

蛍光の波長域が重ならない多重染色 FISH 法を用いた Comammox 細菌の検出

長岡工業高等専門学校 非会員 ○木村天哉 正会員 川上周司 信州大学 会員 山田灯之助
金沢大学 正会員 松浦哲久 長岡技術科学大学 正会員 渡利高大

1. 背景と目的

従来、硝化反応はアンモニア酸化細菌 (AOB) がアンモニアを亜硝酸に酸化、亜硝酸酸化細菌 (NOB) が亜硝酸を硝酸に変える 2 段階の反応とされてきた。しかし 2015 年に NOB の一つである *Nitrospira* 属の中に 2 段階の硝化反応を単独で担う Complete Ammonia Oxidation (Comammox:完全アンモニア酸化) 細菌の存在が確認された。¹⁾ Comammox 細菌を利用することで亜硝酸の蓄積を生じず、より高速にアンモニア除去が行えると考えられる。しかしながら、Comammox 細菌を用いた排水処理技術の開発が望まれる中、各々の研究で開発中のバイオリアクター内に Comammox 細菌がどの程度集積されているかを知ることは容易ではない。現在のところ分離株が得られている Comammox 細菌としては *Nitrospira* 属が挙げられるが、*Nitrospira* 属の中には Comammox 反応を行うものと亜硝酸酸化反応のみを行うものとが混在しており、rRNA 遺伝子に基づく細菌種の同定法では区別が困難である。Comammox 代謝能力の有無を知るためには、アンモニア酸化酵素 ammonia monooxygenases (AMO) の遺伝子の存在を調べる方法が用いられており、現在はゲノム解析を用いる方法が採用されている。しかし、時間面でもコスト面でも煩雑であると言え、こうした現状からも簡易かつ安価な Comammox 細菌の同定技術が望まれている。

山田らの研究では、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いて rRNA と *amoA*-mRNA の同時染色技術を用いてシングルセルレベルで Comammox 細菌を同定できる技術の開発をした²⁾。rRNA 遺伝子に基づく *Nitrospira* 属の同定を rRNA-FISH で行い、AMO に基づくアンモニア酸化代謝能力を *amoA*-mRNA を標的とした CARD-FISH 法で行い、Comammox 代謝能力を持つ *Nitrospira* 属の同定を行った。しかし、本手法には Alexa488 と Cy3 という比較的励起・蛍光波長の近い物質を使用しているため、得られた蛍光にクロストークが起きているという課題があった。本研究では、蛍光の波長域が重ならない rRNA と *amoA*-mRNA の同時染色技術を用いた多重染色 FISH 法を用いて生物膜のどこに Comammox 細菌が生息しているかを調査することを最終目的としている。本研究ではこの目的を達成するための準備段階として、まず Alexa488 と Cy5 という蛍光の波長域が重ならない物質の利用を想定し、tyramide-Cy5 を用いた CARD-FISH 法による Comammox 細菌の検出を試みた。

2. 実験方法

2.1 CARD-FISH 法による *amoA*-mRNA の検出

CARD-FISH 法は Kubota ら^{3,4)}の方法に準拠した。サンプルは塩化アンモニウムを主要基質として運転しているベンチスケールのリアクターから採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定したものをを用いた。HRP 標識プローブを細胞内に浸透させるために、リゾチーム溶液による細胞壁処理を行った。10 mg/ml のリゾチーム溶液をスライドガラスに滴下し、60 分間、37°C で、humid chamber 内で細胞壁処理を施した後、TNT バッファー、H₂O、エタノールに浸して (10,1,1 分) 脱水し、風乾した。プレハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションバッファー (20mM Tris-HCl, 0.9M NaCl, 5mM EDTA, 60% formamide, 0.01% SDS, 1% Blocking Reagent) をスライドガラスに滴下し、40°C の humid chamber 内で 30 分行った。終了後、スライドガラス上のハイブリダイゼーションバッファーを取り除き、0.1μM のプローブ溶液を含むハイブリダイゼーションバッファーを滴下し、40°C の humid chamber 内で 2 時間反応させた。反応終了後、スライドガラスをウォーターバスにて 42°C に温められたウォッシュバッファーで 10 分洗浄し、その後 TNT バッファーに 15 分間浸した。次に、0.1%Blocking

Reagent を含む TSA 反応液 (TSA Plus Cyanine 5; Akoya Biosciences, USA) をスライドグラスに滴下し, 37°C の humid chamber 内で 10 分間反応させた. 反応終了後, スライドグラスを TNT バッファー, H₂O, エタノールに浸して (10, 1, 1 分) 脱水し, 風乾した.

2.2 rRNA-FISH 法による *Nitrospira* 属の検出

FISH 法は, Kubota ら³⁾方法に準拠した. ウェル付きスライドグラスに 1% 低融点アガロース, 0.01% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), PBS を含む固定済みサンプルをマウントした. スライドグラスは完全に風乾し, 50%, 80%, 100% のエタノールに 1 分ずつ浸して脱水した. ハイブリダイゼーションは, ハイブリダイゼーションバッファー (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, 5 mM EDTA, 60% formamide, 0.01% SDS) に Alexa488 標識プローブ (表 2) を最終濃度で 1 μM で添加した混合液をスライドグラスに滴下し, 46°C の humid chamber 内で 24 時間行った. 終了後はスライドグラスを, ウォーターバスに 48°C に温められたウォッシュバッファーで 10 分洗浄し, PBS, 50%, 80%, 100% エタノールに浸して風乾した.

2.3 顕微鏡観察および多重染色 FISH 法

顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon, A1) を用いた. 多重染色は, まず Ntsp-amoA-359r プローブを用いた CARD-FISH 法を行い, その後 Ntspa712 プローブを用いた FISH 法を行った.

3. 結果および考察

Tyramide-Cy5 を用いた CARD-FISH 法により Comammox 細菌の *amoA*-mRNA の検出を行ったところ, DAPI 染色と重なる箇所から蛍光が得られた (Fig.1). Cy5 は可視光ではないため得られた蛍光が CARD-FISH 由来であるかを慎重に確認する必要がある. そこでプローブを添加していない系, Tyramide-Cy5 を添加していない系の 2 つのコントロール実験を行ったところ, 両者からは蛍光は得られなかった (データ非表示). また Tyramide-Cy5 を可視光で観察可能な Tyramide-Cy3 で置き換えて全てのコントロール実験を行ったところ, *amoA*-mRNA の検出を目視で確認することができた. これらの結果を踏まえ, Tyramide-Cy5 を用いた CARD-FISH 法の実験方法を確立できたと判断した. 今後は rRNA-FISH との同時染色のための条件の検討を行っていく.

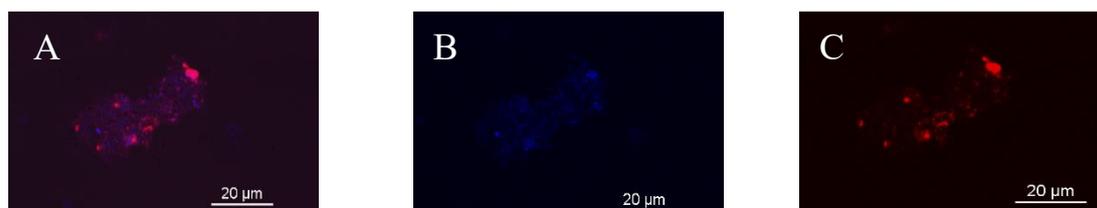


Fig.1 汚泥サンプル中の Comammox 細菌の共焦点顕微鏡による検出画像.

A: DAPI と Cy5 の複合視野, B: DAPI 視野, C: 励起 (Cy5) 視野. スケールバーは 20 μm.

参考文献

- 1) Daims H., *et al.*, Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*. Vol. 24, 528(7583):504-9, 2015.
- 2) 山田灯乃助ら, 多重染色 FISH 法によるシングルセルレベルでの Comammox 細菌の同定, 土木学会論文集(G), 2024 (印刷中)
- 3) Kubota K., CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications, *Microbes Environ*, Vol.28, No.1, pp.3-12, 2013.
- 4) Kubota K., *et al.*, Visualization of *mcr* mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (twopass TSA-FISH), *J. Microbiol. Methods*, Vol. 66, No. 3, pp. 521-528, 2006