

論文内容の要旨

氏名 山口 剛士

本研究では、原核生物の rRNA 及び mRNA を視覚的に検出する新しい視覚的検出技術の開発を行い、従来の高感度 fluorescence in situ hybridization (FISH) 法の問題点であるプローブの細胞浸透性を解決した 2 つの手法について報告した。本研究では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 hybridization chain reaction (HCR) 法に着目し新しい高感度 FISH 法の開発を行った。

第 3 章では、原核生物の rRNA を標的とした新しい高感度 FISH 法として in situ DNA-HCR 法の開発を行った。まず、プローブの交雑時間や交雑温度等のプロトコルの最適化を行った。次に、本手法の特徴を把握するために、蛍光強度、プローブの特異性や挙動及び細胞浸透性を明らかにした。その結果、本手法の蛍光強度は、FISH 法の蛍光強度と比較して約 8 倍の強さを有していることが明らかとなった。また、本手法に用いるプローブの特異性は、FISH 法と同程度であり、プローブの挙動に関しても FISH 法に用いるプローブと同様であることが明らかとなった。さらに、本手法に用いるプローブの細胞浸透性を評価した結果、本手法に用いるプローブは、従来の高感度 FISH 法の一つである catalyzed reporter deposition (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。

第 4 章では、第 3 章で開発を行った in situ DNA-HCR 法の環境微生物への適用可能性について評価した。環境微生物は、FISH 法による検出が困難な海洋中に生息している細菌及び嫌気消化汚泥内及び嫌気グラニュール汚泥内に生息する古細菌とした。まず、海洋中に生息している細菌に対して in situ DNA-HCR 法を適用させた結果、細胞壁処理を施すことで従来の高感度 FISH 法と同程度の検出率を得ることに成功した。この結果より、in situ DNA-HCR 法を高感度 FISH 法として、環境微生物の検出技術として適用できることが明らかとなった。また、細胞壁処理を施さず細菌の検出を行ったところ、CARD-FISH 法よりも高い検出率が得られた。従って、本手法に用いるプローブの高い細胞浸透性が実サンプルをもって証明された。次に、in situ DNA-HCR 法を嫌気グラニュール汚泥内及び嫌気消化汚泥内の古細菌に適用した。その結果、FISH 法で得られる検出率と同等もしくはそれ以上の検出率を得ることに成功した。さらに、本研究では、嫌気消化汚泥内の細菌、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、従来の多重染色法よりも容易かつ短時間で染色することに成功した。

第 5 章では、原核生物の mRNA を標的とした新規高感度 FISH 法として in situ dual DNA-HCR 法の開発を行った。In situ dual DNA-HCR 法は、HCR 法を菌体内で 2 回行うことで、in situ DNA-HCR 法よりも強い蛍光が得られる手法である。まず、実験操作が容易な rRNA を標的としてプロトコルの最適化を行った。プロトコルの最適化を行った in situ dual DNA-HCR 法の蛍光強度は、in situ DNA-HCR 法と比較して約 3 倍程度高く、CARD-FISH 法と同程度の蛍光強度を得ることに成功した。次に、標的 mRNA としてトルエン分解に関与する toluene-4-monoxygenase gene から発現する *tmoA* mRNA 及び toluene dioxygenase の

一部をコードしている *todC* mRNA を選定し、*tmoA*, *todC* mRNA を検出するプローブの設計を行った。設計した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、設計したプローブを用いた系から蛍光が得られ、その特異性は 1 塩基ミスマッチを識別可能であった。さらに、*todC* 遺伝子を有した *Pseudomonas putida* F1 株に対し、本手法と適用させた。その結果、*todC* mRNA の視覚的検出かつ特異的な検出に成功した。この結果から、本手法が新しい mRNA 検出技術として適用できることが明らかとなった。

第 6 章では、第 5 章で開発を行った in situ dual DNA-HCR 法の環境微生物の適用可能性について評価した。標的微生物は、トルエンガスを生物処理しているバイオリアクター内に生息するトルエン分解細菌とした。バイオリアクター内に生息するトルエン分解細菌は 16S rRNA 遺伝子に基づく解析及びトルエン分解に関与する機能遺伝子に基づく解析により特定した。その結果、16S rRNA 遺伝子を標的とした解析では、既知のトルエン分解細菌として *P. putida* F1 株に近縁なクローンが得られた。また、*tmoA* 遺伝子を標的とした解析では、*Pseudoxanthomonas spadix* に近縁なクローンが、*todC* 遺伝子を標的とした解析では *Pseudomonas* sp. LUN2 株に近縁なクローンが得られた。以上の結果から、バイオリアクター内には *tmoA*, *todC* 遺伝子を有したトルエン分解菌が存在していることが明らかとなった。次に、*tmoA*, *todC* mRNA を標的として in situ dual DNA-HCR 法を適用させ、バイオリアクター内のトルエン分解細菌の視覚的検出を試みた。その結果、一部の菌体から蛍光が得られた。これらの結果から、本手法を環境微生物内の mRNA の視覚的検出技術として適用可能であることが明らかとなった。

以上の結果より、従来の高感度 FISH 法の問題であるプローブの細胞浸透性を解決する手法を提供することに成功した。本手法は、高感度 FISH 法の新たな選択肢を提供するだけでなく、プローブの細胞浸透性の問題等によりこれまで検出が困難であった微生物の検出を可能にするものであり、環境微生物の発展に有用な知見と言える。

(1966 字)