

CARD-FISH 法を用いた mRNA と 16S rRNA 特定配列の in situ 同時検出

こんどうたかひろ あおいよしてる つねださとし ひらたあきら
 ○近藤高弘, 青井議輝, 常田聡, 平田彰

早大理工

【目的】これまでシングルセルレベルでの微生物生態解析は主に rRNA の特定配列に基づいた FISH 法を中心に行われてきたが, 系統学的な情報に基づく解析では細菌の機能は推定できない. このため, 今後機能遺伝子をターゲットに解析する必要性が高まると考えられるが, 現状の技術では少量の機能遺伝子をシングルセルレベルで検出することは簡単ではない. そこで, ターゲット遺伝子を高感度に検出する CARD (Catalyzed Reporter Deposition) -FISH 法を適用することで特定 mRNA の発現を in situ で検出し, さらには通常の FISH 法を組み合わせ, 16S rRNA 特定配列と特定 mRNA をシングルセルレベルで同時に検出することを目的とした. 本研究では, 16S rRNA に基づく系統樹上に幅広く存在している脱窒細菌をターゲットにして, 亜硝酸還元酵素をコードする *nirS* mRNA の in situ 検出を試みた.

【方法】供試菌株として *nirS* 遺伝子を保持する *P. aeruginosa*, *P. denitrificans* を *nirS* 遺伝子を保持しない *E. coli*, *P. putida* を用い, LB 液体培地でプレ培養した後, 亜硝酸塩を加え無酸素条件下で培養し *nirS* mRNA を誘導させた. また, 複合系環境サンプルとして脱窒反応が進行している排水処理リアクター内の汚泥を用いた. *nirS* mRNA の検出には, PCR 用のプライマーとして既に開発されている *nirS* 1F-6R プライマーセット¹⁾ の 6R 配列をプローブとして用いた. サンプルに細胞膜透過処理を施して, Biotin 標識したオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイズしたあと TSA Kits (Molecular Probes 社) を用いてシグナル増感を行い蛍光顕微鏡により観察した. 16S rRNA と mRNA の同時検出を行う場合, Cy3 標識した 16S rRNA 特定配列のプローブも同時にハイブリダイゼーションを行った.

【結果および考察】CARD-FISH 法を用いてシグナル増感を行うことで *nirS* mRNA 由来のシグナルをシングルセルレベルで検出することに成功した. また, 16S rRNA をターゲットにした FISH 用プローブとして全真正細菌をターゲットとする EUB338 を用いたところ, *nirS* mRNA 由来の蛍光シグナルと EUB338 由来の蛍光シグナルをシングルセルレベルで同時に検出することに成功した. ただし, 通常の FISH 法に比べ洗浄操作が多くなるため EUB338 の蛍光シグナルが若干減少する傾向があった. 環境サンプルにおいても *nirS* mRNA の検出を試みたところ, *nirS* mRNA 由来のシグナルを確認することができ, 環境サンプルへの適用も可能であることが示唆された.

【引用文献】

- ¹⁾ G. BRAKER *et al.*, 1998 *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3769
 e-mail: stsuneda@waseda.jp (常田 聡)