

# 廃水処理汚泥内 *apsA* mRNA 発現微生物群の高感度 FISH 法による検出

水圏土壌環境制御研究室 大塚 勇輝  
指導教員 山口 隆司

## 1. Introduction

複合微生物系内の微生物叢解析手法の一つに、微生物の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の違いから特定の微生物を検出する方法が用いられている。しかし、この手法では、微生物の持つ生理学的特徴を把握することが難しい。そこで近年、微生物の反応を触媒する酵素の遺伝情報である機能遺伝子の塩基配列から微生物叢の解析が行われている。これまでに、機能遺伝子の塩基配列情報を利用したクローニング解析から、同一機能を保有する微生物群を機能遺伝子により網羅的に検出し、更に Real-time PCR 法により菌数の変遷をモニタリングする技術が報告されている。微生物機能を利用した解析が行われる中、機能遺伝子による解析結果と 16S rRNA 遺伝子による解析結果を一致させる試みが行われている。しかし、両者の解析結果は一部において一致せず、同時に解析することが難しい。この微生物の系統分類学的情報と生理学的特徴を同時解析する方法の一つとして、オリゴヌクレオチドプローブにより微生物の 16S rRNA を、ポリヌクレオチドプローブにより機能遺伝子の mRNA を検出し、顕微鏡の同一視野内で一致させる方法が報告された。しかし、ポリヌクレオチドプローブは、その塩基の長さから、塩基配列のミスマッチを識別する為に、厳しい実験条件の設定が必要であり、実験的な特異性を得ることが難しい特徴を持つ。このため、廃水汚泥のような複雑な菌叢には対応が難しいと考えられ、より特異性の高い手法の適用が望まれる。そこで本研究では、廃水汚泥内に存在する微生物の系統分類学的情報と

生理学的特徴の Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による同時解析を、塩基配列の選択制の高い手法により実施することを目的とした。本研究では、標的として硫酸塩還元細菌や硫黄酸化脱窒菌等の保有する、硫酸還元または硫黄呼吸に関連する *apsA* 遺伝子の mRNA を選定した。実験的な特異性の高い FISH 法として、オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法を選択した。しかし、mRNA は細胞内での存在数が極めて少ないため、既存の方法では検出に十分な感度を得ることができない。そこで、高感度 FISH 法である Catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH 法により mRNA を検出した。

## 2. Materials and Methods

モデルとする機能遺伝子には、硫黄呼吸を行う微生物群が共通して保有する *apsA* 遺伝子を選定した。サンプルには、乳酸塩と硫酸塩を主要有機源とする培地に 30 °C で 3 日間、プレ培養した嫌気性グラニュール汚泥と、人工廃水 (COD/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 5) を処理する UASB リアクターから採取したグラニュール汚泥の二種類を用いた。サンプルは、採取した後、直ちにパラホルムアルデヒドで固定した。

*apsA* mRNA を検出するプローブには APS8R (5' -GCA CAT GTC GCG GAA GTC TTC-3') を選定した。APS8R プローブの有効性は Clone-FISH 法により確認した。また、rRNA を標的とするプローブには、主に *Deltaproteobacteria* 綱に属する硫酸塩還元細菌を検出する SRB385 (5' -CGG CGT CGC TGC GTC AGG-3') を選定した。

mRNA の検出には高感度 FISH 法である CARD-FISH 法 (Fig.1) を用いた. rRNA は, mRNA の検出後, 蛍光標識プローブを用いた FISH 法で検出した. 微生物の系統分類学的情報と生理学的特徴を同時に検出するために両シグナルを同一視野で観察した.



Fig.1 CARD-FISH法の原理

### 3. Result

#### 3-1. プローブの有効性の確認

*apsA* mRNA を FISH 法により検出する為に, プライマー APS8R を選定した. APS8R のプローブとしての有効性を確認する為に, Clone-FISH 法を適用した. 標的は, APSdelta-F (5' -TGG CAG ATC ATG ATC AA-3') と APS *D.vulgaris* 1620R (5' -GCA TCA TGA AGT TCT TG-3') のプライマーペア により増幅させた *apsA* 遺伝子を順方向に組み込んだプラスミドを有する大腸菌である. *apsA* RNA は T7 RNA ポリメラーゼにより発現させた. ネガティブコントロールには, プラスミドを組み込んでいない大腸菌を用いた. 実験の結果, クローン内の *apsA* 遺伝子から転写された RNA を検出することができた (Fig.2). また, ネガティブコントロールからはシグナルが検出されなかった (Data not shown). このことから, APS8R は *apsA* 遺伝子の塩基配列を特異的に検出することが確認された.

#### 3-2. *Desulfovibrio vulgaris* の *apsA* mRNA の検出

Clone-FISH 法により, APS8R プローブの有効性を確認した. 次に, モデル微生物として硫酸塩還元細菌の純粋菌株である *D.vulgaris* を選択し, 細胞内の *apsA* mRNA が検出可能

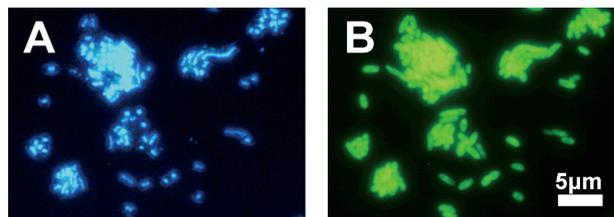


Fig.2 Clone-FISH法を実施した写真. A: DAPI染色観察視野, B: *apsA* RNAを検出した写真.

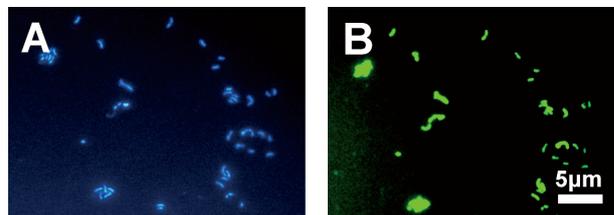


Fig.3 純粋菌株に対してmRNA-FISHを適用した写真. A: DAPI染色観察視野, B: *apsA* mRNAを検出した写真.

であるかを検討した. ネガティブコントロールには *Escherichia coli* を用いた. 実験の結果, *D.vulgaris* から *apsA* mRNA 由来のシグナルが検出された (Fig.3). また *E.coli* からはシグナルは検出されなかった. このことから, APS8R は *apsA* mRNA に対して適用が可能であると判断した.

#### 3-3. 系統分類学的情報と生理学的特徴の FISH 法による同時検出

プレ培養を行った嫌気性グラニュール汚泥を, 複合微生物系を有する環境サンプルのモデルとして用い, *apsA* mRNA と 16S rRNA の同時検出を試みた. 実験の結果, サンプル内の多くの細胞から APS8R 由来のシグナルを検出することができた (Fig.4B). 更に, APS8R 由来のシグナルは, SRB385 由来のシグナルの一部と完全に一致していた (Fig.4B, C). この結果から, シングルセルレベルで系統分類学的情報と生理学的特徴の同時検出が可能であると確認できた. SRB385 は, 主に *Deltaproteobacteria* 綱に属する硫酸塩還元細菌を検出することから, 培養したグラニュール汚泥では, これら微生物が優先して硫酸還元反応を行っていることが示唆された. これにより, 環境中の複合微生物系に存在する微生物群の系統分類学的情報と生理学的特徴を

FISH 法により同時に検出することが可能であることを証明できた。

### 3-4. 汚泥サンプルへの系統分類学的情報と生理学的特徴の FISH 法による同時検出

複合微生物系に存在する微生物群の系統分類学的情報と生理学的特徴を FISH 法により同時検出できることが確認された。続いて、実際の汚泥サンプルへ本手法を適用したときの知見を得るために、人工廃水を処理するリアクターのグラニュール汚泥に対して、*apsA* mRNA と rRNA の同時検出を試みた。実験の結果、グラニュール汚泥の多くの細胞から APS8R 由来のシグナルを検出することができた (Fig.5B)。しかし、SRB385 由来のシグナルと比較したところ、両者のシグナルは全て一致していたなかった (Fig.5B, C)。従って対象サンプルの反応槽内では SRB385 では検出することのできない硫酸塩還元細菌もしくは硫黄呼吸を行う微生物が高い活性を保持していることが示唆された。

続いて、我々が検出している *apsA* 遺伝子を保有する微生物を特定するために *apsA* 遺伝子を標的とした Cloning 解析を行った。APS7F (5' -GGG YCT KTC CGC YAT CAA YAC-3' ) -APS8R プライマーセットを用い、ランダムに 31 クローン採取したところ、*Desulfovibrio burkinensis* (14/31)、*Desulfomicrobium baculatum* (3/31)、*Desulfovibrio sulfodismutans* (3/31) に近縁なクローンなどが検出された。これら硫酸塩還元細菌については近縁種が SRB385 で検出可能であることが分かっており、FISH 法の結果と一致するものであった。これら菌体の他にも、*Thiobacillus denitrificans* (9/31) に近縁なクローンも検出された。*T. denitrificans* に近縁なクローンは Cloning 解析における優占率が高く、更に SRB385 で検出されない。このことから、本実験で得られた

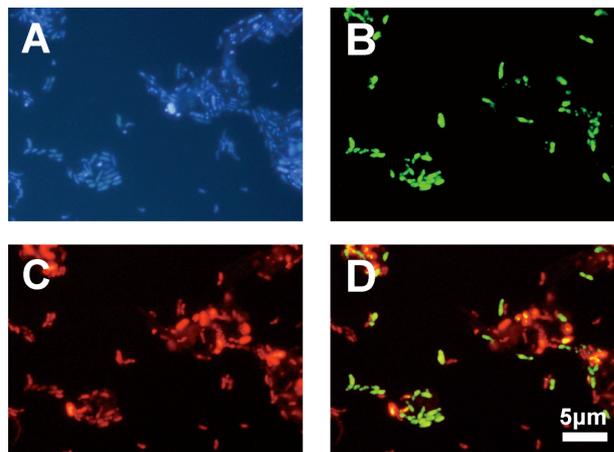


Fig.4 培養したグラニュール汚泥に対して *apsA* mRNA を標的とした CARD-FISH法と硫酸塩還元細菌群の 16S rRNA を標的とした FISH法を同時に適用した写真。A: DAPI染色観察視野、B: *apsA* mRNA を検出した写真、C: 硫酸塩還元細菌群の 16S rRNA を検出した写真、D: BとCの視野を合成した写真。

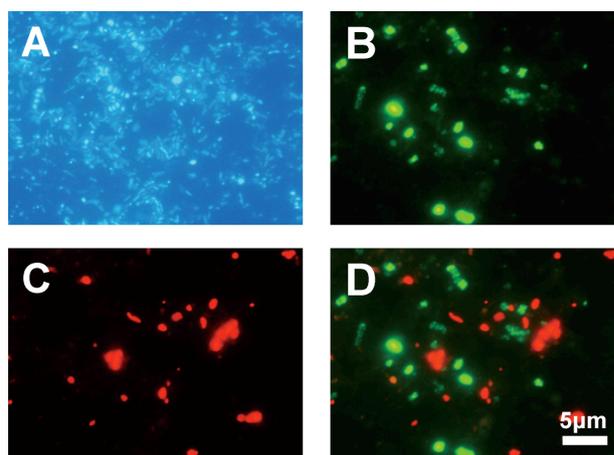


Fig.5 グラニュール汚泥に対して *apsA* mRNA を標的とした CARD-FISH法と硫酸塩還元細菌群の 16S rRNA を標的とした FISH法を同時に適用した写真。A: DAPI染色観察視野、B: *apsA* mRNA を検出した写真、C: 硫酸塩還元細菌群の 16S rRNA を検出した写真、D: BとCの視野を合成した写真。

APS8R 由来のシグナルは、*T. denitrificans* に近縁な菌種から得られていた可能性が高い。しかし、*T. denitrificans* は、硫黄酸化脱窒菌であるため、硝酸塩を添加していない同リアクターで硝酸呼吸により代謝を行っているとは考え難い。このため、硫黄呼吸を行う新規の微生物である可能性も考えられた。

また、*apsA* 遺伝子の Cloning 解析で多くの硫酸塩還元細菌群に近縁なクローンが検出されたが、本手法ではこれらの微生物から *apsA* mRNA を検出できなかった。しかし、同リアクターでは硫酸還元反応が行われていることを確認されている。このため、同リアクター

に存在する硫酸塩還元細菌群は、活性の低い状態であるが硫酸塩還元反応を行っていると考えられた。これを確認するには、より高感度な FISH 法を利用して、機能遺伝子の mRNA を検出する必要があると考えられる。

#### 4. Conclusions

FISH 法を用いた系統分類学的情報と生理学的特徴の同時解析を実施するにあたって、以下の知見が得られた。

- 1) 培養したグラニュール汚泥から、*apsA* mRNA と硫酸塩還元細菌群の 16S rRNA を同時に検出することに成功し、系統分類学的情報と生理学的特徴の同時把握が可能であることを示唆できた。
- 2) 培養していないグラニュール汚泥へ同手法を適用したところ、*Thiobacillus denitrificans* に近縁な菌種の *apsA* mRNA が検出された。