高感度 FISH 法を用いた機能と系統を結びつける シングルセル解析による脱窒素細菌の同定

高橋 竜司^{1,2}・荒木 信夫^{1*}・川上 周司³
青木 仁孝⁴・山口 隆司⁴

¹長岡工業高等専門学校 環境都市工学専攻 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町888)

²エヌ・ティ・ティ・インフラネット (株) 茨城支店 (〒310-0803 茨城県水戸市城南町1-2-21)

³阿南工業高等専門学校 建設システム工学科 (〒774-0017 徳島県阿南市見能林町青木265)

⁴長岡技術科学大学 環境・建設系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

* E-mail: araki@nagaoka-ct.ac.jp

高感度 fluorescence in situ hybridization (FISH) 法の一つである (two-pass) tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法を利用し、脱窒素細菌が保有する rRNA と nitrite reductase (*nir*) K 遺伝子の同時検出を行った。まず三種類の純粋菌株、*Pseudomonas aureofaciens*, *Achromobacter denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* を用いて、rRNA と *nirK* 遺伝子が高い検出率をもって同時に可視化できることを確認した。次に、人工培養液を用いて連続培養した尿尿・浄化槽の脱窒素処理汚泥に対し、16S rRNA 遺伝子、及び *nirK* 遺伝子に基づく分子系統解析を行った。最終的に、尿尿・浄化槽汚泥内に存在する脱窒素細菌の rRNA および *nirK* 遺伝子の同時検出を行い、優占する脱窒素細菌として *Hyphomicrobium* 属の存在を明らかにした。

Key Words : denitrification, two-pass TSA-FISH, single cell analysis, nitrite reductase (*nir*)

1. はじめに

農地、産業排水中に含まれる過剰な窒素化合物は、環境中の窒素循環のバランスを崩し、富栄養化現象を引き起こす。排水中からの窒素除去は、水環境の保全において必要不可欠であり、これまでに多様な窒素除去法が報告されている。中でも生物学的窒素除去法は、微生物の代謝を利用した方法で、物理化学的除去法と比較してランニングコストが抑えられ、また窒素化合物の形態を限定しないという利点がある。しかし、処理プロセス内の微生物叢の変化によって安定した処理水が得られない場合があることが指摘されており、窒素除去性能の安定化や高効率化を図るためには、処理プロセス内の窒素除去に関与している微生物の生態を理解することが重要である。

窒素除去において重要な微生物に、脱窒素細菌がいる。脱窒素細菌は、硝化細菌によって酸化された硝酸態窒素を窒素ガスにまで還元する細菌である。環境中の脱窒素細菌の同定には、これまで rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析が用いられてきた。しかし、生物学的に多様性が極めて大きい脱窒素細菌は、rRNA 遺伝子に基づく分子

系統解析では様々なグループに分類され、脱窒素ポテンシャルの有無を rRNA 遺伝子配列に基づいた系統学的情報のみで判断する事は極めて難しい。近年、それら多様な脱窒素細菌を網羅的に解析する方法として亜硝酸還元酵素遺伝子 nitrite reductase (*nir*) 遺伝子を用いた分子系統解析も多数報告されている^{1,2,3)}。これまでの研究から脱窒素細菌は、*nirK* 遺伝子にコードされる銅含有型か、*nirS* 遺伝子にコードされるシトクロム *cd*₁ 含有型のどちらか一方を有していると考えられている。また、メタノールを炭素源として利用した窒素除去プロセスにおいては、*nirS* および *nirK* 遺伝子の両方が検出されており^{3,4)}、*nirS* および *nirK* 遺伝子保有型の微生物種の両者が窒素除去の役割を担っているものと考えられる。しかしながら、複数の種間で *nir* 遺伝子の水平転移が起こっている可能性が示されており、*nirS* 遺伝子に関しては、科あるいは属レベルで rRNA 遺伝子に基づく系統学的位置と一致するが、*nirK* 遺伝子と rRNA 遺伝子の系統学的位置は、更に系統学的に上位のレベルで一致しないという報告がある⁵⁾。したがって、環境中から *nirK* および rRNA 遺伝子配列を同時に取得した場合においても、その *nirK* 遺伝子を保有する微生物種の正確な系統学的位置の推定は、極

めて困難であると言える。

こうした問題を解決するためには、rRNA 遺伝子に基づく系統分類と機能遺伝子に基づく分類を関連づけて微生物を同定する解析が有効である。その方法の一つにシングルセルレベルで特定の分子を可視化できる fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いた解析方法が報告されている⁹⁾。FISH 法は、核酸プローブを標的微生物の細胞内に浸透させ、細胞内の分子と塩基配列特異的に結合させることで標的微生物のみを標識し、何かしらの可視化技術を施すことで、標的微生物のみを検出するものである。Pratscher らは、ポリヌクレオチドプローブを用いた recognition of individual genes (RING)-FISH 法を用いることで *nirK* 遺伝子と rRNA を同時に検出し、両者を結びつけて微生物種を同定することに成功している⁷⁾。しかし、RING-FISH 法では、遺伝子相溶性の高い近縁な微生物同士を区別して検出することは難しく、微生物個々の遺伝子情報から同定を行う事は難しい。また Moraru らは tyramide signal amplification (TSA)-FISH 法とポリヌクレオチドプローブを用いた Gene-FISH 法を用い、アンモニア酸化古細菌に対し rRNA と機能遺伝子を同時に検出することでその機能を同定している⁸⁾。しかし、Gene-FISH 法で得られる検出率は 40%程度と低く、サンプル中に存在する割合が低い標的微生物の場合、十分に検出することは難しいと思われる。

筆者らの研究グループは、これまでに微生物の遺伝子検出技術として two-pass TSA-FISH 法を開発し、その有効性について報告してきた^{9,10)}。Two-pass TSA-FISH 法で得られる検出率は 98%以上と極めて高く、また遺伝子相溶性が 85%以下であれば近縁種でも識別することが可能である。Two-pass TSA-FISH 法を rRNA と機能遺伝子を同時に検出するシングルセル解析に利用できれば、上述の問題点が改善されると思われる。そこで本研究は、脱窒素ポテンシャルを有する微生物種を明らかにするために、*nirS* および *nirK* 遺伝子の内、その遺伝子を保有する微生物種の推定がより困難であると考えられる *nirK* 遺伝子と rRNA を同時に検出するシングルセル解析を構築することを目的とした。

まず、脱窒素細菌の純粋菌株を用いて rRNA と *nirK* 遺伝子の同時検出のための条件検討を行い本手法の構築を行った。次に本手法を汚泥サンプルに適用するための検討を行った。本研究で対象としたサンプルは、優占する脱窒素細菌の情報が極めて少ない、尿尿処理場の脱窒槽の汚泥とした。汚泥サンプルに対し、rRNA 遺伝子及び *nirK* 遺伝子に基づく分子系統解析を行った後、優占する *nirK* 遺伝子のクローン配列からプローブを設計し、両遺伝子に基づく FISH 解析を行った。これら解析から脱窒素ポテンシャルを有する微生物種の同定を試みた。

2. 実験方法

(1) 純粋菌株の調整

本研究では、*nirK* 遺伝子を保有する純粋菌株として、*Pseudomonas aureofaciens* (NBRC3521)、*Achromobacter denitrificans* (NBRC15125) を、*nirK* を保有しない純粋菌株として *Pseudomonas stutzeri* (JCM20778) を用いた。純粋菌株は、LB培地にて、好気条件下、30°Cで一晩培養を行った。各サンプルは、遠心分離 (8,000×g, 5分, 4°C) で回収し、phosphate-buffered saline (PBS ; 137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, pH8.0) にて、2回の洗浄を行った。その後、4%パラホルムアルデヒド溶液 [wt/vol.] を用いて4°Cで16時間の固定を行った。固定したサンプルは、50%エタノール in PBS 中にて-20°Cで保存した。純粋菌株からのDNA抽出は、PBSによる洗浄後、Mag Extractor (TOYOBO) を用いて行った。

(2) 脱窒素細菌群の集積培養と微生物群集構造解析

解析対象のサンプルには、尿尿・浄化槽汚泥処理脱窒素処理プロセスから採取した汚泥を、メタノールを添加した人工培養液にて集積培養を行い使用した。集積培養は、採取した汚泥をスポンジに吸着させた後、500 mL の三角フラスコに投入して行った。人工培養液は、Osaka らの方法³⁾を参考に調整し、水理学的滞留時間は 8 時間、窒素負荷は 300 mg-N L⁻¹ day⁻¹ とし、室温、暗所の条件下で通水した。また、汚泥内の微生物叢を把握するため、培養開始から 30 日目の汚泥に対し、rRNA 遺伝子、及び *nirK* 遺伝子に基づいた微生物群集構造解析を行った。DNA 抽出には、ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) を使用した。PCR 法は、rRNA 遺伝子標的の場合は EUB338F/Univ907R¹¹⁾を、*nirK* 遺伝子標的の場合は *nirK1F/nirK5R*¹⁾のプライマーセットを用いて行った。PCR 産物は、GENECLEAN Turbo (Q-Biogene) により精製した後、TOPO TA Cloning kit を用いてクローン化した。得られたクローン配列の内、97%以上の相溶性を示すクローン同士は、1つのファイトタイプとして取り扱った。rRNA 遺伝子に基づいた分子系統樹は、分子系統解析ソフトウェア ARB¹²⁾により既報に準じて作成した¹³⁾。短い 16S rRNA 遺伝子配列 (600 bp 以下) に関しては、ARB parsimony insertion tool により系統樹に挿入した。NirK 配列に基づいた分子系統樹は、148 アミノ酸配列に基づき、MEGA5¹⁴⁾に実装された neighbor-joining 法により作成した。ブートストラップ値は、1,000 回の再サンプリングにより決定した。取得されたクローン配列に基づいた多様性解析は、既報¹⁵⁾と同様に行った。

(3) 前処理

固定サンプルは、高撥水性印刷スライドガラス (松浪

硝子) にマウント後、インキュベーター内で乾燥させた。乾燥後、0.4% Metaphor Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, ME) を各ウェルに滴下し、再度インキュベーター内で乾燥させた。その後、50%、80%、99.5%エタノールにそれぞれ3分、1分、1分ずつ浸し、脱水を行った。次に、リゾチーム溶液 (10 mg ml⁻¹ in 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA [pH8.0]) を各ウェルに滴下し、60分、37°Cの条件下で反応させ、細胞壁処理を行った。細胞壁処理後、TNT buffer (100mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) に5分、蒸留水に1分、99.5% エタノールに1分間浸し、洗浄した。

(4) TSA-FISH法

rRNA 標的の TSA-FISH 法は、Kubota¹⁶⁾の方法に準拠した。horseradish peroxidase (HRP) 標識プローブには、*Gammaproteobacteria* 綱に特異的な GAM42a¹⁷⁾、*Hyphomicrobium* 属に特異的な HyphoC1-648¹⁸⁾、*Flavobacteriales* 目に特異的な CFB563¹⁹⁾を用いた。標的細胞の可視化のための TSA 反応では、tyramide-Alexa594 を用いた。

TSA-FISH 法を終えた後、HRP 酵素を失活させるために 0.05 M HCl 溶液を各ウェルに滴下し、10 分、室温の条件下で反応させた。反応後、スライドを TNT で洗浄し、two-pass TSA-FISH 法に供した。

(5) Two-pass TSA-FISH 法

nirK 遺伝子標的の two-pass TSA-FISH 法は、Kawakami⁹⁾の方法に準拠した。ポリヌクレオチドプローブの合成は、テンプレート DNA として純粋菌株から DNA 抽出したもの、*nirK* 遺伝子に基づく群集構造解析から得られたクローン配列を含むプラスミド DNA 及び汚泥から抽出した DNA を用いた。PCRの際に使用するプライマーには、群集構造解析と同じく *nirK1F-nirK5R* を用いた。標的細胞の可視化のための TSA 反応では、tyramide-fluorescein を用いた。また、各プローブの交雑時におけるハイブリダイゼーションバッファーの最適なホルムアミド濃度は、10%間隔で調整し、以下の手順で決定した。純粋菌株を用いた検討では、標的微生物と非標的微生物が識別できる条件とした。集積培養サンプルにおいては、ホルムアミドを徐々に高めて検出を試み、蛍光が見られなくなる条件の一つ前の条件とした。

(6) 顕微鏡観察

洗浄終了後、各ウェルに SlowFade Gold Antifade Reagent with 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen) を滴下し、カバーガラスで封入後、顕微鏡観察を行った。落射蛍光顕微鏡には、BX-60 (Olympus) を用い、写真の撮影には、CCD カメラ DP71 (Olympus) を用

図-1 (Two-pass) TSA-FISH 法による純粋菌株の rRNA および *nirK* 遺伝子の同時検出。(a, d and g) DAPI 染色による全菌染色視野。(b, e and h) GAM42a プローブを用いた TSA-FISH 法による *Gammaproteobacteria* 綱の検出視野 (Alexa594)。(c, f and i) *P. aureofaciens* の *nirK* 遺伝子から合成したポリヌクレオチドプローブを用いた two-pass TSA-FISH 法による *nirK* 遺伝子の検出視野 (fluorescein)。(a, b and c) *P. aureofaciens*, (d, e and f) *P. stutzeri* および (g, h and i) *A. denitrificans* は、それぞれ同一視野。スケールバーは 10 μ m。

いた。検出率を算出するための観察は、目視で行い、蛍光を発する微生物細胞を確認した。また検出率は、蛍光視野で計測される微生物細胞数を DAPI 視野で計測される微生物細胞数で除することで算出した。

3. 実験結果

(1) (Two-pass) TSA-FISH 法による純粋菌株の *nirK* 遺伝子と rRNA の同時検出

純粋菌株に対して、本研究で最適化した rRNA と *nirK* 遺伝子の同時検出法を適用した結果を図-1 に示す。Gam42a プローブを用いた rRNA 標的の TSA-FISH 法では、ホルムアミド濃度 40%で検出を試みたところ、*Gammaproteobacteria* 綱に属する *P. aureofaciens* および *P. stutzeri* からは蛍光が得られたが、*Betaproteobacteria* 綱に属する *A. denitrificans* から蛍光は得られず、十分な特異性をもって検出できる事が確認できた。次に rRNA 標的の TSA-FISH を施した菌体に対し、適切な HRP 活性の失活処理を行った後、続いて two-pass TSA-FISH 法により *nirK* 遺伝子の検出を行った。*P. aureofaciens* の *nirK* 遺伝子からポリヌクレオチドプローブを合成し、*nirK* 遺伝子の検出を試みたところ、ホルムアミド濃度 60%において *P. aureofaciens* からは蛍光が得られたが、*nirK* 遺伝子を保有しない *P. stutzeri* および *A. denitrificans* からは蛍光が確認されなかった。また、TSA-FISH 法および two-pass TSA-FISH 法を行う際のホルムアミド濃度を 80%に設定して実験を行った場合、蛍光は確認できなかった (デー

表-1 集積培養サンプルから得られた細菌の 16S rRNA 遺伝子および *nirK* 遺伝子の多様性解析

遺伝子	解析クローン数	検出ファイロタイプ	Chao1 (95% 信頼区間)	Shannon diversity index	Coverage (%)
細菌 16S rRNA 遺伝子	90	19	37 (23–94)	2.05	88
<i>nirK</i> 遺伝子	46	4	4 (4–4)	1.02	98

タ非表示)。これらの結果から、本手法は標的の rRNA および *nirK* 遺伝子の特異的にかつ同時に検出することが可能であると判断した。また rRNA および *nirK* 遺伝子の DAPI 染色細胞に対する検出率は、90%以上であり、既報の同時検出法^{8,20)}よりも高かった。

(2) 集積培養サンプルの微生物群集構造解析

解析対象とした集積培養サンプルに対して、*nirK* および 16S rRNA 遺伝子に基づいた微生物群集構造解析を行った結果を図-2 および図-3 に示す。また得られたクローン配列に基づいた統計解析の結果を表-1 に示す。表 1 より、*nirK* 遺伝子の多様性は、集積培養サンプル中の 16S rRNA 遺伝子に基づく多様性や、既報の自然環境における *nirK* 遺伝子多様性^{21,22,23)}よりも十分に低いものと考えられた。したがって、*nirK* 遺伝子を保有する微生物種に関しては、メタノールと硝酸塩を使用した培養により集積されたと判断した。

本研究で検出された *nirK* 遺伝子のファイロタイプは、Group I と Group II の大きく 2 つのグループに分類された。この内、優占的に検出された Group I に関しては、近縁な分離株が全く報告されていないグループであった。なお、Group I に属する環境クローンの内、K-M1 (GeneBank accession 番号: BAE43767) および K-M2 (同: BAE43768) に関しては、¹³C 標識メタノールを用いた Stable Isotope Labeling 法により、脱窒条件下でメタノールの取り込みが確認されているが、その遺伝子を保有する微生物種の特定には至っていない³⁾。したがって、本研究で検出された Group I の *nirK* 遺伝子に関しても、メタノール資化性の未知の脱窒素細菌由来である可能性が示唆された。続いて優占的に検出されたファイロタイプ *nirK*C3 は、*Hyphomicrobium* sp. strain NL23 に近縁であった。この strain NL23 は、メタノールを供給している水族館に設置された脱窒リアクターから分離された分離株である²⁴⁾。しかしながら、Group II に属する *nirK* 遺伝子は、その他の分離株が保有する *nirK* 遺伝子とは、系統学的な位置が全く異なっていた。そのため、*nirK* 遺伝子の複数の種間における水平転移を考慮すると、ファイロタイプ *nirK*C3 が *Hyphomicrobium* 属由来の *nirK* 遺伝子か否かに関しては、strain NL23 の *nirK* 遺伝子配列情報のみでは不明瞭であった。以上の結果から、Group II に属する *nirK* 遺伝子に関しても、保有する微生物種の系統学的位置を推定する意義は十分にあると考えられた。

次に解析対象とした集積培養サンプルに対して、rRNA 遺伝子に基づいた微生物群集構造解析を行った結果を図-3 に示す。*nirK* 遺伝子を保有する脱窒素細菌が存在することが知られている系統群の中で、検出頻度の高いファイロタイプは、*Flavobacteriales* 目 (ファイロタイプ 16SC3; 12/90 クローン)、*Hyphomicrobium* 属 (ファイロタイプ 16SC4; 6/90 クローン) であった。*Hyphomicrobium* 属の一部は、メタノール資化性の脱窒素細菌で、*nirK* 遺伝子を保有していることが確認されている¹⁾。一方で、*Flavobacteriales* 目に属する細菌の内、一部が *nirK* 遺伝子を保有する脱窒素細菌であることが知られているが⁵⁾、脱窒素ポテンシャルを有していない系統群も含まれる。最も優占的に検出されたファイロタイプは、メタノール資化性細菌の一種である *Methyloversatilis* 属に近縁であった。なお、*Methyloversatilis* 属細菌は、既報のメタノールを供給した脱窒素プロセスにおいても、本集積培養系と同様に優占的に存在することが報告されている²⁵⁾。また、*Methyloversatilis* 属の分離株 *Methyloversatilis universali* のゲノムには、*nirK* 遺伝子は見出されていない一方で、硝酸還元酵素遺伝子の存在が確認され²⁶⁾、無酸素条件下における酵素の発現も確認されている²⁷⁾。したがって、本研究で検出された *Methyloversatilis* 属のファイロタイプに関しても、集積培養系内に存在するメタノールおよび硝酸塩を利用して優占化したものと考えられる。

(3) (Two-pass) TSA-FISH 法による集積培養サンプル内細菌の rRNA と *nirK* 遺伝子の同時検出

前述の微生物群集構造解析の結果を受けて、優占的に存在していた *nirK* 遺伝子を保有する微生物種の同定を試みた。まず、*nirK* 遺伝子のファイロタイプ *nirK*C3 を保有する微生物種を同定するために、本研究で開発した rRNA と *nirK* 遺伝子の同時検出法を適用した。16S rRNA 標的の TSA-FISH 法では、*Hyphomicrobium* 属を標的とする HyphoC1-648 プローブを使用し、ホルムアミド濃度は 20%に設定して検出を行った。*nirK* 遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法では、*nirK*C3 のクローンをテンプレート DNA としてポリヌクレオチドプローブの合成を行ない、ホルムアミド濃度 50%で検出を試みた。適用の結果、DAPI 視野、Alexa594 視野 (16S rRNA 標的)、および fluorescein 視野 (*nirK* 遺伝子標的) のすべてにおいて蛍光が一致する細胞が、DAPI 染色細胞に対して 1%程度確

図-2 亜硝酸還元酵素 NirK 配列に基づいた分子系統樹 (neighbor joining 法). 太字は本研究で得られた配列. () 内はクローン数, []内は GeneBank Accession 番号を示す. ブートストラップ値は, 85%以上のみを表示.

図-3 rRNA 遺伝子配列に基づいた分子系統樹 (neighbor joining 法). 太字は本研究で得られた配列. () 内はクローン数, []内は GeneBank Accession 番号を示す.

認められた (図-4)。また、プローブを添加しない系からは、蛍光が確認されなかった。以上の結果より、ファイロタイプ *nirKC3* は、処理装置内に生息する *Hyphomicrobium* 属由来の *nirK* 遺伝子であることが明らかとなった。

次に、*nirK* 遺伝子の中で最も優占的に検出された *nirKC1* を有する微生物種の同定を試みた。*nirK* 遺伝子を標的としたプローブの合成は、前述と同様にクローン解析により得られていた配列を使用して行った。rRNA 標的の TSA-FISH 法では、rRNA 遺伝子に基づいた場合の優占度合いから、*nirK* 遺伝子を保有している可能性が高いと考えられた *Flavobacteriales* 目を標的とする CFB563 プローブを使用した。ホルムアミド濃度は、rRNA を標的とした場合は 20%に、*nirK* 遺伝子を標的とした場合は 50%に設定をした。その結果、両者の蛍光が観察されたが、*nirKC1* 由来の蛍光と CFB563 プローブの蛍光が一致する細胞を確認することはできなかった (図-5)。そこで、集積培養サンプル中に存在する *nirK* 遺伝子を網羅的に検出する事を目的に、集積培養サンプル汚泥から抽出した全ゲノム DNA をテンプレートとして、ポリヌクレオチドプローブを合成し¹⁰⁾、再度同時検出を試みた。しかしながら、CFB563 プローブの蛍光と一致する細胞を確認することはできなかった (データ非表示)。以上の結果より、*Flavobacteriales* 目以外の微生物種が、ファイロタイプ *nirKC1* を保有している可能性が示唆された

4. まとめと今後の展望

本研究では、尿尿・浄化槽汚泥処理脱窒素処理プロセス内に生息する脱窒素細菌を同定するために、(two-pass) TSA-FISH 法を用いて rRNA と *nirK* 遺伝子を同時に検出するシングルセル解析技術を構築した。純粋菌株を用いた検討から、本手法の検出率は、rRNA 及び *nirK* 遺伝子ともに 90%以上と高く、存在数が少ない微生物を標的とする場合において有効な手法であることが示された。また、本手法を汚泥サンプルに適用した結果、*Hyphomicrobium* 属において rRNA と *nirK* 遺伝子を同時に検出することができ、脱窒素ポテンシャルを同定することができた。また、FISH 法で検出が確認できた *Hyphomicrobium* 属の存在率は 1%程度であったことから、高い検出率を有する two-pass TSA-FISH 法でなければ標的の *nirK* 遺伝子を検出できなかった可能性が示唆され、本手法の有用性が示された。

一方で、*nirK* 遺伝子に基づく群集構造解析で優占した未同定の遺伝子を rRNA 遺伝子情報と関連付けて同定することはできなかった。本研究では、群集構造解析で優占して検出された遺伝子に注目して解析を行ってきたが、特に PCR 法を介する群集構造解析方法では、遺伝子増幅時におけるバイアスあり、実際の微生物相を反映してい

図-4 (Two-pass)TSA-FISH 法による集積培養サンプル内に生息する *Hyphomicrobium* 属に属する細菌の rRNA および *nirK* 遺伝子の同時検出. (a) DAPI 染色による全菌染色視野. (b) HyphoC1-648 を用いた TSA-FISH 法による *Hyphomicrobium* 属細菌の検出視野 (Alexa594). (c) *nirK* 遺伝子ファイロタイプ *nirK_C3* から合成したポリヌクレオチドプローブを用いた Two-pass TSA-FISH 法による *nirK* 遺伝子の検出視野 (fluorescein). 矢印は、*nirK* 遺伝子と rRNA に由来する蛍光信号が一致した細胞を示す。スケールバーは 10 μ m.

図-5 (Two-pass) TSA-FISH 法による集積培養サンプル内に生息する *Flavobacteriales* 目に属する細菌の rRNA および *nirK* 遺伝子の同時検出. (d) DAPI 染色による全菌染色視野. (e) CFB563 を用いた TSA-FISH 法による *Flavobacteriales* 目細菌の検出視野 (Alexa594). (f) *nirK* 遺伝子ファイロタイプ *nirK_C1* から合成したポリヌクレオチドプローブを用いた Two-pass TSA-FISH 法による *nirK* 遺伝子の検出視野。スケールバーは 10 μ m.

ない可能性がある。また用いたプライマーや解析に供する取得クローン数によってはサンプル内に存在しても検出できない微生物種が存在することが考えられ、本研究で構築した同時染色による解析の場合、*nirK* 遺伝子に基づく群集構造解析で検出された遺伝子を保有する微生物が rRNA 遺伝子に基づく群集構造解析でも検出されなければ両者を同時に染色することはできない。従って、今後は門レベルで包括的に検出できるプローブを用いた解

析を用い、まず系統学的に広義な位置からの同定を行い、そこから詳細な系統学的同定を行うなどの解析が有効と考えている。

本手法は、TSA 反応を用いることから、内在性 HRP 活性を持つサンプルへの適切な処理方法の検討、HRP 酵素の細胞浸透性の問題など克服すべき課題¹⁰⁾もある。その一方で、検出率が高く、幅広い検出レンジで標的遺伝子を検出できることから、シングルセル解析の新たな選択肢として有用なツールになると期待している。

参考文献

- 1) Braker, G., Fesefeldt, A. and Witzel, K. P.: Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, No. 10, pp. 3769-3775, 1998.
- 2) Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, A., and Hallin, S.: Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 49, No. 3, 401-417, 2004.
- 3) Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N. and Inamori, Y.: Identification of acetate- or methanol- assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. *Microb. Ecol.*, Vol. 52, No. 2, pp. 253-266, 2006.
- 4) 新田見匡、今井裕子、中村一穂、松本幹治: NO₃⁻および NO₂⁻を電子受容体としたメタノール脱窒リアクターの運転とその脱窒細菌の遺伝子の解析, *水環境学会誌*, Vol. 31, No. 5, 269-274, 2008.
- 5) Heylen, K., Gevers, D., Vanparys, B., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N., and De Vos, P.: The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.*, Vol. 8, No. 11, pp. 2012-2021, 2006.
- 6) Amann, R., Fuchs B.: Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.*, Vol. 6, pp. 339-348, 2008.
- 7) Pratscher, J., C. Stichternoth, K. Fichtl, K.-H. Schleifer, and G. Braker.: Application of recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization (RING-FISH) to detect nitrite reductase genes (*nirK*) of denitrifiers in pure cultures and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 75, pp. 802-810, 2009.
- 8) Moraru, C. Lam, P. Fuchs, B. M. Kuypers, M. M. Amann, R. : GeneFISH – an in situ technique for linking gene presence and cell identity in environmental microorganisms, *Environ. Microbiol.*, Vol. 12, No. 11, pp. 3057-3073, 2010.
- 9) Kawakami, S., Hasegawa, Imachi, H., Yamaguchi, T., Harada, H., Ohashi, A. and Kubota, K.: Detection of single-copy functional genes in prokaryotic cells by two-pass TSA-FISH with polynucleotide probes, *J. Microbiol. Methods*, Vol. 88, No. 2, pp. 218-223, 2012.
- 10) 長谷川拓也, 川上周司, 久保田健吾, 井町寛之, 大橋晶良, 原田秀樹: 機能遺伝子を標的とした two-pass TSA-FISH 法による環境中未培養微生物の機能推定, *環境工学研究論文集*, Vol. 46, pp. 537-543, 2009.
- 11) Voordouw, G., Armstrong, S. M., Reimer, M. F., Fouts, B., Telang, A. J., Shen, Y. and Gevertz, D. : Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, No. 5, pp. 1623-1629, 1996.
- 12) Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar *et al.*: ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.*, Vol. 32, No. 4, pp. 1363-1371, 2004.
- 13) Imachi H, Sekiguchi Y, Kamagata Y, Loy A, Qiu YL, Hugenholtz P, Kimura N, Wagner M, Ohashi A, Harada H.: Non-sulfate-reducing, syntrophic bacteria affiliated with desulfotomaculum cluster I are widely distributed in methanogenic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 72, No. 3, pp. 2080-2091, 2004.
- 14) Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 8, No. 10, pp. 2731-2739, 2011.
- 15) Narihiro, T., Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M., Yamauchi, T., Shiraishi, K., Kamagata, Y., Nakamura, K., Sekiguchi, Y.: Comparative analysis of bacterial and archaeal communities in methanogenic sludge granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors treating various food-processing, high-strength organic wastewaters, *Microbes Environ.*, Vol. 24, No. 2, pp. 88-96, 2009.
- 16) Kubota, K.: CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications., *Microbes Environ.*, Vol. 28, No. 1, pp. 3-12, 2013.
- 17) Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer K.-H.: Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions, *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 15, No. 4, pp. 593-600, 1992.
- 18) Layton, A. C., Karanth, P. N., Lajoie C. A., Meyers A. J., Gregory, I. R., Stapleton, R. D., Taylor, D. E. and Sayler, G. S. :Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 66, No. 3, pp. 1167-1174, 2000.
- 19) Weller, R., Glöckner, F. O. and Amann R.: 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the in situ detection of members of

- the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides, *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 23, No. 1, pp. 107-114, 2000.
- 20) Hoshino, T. and Schramm, A.: Detection of denitrification genes by in situ rolling circle amplification-fluorescence in situ hybridization to link metabolic potential with identity inside bacterial cells, *Environ. Microbiol.*, Vol. 12, No. 9, pp. 2508–2517, 2010.
 - 21) Katsuyama, C., Kondo, N., Suwa, Y., Yamagishi, T., Itoh, M., Ohte, N., Kimura H, Nagaosa K, Kato K.: Denitrification activity and relevant bacteria revealed by nitrite reductase gene fragments in soil of temperate mixed forest. *Microbes Environ.*, Vol. 23, No. 4, pp. 337–345, 2008.
 - 22) Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S., Senoo, K.: nirK-harboring denitrifiers are more responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil than nirS-harboring bacteria. *Microbes Environ.*, Vol. 25, No. 1, pp. 45–48, 2010.
 - 23) Santoro, A. E., Boehm, A. B., Francis, C. A.: Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 72, No. 3, pp. 2102–2109, 2006.
 - 24) Labbé, N., Juteau, P., Parent, S., and Villemur, R.: Bacterial Diversity in a Marine Methanol-Fed Denitrification Reactor at the Montreal Biodome, Canada. *Microb. Ecol.*, Vol. 46, No. 1, pp. 12–21, 2003.
 - 25) Baytshtok, V., Kim, S., Yu, R., Park, H., Chandran, K.: Molecular and biokinetic characterization of methylotrophic denitrification using nitrate and nitrite as terminal electron acceptors, *Wat. Sci. Technol.*, Vol. 58, No. 2, pp. 359–365, 2008.
 - 26) Kittichotirat, W., Good, N. M., Hall, R., Bringel, F., Lajus, A., Médigue, C., Smalley, N. E., Beck, D., Bumgarner, R., Vuilleumier, S. and Kalyuzhnaya, M. G.: Genome sequence of *Methyloversatilis universalis* FAM5T, a methylotrophic representative of the order Rhodocyclales, *J. Bacteriol.*, Vol. 193, No. 17, pp. 4541–4542, 2011.
 - 27) Lu, H., Kalyuzhnaya, M., Chandran, K.: Comparative proteomic analysis reveals insights into anoxic growth of *Methyloversatilis universalis* FAM5 on methanol and ethanol, *Environ. Microbiol.*, Vol. 14, No. 11, pp. 2935–2945, 2012.

(2013.5.24 受付)

Identification of denitrifying bacteria through single cell analysis with simultaneous detection of *nirK* gene and rRNA by using two-pass tyramide signal amplification fluorescence in situ hybridization

Ryuji TAKAHASHI, Nobuo ARAKI, Shuji KAWAKAMI,
Masataka AOKI and Takashi YAMAGUCHI

We developed a method for single cell analysis with simultaneous detection of a functional gene and rRNA by using two-pass tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization (TSA-FISH) for identification of denitrifying bacteria in activated sludge from a night soil treatment plant. The new method enabled simultaneous detection of the *nirK* gene and rRNA from pure cultures at a high detection rate. Microbial communities in the sludge were identified using cloning analysis based on rRNA genes and the *nirK* gene. On the basis of the results of microbial community analysis, we designed probes targeting rRNA and the *nirK* gene. Simultaneous detection of *nirK* gene and rRNA identified *Hyphomicrobium* as a denitrifier in the sludge.