann, R. I.** (1997). Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 3268–3273.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A. and Harada, H.** (1999). Fluorescence In Situ Hybridization Using 16S rRNA-Targeted Oligonucleotides Reveals Localization of Methanogens and Selected Uncultured Bacteria in Mesophilic and Thermophilic Sludge Granules. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(3), 1280-1288.
- Shiraishi, F., Zippel, B., Neu, T. R. and Arp, G.** (2008). In Situ detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD-FISH. *Journal of Microbiology Methods* **75**, 103-108.
- Singh, S. K., Kumer, R. and Wengel, J.** (1998). Synthesis of Novel Bicyclo [2.2.1] Ribonucleotides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides. *The Journal of Organic Chemistry* **63**, 6078-6079.
- Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A. and Amann, R.** (2010). Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environmental Microbiology* **12**(8), 2327-2340.
- Stahl, D. A. and Amann, R. I.** (1991). Development and application of nucleic acid probes. 205-248. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow., *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd.
- Stoecker, K., Dorninger, C., Daims, H. and Wagner, M.** (2010). Double Labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (DOPE-FISH) Improves Signal Intensity and Increases rRNA Accessibility. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(3), 922-926.
- Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Herndl, G. J.** (2005). Combining Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization and Microautoradiography To Detect Substrate Utilization by Bacteria and Archaea in the Deep Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(7), 4411-4414.
- Thiele, S., Fuchs, B. M. and Amann R.** (2011). Identification of Microorganisms using the Ribosomal RNA approach and Fluorescence in situ hybridization. p 171–189. Edited by Wilderer P, *Treatise on water science*. Elsevier, Oxford.
- Tischer, K., Zeder, M., Klug, R., Pernthaler, J., Schattnerhofer, M., Harms, H. and Wendeberg, A.** (2012). Fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH) of microorganisms in hydrocarbon contaminated aquifer sediment samples. *Systematic and Applied Microbiology* **35**(8),
-

---

526-532.

**Tomac, S., Sarker, M., Ratilainen, T., Wittung, P., Nielsen, P. E., Norden, B. and Gräslund.** (1996). Ionic Effects on the Stability and Conformation of Peptide Nucleic Acid Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 5544-5552.

**Trebesius, K., Amann, R., Ludwig, W., Mühlegger, K. and Schleifer, K.-H.** (1994). Identification of Whole Fixed bacterial Cells with Nonradioactive 23S rRNA-Targeted Polynucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(9), 3228-3235.

**Valm, A.M., Welch, J.L.M., Rieken, C.W., Hasegawa, Y., Sogin, M.L., Oldenbourg, R., Dewhirst, F.E. and Borisy, G.G.** (2011) Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**, 4152–4157.

**Wagner. M. and Haider, S.** (2011). New trends in fluorescence in situ hybridization and functional analysis of microbes *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 96-102.

**Wagner. Y. M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.-H., Bubert, A., Goebel, W. and Schleifer, K.-H.** (1998). In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes* *FEMS Microbiology Letters* **160**, 159-168.

**Waller, G., Amann, R. I. and Beisker, W.** (1993). Optimizing Fluorescent In Situ Hybridization With rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms. *Cytometry* **14**, 136-143.

**Wendeberg, A., Zielinski, F.U., Borowski, C. and Dubilier, N.** (2012). Expression patterns of mRNAs for methanotrophy and thiotrophy in symbionts of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus puteoserpentis*. *The ISME Journal* **6**(1), 104-112.

**Wilhartitz, I., Mach, R. L., Reinthaler, T., Herndl, G. J. and Farnleitner, A. H.** (2007). Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 871-881.

**Woebken, D., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M. M. and Amann, R.** (2007). Potential Interactions of Particle-Associated Anammox Bacteria with Bacterial and Archaeal Partners in the Namibian Upwelling System. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(14), 4648-4657.

**Woebken, D., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M. M. and Amann, R.** (2007). Potential Interactions of Particle-Associated Anammox Bacteria with Bacterial and Archaeal Partners in the Namibian Upwelling System. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(14), 4648-4657.

**Woese, C. R., Winker, S. and Gutell, R. R.** (1990). Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of ‘tetra-loops’. *Proceeding of the National Academy of Science* **87**, 8467-8471.

**Wu, C. H., Hwang, Y.-C., Lee, W., Mulchandani, A., Wood, T. K., Yates, M. V. and Chen W.** (2008). Detection of recombinant *Pseudomonas putida* in the wheat rhizosphere by fluorescence in

---

situ hybridization targeting mRNA and rRNA. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**(3), 511-518.

**Yilmaz, L. S., Parnerkar, S. and Noguera, D. R.** (2011). mathFISH, a Web Tool That Thermodynamics-Based Mathematical Models for In silico Evaluation of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(3), 118-1122.

**Yilmaz, L. S., and Noguera, D. R.** (2004). Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent in situ hybridization. *Applied Environmental Microbiology* **70**, 7126–7139.

**Yu, H., Chao, J., Patek, D., Mujumdar, P., Mujumdar, S. and Waggoner, S.** (1994). Cyanine dye DUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. *Nucleic Acids Research* **22**(15), 3226-3232.

**Zwirgmaier, K., Ludwig, W. and Scheifer, K-H.** (2004). Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization—RING-FISH. *Molecular Microbiology* **51**, 89–96.

**Zwirgmaier K.** (2005). Fluorescence in situ hybridisation (FISH)--the next generation. *FEMS Microbiology Letter* **246**(2), 151-158.

大塚勇輝, 橋本尚人, 荒木信夫, 阿部憲一, 川上周司, 山口隆司, 珠坪一晃 (2007). *apsA* mRNA を標的とした FISH 法による硫酸還元を検出. *環境工学研究論文集* **44**, 633-639

## 第 3 章

# 微生物の rRNA を標的とした in situ DNA-HCR 法の 開発及び特徴

山口剛士、川上周司、幡本将史、高橋優信、久保田健吾、井町寛之、荒木信夫、山口隆司.  
Hybridization Chain Reaction (HCR) 法を用いた新規高感度 FISH 法の開発. *土木学会論文集 G (環境)*、Vol. 67, No. 7, pp.III\_93-III\_98, 2011.

Tsuyoshi Yamaguchi, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Masanobu Takahashi, Hiroyuki Imachi, Nobuo Araki, Takashi Yamaguchi and Kengo Kubota. In situ DNA-HCR : A facilitated in situ hybridization chain reaction system for the detection of environmental microorganisms. *Accepted*.

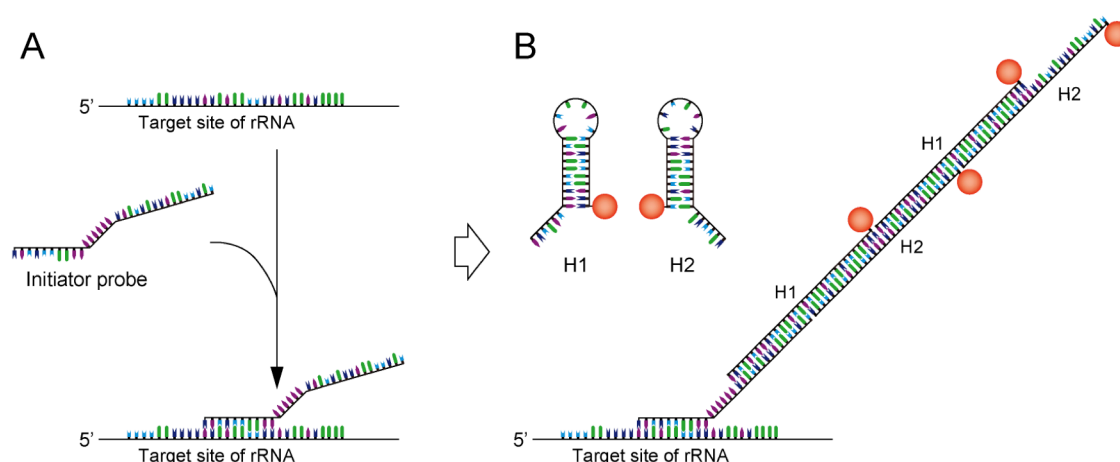
### 第3章 微生物の rRNA を標的とした in situ DNA-HCR 法の開発及び特徴

#### 3.1 はじめに

FISH 法は、微生物の培養を介さず標的微生物のみを視覚的に検出することが可能であるため、環境中の微生物の生態や形状の把握に広く利用させている (Amann *et al.*, 1995; Amann and Fuchs 2008)。しかしながら、FISH 法にはいくつかの問題が存在している。その一つが蛍光強度の問題である。FISH 法は、菌体の rRNA を標的としている手法であるため、FISH 法で得られる蛍光強度が菌体内の rRNA 含有量に依存することが知られている (DeLong *et al.*, 1989)。従って、菌体内の rRNA 含有量が少ない微生物は、FISH 法による検出が困難な場合がある (Pernthaler *et al.*, 2002)。rRNA 含有量が少ない微生物は、貧栄養環境下に生息している場合が多い。特に、土壌や海洋中の微生物は、rRNA 含有量が少ないことが知られている (Pernthaler *et al.*, 2002)。現在、そのような微生物の視覚的検出には蛍光増幅技術に酵素触媒反応を利用した CARD-FISH 法が適用されている (Schonhuber *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 2002)。CARD-FISH 法は、これまでに土壌や海洋、深海等の様々な貧栄養下に生息している微生物の生態解明に利用されてきた (Pernthaler *et al.*, 2002; Orcutt *et al.*, 2005; Sekar *et al.*, 2004)。しかしながら、CARD-FISH 法にもいくつかの問題が報告されている (Kubota 2013)。その一つがプローブの細胞浸透性の問題である。CARD-FISH 法に用いるプローブは、通常の FISH プローブに用いる蛍光物質の分子量と比較して約 40 倍の分子量を有した HRP 酵素を標識する必要があるため、パラホルムアルデヒド等の固定作業のみでは、細胞内に浸透しにくいことが知られている。これまでに、細胞浸透性を向上させるために、リゾチーム、プロテイナーゼ K 等の加水分解酵素を使った処理や SDS を使った化学的な処理、マイクロ波を使った物理処理が報告されている (Kubota 2013)。しかしながら、すべての微生物に一律の効果を示す処理方法は報告されておらず、標的微生物によって処理方法を検討しているのが現状である。従って、細胞壁処理の効果を示さない微生物は、CARD-FISH 法による検出が困難である。

本研究では、プローブの細胞浸透性の問題を解決するために、酵素反応を用いない遺伝子増幅技術である hybridization chain reaction (HCR) 法に着目し (Dirks *et al.*, 2004)、プローブの細胞浸透性が高い高感度 FISH 法 (in situ DNA-HCR 法) の開発を行った。HCR 法は、ステム構造及びループ構造を有した二種のプローブが一本鎖 DNA から互い違いに交雑し伸長反応を示すことによって一本鎖 DNA を検出する方法である。また、その反応は、伸長起点である一本鎖 DNA の存在下のみ起こることが報告されている。HCR 法を FISH 法に応用させた in situ DNA-HCR 法の概略図を **Fig. 3-1** に示す。微生物を特異的に検出するために、まず標的交雑部位に交雑する塩基配列と伸長起点になる塩基配列の両者を持つイニシエータープローブを交雑部位に交雑させる。その後、FISH 法と同様の条件でイニシエータープローブの洗浄を行う。次に、蛍光標識したプローブ 1 (H1) とプローブ 2 (H2) を用いてシグナルの増幅を行う。H1 及び H2 は、rRNA に交雑した伸長起点を有するイニシ

エータープローブのみから互い違いに交雑し伸長反応を示す。その結果、酵素触媒反応を用いることなく蛍光標識した H1 及び H2 が菌体内で留まり高い蛍光感度を得られる。In situ DNA-HCR 法の特長は、伸長起点の存在下のみで H1 及び H2 による伸長が起こるため、特異的にネットワークを組むことが可能である点である。また、in situ DNA-HCR 法に用いるプローブは約 50 塩基程度であり、オリゴヌクレオチドプローブである。これまでに、RNA プローブを用いた in situ RNA-HCR 法は、原核生物を対象にして報告されているが (Choi *et al.*, 2013)、原核生物を標的とした DNA プローブを用いた in situ DNA-HCR 法の報告はされていない。そこで、本章では、原核生物を対象とした in situ DNA-HCR 法のプロトコルの最適化及び本手法の蛍光強度、特異性及びプローブの細胞浸透性の把握を行った。



**Fig. 3-1** Summary of in situ DNA-HCR protocol and reaction. A : Detection of target site by initiator probe. B : Amplification step by H1 and H2.

## 3.2 実験方法

### 3.2.1. モデル微生物の選定

モデル微生物には、*Escherichia coli* K-12 株 (ATCC700296) を選定し、また、ネガティブコントロールとしてメタン菌である *Methanococcus vannielii* (JCM13029) を選定した。プローブの細胞浸透性を評価する際に用いたモデル微生物には CARD-FISH 法を適応する際、細胞壁処理を必要とする *Methanosaeta concilii* (JCM 10134)、*Bacillus subtilis* (DSM 10) を選定した。*M. vannielii* 及び *M. concilii* は JCM が指定する培地で培養し、*B. subtilis* は、DSM が指定する培地で培養し、*E. coli* は LB 培地で培養した。培養した菌体は対数増殖期に回収後、4%パラホルムアルデヒドで 4°C、12 時間固定し、EtOH と PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4]) を 1:1 で混合させた溶液中で -20°C で保存した。

### 3.2.2. プローブの選定

FISH 法、CARD-FISH 法及び in situ DNA-HCR 法に用いたプローブを **Table 3-1** に示す。



In situ DNA-HCR 法に用いたイニシエータープローブは、EUB338 領域に交雑する配列及び伸長起点の配列の両者を有したプローブである。また、その間にはスペーサーとして5つのアデニンを設けた。伸長に用いた H1 及び H2 は Choi らが設計した H1 及び H2 を若干改良し使用した。

### 3.2.3. 細胞壁処理

*B. subtilis* を標的とした in situ DNA-HCR 法には、プローブの細胞浸透性を向上させるために、リゾチーム (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) による細胞壁処理を 37°C で 60 分間行った (Furukawa *et al.*, 2006)。

### 3.2.4. FISH 法

FISH 法は Sekiguchi らの方法の準拠した (Sekiguchi *et al.*, 2001)。まず、固定サンプルを低融点アガロースで包埋し (Pernthaler *et al.*, 2002)、10 穴のスライドガラス (Matsuami, Osaka, Japan) にマウントした。スライドは、60°C で乾燥後、EtOH シリーズ (50, 80 and 96%) に 3、1、1 分間浸して脱水を行った。次に、最終濃度 0.5  $\mu$ M の Cy3 もしくは Alexa555 を標識したプローブを含むハイブリダイゼーション (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.05% SDS) を各穴に 15  $\mu$ l 滴下し、46°C で 2 時間以上交雑させた。その後、スライドを 48°C のハイブリダイゼーションバッファーに浸し、30 分間の洗浄を行った。最後に、MQ で 1 分間、EtOH で 1 分間浸し、風乾させた。

### 3.2.5. CARD-FISH 法

CARD-FISH 法は、Kubota らの方法を若干変更し行った (Kubota *et al.*, 2008)。まず、固定サンプルを低融点アガロースで包埋し (Pernthaler *et al.*, 2002)、10 穴のスライドガラス (Matsuami, Osaka, Japan) にマウントした。スライドは、60°C で乾燥後、EtOH シリーズ (50, 80 and 96%) に 3、1、1 分間浸して脱水を行った。乾燥させた後、最終濃度 0.1  $\mu$ M の HRP 標識プローブを含むハイブリダイゼーション (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.05% SDS, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent) を各穴に 15  $\mu$ l 滴下し、40°C で 2 時間以上交雑させた。その後、スライドを 42°C のハイブリダイゼーションバッファーに浸し、15 分間の洗浄を行った。プローブの洗浄後、TNT バッファーに 15 分間浸し、平衡化させ、TSA 反応に供した。TSA 反応は、Cy3 を標識したチラミドを用いて行った。チラミド反応液は、1 volume の標識チラミド、37.5 volume の amplification buffer (NEN life science)、12.5 volume の 40% dextran sulfate、0.5 volume の 10% blocking reagent を混合させ、各穴に 10  $\mu$ l 滴下し、37°C で 10 分間反応させた。TSA 反応後は、TNT バッファーに 15 分間浸し、MQ で 1 分間及び EtOH で 1 分間浸して脱水及び風乾させた。

Table 3-1 Probes in this study

Probe name	Probe sequence (5'-3') <sup>*1</sup>	%FA <sup>*2</sup>	Reference
<b><u>FISH and CARD-FISH</u></b>			
EUB338	GCTGCCCTCCCGTAGGAGT	20	Amann <i>et al.</i> , 1990
GAM42a	GCCTTCCCAACATCGTTT	0-60	Manz <i>et al.</i> , 1992
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	0-60	Manz <i>et al.</i> , 1996
EUB338-IV	GCA <del>A</del> GCCCTCCCGTAGGAGT	20	Schmid <i>et al.</i> , 2005
EUB338-III	GCTGCC <del>A</del> CCCGTAGGTGT	20	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-II	GCA <del>A</del> GCCCA <del>A</del> CCCGTAGGTGT	20	Daims <i>et al.</i> , 1999
ARC915	GTGCTCCCCCGCCAATTCTCT	40	Stahl <i>et al.</i> , 1991
<b><u>In situ DNA-HCR</u></b>			
<i>Initiator probe</i>			
EUB338-initiatorH	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	This study
GAM42a-initiatorH	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGCCTTCCCAACATCGTTT	0-60	This study
CF319a-initiatorH	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAATGGTCCGTGTCTCAGTAC	0-60	This study
EUB338-1MM-initiatorH	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGCA <del>A</del> GCCCTCCCGTAGGAGT	20	This study
EUB338-2MM-initiatorH	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGC <del>A</del> CCCGTAGGTGT	20	This study
EUB338-3MM-initiatorH	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGCA <del>A</del> GCC <del>A</del> CCCGTAGGTGT	20	This study
ARC915-initiatorH	<u>CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGTCCCGCCAATTCTCT	40	This study
<i>Amplifier probe</i>			
H1	TCTAGTCGTT <del>gatgctttgtatt</del> egg_CGACAGATAA <del>ccgaatacaaa</del> gcaate	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>
H2	ccgaatacaaa <del>gcaate</del> AACGACTAGAgatgctttgtatt <del>eggTTA</del> TCGTCCG	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>

\*1 Double underlined sequences are the initiator sequences.

Grey boxes show the mismatch (MM) sequence.

Lowercase letters represent stem structure of amplifier probe.

Underlined sequence of H1 is complementary to the initiator sequences of initiatorH.

\*2 %FA shows formamide concentration (v/v).

\*3 Probe sequences were changed to DNA probe from RNA probe.

### 3.2.6. In situ DNA-HCR 法

In situ DNA-HCR法に用いる純粋菌株は、低融点アガロースで包埋し、10穴のスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に固着させた。各スライドは60°Cで乾燥後、50、80、96%のEtOHにそれぞれ3、1、1分に浸して脱水を行った。その後、必要であれば細胞壁処理を施した後、TNTバッファーに15分間、MQに1分間浸し、最後にEtOHに1分間浸して脱水、乾燥させた。ハイブリダイゼーションバッファー1 (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.01% SDS) に最終濃度 0.5  $\mu$ M になるようにイニシエータープローブを混合させ、各穴に 15  $\mu$ l 滴下し、46°Cで2時間以上交雑させた。その後、スライドは、48°Cのハイブリダイゼーションバッファー (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.01% SDS) に30分浸し、洗浄を行った。さらに、ウォッシュバッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に室温で5分間洗浄し、スライド上のホルムアミドを除去させた。その後、アンプリファイケーションバッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に蛍光物質を標識したH1及びH2を最終濃度 2.5  $\mu$ M になるように加え、46°Cで2時間交雑させ、シグナル増幅させた。さらに、ウォッシュバッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に4°Cで30分浸し洗浄を行い、MQで1分間、EtOHで1分間浸し、風乾させた。

### 3.2.7. 顕微鏡観察および蛍光強度の算出

FISH 法、CARD-FISH 法及び in situ DNA-HCR 法に用いたサンプルは、褪色防止剤 (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen) で封入後、顕微鏡観察に供した。顕微鏡には、落射蛍光顕微鏡 BX-50 (OLYMPUS), Nikon ECLIPSE 50i (Nikon) を用い、写真の撮影には CCD カメラ DP70 (OLYMPUS), AxioCam HRm (Zeiss) を用いた。各手法の蛍光強度は、1000 cells 以上の微生物を用いて daime software (Daims *et al.*, 2006) により算出した。

### 3.2.8. 熱力学による in situ DNA-HCR 法に用いるプローブの交雑効率の算出

本研究では、HCR 反応におけるプローブの親和性を確認するために、Yilmaz らが提唱している  $\Delta G^0_{\text{overall}}$  を参考にし (Yilmaz and Noguera 2004)、本研究に用いたプローブの  $\Delta G_{\text{overall}}$  を算出した。本研究で用いた算出方法は、付録に記載した。

## 3.3 実験結果及び考察

### 3.3.1 In situ DNA-HCR 法のプロトコルの最適化

当初、本研究は、イニシエータープローブを用いない in situ DNA-HCR法の開発に着手していた。しかしながら、in vitroでは伸長反応を示すものの、in situでは伸長反応を示さず、蛍光の増幅が確認できなかった。そんな中、Choiらは、イニシエータープローブ及びH1及びH2を用いて真核生物のmRNAを検出した報告をした (Choi *et al.*, 2010)。そこで、本研究においてもイニシエータープローブを用いた in situ DNA-HCR法の開発に着手した。Choiら

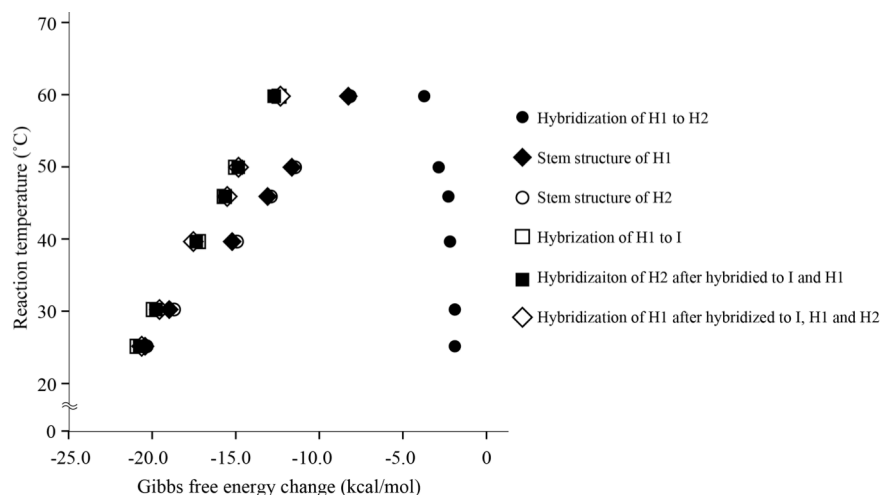


Fig. 3-2 Gibbs free energy change for each temperature and each condition of amplifier probes

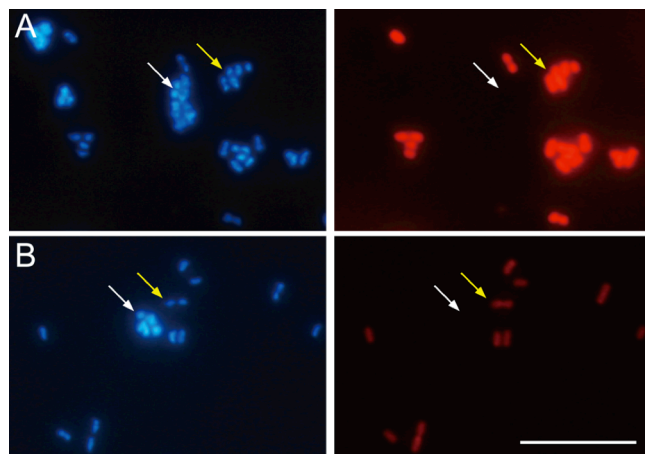
のプロトコルでは、RNAプローブを用いて、イニシエータープローブを50%ホルムアミド、55°Cで16時間交雑させ、H1及びH2による伸長を40%ホルムアミド、45°Cで16時間伸長反応させていた。H1及びH2の交雑条件はイニシエータープローブよりもストリエンジェンシーが低い環境下で行っているが、環境微生物にこの条件を採用した場合、イニシエータープローブの交雑条件に限界が生じ、検出できる微生物が限定されてしまうのではないかと考えた。実際、Choiらのプロトコルと同程度のストリエンジェンシー条件下でH1及びH2による伸長を行ったが蛍光が微弱であった。蛍光が微弱になった要因として、イニシエータープローブよりも高いストリエンジェンシー条件下でH1及びH2による伸長を行うと、交雑したイニシエータープローブが乖離し、H1及びH2の伸長が菌体内で起こらなかった可能性が考えられる。また、高いストリエンジェンシー条件下では、H1及びH2のステム構造が維持することができず、イニシエータープローブの有無によらずH1及びH2のみで伸長反応をしてしまう可能性も考えられた。

そこで、この手法を微生物に適応させるために、FISH法に用いるプロトコルを参考にし、以下の変更を行った。まず、in situ DNA-HCR法に用いるプローブは、操作が容易で分解しにくいDNAプローブを用いた。イニシエータープローブの交雑条件はFISH法と同様条件とし、イニシエータープローブの洗浄方法もFISH法と同様の方法で行った。H1及びH2の交雑条件は、イニシエータープローブの特異性を維持させるためにホルムアミドを添加しないバッファーを用いた。まず、各反応におけるプローブの親和性を確認するために、Yilmazらが提唱している  $\Delta G_{\text{overall}}^0$  を参考にし (Yilmaz and Noguera 2004)、本研究に用いたプローブの  $\Delta G_{\text{overall}}$  を算出した (Fig. 3-2)。その結果、反応温度が高くなるにつれ、H1及びH2自身のステム構造が維持できなくなり、H1とH2のみで伸長しやすい環境になることが明らかとなった。さらに、反応温度が上がるにつれ、H1及びH2自身のステム構造を維持する  $\Delta G$  よりも、イニシエータープローブからH1及びH2が伸長する  $\Delta G_{\text{overall}}$  の方が低くなり、伸長

しやすい環境下になることが明らかとなった。そこで、H1及びH2の伸長温度は、イニシエータープローブが解離しない条件としてイニシエータープローブの交雑条件である46°Cを用いて行った。H1及びH2によるシグナル増幅時間は、2時間以上反応させても蛍光強度に差が見られなかったため、標的微生物に依存せず2時間と一定条件とした。さらに、伸長したH1及びH2を維持させるために、最後の洗浄は低温度条件下で行った。イニシエータープローブ及びH1、H2を交雑させるバッファーはFISH法に用いられるバッファーを参考にし、両バッファー共にSDSを添加した (Behrens *et al.*, 2003)。イニシエータープローブの濃度は、FISH法に用いる濃度と同程度とし、H1及びH2の濃度は最適化を行った結果、2.5 pmol/μlで高い蛍光強度を示したため、H1及びH2の終濃度を2.5 pmol/μlとした。Choiらのプロトコルでは全行程で36時間程度必要であるが、我々が開発したin situ DNA-HCR法の行程時間は、標的微生物や対象サンプルによって異なるが、約6時間程度であり、作業時間を大幅に短縮することに成功した。

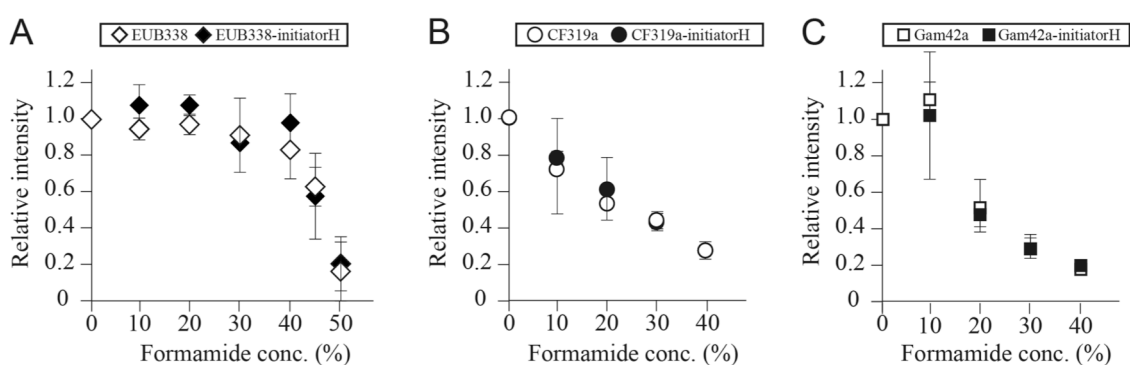
### 3.3.2 In situ DNA-HCR 法の蛍光強度及び特異性

プロトコルの最適化を行った in situ DNA-HCR 法及び FISH 法による *E. coli* の検出結果を **Fig. 3-3** に示す。FISH 法のプロトコルを参考にし、プロトコルの最適化を行った in situ DNA-HCR 法の蛍光強度は、FISH 法で得られる蛍光強度と比較して約 8 倍程度の強さであった。これまでに報告されている分子量が大きい酵素や抗原・抗体を用いない高感度 FISH 法は、DOPE-FISH 法 (Stoecker *et al.*, 2010) もしくは長鎖のプローブであるポリヌクレオチドプローブを用いた FISH 法 (Trebesius *et al.*, 1994) がある。しかし、DOPE-FISH 法の蛍光強度は FISH 法と比較して約 2 倍程度であり、また、ポリヌクレオチドプローブを用いた FISH 法の蛍光強度も特異性を維持させようとする FISH 法と比較して 2 倍程度しか向上しないと報告されている (Trebesius *et al.*, 1994)。また、in situ DNA-HCR 法による蛍光は、イニシエータープローブを交雑しない系では得られなかったことから、本実験で得られた蛍光は H1 及び H2 がイニシエータープローブから特異的に伸長反応を示したことに起因していると考えられる。この結果より、高次構造を有している 16S rRNA においても HCR が起こり、イニシ

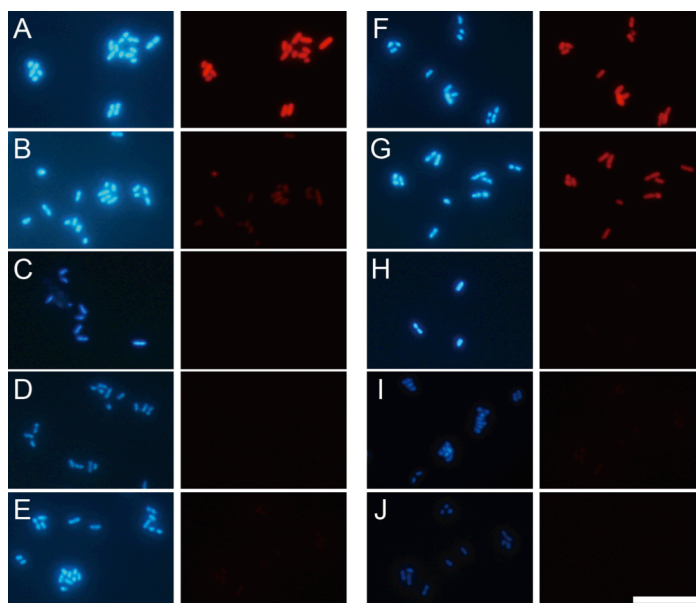


**Fig. 3-3** Photomicrographs of an artificial mixture of *E. coli* and *M. vannielii*. (A) In situ DNA-HCR, (B) FISH. Detection of *E. coli* using Cy3-labeled H1 and H2 (A) or Cy3-labeled EUB338 probe (B). Each double panel depicts DAPI staining (left) and epifluorescence (right) showing identical fields. Exposure times of both method are 100 ms. Yellow arrows indicate *E. coli* cells, and white arrows indicate *M. vannielii* cells. The bar represents 10 μm.

エータープローブから H1 及び H2 が伸長することが明らかとなった。さらに、in situ DNA-HCR 法による蛍光は、標的微生物である *E. coli* のみであり、非標的微生物である *M. vanielii* からは得られなかった (Fig. 3-3)。また、rRNA の代表的な交雑部位である EUB338, CF319a, Gam42a を標的としたイニシエータープローブと FISH プローブのホルムアミド曲線を作成した結果、イニシエータープローブと FISH プローブは、同じ傾向を示した (Fig. 3-4)。従って、イニシエータープローブは、FISH プローブと同等のストリエンジェンシーで交雑が可能であることが明らかとなった。これらの結果から、in situ DNA-HCR 法の特異性は、イニシエータープローブの交雑条件のストリエンジェンシーにより調節が可能であることが明らかとなった。さらに、EUB338 プローブの 1 塩基、2 塩基、3 塩基ミスマッチのイニシエータープローブ (Table 3-1) を用いて in situ DNA-HCR 法の特異性を評価した結果、2 塩基以上のミスマッチプローブでは競合プローブを用いらずとも識別可能であった。また、1 塩基ミスマッチは、競合プローブを用いることで識別することが可能であった (Fig. 3-5)。この結果は、FISH 法に用いるプローブと同じ傾向を示した (Fig. 3-5, Manz *et al.*, 1992)。従って、競合プローブを用いることで FISH 法と同様に特異性を向上させることが出来ることを示している。



**Fig. 3-4** Dissociation curves of the EUB338, CF319a, and Gam42a probes without and with the initiatorH sequence. A: the EUB338 and EUB338-initiatorH probes labeled with AlexaFluor555. B: the CF319a and CF319a-initiatorH probes labeled with Atto550. C: the Gam42a and Gam42a-initiatorH probes labeled with Atto 550. Relative intensity indicates the brightness of the probe at respective formamide concentration relative to the fluorescent intensity of the probe at 0% formamide.



**Fig. 3-5** Detection of *E. coli* cells by in situ DNA-HCR (A–E) or FISH (F–J) at 20% formamide in hybridization buffer. Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). A: EUB338-initiatorH probe and Cy3-labeled amplifier probes, B: EUB338-1MM-initiatorH probe and Cy3-labeled amplifier probes, C: EUB338-1MM- initiatorH probe + a competitor probe (unlabeled EUB338) and Cy3-labeled amplifier probes, D: EUB338-2MM-initiatorH probe and Cy3-labeled amplifier probes, E: EUB338-3MM- initiatorH probe and Cy3-labeled amplifier probes, F: Cy3-labeled EUB338, G: Cy3-labeled EUB338-IV (single mismatch), H: Cy3-labeled EUB338-IV + a competitor probe (unlabeled EUB338), I: Cy3-labeled EUB338-III (two mismatches), J: Cy3-labeled EUB338-II (three mismatches). The exposure times for in situ DNA-HCR and standard FISH were 33 ms and 100 ms, respectively. The bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 In situ DNA-HCR 法の細胞浸透性

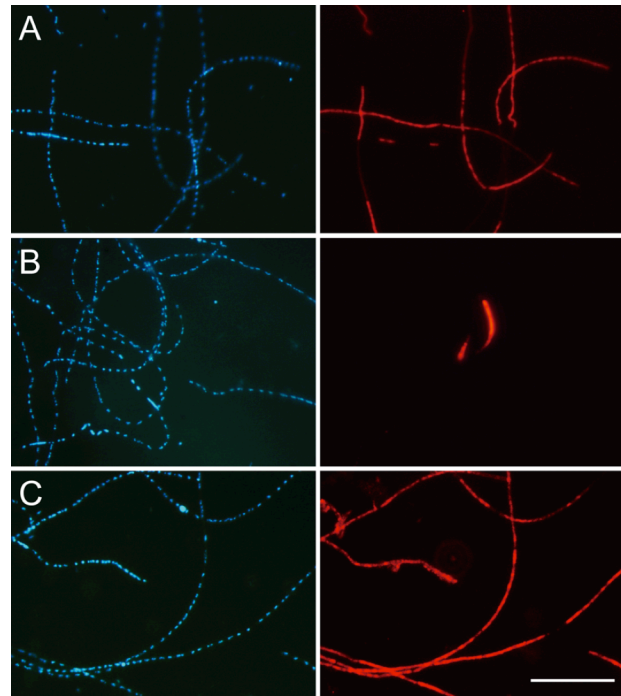
In situ DNA-HCR法の細胞浸透性の評価は、CARD-FISH法を適応させる際、細胞壁処理が必要である*M. concilii*及びFISH法においても細胞壁処理が必須な*B. subtilis*を用いた。本研究では、細胞壁処理を施さず*M. concilii*及び*B. subtilis*の検出を行った。FISH法、CARD-FISH法及びin situ DNA-HCR法を用いて細胞壁処理を施さず*M. concilii*の検出を行った実験結果をFig. 3-6に、*B. subtilis*に対してin situ DNA-HCR法を適用した結果をFig. 3-7に示す。既報で報告されている通り細胞壁処理を施さずCARD-FISH法を*M. concilii*に適応させた結果、プローブの細胞浸透性の問題からすべての*M. concilii*の菌を検出することが困難であった。一方、in situ DNA-HCR法は細胞壁処理を施さずとも*M. concilii*を検出することが可能であった。さらに、グラム陽性菌である*B. subtilis*に細胞壁処理を施さずin situ DNA-HCR法を適用した結果、約30-40%の細胞を検出することが可能であった。また、細胞壁処理を施すことで、すべての*B. subtilis*の菌を検出することが可能であった。グラム陽性菌は細胞壁処理を施さない場合、すべての菌を検出することが困難であり、CARD-FISH法だけでなくFISH法においても蛍光が得られないことが報告されている (Beimfohr *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 2006)。これらの結果は、各手法に用いるプローブの分子量に起因していると考えられ、in situ

DNA-HCR法に用いるプローブの高い細胞浸透性が明らかとなった。また、*B. subtilis* を検出するためには、in situ DNA-HCR法においても細胞壁処理が必要であることが明らかとなった。

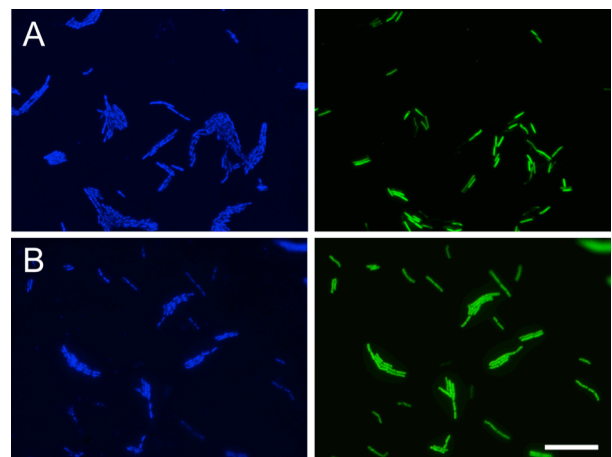
### 3.3.4 本手法の特長と位置づけ

本章では、16S rRNA を標的とした新規視覚的検出技術として in situ DNA-HCR 法の開発を行った。純粋菌株を用いた実験結果より、以下の in situ DNA-HCR 法の特長を明らかにした。1) in situ DNA-HCR 法の蛍光強度は、FISH 法と比較して約 8 倍程度高い。2) in situ DNA-HCR 法に用いるプローブの特異性は、FISH 法に用いるプローブと同程度である。3) in situ DNA-HCR 法に用いるプローブの細胞浸透性は、

CARD-FISH 法に用いるプローブよりも高い。これらの特長と他の高感度 FISH 法の特長を比較した結果を **Table 3-2** に示す。16S rRNA を標的とした高感度 FISH 法における蛍光強度の増幅方法として以下の手法が挙げられる。まず、酵素反応を用いて蛍光増幅する方法、次に、オリゴヌクレオチドプローブまたはポリヌクレオチドプローブに多数の蛍光物質を結合させる方法がある。In situ DNA-HCR 法は、これまでの蛍光増幅技術と異なり、プローブのネットワークを利用した蛍光増幅技術である。また、そのプローブは、CARD-FISH 法に用いるプローブよりも細胞浸透性が高く、高い特異性を有していた。従って、CARD-FISH 法よりも容易に微生物を検出することが可能であると考えられる。さらに、rRNA に交雑するイニシエータープローブは、FISH プローブと同じ配列を用いるため、プローブの設計が容易であり、また、rRNA に交雑する部位に LNA や PNA を挿入するこ



**Fig. 3-6** Detection of axenic *M. concilii* cells (A-C) by FISH (A), CARD-FISH (B), and in situ DNA-HCR (C), without cell wall disruption. Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). Exposure times were adjusted for each method. Bars represent 20  $\mu$ m.



**Fig. 3-7** Detection of *Bacillus subtilis* by in situ DNA-HCR using EUB338-initiatorH and AlexaFluor488 labeled amplifier probes without permeabilization (A), with lysozyme treatment (B). Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). Exposure times were 20 ms. The bar represents 20  $\mu$ m.



とで交雑効率も向上すると考えられる (Kubota *et al.*, 2006; Lehtola *et al.*, 2005)。以上の結果から、本手法は、多々ある高感度 FISH 法の中でも汎用性が高い高感度 FISH 法である。

**Table 3-2** Characteristics of sensitive FISH methods for detecting rRNA in microorganisms

	FISH methods for detecting a rRNA in prokaryotes				
	In situ DNA-HCR	CARD-FISH	DOPE-FISH	Poly-FISH	Oligo-FISH
Signal amplification	Probe network	Enzyme reaction	Double labeling	Multi labeling	Mono labeling
Probe	Oligonucleotide	Oligonucleotide	Oligonucleotide	Polynucleotide	Oligonucleotide
Signal intensity*	8 times	26-41 times	2 times	26 times	1
Specificity	High	High	High	Low	High
Probe permeability	High	Low	High	Low	High
Inactivate of peroxidase activity	No need	Need	No need	No need	No need
Reference	In this study	Hoshino <i>et al.</i> , 2008	Stoecker <i>et al.</i> , 2010	Trebesius <i>et al.</i> , 1994	Amann <i>et al.</i> , 1991

\* : Signal intensity of each method was compared with that of oligo-FISH.

## 参考文献

- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl.** (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* **56**, 1919–1925.
- Amann, R. I.** (1995). In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.3.6**, 1–15.
- Amann, R. I. and Fuchs, B. M.** (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews* **6**, 339–348.
- Behrens, S., Fuchs, B. M., Mueller, F. and Amann, R.** (2003). Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit? *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4935–4941.
- Beimfohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K. H.** (1993) In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci. *Syst Appl Microbiol* **16**:450–456.
- Choi, H. M. T., Chang, J. Y., Trinh, L. A., Padilla, J. E., Fraser, S. E. and Pierce, N. A.** (2010). Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nature biotechnology* **28**(11), 1208–1212.
- Daims, H., Lucker, S. and Wagner, M.** (2006) Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ Microbiol* **8**: 200–213.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R.I., Schleifer, K.-H. and Wagner, M.** (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**: 434–444.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R.** (1989) Phylogenetic stains : Ribosomal

RNA-Based Probes for the Identification of Signal Cells. *Science* **243**, 1360-1363.

**Dirks, R. M., and Pierce, N. A.** (2004). Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proceeding of the National Academy of Science* **101**, 15275-15278.

**Furukawa, K., Hoshino, T., Tsuneda, S. and Inagaki, Y.** (2006). Comprehensive Analysis of Cell Wall-Permeabilizing Conditions for Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization. *Microbes and Environments* **21**(4), 227-234.

**Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H. and Harada, H.** (2006). Improved In Situ Hybridization Efficiency with Locked-Nucleic-Acid-Incorporated DNA Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(8), 5311-5317.

**Kubota, K., Imachi, H., Kawakami, S., Nakamura, K., Harada, H. and Ohashi, A.** (2008). Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *Journal of Microbiological Methods* **72**(1), 54-59.

**Kubota, K.** (2013). CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes and Environments* **28**(1), 3-12.

**Lehtola, M. J., Loades, C. J. and Keevil, C. W.** (2005). Advantage of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter lari. *Journal of Microbiological Methods* **62**, 211-219.

**Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.-H.** (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**: 593 – 600.

**Manz W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. and Schleifer, K.-H.** (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiol* **142**: 1097-1106.

**Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. I.** (2002) Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3094-3101.

**Rosenthal, A. Z., Zhang, X., Lucey, K. S., Ottesen, E. A., Trivedi, V., Choi, H. M. T., Pierce, N. A. and Leadbetter, J. R.** (2013). Localizing transcripts to single cells suggests an important role of uncultured deltaproteobacteria in the termite gut hydrogen economy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(40), 16163-16168.

**Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. & Amann, R. I.** (1997). Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 3268–3273.

**Sekiguchi, Y., Takahashi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A. and Harada, H.** (2001) In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5740–5749.

**Schmid, M. C., Maas, B., Dapena, A., van de Pas-Schoonen, K., van de Vossenberg, J., Kartal, B., van Niftrik, L., Schmidt, I., Cirpus, I., Kuenen, J. G., Wagner, M., Damste, J. S. S., Kuypers, M., Revsbech, N. P., Mendez, R., Jetten, M. S. and Strous M.** (2005) Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1677-1684.

**Stahl, D.A., and Amann R.** (1991) Development of application of nucleic acid probes. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. Stackebrandt E and Goodfellow M (eds). Chichester, UK: John Wiley and Sons, 205-248.

**Stoecker, K., Dorninger, C., Daims, H. and Wagner, M.** (2010). Double Labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (DOPE-FISH) Improves Signal Intensity and Increases rRNA Accessibility. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(3), 922-926.

**Trebesius, K., Amann, R., Ludwig, W., Mühlegger, K. and Schleifer, K-H.** (1994). Identification of Whole Fixed bacterial Cells with Nonradioactive <sup>32</sup>S rRNA-Targeted Polynucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(9), 3228-3235.

**Yilmaz, L.S. and Noguera, D.R.** (2004). Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 7126–7139.

## 第 4 章

# rRNA を標的とした in situ DNA-HCR 法による 環境微生物の検出

Tsuyoshi Yamaguchi, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Masanobu Takahashi, Hiroyuki Imachi, Nobuo Araki, Takashi Yamaguchi and Kengo Kubota. In situ DNA-HCR : A facilitated in situ hybridization chain reaction system for the detection of environmental microorganisms. *Environmental Microbiology, Accepted.*

---

## 第4章 rRNA を標的とした In situ DNA-HCR 法による環境微生物の検出

### 4.1 はじめに

FISH 法は、環境中に生息している微生物を特異的かつ視覚的に検出することができる唯一の手法である (Amann *et al.*, 1995; Amann and Fuchs 2008)。これまでに、FISH 法は嫌気性グラニュールの空間分布の解明や様々な環境下における標的微生物の存在数の解明に使用されている (Sekiguchi *et al.*, 1999)。しかしながら、rRNA を標的とした FISH で得られる蛍光強度は、菌体内に存在している rRNA 数に依存することが知られている (DeLong *et al.*, 1989)。従って、海洋や土壌等、貧栄養環境下に生息し rRNA 存在数が少ない微生物は、FISH 法では検出が困難な場合がある (Amann and Fuchs, 2008)。このような背景の中、酵素反応を用いて蛍光強度を増幅させる高感度 FISH 法として CARD-FISH 法が報告された (Schönhuber *et al.*, 1997)。CARD-FISH 法の蛍光強度は、FISH 法と比較して 26-41 倍程度であり、FISH 法では視覚的な検出が困難な環境微生物の検出を可能にした (Hoshino *et al.*, 2008; Pernthaler *et al.*, 2002)。CARD-FISH 法による微生物の検出は、分子量が蛍光物質よりも大きい酵素 (*e.g.* AlexaFluor488 : 643 Da, horseradish peroxidase : 40 kDa) を細胞内に浸透させる必要がある (Thiele *et al.*, 2011; Amann and Fuchs 2008)。細胞浸透性を向上させる細胞壁処理方法は、これまでにリゾチームやプロテイナーゼ K 等の加水分解酵素を用いた化学的な処理方法や凍結融解等の物理的な処理方法が報告されている (Kubota 2013)。しかしながら、細胞壁処理の効果は標的微生物により異なることが知られており、標的微生物により細胞壁処理を最適化しなければならない。また、環境微生物の中には一般的な細胞壁処理方法では効果を示さない微生物も存在している (Kubota *et al.*, 2008)。特に、メタン菌の特徴的な細胞壁構造である S-レイヤー、シース、シュードムレインやメタノコンドロイチンは、微生物種によって異なることが知られており、細胞壁処理の最適化が困難である (Kubota *et al.*, 2008)。これまでにいくつかの新規の細胞壁処理方法が報告されているが (Kubota 2013)、すべての微生物に効果を示す処理方法が報告されていないのが現状である。従って、細胞壁処理の効果が期待できない微生物は、従来の高感度 FISH 法では検出が困難であると考えられる。このような背景の中、筆者は従来の高感度 FISH 法よりも細胞浸透性が高い高感度 FISH 法の開発を目指し、in situ DNA-HCR 法の開発を行った (第3章参照)。本章では、筆者が開発した新規の高感度 FISH 法である in situ DNA-HCR 法を環境微生物に適用させ、環境微生物に対する適用可能性について評価を行った結果を示す。標的微生物は、代表的な貧栄養環境下である海洋中に生息している細菌、また細胞壁処理の最適化が困難であるメタン菌が多く存在している嫌気性汚泥及び嫌気性消化汚泥内の古細菌とした。In situ DNA-HCR 法の環境微生物への適用可能性は、FISH 法、CARD-FISH 法、in situ DNA-HCR 法による標的微生物の検出率の比較を行い評価した。さらに、in situ DNA-HCR 法による多重染色方法を嫌気性消化汚泥内の細菌、古細菌、*Methanosaetaceae* 科のメタン生成古細菌に適用させ、in situ DNA-HCR 法による多重染色の適用可能性につい

でも確認した。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1. モデル微生物の選定および調整

本章で標的とした環境微生物は、海洋中に生息している細菌及び嫌気性汚泥及び嫌気性消化汚泥内に生息している古細菌とした。海洋サンプルは、新潟県柏崎市の防波堤 (北緯 37 度 32 分、東経 138 度 40 分) から採取した。採取したサンプルは、最終濃度 2%パラホルムアルデヒドで 4°C、12 時間の固定を行った。固定したサンプルは、メンブレンフィルター (pore size :3µm) を用いて砂利等を除去し、メンブレンフィルター (pore size : 0.2 µm) を用いて海洋中に生息している細菌を集菌した後、-20°C で保存した。嫌気性汚泥は、長岡中央浄化センターに設置してある upflow anaerobic sludge blanket (UASB) から採取した。また、嫌気性消化汚泥は、長岡中央浄化センターに設置してある中温消化槽から採取した。採取したサンプルは、遠心分離器を用いて集菌した後、4% パラホルムアルデヒドで 4°C、12 時間の固定を行った後、EtOH と PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4]) を 1:1 で混合させた溶液中で-20°C で保存した。

### 4.2.2. プローブの選定

本章で用いたプローブを **Table 4-1** に示す。In situ DNA-HCR 法の多重染色に用いたプローブは、細菌を標的とした EUB338-initiatorH、古細菌を標的とした ARC915-initiatorC 及び *Methanosetaeaceae* 科のメタン菌を標的とした MX825-initiatorR である。また、各イニシエータープローブから伸長反応を示す伸長プローブとして H1, H2 及び C1, C2 及び R1, R2 を使用した。

### 4.2.3. 細胞壁処理

プローブの細胞浸透性を向上させるために、海洋サンプルにはリゾチーム (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) による細胞壁処理を 37°C で 30 分間行った。その後、TNT バッファー (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) に 15 分間、MQ に 1 分間浸し、最後に EtOH に 1 分間浸して脱水、乾燥させた。

### 4.2.4. FISH 法

FISH 法は Sekiguchi らの方法の準拠した (Sekiguchi *et al.*, 2001)。まず、固定サンプルを低融点アガロースで包埋した (Perenthaler *et al.*, 2002)。アガロースで包埋したサンプルは、60°C で乾燥後、EtOH シリーズ (50、80、96%) に 3、1、1 分間浸して脱水を行った。次に、最終濃度 0.5 µM の蛍光物質を標識したプローブを含むハイブリダイゼーション (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.05% SDS) を各穴に 15 µl 滴下し、46°C で 2 時間以上

Table 4-1 Probes in this study

Probe name	Probe sequence (5'-3') <sup>*1</sup>	Labeling	%FA <sup>*2</sup>	Reference
<b><u>FISH and CARD-FISH</u></b>				
EUB338	GCTGCCTCCCCTAGGAGT	Cy3 or HRP	20	Amann <i>et al.</i> , 1990
ARC915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Cy3 or HRP	40	Stahl <i>et al.</i> , 1991
<b><u>In situ DNA-HCR</u></b>				
<i>Initiator probe</i>				
EUB338-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGAAAAAAGCTGCCTCCCCTAGGAGT</u>	-	20, 40	This study
ARC915-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGAAAAAAGCTGCCTCCCCTAGGAGT</u>	-	40	This study
ARC915-initiatorC	<u>CCAGTTATCAGTAGTCCGTCCTTCATTTTTTGTGCTCCCCCGCCAATTCCT</u>	-	40	This study
MX825-initiatorR	<u>TACGCCCTAAGAATCCGAACCCCTAIGAAATATCGCACCCGTGGCCGACACCTAGC</u>	-	40	This study
<i>Amplifier probe</i>				
H1	<u>TCTAGTCTGTTgagctcttatttggCGACAGATAAcgaatacaagaate</u>	Cy3 or Alexa555	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>
H2	<u>ccgaatacaagaateAACGACTAGAgatcttttatttggTTATCTGTCTG</u>	Cy3 or Alexa555	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>
C1	<u>ATGAAGGACGgactactgataactggGACTTCCATAccagttatcagtagtc</u>	Alexa488	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>
C2	<u>ccagttatcagtagtcCGTCTTCATgactactgataactggTATGGAAATC</u>	Alexa488	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>
R1	<u>CATAGGGTTcggattcttagggcgtgGCAGCATCAAtacgccctaagaatcc</u>	Alexa647	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>
R2	<u>tacgccctaagaatccGAACCCCTATGggattcttagggcgtgTTGATGCTGC</u>	Alexa647	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>*3</sup>

<sup>\*1</sup> Double underlined sequences are the initiator sequences.

Grey boxes show the mismatch (MM) sequence.

Lowercase letters represent stem structure of amplifier probe.

Underlined sequence of H1, C1 and R1 are complementary to the initiator sequences of initiatorH, initiatorC and initiatorR, respectively.

<sup>\*2</sup> %FA shows formamide concentration (v/v).

<sup>\*3</sup> Probe sequences were changed to DNA probe from RNA probe.

交雑させた。その後、スライドを 48°C のハイブリダイゼーションバッファーに浸し、30 分間の洗浄を行った。最後に、MQ で 1 分間、EtOH で 1 分間浸し、風乾させた。フィルター上における FISH 法は、固定サンプルを集菌しているフィルターを 8 分の 1 にカットし、上述した手順で行った。

#### 4.2.5. CARD-FISH 法

CARD-FISH 法は、Kubota らの方法に準拠した (Kubota *et al.*, 2008)。まず、固定サンプルを低融点アガロースで包埋した (Pernthaler *et al.*, 2002)。アガロースで包埋したサンプルは、60°C で乾燥後、EtOH シリーズ (50、80、96%) に 3、1、1 分間浸して脱水を行った。細胞壁処理を行った後、最終濃度 0.1  $\mu\text{M}$  の HRP 標識プローブを含むハイブリダイゼーション (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.05% SDS, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent) を各穴に 15  $\mu\text{l}$  滴下し、40°C で 2 時間以上交雑させた。その後、スライドを 42°C のハイブリダイゼーションバッファーに浸し、15 分間の洗浄を行った。プローブの洗浄後、TNT バッファーに 15 分間浸し、平衡化させ、TSA 反応に供した。TSA 反応は、Cy3 を標識したチラミドを用いて行った。チラミド反応液は、1 volume の標識チラミド、37.5 volume のアンプリファイケーションバッファー (NEN life science)、12.5 volume の 40% dextran sulfate、0.5 volume の 10% blocking reagent を混合させ、各穴に 10  $\mu\text{l}$  滴下し、37°C で 10 分間反応させた。TSA 反応後は、TNT バッファーに 15 分間浸し、MQ で 1 分間及び EtOH で 1 分間浸して脱水及び風乾させた。フィルター上における CARD-FISH 法は、固定サンプルを集菌しているフィルターを 8 分の 1 にカットし、上述した手順で行った。

#### 4.2.6. In situ DNA-HCR 法

固定サンプルは、低融点アガロースを用いて包埋した (Pernthaler *et al.*, 2002)。低融点アガロースで包埋したサンプルは、60°C で乾燥後、50、80、96 % の EtOH にそれぞれ 3、1、1 分に浸して脱水を行った。ハイブリダイゼーションバッファー 1 (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.01% SDS) に最終濃度 0.5  $\mu\text{M}$  になるように initiator プローブを混合させ、各穴に 15  $\mu\text{l}$  滴下し、46°C で 2 時間以上交雑させた。その後、スライドは、48°C のハイブリダイゼーションバッファー (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.01% SDS) に 30 分浸し、洗浄を行った。さらに、洗浄バッファー (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に室温で 5 分間洗浄し、スライド上のホルムアミドを除去させた。その後、アンプリファイケーションバッファー (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に蛍光物質を標識した H1 及び H2 を最終濃度 2.5  $\mu\text{M}$  になるように加え、46°C で 2 時間交雑させ、シグナル増幅させた。さらに、洗浄バッファー (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に 4°C で 30 分浸し洗浄を行い、MQ で 1 分間、EtOH で 1 分間浸し、風乾させた。フィルター上における in situ DNA-HCR 法は、固定サンプルを集菌しているフィルターを 8 分の 1



にカットし、上述した手順で行った。

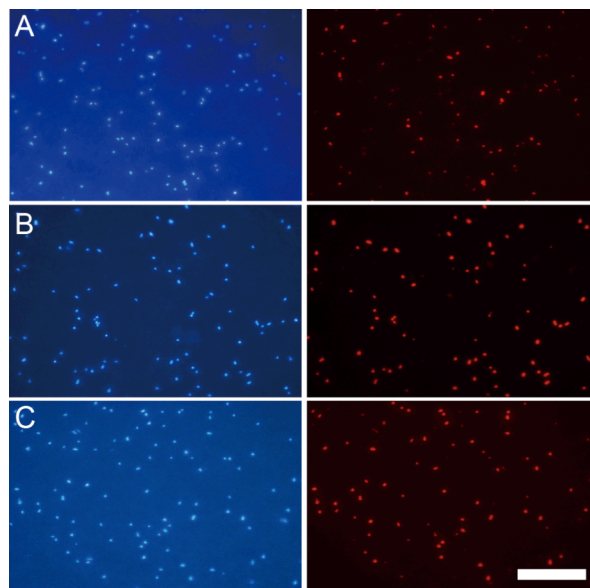
#### 4.2.7. 顕微鏡観察および検出率の算出

FISH 法、CARD-FISH 法及び in situ DNA-HCR 法に用いたサンプルは、褪色防止剤 (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen) で封入後、顕微鏡観察に供した。顕微鏡には、落射蛍光顕微鏡 BX-50 (OLYMPUS) もしくは Axio Imager.M2, Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) を用い、写真の撮影には CCD カメラ DP70 (OLYMPUS, Japan) もしくは AxioCam HRm, Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) を用いた。各手法による検出率は、DAPI 蛍光を全菌と定義し、プローブから得られる蛍光を標的微生物と定義して全菌数から標的微生物数を除して算出を行った。すべての実験は 2 回行った。系統的な比較は、t 検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を用いて行った。

### 4.3 実験結果及び考察

#### 4.3.1 In situ DNA-HCR 法による環境微生物の検出

標的微生物は、貧栄養環境下であり低 rRNA 含有量である海洋中に生息している細菌 (Pernthaler *et al.*, 2002) 及び最適な細胞壁処理の選定が困難であるメタン生成古細菌が多数存在している嫌気性汚泥中の古細菌 (Kubota *et al.*, 2008) とした。FISH 法、CARD-FISH 法及び in situ DNA-HCR 法で得られた海洋中に生息している細菌の検出率及び嫌気性汚泥内の古細菌の検出率を **Table 4-2** に、また、細胞壁処理を施さず各手法による海洋中に生息している細菌を検出した結果を **Fig. 4-1** に示す。まず、FISH 法による海洋中に生息している細菌の検出率は、細胞壁処理を施しても約 65%程度であった。一方、細胞壁処理を施した場合の CARD-FISH 法及び in situ DNA-HCR 法による細菌の検出率は、同程度であり約 88%程度であった ( $P > 0.05$ )。FISH 法による細菌の検出率が低い要因として、一部の海洋中に生息している細菌は FISH 法による検出限界以下の rRNA 含有量しか有していないことが考えられる。細胞壁処理を施さない場合、in situ DNA-HCR 法による検出率は、CARD-FISH 法よりも高い検出率を示した。In situ



**Fig. 4-1** Photomicrographs of EUB338-hybridized marine bacteria by FISH using Cy3-labeled EUB338 (A), CARD-FISH using HRP-labeled EUB338 and tyramide-Cy3 (B), and in situ DNA-HCR using EUB338-initiatorH and Cy3-labeled amplifier probes (C), without permeabilization. Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). Exposure times were adjusted for each method. The bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

**Table 4-2** Detection rate (%) of *Bacteria* and *Archaea* in seawater or anaerobic sludge sample as determined by FISH, CARD-FISH and in situ DNA-HCR with and without cell permeabilization.

Target group	<i>Bacteria</i>		<i>Archaea</i>	
	Seawater		Anaerobic granular sludge	Anaerobic digester sludge
Cell wall treatment	- <sup>*1</sup>	+ <sup>*2</sup>	-	-
FISH	57.6 (6.2) <sup>*3</sup>	64.8 (0.7)	21.5 (3.6)	13.7 (1.3)
CARD-FISH	68.5 (3.5)	87.6 (6.4)	8.9 (2.9)	17.9 (0.9)
In situ DNA-HCR	80.1 (4.8)	88.1 (3.0)	17.7 (3.4)	27.2 (1.7)

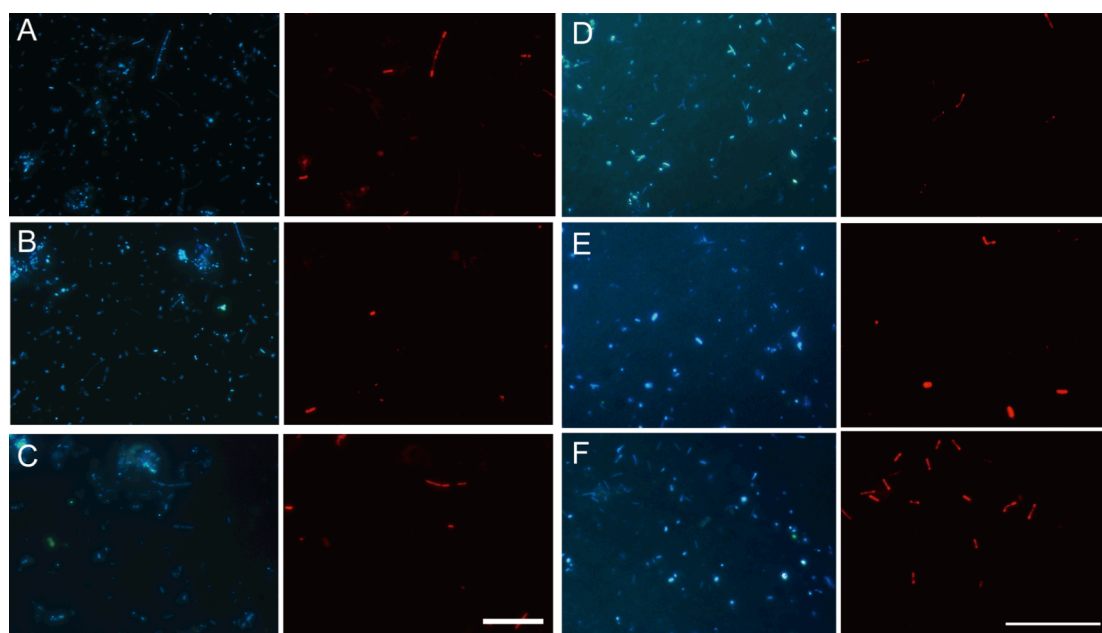
<sup>\*1</sup> - : Without cell wall treatment.

<sup>\*2</sup> + : Lysozyme treatment (1 mg·ml<sup>-1</sup> for 30 min at 37°C).

<sup>\*3</sup> Values in parentheses are standard deviation.

DNA-HCR 法が細胞壁処理を施さずとも高い検出率を達成できた要因として、in situ DNA-HCR 法に用いるプローブが CARD-FISH 法に用いるプローブよりも高い細胞浸透性を有していることが考えられる。これらの結果から、in situ DNA-HCR 法は CARD-FISH 法と同様に高感度 FISH 法として適用することが可能であり、CARD-FISH 法に用いるプローブよりも高い細胞浸透性を有していることが実サンプルをもって証明された。

次に、最適な細胞壁処理の選定が困難であるメタン生成古細菌が多数存在している嫌気性グラニュール汚泥内及び嫌気性消化汚泥内の古細菌を in situ DNA-HCR 法を用いて検出した。細胞壁処理を施さず、各手法を適用し嫌気性グラニュール汚泥中の古細菌及び嫌気性消化性汚泥内の古細菌を検出した結果を **Fig. 4-2** に示す。通常、嫌気性グラニュール汚泥中に生息している微生物は、微生物の活性が高く FISH 法による検出が容易である場合が多いことが知られている (Sekiguchi *et al.*, 1999)。従って、本研究で得られた FISH 法による古細菌の検出率は、約 22%であり、細胞壁処理を施していない CARD-FISH 法による検出率 (約 9%) と比較して高かった。次に、in situ DNA-HCR 法を用いて細胞壁処理を施さず古細菌を検出した結果、古細菌の検出率は、約 18%であり細胞壁処理を施していない CARD-FISH 法による検出率よりも高く、FISH 法による古細菌の検出率と同程度であった ( $P>0.05$ )。In situ DNA-HCR 法による古細菌の検出率が FISH 法による検出率と同程度であった要因として、in situ DNA-HCR 法に用いるプローブの細胞浸透性が FISH 法に用いるプローブの細胞浸透性と同程度であることに起因していると考えられる。さらに、嫌気消化汚泥中の古細菌に in situ DNA-HCR 法を適用させた結果、in situ DNA-HCR 法による古細菌の検出率は、FISH 法および CARD-FISH 法よりも高かった。In situ DNA-HCR 法が一番高い検出率を示した要因として、嫌気性消化汚泥中の微生物の低 rRNA 含有量が考えられる。本研究で得られた FISH 法による古細菌の検出率は、13.7%程度であり FISH 法では視覚的に検出する十分な蛍光が得られなかったと考えられる。一方で、高感度 FISH 法である in situ DNA-HCR 法による嫌気性消化汚泥内の古細菌の割合は、27.2%程度であり高い検出率を示した。CARD-FISH 法による古細菌の検出率は、プローブの細胞浸透性の問題から約 17.9%



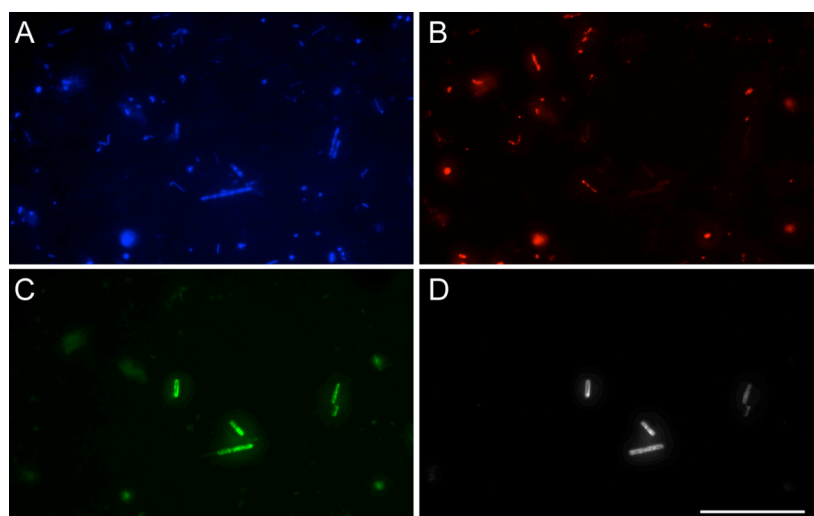
**Fig. 4-2** Detection of *Archaea* in anaerobic granular sludge sample (A-C) and anaerobic digester sludge sample (D-F). (A and D) : FISH, (B and E) : CARD-FISH, (C and F) : in situ DNA-HCR. Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). Exposure times were adjusted for each method. The bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

程度にとどまった。

以上の結果より、in situ DNA-HCR 法が環境中に生息している rRNA 含有量が少ない環境微生物の検出に有効であることが明らかとなった。

#### 4.3.2 In situ DNA-HCR 法による環境微生物の多重染色

次に、in situ DNA-HCR 法による環境微生物の多重染色を試みた。FISH 法による環境微生物の多重染色は、すでにルーティンとなっており、これまでに嫌気性グラニュールの生態解明 (Sekiguchi *et al.*, 1999) や生物学的排水処理汚泥内の微生物叢の解析 (Levantesi *et al.*, 2002) に適用されている。また、CARD-FISH 法を用いた多重染色も報告されており、視覚的な微生物生態の表現方法の一つとなっている (Schreiber *et al.*, 2010; Pernthaler *et al.*, 2008)。そこで、in situ DNA-HCR 法による多重染色を目指し、嫌気性消化汚泥内の細菌、古細菌及び *Methanosaetaceae* 科のメタン生成古細菌の同時検出を行った。その結果、細菌、古細菌及び *Methanosaetaceae* 科のメタン生成古細菌を標的とした in situ DNA-HCR 法から特異的な蛍光が得られた (**Fig. 4-3**)。また、その蛍光は、イニシエータープローブを用いていない系からは得られなかった (データ非表示)。この結果から、伸長プローブが各イニシエータープローブから特異的に伸長反応を示したと考えられる。これまでに、プローブのネットワークを用いた高感度 FISH 法である RING-FISH 法が報告されているが (Zwirgmaier *et al.*, 2004)、プローブの特異性の問題から rRNA に対して適用されていない。また、酵素反応を用いた CARD-FISH 法による多重染色は、標的微生物の検出ごとにプロ



**Fig. 4-3.** Simultaneous detection of Bacteria, Archaea, and Methanosaetaceae in anaerobic digester sludge using multiplex in situ DNA-HCR. All cells were stained with DAPI (blue) (A). In situ DNA-HCR detection of *Bacteria* by targeting the EUB338 site with AlexaFluor555-labeled amplifier probes (red) (B). In situ DNA-FISH detection of *Archaea* by targeting the ARC915 site with AlexaFluor488-labeled amplifier probes (green) (C). In situ DNA-FISH detection of *Methanosaetaceae* by targeting the MX825 site with AlexaFluor647-labeled amplifier probes (white) (D). Bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

ープに標識した酵素を失活させる操作が必要であり、操作の煩雑さや高いバックグラウンドが得られる等の問題が報告されている (Pernthaler *et al.*, 2004)。一方、in situ DNA-HCR 法に用いる伸長プローブによる蛍光増幅は、各イニシエータープローブ配列に依存的に起こるため、同時に多数の蛍光を増幅させることが可能である。従って、各イニシエータープローブのストリンジェンシーが同等である場合、in situ DNA-HCR 法による多重染色は、イニシエータープローブの交雑及び伸長プローブによる蛍光増幅の 2 回のみの操作で可能であるため、CARD-FISH 法よりも容易である。

#### 4.4 まとめ

本章では、in situ DNA-HCR 法による環境微生物の検出の適用可能性の評価及び多重染色法の検討を行った。まず、in situ DNA-HCR 法を用いて環境微生物を検出した結果、in situ DNA-HCR 法は、FISH 法では検出が困難である海洋中の細菌や嫌気性消化汚泥内の古細菌を検出することが可能であった。さらに、細胞壁処理を施すことで in situ DNA-HCR 法による海洋中の細菌の検出率が向上した。従って、in situ DNA-HCR 法においても細胞壁処理を施すことで更に環境微生物の検出が容易になることが明らかとなった。CARD-FISH 法に用いるプローブよりも細胞浸透性が高い本手法は、CARD-FISH 法を適用するための細胞壁処理の最適化が困難な微生物の検出に特に有効であると考えられる。次に、本章では in situ DNA-HCR 法を用いた多重染色法についても報告した。これまでの高感度 FISH 法による多重染色は、煩雑な操作が必要であったが、in situ DNA-HCR 法を用いることで CARD-FISH

法よりも容易な操作で多重染色することが可能になった。

#### 4.5 今後の展望

今後の展開としては、本手法を現在著しく成長している微生物回収技術と組み合わせ、シングルセルジェノミクス解析への適用を考えている。これまでに、高感度 FISH 法と微生物回収技術を組み合わせた報告はされているものの (Sekar *et al.*, 2004)、微生物回収後にシングルセルジェノミクス解析を行った報告はされていない。これは、これまでの高感度 FISH 法では、DNA にダメージをあたえる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や HCl を用いる手法であること、ゲノム解析を行うためには固定作業を除く必要があることに起因している。In situ DNA-HCR 法は、細胞浸透性が高く、さらに DNA にダメージを与える試薬を用いない手法であるため、従来手法では困難であったシングルセルジェノミクス解析への適用が可能になると考えている。また、固定していない死滅した菌体に対して通常の FISH 法を適用できることも報告されている (Amann and Fuchs 2008)。従って、通常の高感度 FISH 法よりもプローブの細胞浸透性が高い本手法を通常の FISH 法のように死滅した細菌に適用できれば、シングルセルジェノミクス解析も可能になるのではないかと考えている。その他、DOPE-FISH 法のように H1 及び H2 に蛍光物質をマルチラベルリングすることで、DOPE-FISH 法 (Stoecker *et al.*, 2010) や CLASI-FISH 法 (Valm *et al.*, 2011) のような多重染色も可能ではないかと考えている。

#### 参考文献

- Amann, R. I. (1995). In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.3.6**, 1–15.
- Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* **56**(1), 919–1925.
- Amann, R. I. and Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews* **6**, 339–348.
- Choi, H. M. T., Chang, J. Y., Trinh, L. A., Padilla, J. E., Fraser, S. E. and Pierce, N. A. (2010). Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nature biotechnology* **28**(11), 1208–1212.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R. (1989) Phylogenetic stains : Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Signal Cells. *Science* **243**, 1360–1363.
- Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. and Wagner, M. (2008) Quantification of Target Molecules Needed To Detect Microorganisms by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Catalyzed Reporter Deposition-FISH, *Applied and Environmental Microbiology* **74**,

---

5068-5077.

**Kubota, K., Imachi, H., Kawakami, S., Nakamura, K., Harada, H. and Ohashi, A. (2008).** Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *Journal of Microbiological Methods* **72**(1), 54-59.

**Kubota, K. (2013).** CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes and Environments* **28**(1), 3-12.

**Levantesi, C., Seraçm, L.S., Crocettii, G.R., Lemos, P.C., Rossetti, S., Blackall, L.L., Reis, M.A.M. and Tandoi, V. (2002).** Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor. *Environmental Microbiology* **46**, 195-198.

**Pernthaler, A. and Amann, R. (2004).** Simultaneous Fluorescence In Situ hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(9), 5426-5433.

**Pernthaler, A., Dekas, A. E., Brown, C. T., Goffredi, S. K., Embaye, T, and Orphan, V. J. (2008).** Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proceeding of the National Academy of Science* **105**(16), 7052-7057.

**Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. I. (2002)** Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporer Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3094-3101.

**Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. & Amann, R. I. (1997).** Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3268-3273.

**Schreiber, L., Holler, T., Knittel, K., Meyerdierks, A. and Amann, R. (2010).** Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs of the ANME-2 clade. *Environmental Microbiology* **12**(8), 2327-2340.

**Sekar, R., Fuchs, B. M., Amann, R. I. and Pernthaler, J. (2004.).** Flow Sorting of Marine Bacterioplankton after Fluorescence in situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(10), 6210-6219.

**Sekiguchi, Y., Takahashi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A. and Harada, H. (2001)** In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5740-5749.

**Stahl, D.A., and Amann R. (1991)** Development of application of nucleic acid probes. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. Stackebrandt E and Goodfellow M (eds). Chichester, UK: John Wiley and Sons, 205-248.

**Stoecker, K., Dorninger, C., Daims, H. and Wagner, M. (2010).** Double Labeling of

Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (DOPE-FISH) Improves Signal Intensity and Increases rRNA Accessibility. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(3), 922-926.

**Thiele, S., Fuchs, B. M. and Amann R.** (2011). Identification of Microorganisms using the Ribosomal RNA approach and Fluorescence in situ hybridization. p 171–189. Edited by Wilderer P, Treatise on water science. Elsevier, Oxford.

**Valm, A.M., Welch, J.L.M., Rieken, C.W., Hasegawa, Y., Sogin, M.L., Oldenbourg, R., Dewhirst, F.E. and Borisy, G.G.** (2011) Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**, 4152–4157.

**Zwirgmaier, K., Ludwig, W. and Scheifer, K-H.** (2004). Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization—RING-FISH. *Molecular Microbiology* **51**, 89–96.

## 第 5 章

### 微生物の mRNA を標的とした in situ dual DNA-HCR 法の開発及び特長

Tsuyoshi Yamaguchi, Kyohei Ohmiya, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Kengo Kubota, Nobuo Araki and Takashi Yamaguchi. Visualization of mRNA in a toluene degrading bacteria by in situ DNA-hybridization chain reaction systems. In preparation

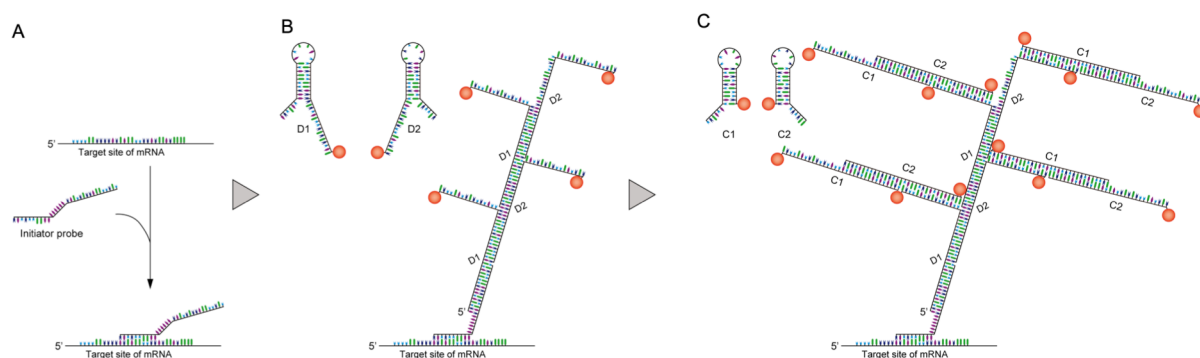


---

## 第5章 微生物の mRNA を標的とした in situ dual DNA-HCR 法の開発及び特長

### 5.1 はじめに

FISH 法は、微生物内の 16S rRNA を標的として視覚的かつ特異的に検出することができる手法である (Amann and Fuchs, 2008)。FISH 法に限らず環境微生物を同定する場合、主に 16S rRNA 遺伝子を標的とした方法が用いられている (Woese 1987)。しかしながら、環境微生物の中には特定のタンパク質をコードしている機能遺伝子が他の微生物に移動する水平伝播を行う微生物が報告されている (Hendrickx *et al.*, 2006; Okunishi *et al.*, 2012)。特に、脱窒細菌群や BTEX を生物学的に分解する微生物群は、水平伝播を行うと報告されており、系統学的に多様性が大きいと知られている (Hendrickx *et al.*, 2006; Okunishi *et al.*, 2012)。従って、これら微生物は、16S rRNA 遺伝子に基づく解析では特定の機能を有しているのか判断することが困難である。このような微生物の機能を把握する場合、特定の機能を有した機能遺伝子やその遺伝子からの転写物 (mRNA)、タンパク質を標的とした手法が用いられている。また、近年では環境中に存在する DNA や mRNA、タンパク質を網羅的に解析できるメタゲノム解析やメタトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析により in situ にどのような遺伝子が存在しているのか容易に把握できるようになった (Handelsman 2004)。FISH 法は、微生物内の特定の分子を視覚的に検出できる手法であるため、in situ における微生物の空間分布等の把握に有効である。しかしながら、通常の FISH 法では、蛍光強度が標的とする分子量に依存するため、機能を把握することで可能な mRNA ( $10^1$ - $10^2$  copies/cells) や機能遺伝子 (1-10 copies/cell) を検出することが困難である。従って、このような存在数が少ない分子は、高感度 FISH 法を適用することで視覚的に検出している (Pernthelaer *et al.*, 2004; Kawakami *et al.*, 2011; Kubota *et al.*, 2006; Moraru *et al.*, 2012; Zweigner *et al.*, 2004; Mota *et al.*, 2012; etc)。近年では、click chemistry を利用し標的タンパク質を視覚的に検出する手法も報告されている (Hatzenpichler *et al.*, 2014)。このような報告が示すように、視覚的に微生物機能を検出しその微生物を把握することは、in situ における微生物生態を把握する上で非常に重要である。しかしながら、従来の高感度 FISH 法では作業の複雑さや細胞浸透性や特異性の問題等が報告されており、汎用性が高いとは言えないのが現状である (第2章参照)。さらに、酵素を増幅に用いる従来の方法では、菌体内の内在性活性を失活させる必要があり、失活方法をサンプルごとに最適化する必要がある (Kubota 2013)。そこで、本研究では、操作が容易で細胞浸透性や特異性の問題を解決し、さらに内在性活性の失活方法の最適化が必要ない in situ DNA-HCR 法を用いて新規の mRNA 検出技術の開発を試みた。存在数が少ない mRNA を視覚的に検出するためには、1) 十分な蛍光強度の確保、2) プローブの特異性の確保、が必要である。そこで、まず、in situ DNA-HCR 法の更なる蛍光増幅を目指し、2度の伸長反応による蛍光増幅を行う in situ dual DNA-HCR 法を開発を行った (Fig. 5-1)。伸長プローブは、2回の伸長反応を示すように、H1 及び H2 に新たな伸長基点 (initiatorC) を挿入した D1 及び D2 を使用し、D1 及び D2 から伸長を示



**Fig. 5-1** Principle of in situ dual DNA-HCR. (A) Initiator probe hybridized to target mRNA. (B) D1 and D2 are amplified from initiator probe. (C) C1 and C2 are amplified from initiator sequence of D1 and D2.

す C1 及び C2 を用いた。標的とした mRNA は、トルエン分解微生物の toluene 4-monooxygenase gene から発現する *tmoA* mRNA の検出及び toluene dioxygenase の一部の遺伝子から発現する *todC* mRNA とした (Hendorickx *et al.*, 2006)。トルエン分解菌を標的微生物に選定した要因を以下に示す。1) トルエン分解能を有する微生物の特異的な検出にはトルエン分解に関与する遺伝子マーカーを必要とすること。2) 第 6 章で報告を行うトルエンガスを処理しているバイオリクター内の微生物解析の結果、*tmoA*, *todC* 遺伝子を有した微生物が存在していること (第 6 章参照)。3) そのバイオリクター内には内在性活性を有した微生物が存在していたこと (第 6 章参照)。以上のことから、トルエン分解菌の *todC*, *tmoA* mRNA を標的 mRNA とした。

本研究では、まず *todC* mRNA 及び *tmoA* mRNA の検出を目指し、イニシエータープローブの設計を行った。その後、設計したプローブの有効性と特異性を Clone-FISH 法により評価した。また、本手法と in situ DNA-HCR 法及び CARD-FISH 法の蛍光強度と比較し、本手法が mRNA を視覚的に検出可能な蛍光強度であるか検討を行った。最終的に純粋菌株として *todC* 遺伝子を有した *Pseudomonas putida* F1 株に本手法を適用した。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1. モデル微生物の選定および調整

In situ dual DNA-HCR 法のプロトコルの確立に用いたモデル微生物及び標的部位には、*Escherichia coli* K-12 株 (ATCC700296) の EUB338 領域を使用した。ネガティブコントロール微生物には、*Methanococcus maripaludis* S2 株 (JCM13030) を用いた。*E. coli* は、LB 培地で培養し、対数増殖期に回収した。*M. maripaludis* は、JCM が指定する培地で培養した。培養後、サンプルは対数増殖期に回収し、4% パラホルムアルデヒドで 4°C、12 時間の固定を行った後、EtOH と PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4]) を 1:1 で混合させた溶液中で -20°C で保存した。また、*P. putida* F1 株

(ATCC700007) は ATCC が指定する培地で培養した。その後、無機塩培地として hunters 培地 (Stanier *et al.*, 1966) を選定し、トルエンを炭素源として *P. putida* F1 株の培養を行った。その後、トルエン濃度が減少したことを FID 計 (Shimadzu VMS-1000F, detector; FID) で確認し、4%パラホルムアルデヒドで 4°C、6 時間の固定を行った後、EtOH と PBS を 1:1 で混合させた溶液中で -20°C で保存した。

### 5.2.2. プロブ及びプライマーの選定

本研究に用いたプライマー及びプロブを **Table 5-1** に示す。本研究では、第 2 章に用いた H1 及び H2 に C1 及び C2 の伸長起点であるイニシエーター配列を加えた D1 及び D2 の設計を行った。また、*tmoA* mRNA 及び *todC* mRNA を検出するイニシエータープロブは、*tmoA* 遺伝子及び *todC* 遺伝子を検出する際に用いられるフォワードプライマー配列の相補鎖をイニシエータープロブとして用いた。

### 5.2.3. in vitro におけるプロブの伸長確認

本研究に用いたプロブの伸長反応は、Choi らの報告を参考にし、電気泳動を用いて確認した (Choi *et al.*, 2010)。まず、設計した伸長プロブ (3 µM) 及びイニシエータープロブ (0.3 µM) を各チューブに用意し、95°C で 5 分、25°C で 60 分温置した後、各プロブを混合させ、46°C で 2 時間反応させた。最後に、電気泳動を用いて HCR 反応による伸長を確認した。

### 5.2.4. Clone-FISH 法のためのサンプルの調整

*tmoA* 遺伝子もしくは *todC* 遺伝子の一部を組み込んだプラスミドをもつ *E. coli* のサンプル調整には Schramm ら及び Kubota らの報告に準拠し行った (Schramm *et al.*, 2004; Kubota *et al.*, 2006)。まず、トルエンガスを生物分解しているバイオリアクター (中村ら 2012) から汚泥を採取し、DNA を抽出した。DNA 抽出には、ISOIL for beads beating (Nippon gene) を用いて、提示されているプロトコルに準拠し行った。抽出した DNA は、*tmoA* 遺伝子及び *todC* 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて PCR を行った。PCR 試薬には、TaKaRa Extaq Hot Start Version (TaKaRa) を用いた。PCR 反応は、95°C で 2 分間の初期変性を行った後、95°C-1 分、65°C-1 分、72°C-2 分のサイクルを 30 サイクル (*tmoA* 遺伝子) もしくは 35 サイクル (*todC* 遺伝子) 行った後、72°C で 5 分間反応させた。増幅した PCR 産物は、MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) により精製し、pCR2.1 TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, USA) にライゲーションした。ライゲーション反応と NovaBlue (DE3) コンピテントセルの形質変換は、製造会社のプロトコルに準拠し行った。DE3 コンピテントセルを用いたクローニングは青白選択でできない。そこで、インサートチェック及びインサートの方向の確認は、ランダムにコロニーを 50 個程度回収し、pUC/M13f-*tmoAr*

Table 5-1 Primers and probes used in this study

Probe name or probe name	Probe sequence(5'-3') <sup>1</sup>	Labeling	%FA <sup>2</sup>	Reference
<b>Primer</b>				
TmoA-F	CGAAACGGTTYACCAAYATG			Hendricks <i>et al.</i> , 2006
TmoA-R	ACCGGATATTTYTCTCSAGCCA			Hendricks <i>et al.</i> , 2006
TodC-F	CAGTCCGCCAYCGTGGYATG			Hendricks <i>et al.</i> , 2006
TodC-R	GCCACTTCCATGYCCRCCECA			Hendricks <i>et al.</i> , 2006
<b>Probe</b>				
<b>CARD-FISH</b>				
EUB338	GCTGCCTCCGTAGGAGT	HRP	20	Amann <i>et al.</i> , 1990
<b>In situ DNA-HCR</b>				
<i>Initiator probe</i>				
EUB338-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		20	This study
<i>Amplifier probe</i>				
H1	<u>TCTAGTCGTT</u> <u>gaigctttgatitagg</u> CGACAGATAA <u>ccgaatacaagcate</u>	Alexa555 or Cy3	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>3</sup>
H2	<u>ccgaatacaagcate</u> AACGACTAGA <u>gatgctttgatitagg</u> TTATCTGTGC	Alexa555 or Cy3	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>3</sup>
<b>In situ dual DNA-HCR</b>				
<i>Initiator probe</i>				
EUB338-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		20	This study
tmoA-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		15	This study
tmoA-1MM-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		15	This study
tmoA-2MM-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		15	This study
todC-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		15	This study
todC-1MM-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		15	This study
todC-2MM-initiatorH	<u>CCGAATACAAAAGCATCAACGACTAGA</u> AAAAAAGTGCCTCCCGTAGGAGT		15	This study
<i>Amplifier probe</i>				
D1	<u>TCTAGTCGTT</u> <u>gaigctttgatitagg</u> CGACAGATAA <u>ccgaatacaagcate</u> <u>CCAGCAICAAATACGCCCTAAGAAATCC</u>	Alexa488orAlexa555orCy3	0	This study
D2	<u>TACGCCCTAAGAAATCCGAACCTAATG</u> <u>ccgaatacaagcate</u> AACGACTAGA <u>gaigctttgatitagg</u> TTATCTGTGC	Alexa488orAlexa555orCy3	0	This study
C1	<u>CATAGGGTTT</u> <u>ggattcttagggcgtg</u> GCAGCATCAA <u>taecgccctagaatcc</u>	Alexa488orAlexa555orCy3	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>3</sup>
C2	<u>taecgccctagaatcc</u> GAACCCCTATC <u>ggattcttagggcgtg</u> TTGATGCTGC	Alexa488orAlexa555orCy3	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>3</sup>

\*1 Double underlined sequences are the initiator sequences.

Grey boxes show the mismatch (MM) sequence.

Lowercase letters represent stem structure of amplifier probe.

Underlined sequence of H1 is complementary to the initiator sequences of initiatorH.

\*2 %FA shows formamide concentration (v/v).

\*3 Probe sequences were changed to DNA probe from RNA probe.

を用いた PCR により行った。ポジティブインサートを持つクローンは、ampicillin (50 µg/ml) を含む LB 培地で一晚震盪培養を行った。その後、ampicillin を含む 5 ml の LB 培地に培養したクローンを 50 µl 加え、37°C で浸透培養を行った。O.D.600 が 0.3-0.4 になったところで IPTG (TaKaRa Bio) を 1 mM になるように加え、mRNA の発現を促し 1 時間の震盪培養を行った。その後、chloramphenicol (Zymo Research, Orange, CA, USA) を 200 mg/l になるように加え、4 時間後に回収を行った。回収したサンプルは、4% パラフィルムアルデヒドで 4°C、6 時間の固定を行った。また、ネガティブコントロールとしてネガティブインサートしたプラスミドをもつクローン及びセルフライゲーションしたプラスミドをもつクローンを用意し、上述したように IPTG 誘導、chloramphenicol を添加し培養し、固定したサンプルを用いた。固定したサンプルは、EtOH と PBS を 1:1 で混合させた溶液中で -20°C で保存した。

### 5.2.5. CARD-FISH 法

CARD-FISH 法は、Kubota らの方法を若干変更し、行った (Kubota *et al.*, 2008)。まず、固定サンプルを低融点アガロースで包埋し (Pernthaler *et al.*, 2002)、10 穴のスライドガラス (Matsuami, Osaka, Japan) にマウントした。スライドは、60°C で乾燥後、EtOH シリーズ (50、80 and 96%) に 3、1、1 分間浸して脱水を行った。次に、プローブの細胞浸透性を向上させるために、リゾチーム (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) による細胞壁処理を 37°C で 30 分間行った。その後、TNT バッファー (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) に 15 分間、MQ に 1 分間浸し、最後に EtOH に 1 分間浸して脱水、乾燥させた。乾燥させた後、最終濃度 0.1 µM の HRP 標識プローブを含むハイブリダイゼーション (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.05% SDS, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent) を各穴に 15 µl 滴下し、40°C で 2 時間以上交雑させた。その後、スライドを 42°C のハイブリダイゼーションバッファーに浸し、15 分間の洗浄を行った。プローブの洗浄後、TNT バッファーに 15 分間浸し、平衡化させ、TSA 反応に供した。TSA 反応は、Cy3 を標識したチラミドを用いて行った。チラミド反応液は、1 volume の標識チラミド、37.5 volume のアンプリファイケーションバッファー (NEN life science)、12.5 volume の 40% dextran sulfate、0.5 volume の 10% blocking reagent を混合させ、各穴に 10 µl 滴下し、37°C で 10 分間反応させた。TSA 反応後は、TNT バッファーに 15 分間浸し、MQ で 1 分間及び EtOH で 1 分間浸して脱水及び風乾させた。

### 5.2.6. In situ DNA-HCR 法

固定サンプルは、低融点アガロースで包埋し、10 穴のスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に固着させた。各スライドは 60°C で乾燥後、50、80、96 % の EtOH にそれぞれ 3、1、1 分に浸して脱水を行った。ハイブリダイゼーションバッファー 1 (20 mM Tris-HCl, 0.9 M

NaCl, X% formamide, 0.01% SDS) に最終濃度 0.5  $\mu$ M になるようにイニシエータープローブを混合させ、各穴に 15  $\mu$ l 滴下し、46°C で 2 時間以上交雑させた。その後、スライドは、48°C のハイブリダイゼーションバッファー (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.01% SDS) に 30 分浸し、洗浄を行った。さらに、洗浄バッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に室温で 5 分間洗浄し、スライド上のホルムアミドを除去させた。その後、アンプライケーションバッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に蛍光物質を標識した H1 及び H2 を最終濃度 2.5  $\mu$ M になるように加え、46°C で 2 時間交雑させ、シグナル増幅させた。さらに、洗浄バッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に 4°C で 30 分浸し洗浄を行い、MQ で 1 分間、EtOH で 1 分間浸し、風乾させた。

### 5.2.7. In situ dual DNA-HCR 法

固定サンプルは、低融点アガロースで包埋し、10 穴のスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に固着させた。各スライドは 60°C で乾燥後、50、80、96 %の EtOH にそれぞれ 3、1、1 分に浸して脱水を行った。ハイブリダイゼーションバッファー 1 (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.01% SDS, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent) に最終濃度 0.5  $\mu$ M になるようにイニシエータープローブを混合させ、各穴に 15  $\mu$ l 滴下し、46°C で 2 時間以上交雑させた。その後、スライドは、48°C のハイブリダイゼーションバッファー (20 mM Tris-HCl, X M NaCl, 0.01% SDS) に 30 分浸し、洗浄を行った。その後、アンプライケーションバッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent) に蛍光物質を標識した D1 及び D2 を最終濃度 2.5  $\mu$ M になるように加え、46°C で 2 時間交雑させ、シグナル増幅させた。余剰プローブの洗浄は、PBST で 4°C、10 分浸すことで行った後、MQ で 1 分間浸した。その後、2 回目の伸長を行うため、アンプライケーションバッファーに蛍光物質を標識した C1 及び C2 を最終濃度 2.5  $\mu$ M になるように加え、46°C で 2 時間交雑させた。最後に、PBST で 4°C、10 分浸し洗浄を行い、MQ で 1 分間、EtOH で 1 分間浸し、風乾させた。

### 5.2.8. 顕微鏡観察および検出率の算出

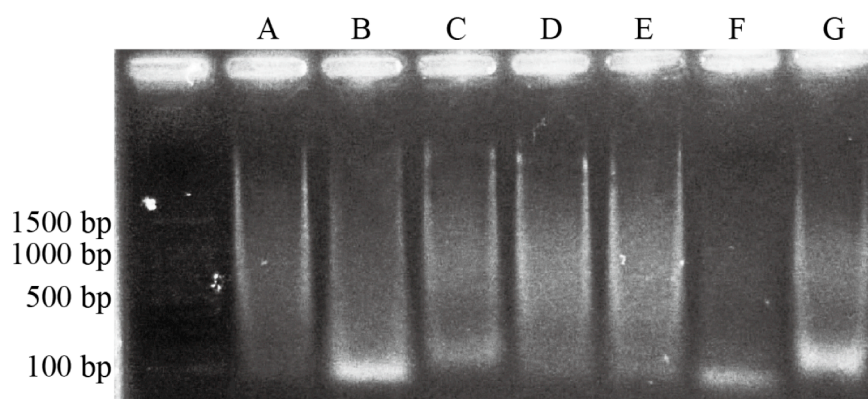
CARD-FISH 法、in situ DNA-HCR 法及び in situ dual DNA-HCR 法に用いたサンプルは、褪色防止剤 (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen) で封入後、顕微鏡観察に供した。顕微鏡には、落射蛍光顕微鏡 BX-53 (OLYMPUS) を用い、写真の撮影には CCD カメラ VB7010 (KEYENCE) を用いた。各手法の蛍光強度は daime software (Daims *et al.*, 2006) を用いて行った。

### 5.3 実験結果及び考察

#### 5.3.1. In situ dual DNA-HCR 法のプロトコルの最適化

まず、in situ dual DNA-HCR 法に用いるプローブが特異的な伸長反応を示すのか電気泳動を用いて確認した。その結果、2 度目の伸長反応に用いるプローブである C1 及び C2 は、本研究で設計した各イニシエーター配列を有した D1 及び D2 からそれぞれ特異的な伸長を示した (**Fig. 5-2, D and E**)。また、イニシエーター配列をもつ D1 及び D2 が存在しない場合、C1 及び C2 による伸長は反応が鈍化した (**Fig. 5-2, F**)。In vitro の実験結果から、C1 及び C2 は、本研究で設計を行ったイニシエーター配列を組み込んだ D1 及び D2 から伸長反応を起こすことが出来ることが明らかとなった。また、ネガティブコントロールとしてイニシエータープローブを用いない系で行った結果、100 bp 近辺にバンド強度が強いバンドが得られた (**Fig. 5-2, B, F and G**)。従って、イニシエータープローブが存在していない環境下では伸長プローブによる伸長が困難な環境であると判断した。

次に、in situ でのプローブの伸長を確認するために、*E. coli* の EUB338 領域を標的とし in situ dual DNA-HCR 法を適用させた。In situ DNA-HCR 法と同じ試薬及び実験条件で行った結果、通常の in situ DNA-HCR 法よりも高い蛍光強度を得ることに成功した。従って、in situ においても 2 度目の伸長反応を起こすことが可能であることが明らかとなった。しかしながら、その蛍光強度は、CARD-FISH 法で得られる蛍光強度よりも低く、またスライド上からは非特異的な蛍光が得られた。CARD-FISH 法の蛍光強度で検出可能な存在数は 14-50 copies/cell と報告されており (Hoshino *et al.*, 2008)、存在数が少ない mRNA を検出するためには、CARD-FISH 法で得られる蛍光強度まで引き上げる必要がある。そこで、まず更なる蛍光増幅を目指し CARD-FISH 法に用いられる試薬を参考にし、試薬の検討を行った。その結果を **Table 5-2** に示す。CARD-FISH 法の際に用いられる dextran sulfate 及び blocking reagent をハイブリダイゼーションバッファーや伸長反応液に加えた。まず、dextran sulfate



**Fig. 5-1.** validation in a test tube. (A) : amplification reaction by initiatorH, H1 and H2. (B) : without initiatorH. (C) : amplification reaction by initiatorH, D1 and D2. (D) : amplification reaction by D1, C1 and C2. (E) amplification reaction by D2, C1 and C2. (F) : negative control by using D1 and D2. (G) : negative control by using C1 and C2.

を伸長反応液に添加した結果、蛍光強度は著しく向上した。この要因として、dextran sulfate によりプローブの実行濃度が向上し、交雑効率が向上したことに起因していると考えられる。また、blocking reagent を伸長反応液に添加した結果、非特異的な蛍光が抑制された。次に、伸長反応液に dextran sulfate 及び blocking reagent の両方を添加した。その結果、20% dextran sulfate を添加した系では、伸長反応液の粘性が強くなり、非特異的な蛍光が得られた。一方で、10% dextran sulfate 及び 1% blocking reagent を添加した系では、通常よりも強い蛍光強度が得られ、また非特異的な蛍光が得られなかった。従って、最適な伸長反応液は、10% dextran sulfate 及び 1% blocking reagent を添加した系とした。さらに、CARD-FISH 法で用いられるハイブリダイゼーション (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent, 0.01% SDS) を使用した結果、更なる強い蛍光が得られた。これらの結果から、in situ dual DNA-HCR 法に用いる試薬には、ハイブリダイゼーションバッファー及びアンプリファイケーションバッファーに 10% dextran sulfate 及び 1% blocking reagent を添加した。次に、試薬の最適化を行った in situ dual DNA-HCR 法を用いて in situ DNA-HCR 法と蛍光高強度を比較した結果を Fig. 5-3 に示す。その結果、in situ dual DNA-HCR 法の蛍光強度は、in situ DNA-HCR 法よりも約 3 倍程度強かった。また、CARD-FISH 法の蛍光強度は in situ DNA-HCR 法と比較して約 3 倍程度強く、in situ dual DNA-HCR 法の蛍光強度は CARD-FISH と同程度であった (Fig. 5-4)。従って、試薬の最適化を行うことで飛躍的に蛍光強度が改善され、mRNA を検出できるレベルまで蛍光強度を引き上げることに成功した。

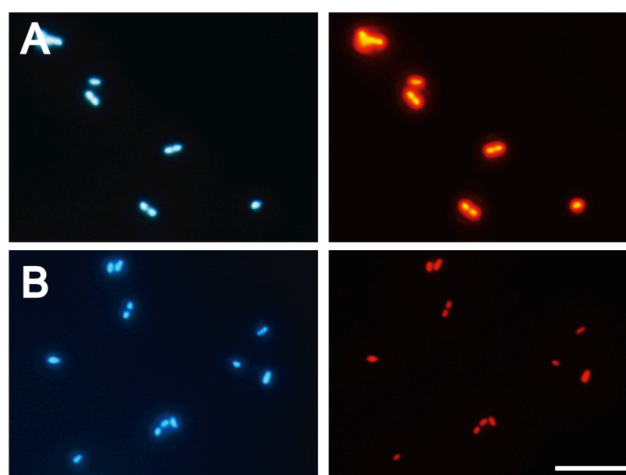
**Table 5-2.** Effect of Blocking reagent and dextran sulfate for improving signal and noise level in hybridization buffer and amplification buffer

Hybridization buffer <sup>a</sup>	Amplification buffer <sup>a</sup>	Signal intensity <sup>b</sup>	Noise <sup>c</sup>
None	None	+	----
None	0.5 % BR	+	---
None	1.0 % BR	+	--
None	10% DS	++	----
None	20% DS	++	----
None	1.0 % BR+10% DS	+++	-
None	1.0 % BR+20% DS	+++	---
1.0 % BR+10% DS	1.0 % BR+10% DS	++++	-
1.0 % BR+10% DS	1.0 % BR+20% DS	+++++	--

a : BR, blocking reagent; DS, dextran sulfate

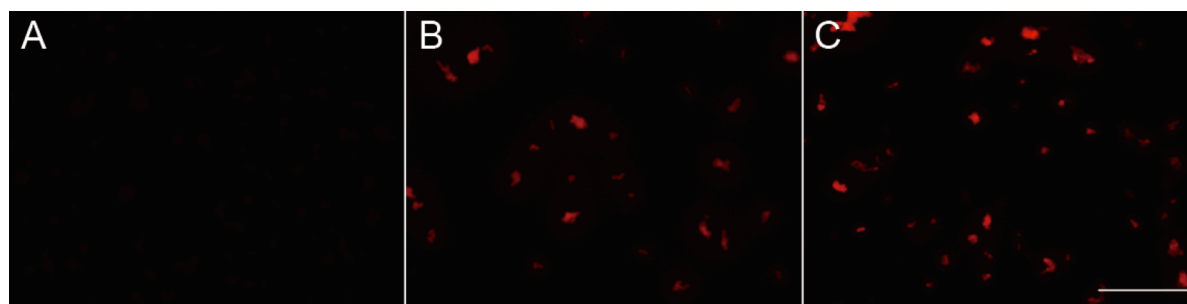
b : Renge of signal intensity form + (lowest) to +++++ (highest)

c : Renge of noise form - (lowest) to ---- (highest)



**Fig. 5-3** Detection of *E.coli* by in situ dual DNA-HCR (A), in situ DNA-HCR (B). Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). Exposure time were 20 ms for each method. The bar represents 20  $\mu$ m.

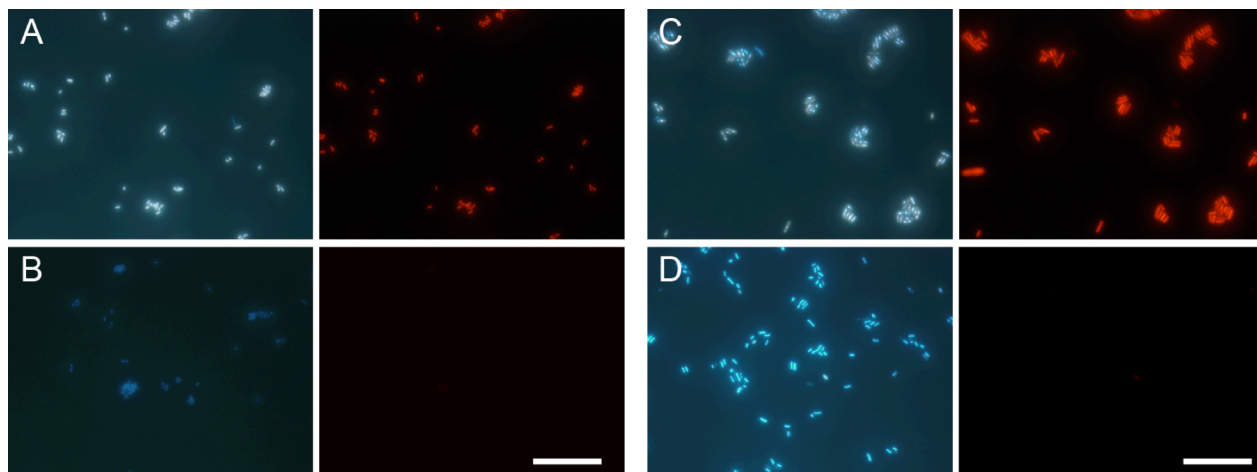




**Fig. 5-4.** Detection of *E. coli* by using in situ DNA-HCR (A), CARD-FISH (B) and in situ dual DNA-HCR (C). Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). The bar represents 10  $\mu\text{m}$ . The exposure times for each method were fixed.

### 5.3.2. Clone-FISH 法によるプローブの有効性の評価

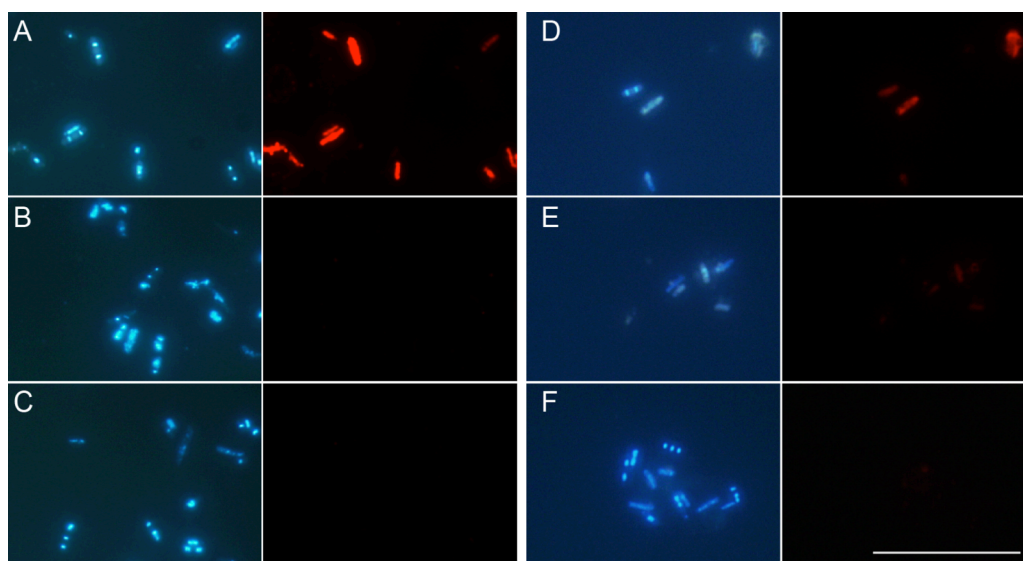
次に、本研究で設計したイニシエータープローブが *tmoA* mRNA, *todC* mRNA を検出できるかどうか検討するために Clone-FISH 法を用いてプローブの有効性を確認した。Clone-FISH 法に用いたクローンは、*tmoA* 遺伝子もしくは *todC* 遺伝子をプラスミドに組み込んだ *E. coli* とした。*tmoA* 遺伝子及び *todC* 遺伝子を標的としたプライマーセットはこれまでに報告されているが、in situ hybridization に適用した報告されていない。そこで、*tmoA* 遺伝子及び *todC* 遺伝子を検出することが出来るプライマーが in situ hybridization に適用できるのか検討を行った。設計したイニシエータープローブは、*tmoA* 遺伝子もしくは *todC* 遺伝子のほぼ中央に位置する標的部位である *tmoA*-フォワードプライマー及び *todC*-フォワードプライマーを用いた。その設計したイニシエータープローブを用いた in situ dual DNA-HCR 法による Clone-FISH 法の結果を **Fig. 5-5** に示す。*tmoA*-イニシエータープローブを用いて in situ dual DNA-HCR 法を適用した結果、ホルムアミド濃度 15%においてすべての菌体から強い蛍光が得られた (**Fig. 5-5, A**)。また、*todC*-イニシエータープローブにおいてもホルムアミド濃度 15%が最適な条件であった(**Fig. 5-5, C**)。さらに、イニシエータープローブを添加していない系では蛍光が得られなかった (**Fig. 5-5, B, D**)。また、in situ dual DNA-HCR 法の蛍光強度は、高ストリンジェンシー条件下になるにつれ微弱となった (データ非表示)。これらの結果から、イニシエータープローブは、標的部位のみに特異的に交雑していると判断した。



**Fig. 5-5.** Detection of *E.coli* which is induced the partial *tmoA* or *todC* gene in plasmid by in situ dual DNA-HCR using initiator probe and amplifier probes (A, C) or without initiator probe (C, D). (A, B): Partial *tmoA* gene was induced. (C, D): Partial *todC* gene was induced. Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). The bar represents 20  $\mu$ m.

### 5.3.3. 本手法の特異性

次に、1-2塩基ミスマッチイニシエータープローブを用いて本研究で設計したプローブの特異性の評価を行った。*tmoA* 遺伝子に近縁な遺伝子として、*Pseudomonas stutzeri* OX1 株が有している toluene/o-xylene monooxygenase gene (*touA*) 遺伝子が報告されている。*touA* 遺伝子は、*tmoA* フォワードプライマーと一塩基ミスマッチで交雑することが報告されている (Hendrickx *et al.*, 2006)。*touA* 遺伝子は、*tmoA* フォワードプライマーと一塩基ミスマッチで交雑することが報告されている (Hendrickx *et al.*, 2006)。また、*todC* 遺伝子に近縁な遺伝子として、*Ralstonia sp.*が有している terminal oxygenase large subunit の *McbAa* 遺伝子が報告されている。*McbAa* 遺伝子は、*todC* フォワードプライマーと一塩基ミスマッチで交雑することが報告されている (Hendrickx *et al.*, 2006)。従って、*tmoA*, *todC* mRNA のみを検出する場合、一塩基ミスマッチを識別させる必要がある。そこで、in situ dual DNA-HCR 法の特異性を評価するために、*tmoA* もしくは *todC* 遺伝子を挿入したプラスミドを有したクローンを用いて、*tmoA*-、*todC*-イニシエータープローブ及び 1-2 塩基ミスマッチ (*tmoA*-、*todC*-イニシエータープローブ-1MM、-2MM) を用いて in situ dual DNA-HCR 法を適用させた。最適交雑条件下 (15% formamide) における実験結果を **Fig. 5-6** に示す。その結果、標的部位とパーフェクトマッチである *tmoA*-イニシエータープローブを用いた in situ dual DNA-HCR 法は、菌体から強い蛍光を得ることに成功した (**Fig. 5-6, A**)。一方で、*tmoA*-イニシエータープローブ-1MM 及び-2MM を用いた場合、菌体から蛍光が得られなかった (**Fig. 5-6, B and C**)。また、*todC*-イニシエータープローブを用いた場合は、1 塩基ミスマッチから微弱な蛍光が得られたが、2 塩基ミスマッチからは蛍光が得られなかった (**Fig. 5-6, D-F**)。この結果から、本研究で設計した *tmoA*-イニシエータープローブは、競合プローブを用いらずとも 1 塩基ミスマッチの識別が可能な高い特異性を有していた。また、微弱な蛍光が得られ

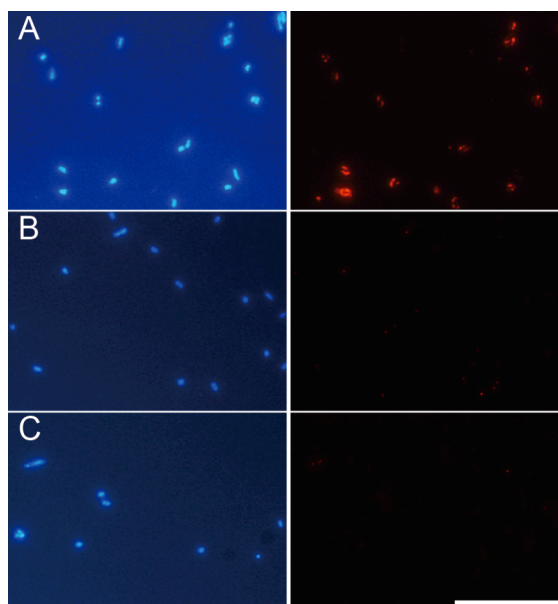


**Fig. 5-6** Detection of *E.coli* which is induced the partial *tmoA* gene (A-C) or *todC* gene (D-F) in plasmid by in situ dual DNA-HCR. A, D: Perfect match initiator probe was used. B, E: 1 mismatch initiator probe was used. C, F: 2 mismatch initiator probe was used. Each double panel depicts DAPI staining (left) and probe staining (right). The bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

た 1 塩基ミスマッチの *todC*-イニシエータープローブは、パーフェクトマッチの蛍光と比較して蛍光強度に差が見られるため、1 塩基ミスマッチも識別可能であると判断した。

#### 5.3.4. In situ dual DNA-HCR 法による *P. putida* F1 株の *todC* mRNA の視覚的検出

In situ dual DNA-HCR 法による原核生物内の mRNA の視覚的検出の適用可能性は、*P. putida* F1 株を用いて確認した。*P. putida* F1 株は、トルエンを炭素源をした培地で培養を行い、*P. putida* F1 株の増殖確認は OD<sub>600</sub> を用いて行った。その結果、*P. putida* F1 株の増殖によりトルエン濃度が減少したことから *todC* mRNA が発現したと考えた。そこで次に、*P. putida* F1 株の *todC* mRNA に対して in situ dual DNA-HCR 法を適用させた (Fig. 5-7)。その結果、*todC*-イニシエータープローブを用いた系から蛍光が得られた。また、その蛍光は、菌体を覆うようなハロ蛍光が得られた。ハロ蛍光を示す FISH 法として RING-FISH 法がある (Zwirgmaier *et al.*, 2004)。RING-FISH 法



**Fig. 5-7** Detection of *todC* mRNA in *P. putida* F1 by in situ dual DNA-HCR. (A) : perfect match of initiatorH was used. (B) : One-mismatch initiatorH was used. (C) : Without initiator probe. Left panel depict DAPI staining (blue) and right panels depict probe signal (red). The bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

及び本手法は、プローブ同士の交雑により蛍光増幅させる方法である。従って、本手法においてもプローブ同士の交雑により、細胞外まで伸長が進行したのではないかと考えられる。一方、その蛍光は、イニシエータープローブを用いない系や1塩基ミスマッチのイニシエータープローブを用いた系から得られなかった (**Fig. 5-7**)。以上の結果から、in situ dual DNA-HCR 法は、原核生物の mRNA を視覚的に検出可能である判断した。

#### 5.4 まとめ

本研究では、in situ dual DNA-HCR 法の蛍光強度を CARD-FISH 法の蛍光強度と同程度まで引き上げることに成功し、in situ dual DNA-HCR 法が酵素を必要としない mRNA 検出技術として確立できるポテンシャルを有していることを明らかにした。また、in situ dual DNA-HCR 法を用いて純粋菌株内の mRNA の視覚的検出にも成功した。さらに、本手法の特徴として、酵素を用いない手法であるため、CARD-FISH 法で用いるプローブよりも細胞浸透性が高いと考えられることや菌体内の内在性活性の失活をさせる必要がない。従って、本手法は、プローブの浸透性が低い微生物や内在性活性の失活が困難な微生物の mRNA の視覚的検出に有効な手法であり、in situ における微生物生態解析や生理学的活性同定に有効なツールになると考えられる。さらに、本研究のイニシエータープローブは、混合塩基を有しているにも関わらず一塩基ミスマッチを識別できる高い特異性を有していることが明らかとなった。従って、系統学的に様々な位置に分類されるトルエン分解菌の *tmoA*, *todC* 遺伝子から発現した *tmoA*, *todC* mRNA を網羅的に検出することが可能になると考えられる。

#### 参考文献

- Amann, R. I. and Fuchs, B. M.** (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews* **6**, 339-348.
- Handelsman, J.** (2004): Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 68, No. 4, pp. 669-685.
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Ruegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlomann, M., Brennerova, M., Brenner, V., Pieper, D. H., Top, E. M., Dejonghe, W., Bastiaens, L. and Springael D.** (2006): Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site, *Journal of Microbiology Methods*, **64**(2), 250-265.
- Hendrickx, B., Dejonghe, W., Faber, F., Boenne, W., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M. and Springael, D.** (2006): PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 55, No. 2, pp. 262-273.

- 
- Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H. and Wagner, M.** (2008) Quantification of Target Molecules Needed To Detect Microorganisms by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Catalyzed Reporter Deposition-FISH, *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5068-5077.
- Kubota, K., Imachi, H., Kawakami, S., Nakamura, K., Harada, H. and Ohashi, A.** (2008). Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *Journal of Microbiological Methods* **72**(1), 54-59.
- Kawakami, S., Hasegawa, T., Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H., Ohashi A. and Kubota, K.** (2011). Detection of single copy function genes in prokaryotic cells by two-pss TSA-FISH with polynucleotide probes. *Journal of Microbiological Methods* **88**(2), 218-223.
- Moraru, C., Lam, P., Fuchs, B. M., Kuypers, M. M. M. and Amann, R.** (2010). GeneFISH - an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms. *Environmental Microbiology* **12**(11), 3057–3073.
- Okunishi, S., Morita, Y., Higuchi, T., Maeda, H. and Nishi, K.** (2012): Transformation of microflora during degradation of gaseous toluene in a biofilter detected using PCR-DGGE, *Journal of the Air & Waste Management Association*, **62**(7), 748-757.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. I.** (2002) Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3094-3101.
- Pernthaler, A. and Amann, R.** (2004). Simultaneous Fluorescence In Situ hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(9), 5426-5433.
- Roland Hatzenpichler, Silvan Scheller, Patricia L Tavormina, Brett M Babin, David A Tirrell, and Victoria J Orphan** (2014) In situ visualization of newly synthesized proteins in environmental microbes using amino acid tagging and click chemistry, *Environmental Microbiology* **16**(8), 2568-2590.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M.** (1966) The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* **43**,159–271.
- Schramm, A., Fuchs, B. M., Nielsen, J. L., Tonolla, M. and Stahl,D. A.**(2002): Fluorescence in situ hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries, *Environmental Microbiology* **4**(11), 713-720.
- Woese, C. R., Winker, S. and Gutell, R. R.** (1990). Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of ‘tetra-loops’. *Proceeding of the National Academy of Science* **87**, 8467-8471.
- Zwirgmaier, K., Ludwig, W. and Scheifer, K-H.** (2004). Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization—RING-FISH. *Molecular Microbiology* **51**, 89–96.
-

中村将一郎, 田村英輔, 谷川大輔, 長野晃弘, 山口隆司 (2012): DHS リアクターを用いたトルエンガスの連続処理特性, 土木学会論文集 *G (環境)*, **68**(7), 595-601.

## 第 6 章

# In situ dual DNA-HCR による環境微生物中の mRNA の視覚的検出

山口剛士, 中村将一郎, 幡本将史, 田村英輔, 谷川大輔, 川上周司, 加藤薫, 長野晃弘, 山口隆司. トルエンガス処理に用いた DHS リアクター内の微生物群集構造解析. *土木学会論文集 G (環境)*, Vol. 69, No. 7, pp.III\_215-III\_222, 2013.

Tsuyoshi Yamaguchi, Kyokei Ohmiya, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Kengo Kubota, Nobuo Araki and Takashi Yamaguchi. Visualization of mRNA in a toluene degrading bacteria by in situ DNA-hybridization chain reaction systems. In preparation

## 第6章 In situ dual DNA-HCR 法による環境微生物中の mRNA の視覚的検出

## 6.1 はじめに

環境微生物の生理学的機能を理解するには、16S rRNA 遺伝子に基づいた解析では困難な場合がある。微生物の生理学的機能を解析する方法として、標的機能遺伝子を標的としたクローン解析 (Hales *et al.*, 1996; Rothauwe *et al.*, 1997) や近年では環境中の全 DNA を網羅的に解析するメタゲノム解析 (Tyson *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2004) や全 mRNA を解析するトランスクリプトーム解析や全タンパク質を解析するプロテオーム解析等が報告されている。しかしながら、これらの手法では DNA, RNA やタンパク質を抽出等が必要であるため、*in situ* における微生物の空間分布を把握することが不可能である。FISH 法は、環境微生物の分離培養を介することなく、標的微生物を特異的かつ視覚的に検出することができるツールである (Amann and Fuchs 2008)。これまでに、微生物の生理学的活性を理解することができる微生物内の mRNA や酵素を標的とした高感度 FISH 法がいくつか報告されている (Kubota *et al.*, 2006; Pernthaler *et al.*, 2004; Pilhofer *et al.*, 2009; Bakermans and Madsen, 2002; Kofoed *et al.*, 2012)。しかしながら、これらは長鎖のプロープであるポリヌクレオチドプロープを用いた手法や分子量が大きい酵素を用いた手法であり、作業の繁雑さやプロープの細胞浸透性やプロープの特異性の問題等が報告されており、汎用性が高いとは言えないのが現状である (第2章参照)。そこで、第5章において酵素反応を用いない新規の視覚的 mRNA 検出技術の開発を行った (第5章参照)。本手法は、CARD-FISH 法と同程度の蛍光強度であり、一塩基ミスマッチも識別できる高い特異性を有していることが明らかとなった。本章では、mRNA を検出するために開発を行った *in situ* dual DNA-HCR 法を環境微生物に適用可能なレベルまで引き上げることを目的とした。本手法を適用した微生物は、トルエン分解菌とした。トルエン分解菌は、系統学的に多岐に分類しており、16S rRNA 遺伝子による解析では、未培養のトルエン分解菌を把握できない場合が報告されている。従って、トルエン分解菌を検出する方法として機能遺伝子を標識とした解析がされている。これまで報告されているトルエン分解菌の多くは *Pseudomonas* 属に属する微生物であるが、その他、*Rhodococcus*、*Comamonas*、*Acidovorax*、*Variovorax* 属等も同様にトルエン分解菌として報告がされている。また、近年では TM7 に

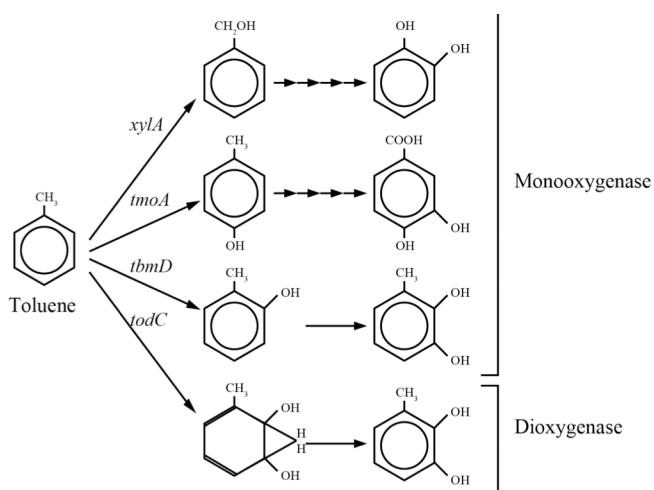


Fig. 6-1 Initial attack in different pathway for the bacterial degradation of toluene.



属する微生物もトルエン分解に関与している可能性があるとの報告もある (Luo *et al.*, 2009)。それらトルエン分解菌は、主に BTEX に汚染させた土壌やトルエンを除去しているバイオリアクターから報告されている (Hendrickx *et al.*, 2006; Hendrickx *et al.*, 2006; Okunishi *et al.*, 2012)。

トルエン分解菌によるトルエン分解は、最初に monooxygenase もしくは dioxygenase による芳香環の酸化、もしくは monooxygenase によるアルキル側鎖の酸化から始まる。芳香環の最初の酸化に関与する酵素は、toluene-4-monooxygenase、toluene/benzene-2-monooxygenase 及び toluene dioxygenase であり、アルキル側鎖の酸化に関与する酵素は xylene monooxygenase である (Fig. 6-1)。それぞれの酵素の一部をコードしている機能遺伝子である *tmoA*、*tbmD*、*todC* 及び *xylA* 遺伝子は、トルエン分解菌を検出できるマーカー遺伝子として解析に用いられている (Hendrickx *et al.*, 2006)。そこで、本研究では、安定したトルエンの生物学的除去性能を示した down-flow hanging sponge (DHS) リアクター内の汚泥を採取し (中村ら, 2012)、DHS リアクター内のトルエン分解菌の特定及びトルエン分解菌の視覚的検出を試みた。本研究では *tmoA* 遺伝子から発現する *tmoA* mRNA 及び *todC* 遺伝子から発現する *todC* mRNA を標的 mRNA とした。まず、DHS リアクター内に存在するトルエン分解菌を、16S rRNA 遺伝子及び機能遺伝子 (*tmoA*, *todC*, *tbmD*, *xylA* 遺伝子) を標的としたクローン解析により明らかにした。次に、特異的な検出が可能であった *tmoA*-, *todC* 遺伝子から発現した mRNA に対して in situ dual DNA-HCR 法を用いて mRNA の視覚的検出を試みた。

## 6.2 実験方法

### 6.2.1. 実験装置、供試汚泥および DNA 抽出

本研究で用いた DHS リアクターを Fig. 6-2 に示す。解析対象の DHS リアクターは、高さ 1 m、直径 0.2 m のステンレス製のカラムを用いたもので、リアクター内に上部、中部、下部の 3 つのコンパートメントを設けている。スポンジ担体には、都市下水を処理していた活性汚泥を植種し、トルエン濃度は、1000 ppmC (v/v) になるように設定しリアクター下部からトルエンガスを連続供給した。また、窒素源として塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )、リン源としてリン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 及びリン酸水素二カリウム ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) を混合した溶液を栄養塩と

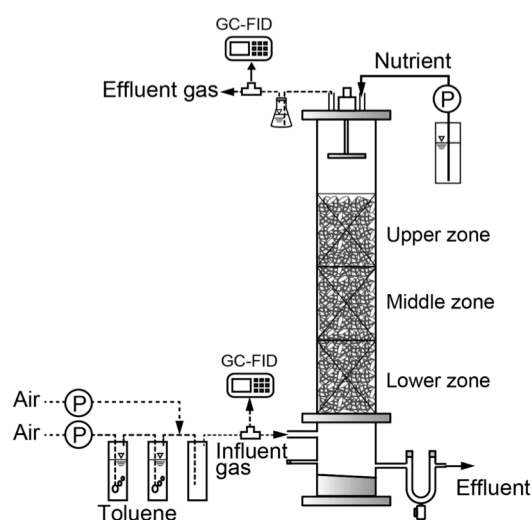


Fig. 6-2 Schematic diagram of the DHS reactor used in this study.

し、トルエンの炭素と質量比で C:N:P=300:5:1 になるように設定して、リアクター上部から連続供給した。DNA 抽出を行った汚泥は、トルエン除去率が 80%以上を達成し、処理が安定したと考えられる運転 466 日目の汚泥サンプルを採取した。16S rRNA 遺伝子に基づく微生物群集構造解析に用いた供試汚泥は、DHS リアクター内の上部 (リアクター底から 0.7 m)、中部 (0.4 m)、下部 (0.2 m) の 3 カ所からスポンジを採取し、PBS (137 mM NaCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.68 mM KCl、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4]) に浸し汚泥が出なくなるまで搾取した。機能遺伝子のクローン解析に用いた汚泥は、リアクター下部から採取した。採取した汚泥の DNA 抽出には ISOIL for Beads Beating (Nippon gene) を用いて、掲示されているプロトコールに準拠し行った。

### 6.2.2. 16S rRNA 遺伝子及びトルエン分解に関与する機能遺伝子を標的としたクローン解析

本章で用いたプライマーセットを **Table 6-1** に示す。*Bacteria* の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析には EUB338F-U1492R のプライマーセットを用い、PCR 試薬には TaKaRa Extaq Hot start Version (TaKaRa) を用いた。PCR 反応は 95°C で 2 分間の初期変性を行った後、95°C-30 秒、50°C-30 秒、72°C-1 分 30 秒のサイクルを 25 サイクル行った後、72°C で 5 分間反応させた。トルエン分解に関与する機能遺伝子のクローン解析は以下の PCR 反応で行った。*tmoA*、*tbmD*、*todC* 遺伝子は、95°C で 5 分間初期変性を行い、95°C-1 分、65°C-1 分、72°C-2 分のサイクルを 30 (*tmoA*)、25 (*tbmD*)、35 (*todC*) サイクル行った後、最後に 72°C で 5 分間反応させた。*xylA* 遺伝子は 95°C で 5 分間初期変性を行い、95°C-1 分、60°C-1 分、72°C-2 分のサイクルを 45 サイクル行った後、最後に 72°C で 5 分間反応させた。増幅した PCR 産物は、MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN、Tokyo、Japan) により精製し、TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いたクローニングを行った。その後、クローンを無作為に選択し、各クローンの塩基配列を決定した。塩基配列の解析はタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミックスセンターに委託した。16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析から得られた各クローンは、Fast group II (Yu *et al.*, 2006) を用いて塩基配列の相同性が 97%以上を同一の OTU として分類分けした。各 OTU の代表配列及び機能遺伝子の塩基配列は NCBI の Blast 相同性検索ツールを用いて近縁種の推定を行った。

### 6.2.3. サンプルの調整

本章で標的とした環境微生物は、DHS リアクター内の下部の汚泥中に存在している微生物とした。まず、リアクター下部からスポンジを採取し、PBS に浸し汚泥を搾取した。その後、12% パラホルムアルデヒドを搾取した汚泥に添加し (最終濃度 4% パラホルムアルデヒド)、室温で 1 時間の固定を行った。固定したサンプルは、メンブレンフィルター (pore size :3µm) を用いて不純物等を除去し、メンブレンフィルター (pore size : 0.2 µm) を用い

て汚泥内に生息している微生物を集菌した後、直ちに実験に供した。

### 6.2.3. 本研究で用いたプローブ

本研究で用いたプローブを **Table6-1** に示す。本研究では、*tmoA* mRNA 及び *todC* mRNA を標的としたプローブを用いた。

### 6.2.4. In situ dual DNA-HCR 法

フィルターに固着させた固定サンプルを低融点アガロースで包埋させた。フィルターは 60°C で乾燥後、50、80、96 %の EtOH にそれぞれ 3、1、1 分に浸して脱水を行った。ハイブリダイゼーションバッファー1 (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide, 0.01% SDS, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent) に最終濃度 0.5 µM になるようにイニシエータープローブを混合させ、各穴に 15 µl 滴下し、46°C で2時間以上交雑させた。その後、スライドは、48°C のハイブリダイゼーションバッファー (20 mM Tris-HCl, X M NaCl, 0.01% SDS) に30分浸し、洗浄を行った。その後、アンプリファイケーションバッファー (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 10% dextran sulfate, 1% blocking reagent) に蛍光物質を標識した D1 及び D2 を最終濃度 2.5 µM になるように加え、46°C で30分間交雑させ、シグナル増幅させた。余剰なプローブの洗浄は、PBST (1xPBS, 0.05% tween20) で4°C、10分浸し洗浄を行い、MQ で1分間浸した。その後、2回目の伸長を行うため、アンプリファイケーションバッファーに蛍光物質を標識した C1 及び C2 を最終濃度 2.5 µM になるように加え、46°C で30分間交雑させ、2回目のシグナル増幅を行った。最後に、PBST で4°C、10分浸し洗浄を行い、MQ で1分間、EtOH で1分間浸し、風乾させた。

### 6.2.5. 顕微鏡観察

CARD-FISH 法及び in situ dual DNA-HCR 法に用いたサンプルは、褪色防止剤 (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen) で封入後、顕微鏡観察に供した。顕微鏡には、落射蛍光顕微鏡 BX-53 (OLYMPUS) を用い、写真の撮影には CCD カメラ VB7010 (KEYENCE) を用いた。

Table 6-1 Primers and probes used in this study

Probe name or probe name	Probe sequence(5'-3') <sup>1</sup>	Labeling	%FA <sup>2</sup>	Reference
<b>Primer</b>				
EUB338F	ACTCTACGGGAGGCAGCAG			Lane <i>et al.</i> , 1991
U1492R	GGYTACCTTGTACGACTT			Lane <i>et al.</i> , 1991
TmoA-F	CGAAACGGTTYACCAAYAIG			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
TmoA-R	ACGGGATAITTYTCTTCSAGCCA			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
TbmD-F	GCCTGACCAATGGATGCSACTGG			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
TbmD-R	CGCCAGAACCACTTGTCTRRITCCA			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
XyIA-F	CCAGGTGGAATTTTCAGTGGTGG			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
XyIA-R	AATTAACCTCGAAGGCCCAACCCCA			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
TodC-F	CAGTGGCCCAAYCGTGGYATG			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
TodC-R	GCCACTTCCATGYCCRCCCA			Hendrikkx <i>et al.</i> , 2006
<b>Probe</b>				
<b>In situ dual DNA-HCR</b>				
<i>Initiator probe</i>				
EUB338-initiatorH	<u>CCGAAATACAAAAGCAICAAACGACTAGAAAAAAGCTGCCTCCGTAGGAGT</u>	-	20	This study
tmoA-initiatorH	<u>CCGAAATACAAAAGCAICAAACGACTAGAAAAAACAATRTTGGTTRAAAGCCGGTTTCG</u>	-	15	This study
todC-initiatorH	<u>CCGAAATACAAAAGCAICAAACGACTAGAAAAAACATRCCACGRTGGCGGCACCTG</u>	-	15	This study
<i>Amplifier probe</i>				
D1	TCTAGTCTGTTgatacttttatttcggCGACAGATAccgaatacaaaacate <u>GCAGCATCAATAACGCCCTAAAGAAATCC</u>	Alexa488	0	This study
D2	<u>TACGCCCTAAGAAATCCGAACCCATATGccgaatacaaaacateAACGACTAGA</u> gatacttttatttcggTTATCTGTCTCG	Alexa488	0	This study
C1	CATAGGGTTTCgatacttttatttcgggtaGCAGCATCAAtaegccctaaagaatcc	Alexa488	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>3</sup>
C2	taegccctaaagaatccGAAACCCATATGgatacttttatttcgggtaTTGATGCTGTC	Alexa488	0	Choi <i>et al.</i> , 2010 <sup>3</sup>

\*1 Double underlined sequences are the initiator sequences.

Grey boxes show the mismatch (MM) sequence.

Lowercase letters represent stem structure of amplifier probe.

Underlined sequence of H1 is complementary to the initiator sequences of initiatorH.

\*2 %FA shows formamide concentration (v/v).

\*3 Probe sequences were changed to DNA probe from RNA probe.

## 6.3 実験結果及び考察

## 6.3.1 16S rRNA 遺伝子に基づく DHS リアクター汚泥の微生物群集構造解析

バクテリアを標的としたクローン解析で得られたクローンの門・綱レベルでの分類結果を **Table 6-2** に、また DHS リアクター内で優占していたクローン配列の Blast 相同性検索結果を **Table 6-3** に示す。各汚泥採取場所の OTU を決定した結果、上部、中部、下部においてそれぞれ 42、47、52 の OTU が得られた。各汚泥採取場所による OTU 数には差が見られなかった。16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析の結果、すべての汚泥採取場所で *Proteobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Verrucomicrobia* 門、*Firmicutes* 門に属するクローンが存在していた。クローン配列の門・綱レベルでの分類では、汚泥採取場所による微生物の存在割合がいずれの箇所ともほぼ同じであった。特に、多種のトルエン分解菌が存在する *Proteobacteria* 門 (*Zeyullah et al.*, 2009) に属するクローンは、すべての汚泥採取場所で 50%以上存在していた。各汚泥採取場所で多く存在していた 16S rRNA 遺伝子クローンの Blast 相同性検索結果、既知のトルエン分解菌と考えられる *Pseudomonas* 属に属する微生物群 (*Hendrickx et al.*, 2006) 及び有機酸分解菌である *Bacteroidetes* 門に属する *Acidovorax caeni* (*Keylen et al.*, 2008) の近縁種などが優占して存在していたことが明らかとなった。トルエン分解菌として考えられる一部の *Pseudomonas* 属はすべてのサンプル採取場所で存在しており、特にトルエンガスの流入口に近く、トルエン濃度が最も高いと考えられるリアクター下部では、トルエン分解菌と考えられる *P. putida* F1 の近縁種が、全クローンの 5% 程度 (79 クローン中 4 クローン) を占めていた。この結果より、*P. putida* F1 の近縁種が DHS リアクターにおけるトルエン分解に関与すると考えられる主な微生物であると確認された。また、トルエンは *meta* もしくは *ortho* 開裂による環開裂によって有機酸に分解される。有機酸分解菌として知られている *A. caeni* (*Keylen et al.*, 2008) が優占種の 1 つとして検出された要因として、トルエン分解菌によって生成された有機酸が *A. caeni* によって分解されていたことに起因していると考え

**Table 6-2.** Bacterial 16S rRNA gene clones retrieved the DHS retained sludges.

Classification	Number of clones (% of total clones)		
	Upper	Middle	Lower
<i>Proteobacteria</i>			
<i>Alphaproteobacteria</i>	5 (8)	9 (15)	6 (8)
<i>Betaproteobacteria</i>	10 (15)	13 (21)	14 (18)
<i>Deltaproteobacteria</i>	6 (9)	3 (5)	5 (6)
<i>Gammaproteobacteria</i>	22 (34)	10 (16)	16 (20)
<i>Bacteroidetes</i>			
<i>Flacvobacteriia</i>	7 (11)	1 (2)	4 (5)
<i>Sphingobacteriia</i>	4 (6)	7 (11)	13 (16)
<i>Cytophagia</i>	2 (3)	2 (3)	
<i>Verrucomicrobia</i>			
<i>Verrucomicrobiae</i>	3 (5)	5 (8)	8 (10)
<i>Firmicutes</i>			
<i>Clostridia</i>	3 (5)	4 (6)	7 (9)
<i>Vlostridia</i>			3 (4)
<i>Acidobacteria</i>			
<i>Acidobacteriales</i>	2 (3)	4 (6)	
<i>Solibacteres</i>	1 (2)		
<i>Planctomycetes</i>			
<i>Planctomyceteles</i>		1 (2)	
<i>Planctomycetia</i>		1 (2)	1 (1)
Other		2 (3)	2 (3)
Total (%)	65 (100)	62 (100)	79 (100)

**Table 6-3.** Analysis of selected clones from clone libraries constructed with amplicons from each sludge of DHS reactor. The closest match was determined by a BLAST analysis of GenBank

Sample	Number of clones	Close relatives	Identity (%)	Accession number
Upper	4	<i>Steroidobacter denitrificans</i>	94	NR_044309
	4	<i>Luteimonas marina</i>	98	NR_044458
	3	<i>Empedobacter brevis</i>	82	NR_042471
	3	<i>Candidatus Solibacter</i>	93	NR_074351
Middle	8	<i>Acidovorax caeni</i>	97	NR_042427
	3	<i>Stella humosa</i>	92	NR_025582
	2	<i>Variovorax boronicumulans</i>	98	NR_074646
	2	<i>Mycoplana bullata</i>	99	NR_025831
Lower	5	<i>Acidovorax caeni</i>	98	NR_042427
	4	<i>Pseudomonas putida F1</i>	99	NR_074739
	4	<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	99	NR_074828
	3	<i>Acidovorax defluvii</i>	99	NR_026506

られる。また、揮発性有機化合物の一種である  $\alpha$ -pinene を生物学的に処理しているリアクター内にも有機酸分解菌の1つとして *A. caeni* が検出されている (Cheng *et al.*, 2011)。その他、トルエン分解菌として考えられる *Mycoplana bullat* や *Nevskia sp.* に近縁なクローンがリアクター中部及び下部で 2-3% 程度存在していた (Velen *et al.*, 2012; Juteau *et al.*, 1999)。

### 6.3.2. 機能遺伝子に基づく DHS リアクター汚泥の微生物群集構造解析

トルエン分解菌として考えられる多種の微生物が存在していたリアクター下部の汚泥を用いて、トルエンの酸化分解の最初の反応を担う酵素の一部をコードしている機能遺伝子 (*tmoA*, *tbmD*, *todC*, *xylA*) に基づくクローン解析を行い、各機能遺伝子を有している微生物の特定を試みた。まず、PCR 法により各機能遺伝子の増幅を試みたが *xylA* 遺伝子のみ遺伝子増幅が見られなかった。*xylA* 遺伝子を有したトルエン分解菌は他のトルエン分解菌と競合した場合、増殖することが困難であることが知られている (Duetz *et al.*, 1994)。*xylA* 遺伝子は、植種汚泥に用いた活性汚泥中には存在していたことから (データ非表示)、リアクター内で他のトルエン分解菌と競合した結果、*xylA* 遺伝子を有した微生物は増殖出来なかったのではないかと考えられる。遺伝子増幅が確認できた *tmoA*, *tbmD*, *todC* 遺伝子のクローン解析の結果を **Table 6-4** に示す。*tmoA*, *todC* 遺伝子を標的としたプライマーセットでは標的遺伝子のクローンが得られたが、*tbmD* 遺伝子を標的としたプライマーセットでは、*tbmD* 遺伝子ではなく phenol hydroxylase に近縁な遺伝子が得られた。Phenol hydroxylase は、フェノール類を分解する酵素であり、フェノール類は Monooxygenase によるトルエン分解の過程において生成されることが知られている (**Fig. 6-1**)。また、Phenol hydroxylase は、*tbmD* 遺伝子と高い相同性を有していることが知られ

**Table 6-4.** Nearest match strain for each function gene based on cloning analysis by using each primer set

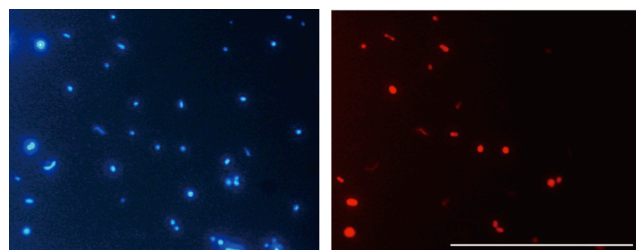
Primer	Number of clones	Close relatives	Identity (%)	Accession number
TMOA-F/R	69	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59, TMOA hydroxylase alpha subunit gene	87	EU734589
	21	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1, toluene-4-monooxygenase gene	95	AY552601
TBMD-F/R	20	<i>Azotobacter vinelandii</i> CA6, multi-component phenol hydroxylase alpha subunit gene	92	CP005095
	9	<i>Burkholderia</i> sp. HA-OP24, phenol hydroxylase alpha subunit gene	84	JQ015321
	9	<i>Pseudomonas resinovorans</i> NBRC 106553, phenol hydroxylase P3 gene	82	NC_021499
	8	<i>Oleomonas</i> sp. SJ-1, phenol hydroxylase subunit gene	91	JQ346085
TODC-F/R	49	<i>Pseudomonas</i> sp. LUN2, toluene dioxygenase gene	99	EF683125
	8	<i>Pseudomonas</i> sp. chlorobenzene dioxygenase terminal oxygenase large subunit ( <i>tcbAa</i> ) gene	92	U15298

ており、既報においても同様の結果が得られている (Hendrickx *et al.*, 2006)。

*tmoA* 遺伝子を標的としたクローン解析では *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 株のもつ *tmoA* 遺伝子の塩基配列と相同性 87% のクローンが、*todC* 遺伝子を標的としたクローン解析では *Pseudomonas* sp. LUN2 株のもつ *todC* 遺伝子の塩基配列と相同性 99% のクローンが優占的に検出された。16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析で検出されたトルエン分解菌 *P. putida* F1 株は *todC* 遺伝子を有していることが知られているが (Hendrickx *et al.*, 2006)、*todC* 遺伝子を標的としたクローン解析では検出されなかった。既報においても 16S rRNA 遺伝子及び機能遺伝子の解析結果が一致しないことが報告されている (Okunishi *et al.*, 2009)。この要因として、全細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析では、すべてのトルエン分解菌を把握し切れなかった可能性が考えられる。また、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析では検出されなかった *tmoA* 遺伝子を有した微生物は、*tmoA* 遺伝子を検出することができるプライマーセットを用いることで検出することが可能であった。この結果より、DHS リアクター内のトルエン分解菌は、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析で検出され、トルエン分解菌として考えられる *P. putida* F1 株, *Mycoplana bullata* や *Nevskia* sp. 以外のトルエン分解菌によってもトルエンが分解されていた可能性が高いことが明らかとなった。

## 6.3.3. トルエン分解に関与する環境微生物の mRNA の視覚的検出

リアクター内における微生物群集構造解析の結果、*tmoA*、*todC* 遺伝子を標的としたプライマーセットで特異的な各標的遺伝子の検出が可能であった。まず、本手法の適用有効性を評価するために、CARD-FISH 法を適用する際に考慮する必要がある菌体内の内在性 HRP 活性について確認した。その結果、プローブを滴下せずともチラミド反応が得られ、菌体から蛍光が得られた (Fig. 6-3)。従って、本研究



**Fig. 6.3** False positive signal by endogenous peroxidase activity. Each double panel depicts DAPI staining (left) and epifluorescence (right) showing identical fields. The bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

に用いたサンプル中には内在性 HRP 活性を失活させる必要がある微生物が存在していることが明らかとなった。本研究では、内在性 HRP 活性を失活させる操作が必要ない in situ dual DNA-HCR 法が微生物を視覚的に検出するには有効であると判断し、*tmoA*、*todC* 遺伝子を標的としたフォワードプライマーの相補鎖配列をイニシエータープローブに挿入した in situ dual DNA-HCR 法を本研究に用いた環境サンプルに適用させた。まず、スライド上で in situ dual DNA-HCR 法を適用した結果、菌体以外の不純物が多く存在しており、菌体の特定が困難であった。サンプル内の不純物の除去は、メンブレンフィルター (pore size : 3  $\mu\text{m}$ ) を用いて行った。その結果、菌体のみを回収することに成功した。しかしながら、回収した菌を用いて実験を行ったが、スライド上から非特異的な蛍光が得られた。また、その非特異的な蛍光は、イニシエータープローブの有無に関係なく得られた。従って、伸長プローブの洗浄方法に問題があると考え、界面活性剤である tween20 を伸長プローブの洗浄液に添加し、非特異的な蛍光の除去を試みた。その結果、0.05% tween 20 を洗浄液に添加することで非特異的な蛍光の抑制に成功した。これまでの検討結果から得られた最適条件を用いて in situ dual DNA-HCR 法を環境サンプルに試みたが、菌体から蛍光が得られなかった。微生物解析の結果から *todC* 遺伝子を有した *P. putida* F1 株に近縁なクローンは、約 5%程度しか存在しておらず、また *tmoA* 遺伝子を有した微生物は 16S rRNA 遺伝子を標的とした微生物槽解析では検出されていないことを考慮すると、サンプル中にトルエン分解菌が存在している割合が非常に少ないと考えた。そこで、スライド上にアプライしている量が少ないのではないかと考え、メンブレンフィルター (pore size : 0.2  $\mu\text{m}$ ) を用いてフィルター上に菌体を回収した。その結果、スライド上で行うよりも多くの菌体に対して in situ dual DNA-HCR 法を適用できるようになった。まず、細菌の代表的な交雑部位である EUB338 領域に対し in situ dual DNA-HCR 法を適用させた結果、交雑したプローブ由来の蛍光を得ることに成功した。この結果より、環境サンプルの固定方法や in situ dual DNA-HCR 法のプロトコールに問題ないことが明らかとなった。次に、in situ dual DNA-HCR 法による



*tmoA* mRNA の視覚的検出を試みた結果、一部の菌体から蛍光を得ることに成功した (Fig.6-3, A)。さらに、微生物群集構造解析の結果より *tmoA* 遺伝子を有したトルエン分解菌よりも存在数が多いと考えられる *todC* 遺伝子を有したトルエン分解菌の *todC* mRNA の視覚的検出を試みた。その結果、フィルターから非特異的な蛍光が得られたが、一部の菌体からも蛍光が得られた (Fig.6-3, B)。また、それらの蛍光は、イニシエータープローブを用いない系では得られなかった (Fig.6-3, C)。従って、得られた蛍光は、*tmoA*, *todC* mRNA 由来であると判断した。

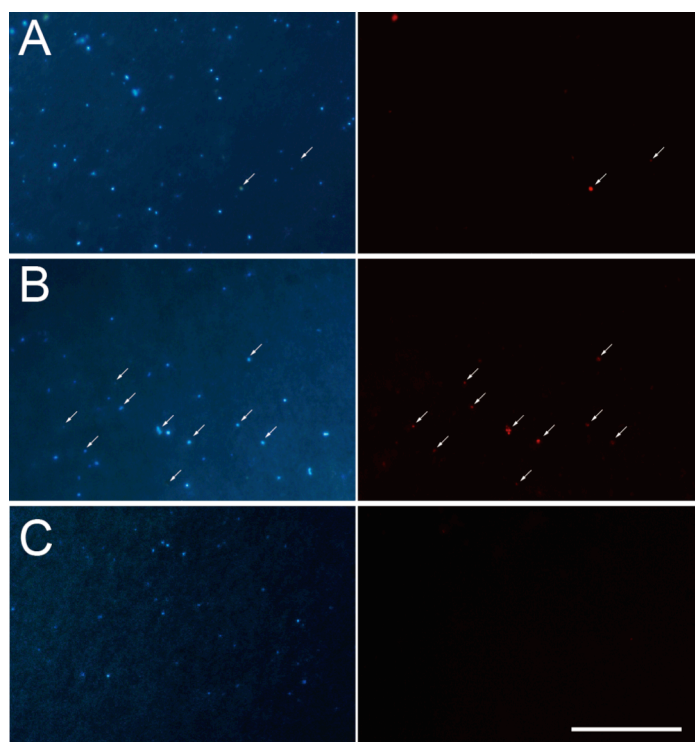
#### 6.4 まとめ

本章では、in situ dual DNA-HCR 法を mRNA に適用させる環境微生物の選定及びバイオリアクター内のトル

エン分解菌の視覚的 mRNA の検出を試みた。まず、トルエンガスを処理している DHS リアクターの微生物群集構造解析を行った結果、16S rRNA 遺伝子を標的とした場合、リアクター下部にトルエン分解菌として考えられている *P. putida* F1 に近縁なクローンが約 5% 存在していた。さらに、機能遺伝子を標的とした解析では、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析では得られなかったトルエン分解菌を把握することが可能であった。従って、本研究に用いた DHS リアクター内には多種のトルエン分解が生息していることが明らかとなった。次に、トルエン分解菌が生息していると考えられる DHS リアクター内のトルエン分解菌の mRNA を in situ dual DNA-HCR 法を用いて視覚的検出を行った。その結果、フィルターから非特異的な蛍光が得られるが、トルエン分解に関与する機能遺伝子である *tmoA*, *todC* 遺伝子から発現した *tmoA*, *todC* mRNA の視覚的検出に成功した。

#### 参考文献

Amann, R. I. and Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews* 6, 339-348.



**Fig. 6.3** Detection of *tmoA* mRNA (A) and *todC* mRNA (B) in toluene degrading microorganisms from sludge of DHS reactor by in situ dual DNA-HCR. (C) : Negative control (without initiator probe). Each double panel depicts DAPI staining (left) and epifluorescence (right) showing identical fields. White arrows indicate positive cells. The bar represents 20  $\mu\text{m}$ .

- Bakermans C. and Madsen, E. L.** (2002). Detection in coal tar waste-contaminated groundwater of mRNA transcripts related to naphthalene dioxygenase by fluorescent in situ hybridization with tyramide signal amplification. *Journal of Microbiological Methods* **50**, 74–85.
- Cheng, Z. W., Zhang, L. L., Chen, J. M., Yu, J. M., Gao, Z. L. and Jiang, Y. F.** (2011). Treatment of gaseous alpha-pinene by a combined system containing photo oxidation and aerobic biotrickling filtration, *Journal of Hazard Mater*, **192**(3), 1650-1658.
- Duetz, W. A., De Long, C., Williams, P. A. and Andel, J. G. v.** (1994). Competition in chemostat culture between Pseudomonas strains the use different pathways for the degradation of toluene, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(8), 2858-2863.
- Hales, B. A., Edwards, C., Ritchie, D. A., Hall, G., Pickup, R. W. and Saunders, J. R.** (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 668–675.
- Hendrickx, B., Dejonghe, W., Faber, F., Boenne, W., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M. and Springael, D.** (2006). PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites, *FEMS Microbiology Ecology*, **55**(2), 262-273.
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Ruegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlomann, M., Brennerova, M., Brenner, V., Pieper, D. H., Top, E. M., Dejonghe, W., Bastiaens L. and Springael, D.** (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site, *Journal of Microbiology Methods*, **64**(2), 250-265.
- Juteau, P., Rho, D., Larocque, R. and LeDuy, A.** (1999). Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter, *Applied Microbiolal Biotechnology*, **52**, 863-868.
- Kubota, K., Ohashi A., Imachi, H. and Harada, H.** (2006). Visualization of mcr mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probes and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH). *Journal of Microbiological Methods* **66**, 521-528.
- Keylen, K., Lebbe, L. and Vos, P. D.** (2008). *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**, 73-77.
- Kofoed, M. V. W., Nielsen, D. Å., Revsbech, N. P. and Schramm A.** (2012). Fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of nitrite reductase transcripts (nirS mRNA) in *Pseudomonas stutzeri* biofilms relative to a microscale oxygen gradient. *Systematic and Applied Microbiology* **35**(8), 513-517.

- Lane D.J.** (1991). 16S/23S rRNA sequencing. 115–175. Editing by Stackebrandt E., Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Okunishi, S., Morita, Y., Higuchi, T., Maeta, H. and Nishi, K.** (2012). Transformation of microflora during degradation of gaseous toluene in a biofilter detected using PCR-DGGE. *Journal of the air and waste management association*, **62**, 748-757.
- Pernthaler, A. and Amann, R.** (2004). Simultaneous Fluorescence In Situ hybridization of mRNA and rRNA in Environmental Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(9), 5426-5433.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. I.** (2002). Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3094-3101.
- Pilhofer, M., Pavlekovic, M., Lee, N. M., Ludwig, W. and Schleifer K. H.** (2009). Fluorescence in situ hybridization for intracellular localization of nifH mRNA. *Systematic and Applied Microbiology* **32**(3), 186-192.
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., Banfield, J.F.** (2004): Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**, 37-43.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P. and Liesack, W.** (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4704-4712.
- Velen, M., Varma, S. S., Gnanambigal. P. and Lakshmi M. B.** (2012). Biodegradation of toluene in the contaminated soil by *Mycoplana* sp. MVMB2., *International journal of Chemical and Environmental Engineering*, **3**(5), 318-323.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H. and Smith, H.O.** (2004): Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.
- Yu, Y., Breitbart, M., McNairnie, P. and Rohwer, F.** (2006). FastGroupII: a web-based bioinformatics platform for analyses of large 16S rDNA libraries, *BMC Bioinformatics*, **7**, 57.
- 中村将一郎, 田村英輔, 谷川大輔, 長野晃弘, 山口隆司 (2012): DHS リアクターを用いたトルエンガスの連続処理特性, *土木学会論文集 G (環境)*, **68**(7), 595-601.

## 第7章

### 総括

---

## 第7章 総括

### 7.1 本研究で行ったこと

本研究では、新規の蛍光増幅技術として HCR 法に着目し、原核生物の rRNA 及び mRNA を標的とした新しい高感度 FISH 法の開発を行った。また、トルエンを生物分解しているバイオリアクター内の微生物群集構造解析を行い、微生物の機能と系統が一致しないトルエン分解菌を特定するとともに、リアクター内に生息しているトルエン分解菌の mRNA の視覚的検出に試みた。

まず、第3章では HCR 法を用いて原核生物の rRNA を標的とした高感度 FISH (in situ DNA-HCR) 法の開発を行い、開発した in situ DNA-HCR 法の特長を把握した。In situ DNA-HCR 法に用いたプローブは、FISH プローブ配列と HCR 反応に用いるイニシエーター配列を組み合わせたイニシエータープローブ及び Choi らが設計した伸長プローブを RNA から DNA に変更した伸長プローブを用いた。また、in situ における HCR 反応は、HCR 反応に用いる反応温度や反応時間の検討を行い最適化した。その結果、in situ DNA-HCR 法の蛍光強度は、FISH 法で得られる蛍光強度よりも約 8 倍程度高かった。また、in situ DNA-HCR 法に用いるイニシエータープローブの特異性及び挙動は、FISH 法と同程度であり、FISH 法で用いる交雑条件と同程度で適用することが可能であった。さらに、in situ DNA-HCR 法に用いるプローブの細胞浸透性を *Methanosaeta concilii* 及び *Bacillus subtilis* を用いて確認した結果、CARD-FISH 法に用いるプローブよりも細胞浸透性が高いことが明らかとなった。本研究により、原核生物を対象として DNA プローブを用いた HCR 法による高感度 FISH 法を開発することに成功し、高感度 FISH 法として汎用性が高いことを報告した。

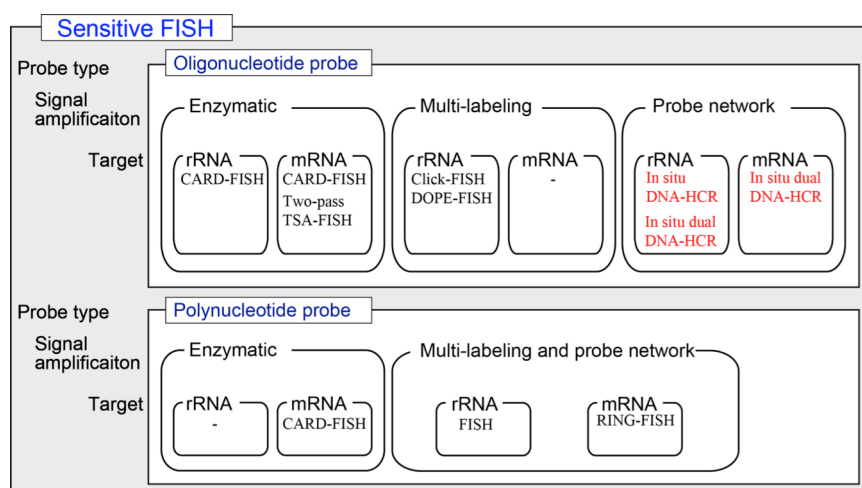
第4章では、第3章で開発を行った in situ DNA-HCR 法を環境サンプルに適用し、環境サンプルに対する適用可能性について報告した。モデル環境微生物には、低 rRNA 含有量の微生物が多く存在することが報告されている海洋中に生息する細菌及び嫌気性グラニューール汚泥及び嫌気性消化汚泥内の古細菌を用いた。まず、細胞壁処理を施した海洋中の細菌を標的とした場合、in situ DNA-HCR 法の検出率は、CARD-FISH 法と同程度の検出率を得ることに成功した。この結果から、in situ DNA-HCR 法は、CARD-FISH 法と同様に高感度 FISH 法として貧栄養環境下に生息している微生物に適用できることが明らかとなった。さらに、嫌気性消化汚泥内に生息し、一般的に細胞壁処理の最適化が困難である古細菌に対して in situ DNA-HCR 法を適用させた結果、CARD-FISH 法や FISH 法よりも高い検出率を示した。従って、in situ DNA-HCR 法は、低 rRNA 含有量が少ない古細菌に対して特に有効な手法であると言える。さらに、嫌気性消化汚泥内の細菌、古細菌及び *Methanosaetaceae* 科のメタン生成古細菌の同時染色にも成功させ、in situ DNA-HCR 法を FISH 法や CARD-FISH 法のように多重染色のルーティンワークとして使用できる技術として確立した。

第5章では、プローブの細胞浸透性が高い *in situ* DNA-HCR 法を改良し、微生物の機能を把握することが可能な mRNA を標的とした視覚的 mRNA 検出技術 (*in situ* dual DNA-HCR 法) の開発を行い、開発した *in situ* dual DNA-HCR 法の特長を把握した。HCR による蛍光増幅は、第3章及び第4章に用いた伸長プローブに新たなイニシエーター配列を組み合わせた伸長プローブ及びそのイニシエーター配列から伸長反応を示す伸長プローブの計4つの伸長プローブを用いて行った。まず、RNA の減少等が見られず操作が容易な EUB338 領域を標的として、プロトコールの最適化を行った。その結果、ハイブリダイゼーションバッファー及び伸長反応液に dextran sulfate 及び blocking reagent を加えることで飛躍的な蛍光増幅が見られ、*in situ* DNA-HCR 法と比較して約3倍程度の蛍光強度を得ることに成功した。さらに、その蛍光強度は、CARD-FISH 法と同程度であり原核生物の mRNA を視覚的に検出出来るポテンシャルを有していることが明らかとなった。次に、標的 mRNA としてトルエン分解に関与する機能遺伝子である *tmoA*, *todC* 遺伝子から発現する *tmoA*, *todC* mRNA を選定し、その mRNA に交雑するイニシエータープローブの設計を行った。イニシエータープローブの適用可能性は、Clone-FISH 法を用いて評価した。その結果、設計したイニシエータープローブは、各々の mRNA に交雑し蛍光が得られたため *in situ* での検出に適用可能であると判断した。また、そのイニシエータープローブは、一塩基ミスマッチを識別できる非常に高い特異性を有していることが明らかとなった。また、本手法を用いて純粋菌株中の *todC* mRNA の視覚的検出にも成功した。

第6章では、新規 mRNA 検出技術として開発を行った *in situ* dual DNA-HCR 法の環境サンプルに対する適用可能性について報告した。まず、標的微生物を選定するために、トルエン分解を行っているバイオリアクター内の微生物群集構造解析を行い、トルエン分解菌を把握した。その結果、用いたバイオリアクター内には *todC* 遺伝子を有していることが知られている *P. putida* F1 株に近縁なクローンが約6%存在していることが明らかとなった。また、機能遺伝子を標的したクローン解析から *tmoA* 遺伝子を有した微生物もそのバイオリアクター内に生息していることが明らかとなった。そこで、そのバイオリアクター内に存在しているトルエン分解菌内の *tmoA*, *todC* 遺伝子から発現した mRNA に対して *in situ* dual DNA-HCR 法を適用させ、環境微生物中の mRNA の視覚的検出を試みた。その結果、非特異的な蛍光が多く見られるものの一部の菌体から蛍光を得ることに成功した。

## 7.2 本研究の位置づけ

本研究では、蛍光増幅技術に酵素反応を用いない HCR 法を活用し新しい高感度 FISH 法の開発を行った。本研究で開発を行った微生物視覚的検出技術は、微生物の同定が可能な rRNA を標的とした技術 (*in situ* DNA-HCR 法) 及び微生物の機能を把握することが可能な mRNA を標的とした技術 (*in situ* dual DNA-HCR 法) の二つである。本研究で開発した rRNA 及び mRNA を標的とした高感度 FISH 法と従来の高感度 FISH 法の間を Fig. 7-1 及び



**Fig. 7-1.** Schematic diagram of FISH. In situ DNA-HCR and in situ dual DNA-HCR were introduced in this study

**Table 7-1.** Comparison of FISH methods for detecting rRNA in prokaryotes

	FISH methods for detecting a rRNA in prokaryotes			
	In situ DNA-HCR	In situ dual DNA-HCR	CARD-FISH	DOPE-FISH
Probe	Oligonucleotide	Oligonucleotide	Oligonucleotide	Oligonucleotide
Signal amplification	Probe network	Probe network	Enzyme reaction	Double labeling
Signal intensity *1	8 times	24 times	26-41 times	2 times
Specificity	High	High	High	High
Probe permeability	High	High	Low	High
Inactivation of EPX *2	No need	No need	Need	No need
Reference	In this study	In this study	Hoshino <i>et al.</i> , 2008	Stoecker <i>et al.</i> , 2010

\*1 Signal intensity of each method is compared with that of oligo-FISH.

\*2 EPX : Endogenous peroxidase

**Table 7-1, Table 7-2** に本手法の適用可能な研究を **Fig. 7-2** に示す。

まず、rRNA を標的とした in situ DNA-HCR 法は、従来高感度 FISH 法の問題点であったプローブの細胞浸透性を解決することが可能な唯一の方法であると考えている。これまでに、この問題を解決する方法として、オリゴヌクレオチドプローブの複数の蛍光物質を標識する方法がいくつか報告されている (e.g. DOPE-FISH 法)。しかしながら、DOPE-FISH 法の蛍光強度は、FISH 法と比較して 2 倍程度高いと報告されているが、それでも蛍光強度が不十分であり貧栄養環境下に生息する微生物には適用が困難であると考えられる。従って、プローブの細胞浸透性が高く FISH 法と比較して約 8 倍程度の蛍光強度が得られる in situ DNA-HCR 法は、高感度 FISH 法の一つのオプションになるだけでなく、これまで検出が困難であった微生物の検出に有効な手法であると考えられる (**Fig. 7-1, Table 7-1**)。また、in situ DNA-HCR 法による検出が困難な微生物には、通常の FISH 法と比較して約 24 倍程度高い蛍光強度を有し、mRNA だけでなく rRNA にも適用可能である in situ dual DNA-HCR 法を適用することで、検出が容易になると考えられる (**Table 7-1**)。

**Table 7-2.** Comparison of FISH methods for detecting mRNA in prokaryotes

	FISH methods for detecting a mRNA in prokaryotes			
	In situ dual DNA-HCR	Two-pass TSA-FISH	CARD-FISH	RING-FISH
Probe	Oligonucleotide	Oligonucleotide	Oligonucleotide	Polynucleotide
Signal amplification	Probe network	Enzyme reaction	Enzyme reaction	Probe network
Specificity	High	High	High	Low
Probe permeability	High	Low	Low	Low
Inactivation of EPX* <sup>1</sup>	No need	Need	Need	No need
Reference	In this study	Kubota <i>et al.</i> , 2006	Hoshino <i>et al.</i> , 2008	Zwirgmaier <i>et al.</i> , 2003

\*1 EPX : Endogenous peroxidase

また、rRNA を標的とした本手法は、微生物回収装置と組み合わせ、シングルセルジェノミクス解析による未培養微生物のゲノム解析が可能になるのではないかと考えている。現在、低 rRNA 含有量微生物の研究には、CARD-FISH 法が適用されているが、操作上 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や HCl 等の DNA にダメージを与えている可能性がある。また、DNA 及びタンパク質を架橋させるパラホルムアルデヒドによる固定では、フローサイトメーターで回収した微生物内の DNA 収量が減少することも報告されており、微生物の全ゲノムを把握するためには固定操作を避ける必要がある。従って、プローブの浸透性が低い CARD-FISH 法ではゲノム解析には適していない。従って、細胞浸透性が他の手法と比較して高く、DNA にダメージを与えない本手法は、そのようなゲノム解析にも応用することが可能であると考えている。その他、本手法の適用方法としては、海洋サンプル等のそもそも rRNA のオペロン数が少なく rRNA の発現量が少ない微生物の分離培養における集積度の確認等にも柔軟に適用できると考えている。

次に、mRNA を検出可能な新規高感度 FISH 法である in situ dual DNA-HCR 法は、酵素反応を必要としないオリゴプローブを用いた mRNA 検出技術として唯一の方法であると考えられる (Fig. 7-1)。酵素反応を用いない高感度 FISH 法として RING-FISH 法が唯一 mRNA に適用されている手法である。しかし、RING-FISH 法は、ポリヌクレオチドプローブを用いる方法であるため、高い特異性を保つことが困難である。従って、本研究で適用した mRNA の様に一塩基ミスマッチを識別する必要がある場合は、ポリヌクレオチドプローブでの適用が困難であると考えられる。オリゴヌクレオチドプローブを用いた方法としては、CARD-FISH 法が報告されている。しかし、CARD-FISH 法は、分子量が大きい酵素を用いるため細胞壁処理が必要であり、またその酵素による擬陽性の蛍光が得られる場合も報告されている。従って、本研究に用いた擬陽性を示す環境サンプルへの適用や細胞浸透性が低い微生物に対して、特に酵素反応やポリヌクレオチドプローブを用いない本手法は、有効な手法であると考えられる (Table. 7-2)。

さらに、DNA-HCR に用いる伸長プローブは、イニシエータープローブから特異的に伸長を示すことが明らかとなった。従って、複数のイニシエータープローブ及び伸長プローブ



**Table 7-3.** Comparison of novel sensitive FISH in this study and HCR-FISH of previous studies

Methods	In situ dual DNA-HCR		In situ DNA-HCR			HCR-FISH	
	Prokaryotes	Prokaryotes	Prokaryotes	Prokaryotes	Eukaryotes	Eukaryotes	
target							
Probe types	DNA	DNA	RNA	RNA	DNA	DNA	
Target molecular	rRNA, mRNA	rRNA	rRNA, mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	
Signal / Noise ratio	High	High	Low	Low	High	High	
Handleability	High	High	Low	Low	High	High	
Probe permeability	High	High	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested	
Specificity	High	High	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested	
Hybridization conditions* <sup>1</sup>	46°C+X% FA	46°C+X% FA	55°C+50% FA	55°C+50% FA	45°C+50% FA	45°C+50% FA	
Amplification conditions* <sup>1</sup>	46°C+0% FA	46°C+0% FA	45°C+40% FA	45°C+40% FA	45°C+0% FA	45°C+0% FA	
Amplification time	4 hours	2 hours	12-16 hours	12-16 hours	12-16 hours	12-16 hours	
Reference	In this study	In this study	Rosenthal <i>et al.</i> , 2013	Choi <i>et al.</i> , 2010	Choi <i>et al.</i> , 2014		

\*<sup>1</sup>FA: formamide concentration

ブを用意するだけで、同時に異なる標的を検出することが可能である。従って、mRNA と rRNA の同時染色等の多重染色も従来の手法と比較して容易になると考えている (Fig. 7-2)。これまでに CARD-FISH 法による多重染色方法が報告されているが、多重染色を行うためには煩雑な操作が必要であり、細胞浸透性や酵素による擬陽性の検出等の問題から適用に限界が生じる場合が考えられる。また、そのような操作上の問題から、これまでに mRNA 同士や機能遺伝子同士の同時検出は報告されていない。本研究が成功し、mRNA 同士や機能遺伝子同士の同時に検出することが可能になれば、これまで以上に in situ における詳細な解析が可能になると考えている。例えば、本研究で標的としたトルエン分解菌等の 16S rRNA を標的とした解析では機能を網羅できない微生物群の微生物機能に特化した微生物間同士の空間分布の把握が可能になる。また、rRNA を標的とした in situ DNA-HCR 法と同様に微生物回収技術とも組み合わせることも可能であると考えている。これらを踏まえると、本研究で開発を行った HCR 法を用いた新規高感度 FISH 法 (in situ DNA-HCR 法及び in situ dual DNA-HCR 法) は、環境微生物の検出を容易にするだけでなく、様々な解析方法と組み合わせることも可能であるため、未培養、難培養微生物の生態解明に大きく寄与するものと考えられる。

最後に、本研究で開発を行った in situ DNA-HCR 法及び in situ dual DNA-HCR 法と従来の HCR 法を用いた FISH 法との比較を Table 7-3 に示す。既往の報告では、HCR 法を用いた FISH 法は真核生物に適用されている。原核生物の rRNA に適用された HCR-FISH 法は、RNA プロブを用いているため実験操作が煩雑であり、また、イニシエータープロブの交雑条件は検討されていない。本研究で開発した技術は、イニシエータープロブの特異性を明らかにしており、イニシエータープロブの交雑条件を変更することで通常の FISH 法と同じように様々な標的部位に適用可能である。最後に本研究で開発を行った 2 つの新規高感度 FISH 法のプロトコールを添付し、本論文を締めくくりとしたい。

Sensitive FISH		
Tasks	Problems	Solutions
Detection of rRNA in environmental micro-organisms	Low abundance	Enrichment by filtration
	Low rRNA contents	CARD-FISH
		Polynucleotide probes
		In situ DNA-HCR
	Low cell permeability	In situ dual DNA-HCR
		Permeabilization
	High peroxidase activity	In situ DNA-HCR
In situ dual DNA-HCR		
Inactivation by chemical		
Low probe accessibility	LNA, PNA	
	helper probes	
Low signal/noise ratio	CARD-FISH	
	In situ DNA-HCR	
	In situ dual DNA-HCR	
Detection of mRNA in environmental micro-organisms	High peroxidase activity	Inactivation by chemical
		In situ dual DNA-HCR
	Low cell permeability	Permeabilization
In situ dual DNA-HCR		
Low probe accessibility	LNA, PNA	
Simultaneous detection of rRNA and mRNA or mRNA and mRNA in environmental micro-organisms	Long working time	In situ dual DNA-HCR
	Low cell permeability	Permeabilization
		In situ dual DNA-HCR
Low probe accessibility	LNA, PNA	

(Modified from Wagner *et al.*, 2002)

**Fig. 7-2.** A guide for solving frequently encountered problems with FISH. In situ DNA-HCR and in situ dual DNA-HCR were introduced in this study

---

# 付録

---

---

## プロトコル

### In situ DNA-HCR –Yamaguchi *et al.*, 2014-

#### Reagent

- ・PBS
- ・1% low melting point agarose
- ・1 M Tris-HCl
- ・5 M NaCl
- ・formamide
- ・10% SDS and 0.01% SDS
- ・500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ・TNT (0.05% tween 20 in 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)

#### Sample preparation

##### For slide

1. 1.5 mL tube に固定サンプルを x volume、1xPBS を (1-x) volume, 0.01% SDS を 0.1 volume 加える。
2. 0.1 volume の 1% low melting point agarose を更に加え、60°C 程度で加熱する。
3. スライドにアプライし、60°C で 10 分間程度乾燥させる。
4. 乾燥させたサンプルは、50, 80, 96% EtOH にそれぞれ 3, 1, 1 分間浸し脱水させる。
5. 風乾させる。

##### For filter

6. 固定サンプルを集菌したフィルターを実験条件に合わせてカットする。
7. 0.1% low melting point agarose に浸した後、パラフィルム上で載せ、60°C で 10 分間程度乾燥させる。
8. 乾燥させたサンプルに 50% EtOH を滴下し、パラフィルムからフィルターを剥がす。(ゆっくりかつ慎重に行う)
9. その後、50, 80, 96% EtOH にそれぞれ 3, 1, 1 分間浸し脱水させる。
10. 風乾させる。

#### Permeabilization (if necessary: but gram-positive cells were required)

1. 風乾させた固定サンプルに X mg/ml の lysozyme や X mg/ml proteinase K 等の最適化した濃度で最適化した反応時間で処理を行う。
  2. 細胞壁処理が終わったサンプルは、TNT に 15 分間浸し洗浄する (室温)。
-

- 
3. 更に、MQ に 1 分間浸し、EtOH に 1 分間浸して風乾させる。

### Hybridization and Washing of initiator probe

1. ハイブリダイゼーションバッファーを作成する。最終濃度で 20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, X% formamide になるように 2 mL tube (洗浄を NaCl で行う場合) もしくは 50 mL tube (洗浄を formamide で行う場合) に試薬を加える。MQ で 2, 50 ml にメスアップした後、0.01% SDS になるように 10% SDS を加える。
2. 作成したハイブリダイゼーションバッファーから 10-100  $\mu$ l 程度とり、そこに最終濃度で 0.5  $\mu$ M になるようにイニシエータープローブを加える。
3. 50 mL tube にキムワイプを敷き、そこにハイブリダイゼーションバッファーを 10 ml 程度加え、ハイブリダイゼーションチャンパーを作成する。
4. 0.5  $\mu$ M イニシエータープローブを、各ウェルもしくはフィルターにアプライする。
5. チャンパーに入れ、46°C で 2 時間以上交雑させる。
6. 交雑させたサンプルは、50 mL のウォッシュバッファー (ハイブリダイゼーションバッファーと同じ、もしくは 20 mM Tris-HCl, X M NaCl, 0.05% SDS) に 30 分間浸し、洗浄を行う (NaCl で洗浄する場合の塩濃度は Silva HP の FISH protocol に記載してあるのでそこを参照する)。
7. Formamide で洗浄を行った場合には、ウォッシュバッファーで洗浄した後、伸長反応液に 5 分浸し、formamide を除去させる。

### Preparation of amplifier probes (during washing step)

1. 伸長反応液を作成する。最終濃度で 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS になるように 2 ml tube に加える。
2. そこから 20 $\mu$ l 程度とり、PCR tube に加える。
3. そこに最終濃度で 5  $\mu$ M になるように伸長プローブを加える (伸長プローブは別々の tube で用意する)。
4. PCR 機を用いて 95°C を 90 秒, 25°C で 30 分間にセットし伸長プローブの解離及びシステム構造の安定化を行う。
5. PCR 機で準備を行った後、それぞれの伸長プローブを混ぜる。

### Signal amplification using amplifier probes and washing

1. 洗浄を行ったスライドのウェルの周りをキムワイプ等で拭き、周りの水分を除去する。フィルターで行っている場合は、サンプルをアプライしていない面を下にしてキムワイプに載せ、水分を除去する。
  2. 混合させた伸長プローブ (最終濃度 2.5  $\mu$ M) を各ウェルやフィルターにアプライし、
-

- 
- 46°C で 2 時間反応させる。(チャンパーは伸長反応液で作成する)
3. 反応後、50 ml の伸長反応液に浸し、4°C で 30 分間の洗浄を行う。
  4. 最後に、MQ に 1 分間、EtOH に 1 分間浸し、冷蔵庫 (4°C) で乾燥させる。

## **In situ dual DNA-HCR**

### **Reagent**

- ・PBS
- ・PBST (0.05% tween 20 in 1 x PBS)
- ・1% low melting point agarose
- ・1 M Tris-HCl
- ・5 M NaCl
- ・formamide
- ・10% SDS and 0.01% SDS
- ・500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ・TNT (0.05% tween 20 in 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)
- ・Dextran sulfate
- ・10% blocking reagent (in maleic acid, store at 4°C)

### **Sample preparation**

#### For slide

1. 1.5 mL tube に固定サンプルを x volume、1xPBS を (1-x) volume, 0.01% SDS を 0.1 volume 加える。
2. 0.1 volume の 1% low melting point agarose を更に加え、60°C 程度で加熱する。
3. スライドにアプライし、60°C で 10 分間程度乾燥させる。
4. 乾燥させたサンプルは、50, 80, 96% EtOH にそれぞれ 3, 1, 1 分間浸し脱水させる。
5. 風乾させる。

#### For filter

1. 固定サンプルを集菌したフィルターを実験条件に合わせてカットする。
  2. 0.1% low melting point agarose に浸した後、パラフィルム上で載せ、60°C で 10 分間程度乾燥させる。
  3. 乾燥させたサンプルに 50% EtOH を滴下し、パラフィルムからフィルターを剥がす。(ゆっくりかつ慎重に行う)
-

- 
- その後、50, 80, 96% EtOH にそれぞれ 3, 1, 1 分間浸し脱水させる。
  - 風乾させる。

### **Permeabilization**

#### **(if necessary: but gram-positive cells were required)**

- 風乾させた固定サンプルに X mg/ml の lysozyme や X mg/ml proteinase K 等の最適化した濃度で最適化した反応時間で処理を行う。
- 細胞壁処理が終わったサンプルは、TNT に 15 分間浸し洗浄する (室温)。
- 更に、MQ に 1 分間浸し、EtOH に 1 分間浸して風乾させる。

### **Hybridization and Washing of initiator probe**

- ハイブリダイゼーションバッファーを作成する。まず、20 mg dextran sulfate を 2 ml tube に加え、その tube に最終濃度で 20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl になるように試薬を加える。MQ で 1ml 程度までメスマップし、60°C で完全に dextran sulfate が溶けるのを待つ。溶けたのを確認した後、X ml formamide および 10 % blocking reagent (最終濃度 X% formamide, 1% blocking reagent)を加え、MQ で 2 mL までメスマップさせる。最後に、10% SDS を最終濃度 0.01% SDS になるように加える。
- 作成したハイブリダイゼーションバッファーから 10-100  $\mu$ l 程度とり、そこに最終濃度で 0.5  $\mu$ M になるように initiator probe を加える。
- ハイブリダイゼーションチャンパーを作成する。まず、50 mL tube に in situ DNA-HCR のハイブリダイゼーションバッファーを作成する。次に、その溶液をキムワイプが敷いてある 50 mL tube に 10 mL 程度加える。
- 0.5  $\mu$ M initiator プローブを、各ウェルもしくはフィルターにアプライする。
- チャンパーに入れ、46°C で一晩交雑させる。
- 交雑させたサンプルは、50 mL のウォッシュバッファー (ハイブリダイゼーションバッファーと同じ、もしくは 20 mM Tris-HCl, X M NaCl, 0.05% SDS) に 30 分間浸し、洗浄を行う (NaCl で洗浄する場合の塩濃度は Silva HP の FISH protocol に記載してあるのでそこを参照する)。
- Formamide で洗浄を行った場合には、ウォッシュバッファーで洗浄した後、伸長反応液に 5 分浸し、formamide を除去させる。

### **Preparation of amplifier probes for first signal amplification**

#### **(during washing step)**

- 伸長反応液を作成する。最終濃度で 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS になるように 2 ml tube に加える。
-

- 
2. そこから 20 $\mu$ l 程度とり、PCR tube に加える。
  3. そこに最終濃度で 5  $\mu$ M になるように 1 回目の伸長に用いる伸長プローブを加える (伸長プローブは別々のチューブで用意する)。
  4. PCR 機を用いて 95°C を 90 秒, 25°C で 30 分間にセットし伸長プローブの解離及びシステム構造の安定化を行う。
  5. PCR 機で準備を行った後、それぞれの伸長プローブを混ぜる。

## **Signal amplification using amplifier probes and washing**

### **(First signal amplification)**

1. 洗浄を行ったスライドのウェルの周りをキムワイプ等で拭き、周りの水分を除去する。フィルターで行っている場合は、サンプルをアプライしていない面を下にしてキムワイプに載せ、水分を除去する。
2. 混合させた伸長プローブ (最終濃度 2.5  $\mu$ M) を各ウェルやフィルターにアプライし、46°C で 2 時間反応させる。(チャンパーは伸長反応液で作成する)
3. 反応後、50 ml の PBST に浸し、4°C で 10 分間の洗浄を行う。

## **Preparation of amplifier probes for second signal amplification**

### **(During first signal amplification)**

1. 20  $\mu$ L 程度の伸長反応液とり、PCR tube に加える。
2. そこに最終濃度で 5  $\mu$ M になるように 2 回目の伸長に用いる amplifier probe を加える (伸長プローブは別々の tube で用意する)。
3. PCR 機を用いて 95°C を 90 秒, 25°C で 30 分間にセットし伸長プローブの解離及びシステム構造の安定化を行う。
4. PCR 機で準備を行った後、それぞれの伸長プローブを混ぜる。

## **Signal amplification using amplifier probes and washing**

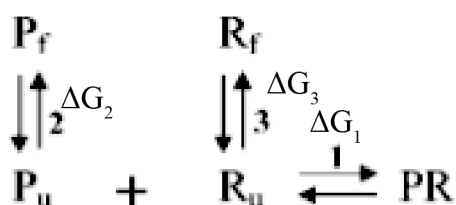
### **(Second signal amplification)**

1. 洗浄を行ったスライドのウェルの周りをキムワイプ等で拭き、周りの水分を除去する。フィルターで行っている場合は、サンプルをアプライしていない面を下にしてキムワイプに載せ、水分を除去する。
  2. 混合させた伸長プローブ (最終濃度 2.5  $\mu$ M) を各ウェルやフィルターにアプライし、46°C で 2 時間反応させる。(チャンパーは伸長反応液で作成する)
  3. 反応後、50 ml の PBST に浸し、4°C で 10 分間の洗浄を行う。
  4. 最後に、MQ に 1 分間浸し、EtOH に 1 分間浸して冷蔵庫 (4°C) で乾燥させる。
-



## 熱力学による in situ DNA-HCR 法に用いるプローブの交雑効率の算出

本研究で用いた熱力学による in situ DNA-HCR 法に用いるプローブの交雑効率の算出は Yilmaz が提唱するモデル式を用いて算出を行った (Yilmaz and Noguera 2004)。モデル式の概要及び式を下記に示す (Fig. S1)。また、DNA-DNA の交雑に必要な  $\Delta S$  及び  $\Delta H$  は、Sugimoto らが指示する数値を用いた (Sugimoto *et al.*, 1996)。得られた  $\Delta S$  及び  $\Delta H$  を用いて  $\Delta G_1$  を算出した (変数は、温度のみとし、25°C から 60°C まで各温度における  $\Delta G_1$  を算出した)。また、プローブ自身の高次構造における  $\Delta G_2$  は、mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) を用いて算出した (変数は温度のみとし、25°C から 60°C まで各温度における  $\Delta G_2$  を算出した)。最後にプローブが交雑する部位の交雑効率についても mfold を用いて算出した (変数は、温度のみとし、25°C から 60°C まで各温度における  $\Delta G_3$  を算出した)。得られ  $\Delta G_1$ 、 $\Delta G_2$  及び  $\Delta G_3$  から  $K_1$ 、 $K_2$  及び  $K_3$  を算出し (式 (1) を参照)、その  $K_{1-3}$  を用いて  $K_{\text{overall}}$  を算出した (式 (2) を参照)。最後に式 (3) を用いて各状態における  $\Delta G_{\text{overall}}$  の算出を行った。



$\Delta G_1$  = プローブと交雑部位が交雑する際の自由エネルギー

$\Delta G_2$  = プローブ自身で交雑する際の自由エネルギー

$\Delta G_3$  = 標的部位自身で交雑する際の自由エネルギー

$$\Delta G_i = -RT \ln K_i \quad (1)$$

$$K_{\text{overall}} = \frac{K_1}{(1+K_2)(1+K_3)} \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{overall}} = -RT \ln K_{\text{overall}} \quad (3)$$

$K_i$ :  $i$  に対する平衡定数

$R$ : 気体定数 ( $1.99 \times 10^{-3}$  kcal/mol)

$T$ : 反応温度 [K: ケルビン]

(本研究では 288.15 K [273.15+25°C] から 333.15 K [273.15+60°C] を使用)

Fig. S1 本研究に用いたモデル及び式

---

## 本論文の基礎となる学術論文

1. 山口剛士, 川上周司, 幡本将史, 高橋優信, 久保田健吾, 井町寛之, 荒木信夫, 山口隆司. Hybridization Chain Reaction (HCR) 法を用いた新規高感度 FISH 法の開発. *土木学会論文集 G (環境)*, Vol. 67, No. 7, pp. III\_93-III\_98, 2011.
2. 山口剛士, 中村将一郎, 幡本将史, 田村英輔, 谷川大輔, 川上周司, 加藤薫, 長野晃弘, 山口隆司. トルエンガス処理に用いた DHS リアクター内の微生物群集構造解析. *土木学会論文集 G (環境)*, Vol. 69, No. 7, pp. III\_215-III\_222, 2013.
3. **Tsuyoshi Yamaguchi**, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Masanobu Takahashi, Hiroyuki Imachi, Nobuo Araki, Takashi Yamaguchi and Kengo Kubota. In situ DNA-HCR : A facilitated in situ hybridization chain reaction system for the detection of environmental microorganisms. *Environmental Microbiology. Accepted*
4. **Tsuyoshi Yamaguchi**, Kyokei Ohmiya, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Kengo Kubota, Nobuo Araki and Takashi Yamaguchi. Visualization of mRNA in a toluene degrading bacteria by in situ DNA-hybridization chain reaction system. In preparation

## 参考論文及び書籍

1. 山口隆司, 山口剛士, 幡本将史, 中村明靖, 川上周司, 久保田健吾. 「微生物検出向け新規高感度 FISH 法の開発 (第 2 章 第 2 節)」 微生物燃料電池による廃水処理システム最前線, p. 75-86. 株式会社 エヌ・ティー・エス. 2013.
  2. **Tsuyoshi Yamaguchi**, Bernhard Fuchs, Shuji Kawakami, Kengo Kubota, Masashi Hatamoto, Rudolf Amann and Takashi Yamaguchi. Rapid and Sensitive Identification of Marine Bacteria by an Improved in situ DNA-Hybridization Chain Reaction (quickHCR-FISH). *Submitted*.
  3. **Tsuyoshi Yamaguchi**, Shuji Kawakami, Masashi Hatamoto, Kengo Kubota, Masanobu Takahashi, Hiroyuki Imachi, Nobuo Araki and Takashi Yamaguchi. Detection of Archaea in an upflow anaerobic sludge blanket reactor by in situ hybridization chain reaction-fluorescence in situ hybridization, *The 13th World Congress on Anaerobic Digestion (AD13)*, 2013.
-

## 謝辞

本研究は、筆者が長岡技術科学大学博士課程において行った研究をまとめたものです。本研究を遂行するにあたり、指導教官をはじめ多くの先輩方、研究室の皆様から多くの協力を頂きました。心より感謝の意を表します。

長岡技術科学大学 環境・建設系 山口隆司教授には、本研究を遂行するにあたり貴重なご助言及び多額の研究費を惜しみなく投じて下さいましたことを心から感謝しております。また、山口先生にお言葉がなかったら博士課程時にドイツのマックスプランク研究所にも行けていなかったのではないかと思います。また、同 幡本将史助教にも、本研究を行う上で貴重なご助言を頂きました。海洋開発研究機構 深海・地殻内生物圏研究分野 井町寛之主任研究員には、研究に対する姿勢や貴重のご助言を頂きました。東北大学 久保田健吾准教授には、本研究の副査だけでなく、本研究を進める上で貴重なご助言のみならず研究の姿勢や論文での表現方法や書き方等いろいろと勉強させて頂きました。阿南工業高等専門学校 川上周司助教には、わたしが学部生の時からお世話になりました。学部生の時に川上先生の元でプレトレーニングをしていなかったら博士課程には進んでいないかも知れません。また、川上先生の指導の下、この本研究を進めていき最終的にはマックスプランク研究所に研究留学できたことも非常に感謝しております。マックスプランク研究所では Prof. Dr. Rudolf Amann 及び Prof. Dr. Bernard M. Fuchs の指導の下、海外での研究や研究に対する姿勢等、さまざまな観点から勉強させて頂きました。最新の情報も多く提供して頂き、感謝しております。また、長岡技術科学大学 生物系 小笠原渉 准教授、環境・建設系 姫野修司 准教授、独立行政法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 生物資源情報基盤研究グループ 玉木秀幸 主任研究員には、学位審査に際して貴重なアドバイスを頂きました。深く感謝しております。また、研究を進める上で格段のご便宜とご配慮を頂きました長岡技術科学大学 渡邊高子 技官、金安奨太郎 技官、重野晶子 秘書に深く感謝します。

水圏土壌環境制御工学研究室の皆様には、研究のみならず学部生の時から7年間という長きにわたり、楽しい時間を過ごすことができ感謝しております。特に本研究室の先輩にあたる中村明靖氏（株式会社コーンズ・エージー）、高橋優信先生（東北大学 特任助教）、阿部憲一氏（東北大学 ポストドクター）には多方面から筆者の研究のアドバイスを頂きました。また、長岡技術科学大学 卒業生 大矢明子氏、平岡大雅氏には学部生時のプレトレーニングの際にお世話になりました。佐藤崇史氏、吉田理奈氏には本研究を遂行するにあたり多大な協力を頂きました。長岡技術科学大学 修士課程 大宮恭平氏には、大変な本研究を一緒に遂行して頂きました。大変な研究で何度かめげそうでしたが、大宮君のお陰で本研究は大きな進歩をとげました。感謝しております。

最後に、家族の皆様には、筆者が在学の間、大変お世話になりました。両親には“自由に生きなさい”と小さい頃から言われ続けてきましたが、7年間という長きにわたり実家から離れた長岡に住み、また日本だけでなくドイツや台湾での研究留学等、本当に自由にさせて頂きました。また私生活面の金銭的な援助をして頂きまして、誠に有り難うございました。これから少しずつ恩返しをしていきたいと思ひます。また、謝辞に書ききれないすべての出会った方々に感謝いたします。

2015年

山口 剛士