

メタン生成古細菌に高感度 FISH 法を適用するための細胞壁処理

水圏土壌環境制御研究室 久保田健吾
指導教官 大橋 晶良, 原田 秀樹

1. はじめに

Fluorescence in situ hybridization (FISH)法は、微生物を培養によらず特異的に検出できる手法として、さまざまな環境に存在している培養困難な微生物の解析や in situ での微生物層の空間分布の把握など、広く用いられている¹⁾。

しかしこれまでのところ FISH 法は、微生物の保持している rRNA が少ない、特異的に設計されたオリゴヌクレオチドプローブと rRNA の接触効率が悪い、プローブが微生物内に浸透しないなどの問題から、検出がしばしば困難となる¹⁾。我々の研究グループでは、嫌気性消化汚泥中に存在する各種微生物のモニタリングを FISH 法で試みたところ、微生物から得られる蛍光が弱く、定量に困難をきたした。さらにメタンの放出源であるシベリア湿原土壌においても同様の結果が得られた。

シベリア湿原土壌サンプル中の微生物に対し、アクリジンオレンジ染色剤による更なる検討を行ったところ、微生物が保持している rRNA が少ないことから FISH 法による検出が困難であったことが判明した²⁾。この様に環境中に存在する多くの微生物は、純粋培養で生育させた場合などに比べて成長速度が非常に遅く、FISH 法での検出が極めて困難となる場合が存在する。そのため、微生物をモニタリングする手法として FISH 法を用いる場合、このような微生物群を度外視することはできず、より高感度に検出できる手法を用いることが必要となる。

FISH 法が世の中に報告されて以来、多くの研究者によってより高感度に検出する方法が開発されてきた。オリゴヌクレオチドプロー

ブに標識する蛍光分子の改良や酵素を用いたシグナル増幅方法などである³⁻⁶⁾。蛍光分子は Cy3 など非常に蛍光強度の強いものが報告されているが、近年ではこの方面で、劇的なシグナルの増加を可能にする物質の報告はない。そのため、報告されているシグナル増幅法の多くは酵素反応を伴ったものである。

しかしこの酵素は、蛍光分子に比べ分子量が非常に大きく、パラホルムアルデヒドやエタノールなどで固定した微生物体内に浸透することが非常に難しいことが知られている。これまでのところ、報告されている高感度 FISH 法の多くはグラム陰性細菌を標的としており⁷⁾、グラム陽性細菌や古細菌などに適用した報告は皆無に等しい。

そこで本研究ではメタン生成古細菌に着目し、高感度 FISH 法をメタン生成古細菌に適用するための細胞壁処理について検討を行った。研究に先立ち、まず用いる高感度 FISH 法の選定を行った。そしてメタン生成古細菌の 4 つの細胞壁構造 (シュードムレイン、メタノコンドロイチン、S レイヤー、シース)について、純菌を用いて検討を行い、得られた知見をもとに環境サンプルへの適用性について評価した。

2. 高感度 FISH 法の選定

メタン生成古細菌の細胞壁処理を行うにあたり、高感度 FISH 法の選定を行った。高感度 FISH 法は alkaline phosphatase (AP)を用いた ECF-FISH 法、HNPP-FISH 法、horseradish peroxidase (HRP)を用いた CARD-FISH 法について検討を行った。

2.1. ECF-FISH 法

ECF-FISH 法を用いて微生物を検出することはできなかった。ECF はメンブレンハイブリダイゼーションなどに用いられる基質であるが、AP と反応後の生成物が水溶性であり、非水溶性かつ微生物体内への沈着が求められる in situ hybridization (ISH)用の基質として適さないことが分かった。

2.2. HNPP-FISH 法

HNPP / Fast Red TR を基質として用いるこの方法は、既に ISH に適用報告があり FITC に比べ約 8 倍の蛍光強度があるとの報告がある³⁾。本研究でも HNPP-FISH 法を用いて微生物を検出することができたが、シグナルの増幅はあまり観察されなかった。これは蛍光強度の比較対象に Cy3 を用いていたためであると考えられた。別の文献で Cy3 が FITC に比べ約 7 倍の蛍光強度を持っているとの報告⁸⁾があることから、本研究での実験結果は妥当であり、HNPP-FISH 法によるシグナル増幅は行われていたと判断した。更なるシグナル増幅を行うために、HNPP / Fast Red TR の反応回数を増やす、濃度を上げるなど試みたが、弱冠のシグナルの増幅と共に非特異的なバックグラウンドを誘発したことから、本法を断念した。

2.3. CARD-FISH 法

CARD-FISH 法はこれまで行ってきた AP を用いる方法ではなく HRP を触媒酵素に用いたシグナル増幅方法である。この方法も既に ISH に適用報告があり⁴⁾、同一の蛍光分子を用い

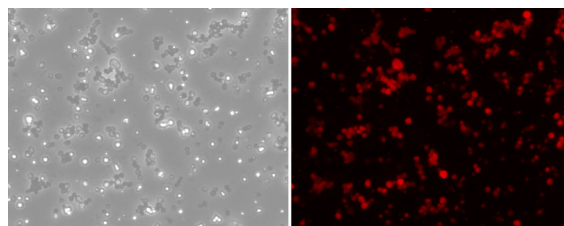


Fig.1. HNPP-FISH of *M.vannielii* hybridized with ARC915 probe. Left (phase contrast) and right (epifluorescent) micrograph show identical field. Non-specific and unknown particles appeared after three times of enzymatic reaction.

て蛍光標識プローブによる FISH 法に比べて 20 倍近い蛍光強度が得られたと報告している。本研究でも、同様の結果が得られ、非常に強い蛍光シグナルが観察されたことから、本法をメタン生成古細菌の細胞壁処理方法検討の指標とした。

3. メタン生成古細菌の細胞壁処理

3.1. 実験方法

3.1.1. 供試菌体

実験に用いたメタン生成古細菌およびその細胞壁構造は Table 1 の通りである。メタン生成古細菌は純粋培養し、対数増殖期に集菌、固定した。実サンプルは、本研究室で稼働しているスクロース、プロピオン酸、酢酸を主基質とした人工廃水を処理している中温グラニューール汚泥と長岡市下水処理場消化槽中の嫌気性消化汚泥を用いた。固定は架橋剤 (3% パラホルムアルデヒド, 4°C, 3-6h)もしくは沈殿剤 (50%エタノール/PBS)を用いて行い、50%エタノール/PBS 溶液中で保存した (-20°C)。

Table 1 Tested methanogens and cultivate condition in this study

Organisms	DSM No.	Medium	Substrates	Temperature
<i>Methanococcus vannielii</i>	1224	Widdele	H ₂ /CO ₂ , NaCl, Acetate, Yeast extract	37 °C
<i>Methanoculleus bourgensis</i>	3045	Widdele	H ₂ /CO ₂ , Acetate, Formate, Yeast extract	37 °C
<i>Methanospirillum hungatei</i>	864	Widdele	H ₂ /CO ₂ , Acetate	37 °C
<i>Methanosaeta concilii</i>	3671	Widdele	Acetate	37 °C
<i>Methanosarcian barkeri</i>	800	Widdele	Methanol, Yeast extract	37 °C
<i>Methanobacterium bryantii</i>	863	Widdele	H ₂ /CO ₂ , Acetate, Formate, Yeast extract	37 °C

3.1.2. スライドガラスの準備

蛍光染色用ウェル付スライドガラスに 0.1% 低融点アガロースで包括したサンプルをマウントし、37°C で1時間以上乾燥したのち、50, 80, 95%エタノールで脱水した (5, 2, 1 分)。脱水したスライドガラスは、CARD-FISH 法に供するまで-20°C で保存した。

3.1.3. プロテアーゼ K 処理

プロテアーゼ K (15µg/ml in 10mM Tris-HCl [pH7.5])をスライドガラスにマウントし、室温で 10-20 分間反応させた。反応後 MQ ですすぎ、PBSX (0.05% Triton X-100 in PBS [pH7.2]) で 10 分間、振盪洗浄を行い、エタノールで脱水した。

3.1.4. シュードムレイン加水分解酵素処理

シュードムレイン加水分解酵素は *Methanothermobacter wolfei* (DSM2970)から抽出したものをを用いた。8L の Widdel 培地に水素、酢酸、蟻酸、酵母抽出液を加え、60°C で培養した *M.wolfei* を対数増殖期に集菌し、濃縮した。ほぼ O.D.₅₄₆=3 にまで濃縮した後、水素欠乏条件下で更に培養を行った (60°C, 30h)。シュードムレイン加水分解酵素を含む濃緑色の Crude 溶液は、DNA 除去キットで精製し、-20°C で保存した。

細胞壁処理反応は、精製 Crude 溶液に 0.5mg/l の L-システイン、Na₂S·9H₂O と 5mM DTT を加え、嫌気チャンバー中で行った (60°C, 15-60 分)。反応後 MQ ですすぎ、PBSX で 10 分間、振盪洗浄を行い、エタノールで脱水した。

3.1.5. CARD-FISH 法

ハイブリダイゼーションは 0.1mM の HRP 標識 ARC915 プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl [pH7.2], 60% formamide, 0.01% SDS, 10% dextran sulphate, 1% blocking reagent)をマウントし、モイスチャーチャンバー中で行った (40°C, >2h)。余剰なプローブの洗浄はハイブリダイゼーションバッファーに 5mM EDTA [pH8.0]を加えた洗浄バッファー中で行った (42°C, 20 分)。洗浄後、TNT バッファー (100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.05% Tween-20)に浸したのち (15 分、室温)、FITC もしくは Cy3 標識チラミドを用いて TSA 反応を行った (15 分、室温)。反応後、TNT バッファーで洗浄し (15 分、室温)、DAPI による全菌染色を行った。最後に MQ, エタノールに浸し (各 1 分)、風乾させた。スライドガラスは、ハイブリダイゼーションが始まってから、TNT バッファーによる最後の洗浄が終わるまで乾燥させずに行った。FITC 標識チラミドは NIBA フィルターセット、Cy3 標識チラミドは Cy3 フィルターセットを用いて観察した。

3.2. 結果と考察

3.2.1. メタン生成古細菌の細胞壁処理

S レイヤーを細胞壁にもつ *M.vannielii* と *M.bourgensis* は特別な細胞壁処理を行わなくても CARD-FISH 法を用いて検出することができた。しかしながらエタノール固定を行ったときには、菌体損失が著しく、シグナルを失

Table 2 Optimized penetration methods for tested methanogens

Cell wall structure	Tested pure methanogens	Penetration method
Pseudomurein	<i>Methanobacterium bryantii</i>	Pseudomurein degrading enzyme extracted from <i>M.wolfei</i>
S-layer	<i>Methanococcus vannielii</i> <i>Methanoculleus bourgensis</i>	not required (Paraformaldehyde fixation)
Methanochondroitin	<i>Methanosarcina barkeri</i>	not required, but signal from sarcina-aggregate
Sheath	<i>Methanospirillum hungatei</i>	Proteinase K, DTT-SDS
	<i>Methanosaeta concilii</i>	Proteinase K

った。このことからパラホルムアルデヒドによる固定が推奨された。加えて、プロテアーゼ K などによる処理に対しても弱く、多くの菌体が損失した。

M.hungatei と *M.concili* の細胞壁はシースと呼ばれる鞘状の構造をしており、いくつもの細胞がつながってできている。加水分解酵素プロテアーゼ K を用いて細胞壁を処理することで検出可能となったが、過度の処理は逆にシグナルを低下、もしくは失うこととなった。*M.hungatei* の細胞壁を処理するために、凍結融解、エレクトロポレーションなどの物理的

処理、SDS や Triton X-100 などの界面活性剤、アルカリ-SDS、DTT-SDS などによる処理を試みたが、いずれも効果が見られない、もしくは非常に不安定で、再現性に欠けた。

メタノコンドロイチンは *Methanosarcina* 属に見られる特徴的な細胞壁構造である。パラホルムアルデヒド固定、エタノール固定とも、無処理で検出することができたが、シングルセルレベルで蛍光が得られる、蛍光標識プローブによる FISH 法と異なり、sarcina の塊の周りから強い蛍光が得られた。この問題を解決するために、プロテアーゼ K や DMSO、様々

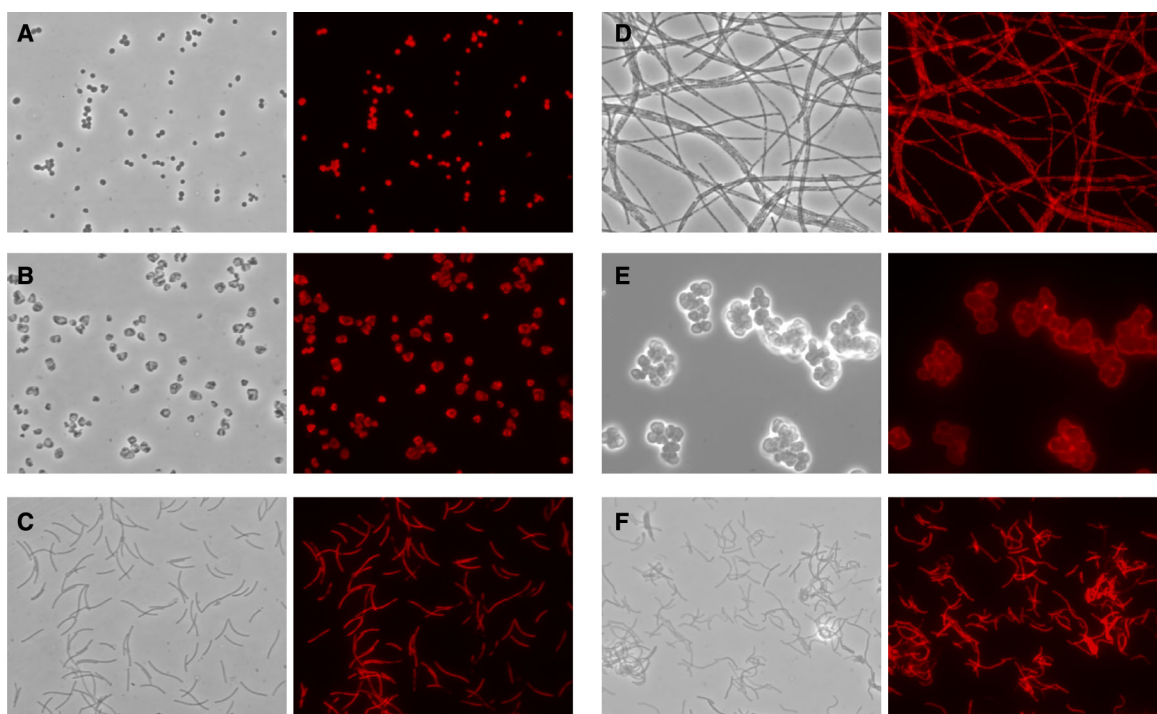


Fig.2. In situ hybridization with HRP-labeled ARC915 probe and catalyzed reporter deposition with tyramide-Cy3. A: *M.vannielii*. B: *M.bourgensis*. C: *M.hungatei* with proteinase K treatment. D: *M.concili* with proteinase K treatment. E: *M.barkeri*. F: *M.bryantii* with pseudomurein degrading enzyme from *M.wolf* treatment. Left (phase contrast) and right (epifluorescent) micrograph show identical feild.

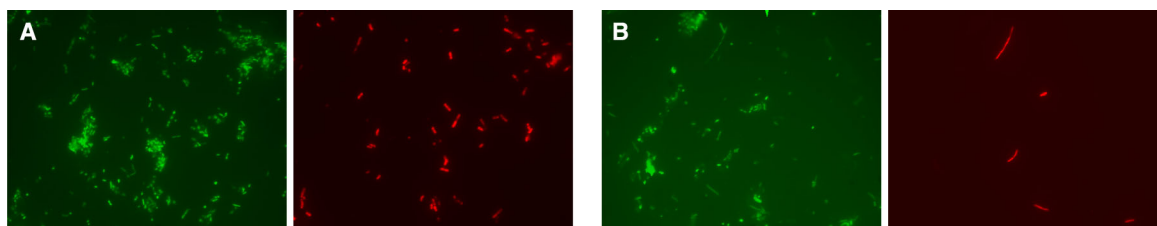


Fig.3. In situ hybridization with HRP-labeled ARC915 probe and catalyzed reporter deposition with tyramide-FITC. Proteinase K treatment was performed prior to hybridization. A: UASB granular sludge. B: anaerobic digested sludge. Left (DAPI) and right (epifluorescent) micrograph show identical feild.

な界面活性剤 (SDS, Triton X-100, Tween-20, CHAPS, Sodium cholate, Sucrose monocrate, Sodium hydrate)を試みたが、シングルセルレベルでの検出には至らなかった。しかし、EUB338 や EUB516 によるネガティブコントロール実験から得られるシグナルは極めて弱く、特異的な検出のための識別は行っていると推測された。

シュードムレインと呼ばれる細胞壁はメタン生成古細菌に特徴的な細胞壁構造であり、この細胞壁をもつ *M.bryantii* は、蛍光標識プローブによる FISH 法を行う場合でも、凍結融解などの前処理を行い、浸透性を向上させる必要がある。また、リゾチームやプロテアーゼ K などの一般的な加水分解酵素は効果が見込めないことが知られている。本研究でも界面活性剤やプロテアーゼ K による処理を試みたが、効果は見られなかった。

そこで、現在までに報告されているシュードムレインを唯一加水分解することができる *M.wolfei* の自己溶解酵素を抽出し⁹⁾、用いたところ、CARD-FISH 法で検出することができた。抽出酵素 Crude 溶液中に存在すると思われる核酸の対象微生物への吸着は、観察されなかったが、一応 DNA 除去キットを用いて、精製した溶液を用いることとした。

3.2.2. 実サンプルへの適用

CARD-FISH 法をメタン生成コンソーシアに適用する第一段階として、十分な rRNA を保持している微生物群を対象とした。中温 UASB グラニュール汚泥中に存在するメタン生成古細菌の多くは、蛍光標識プローブによる FISH 法で検出するのに十分な rRNA を保持していること、また存在比が比較的多いことから、初期検討サンプルとして採用した。

まず、前処理にプロテアーゼ K を用いて CARD-FISH 法を適用したところ、ARC915 プローブに反応するメタン生成古細菌と思われ

る微生物を特異的に検出することができた。

そこで FISH 法では弱く、信頼性に欠けるシグナルしか得られなかった嫌気性消化汚泥を、プロテアーゼ K で処理し、CARD-FISH 法を適用したところ、非常に強いシグナルで ARC915 プローブに反応する微生物から蛍光が得られたことから、これまでの FISH 法では検出することが難しかったサンプルから、メタン生成古細菌を検出することができる可能性が示唆された。

4. まとめおよび今後の展開

高感度 FISH 法の選定に始まり、メタン生成古細菌の細胞壁処理および環境サンプルへの適用について検討を行ったところ、比較的 rRNA 含量の少ないメタン生成古細菌を検出することに成功した。本法が様々な環境中に存在するメタン生成古細菌を検出するために非常に効果的なツールとなると考えられる。

しかし、現在の所環境サンプルに適用した細胞壁処理方法はプロテアーゼ K のみであり、細胞壁にシュードムレインをもつメタン生成古細菌は検出されていないことは明らかである。シュードムレイン加水分解酵素処理による細胞壁処理を行い、実サンプルからのメタン生成古細菌の検出について検討する必要がある。

また、従来の FISH 法との検出率の比較、細胞壁処理による全菌対数の損失割合を、中温グラニュール汚泥を用いて、メンブレンフィルターによる CARD-FISH 法で確認し、メタン生成コンソーシアへの適用性について検討する必要がある。

参考文献

- 1) Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H.,
Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.

- Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169 (1995).
- 2) 丸山康貴, 関口勇地, 大橋晶良, 原田秀樹, シベリア湿地帯におけるメタン放出に関与する微生物群の把握および定量化. 長岡技術科学大学修士論文 (2001).
 - 3) Yamaguchi, N., Inaoka, S., Tani, K., Kenzaka, T., and Nasu, M., Detection of specific bacterial cells with 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate and Fast Red TR in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 275-278 (1996).
 - 4) Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., and Amann, R., Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3268-3273 (1997).
 - 5) Hoshino, T., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A., and Inamori, Y., Direct detection by in situ PCR of the *amoA* gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5261-5266 (2001).
 - 6) Trebesius, K., Amann, R., Ludwig, W., Mühlegger, K., and Schleifer, K.-H., Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive 23S rRNA-targeted polynucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3228-3235 (1994).
 - 7) Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R., Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3094-3101 (2002).
 - 8) Wessendorf, M. W., and Brelje, T. C., Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry*, **98**, 81-85 (1992).
 - 9) Kiener, A., König, H., Winter, J., and Leisinger, T., Purification and use of *Methanobacterium wolfei*

pseudomurein endopeptidase for lysis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.*, **169**, 1010-1016 (1987).