【本件リリース先】
文部科学記者会、科学記者会、
広島大学関係報道機関

NEWS　RELEASE

広島大学

広島大学広報グループ
〒739-8511 東広島市鏡山 1-3-2
TEL：082-424-3749 FAX：082-424-6040
E-mail: koho@office.hiroshima-u.ac.jp

本件の報道解禁につきましては、令和２年６月１５日(月)午後７時以降にお願いいたします。

令和２年６月１１日

微生物細胞内で発現している mRNA を特異的に検出

～微生物菌叢内の「誰が何をしているのか？」を可視化～

【本研究成果のポイント】

- 多種多様な微生物から構成される微生物叢内の「誰が何をしているのか？」を直接識別する方法はありませんでしたが、mRNA 特異的に蛍光標識することができるようになりました。
- 異なる厚さのペプチドクリカン層を持つグラム陽性菌・陰性菌が混在している状態でも、各々が発現している mRNA のみ同一方法で特異的検出が可能です。
- 微生物叢内で重要な機能を持つ微生物を、1 細胞レベルで mRNA の発現で特定することが可能となり、共生関係など微生物の相互作用の解明や、難培養細菌の重要遺伝子探索に役立ちます。

【概要】

広島大学大学院統合生命科学研究科の高橋宏和研究員、堀尾京平(同研究科博士課程後期 1 年)および岡村好子教授は、同研究科の中島田豊教授、秋庸裕教授、および小堀俊郎上級研究員(農研機構・食品研究部門)らとの共同研究により、RNaseH-assisted rolling circle amplification（RHa-RCA）を利用した蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(fluorescence *in situ* hybridization, RHa-RCA―FISH)法を確立し、微生物細胞内で発現している特定の mRNA のみを、1 細胞レベルで可視化に成功しました。今回の研究により、微生物を破壊せず、また逆転写せず、1 細胞レベルで mRNA の直接検出が可能になり、異なる厚さのペプチドクリカン層を持ち多数の微生物種が混在している微生物叢(microbiota、マイクロバイオータ)、例えば腸内細菌叢や土壌細菌叢において、興味深い遺伝子を発現している微生物種の特定に役立つことが期待されます。この成果は、*Scientific Reports* 誌（電子版:英国時間 2020 年 6 月 15 日 AM10:00（日本時間 6 月 15 日 PM7：00）公開)に掲載されます。

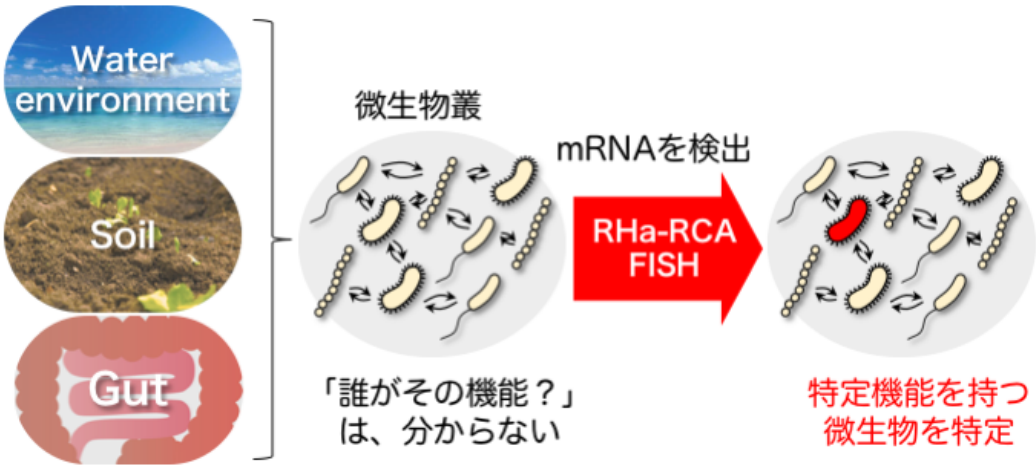

図１．本研究の目的の概念図

【背景】

近年、次世代シークエンサー(注 1)の発達により土壌等の環境試料やヒトの腸内おける微生物叢(注 2)の遺伝子解析が盛んに行われています。この遺伝子解析のうち、ゲノム DNA を解析することをメタゲノム解析、mRNA を解析することをメタトランスクリプトーム解析と呼び、二つ合わせてメタ解析と呼びます。メタゲノム解析では、主に微生物叢を構成している微生物種やその構成割合がわかり、メタトランスクリプトーム解析では、微生物叢で発現している mRNA の種類と数がわかり、活動の概要が推定できます(注 3)。しかしこれらの解析には菌体を破砕し、抽出した DNA および RNA を個別に使用するため、様々な細菌のミックスした遺伝子情報の中から、個々の微生物レベルで「誰が何をしているのか？」は厳密には分かりません。近年、腸内微生物叢や土壌微生物叢の機能が、人間や動植物の生活に大きな影響を与えていることへの理解が深まっています。また、細菌叢の僅かにしか存在しない希少種が、微生物叢の活動全体に影響を及ぼす重要な役割を担っていることも少しずつ明らかになってきています(注 4)。これらの注目すべき微生物が実際にその機能をもっているかは、ゲノム情報と mRNA 配列を照合しないと解明することが出来ません。

海外では、メタ解析に加えて、微生物叢に含まれる全ての微生物を 1 細胞ずつ単離し、1 細胞全ゲノム解析によって完全なゲノム配列情報を得ることにより、細菌叢の中で「誰が何をしているのか？」を見いだそうと試みられています。一方、1ｇの土壌中には 100 億近い微生物が存在していると考えられていることから、微生物叢の 1 細胞全ゲノム解析は膨大な時間と莫大な予算が掛かることが容易に想像されます。そのため、より簡便に「誰が何をしているのか？」を見いだすために、個々の微生物が発現している mRNA を細胞内で可視化・解析ができる、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（fluorescence *in situ* hybridization, FISH）法に大きな期待がかけられていました。FISH 法は、細胞の構造を保ったまま、細胞内の mRNA の発現を確認することができます。しかし、これまでに開発されてきた様々な FISH 法では、ゲノム DNA 由来のノイズが確認されたり、メタトランスクリプトーム解析で得られた mRNA の断片配列では、蛍光プローブの設定箇所が限られるため感度が不足していたりしました。そこで、感度・特異性共に優れた新しい FISH 法の確立が望まれていました。

【研究成果の内容】

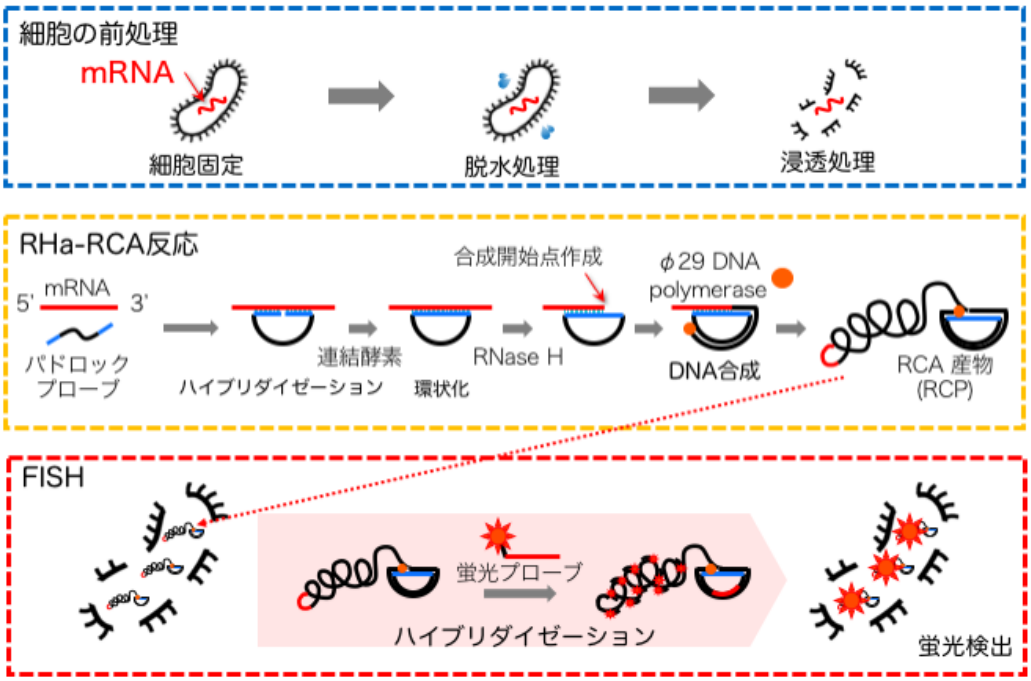

図２. RHa-RCA―FISH による微生物細胞の蛍光標識手順

本研究では、当研究室で確立した RHa-RCA（参考文献１）(注 5)を利用した FISH 法の確立に取り組みました。RHa-RCA 法は、南京錠型 DNA プローブ(パドロックプローブ, PLP)を mRNA にハイブリダイズさせ、DNA 連結酵素で環状化し、RNA に RNaseH でニックと呼ばれる切れ目を形成して RCA 反応を開始させるため、標的の配列情報が短くても PLP が設定でき、RNA 検出に利用可能です。また、RNaseH は、DNA とハイブリダイズした RNA にしか DNA 合成開始点を形成できないため、DNA 配列の存在による擬陽性は発生しません。RCA 法で合成された 1 本鎖 DNA は、RCA 産物(RCA products, RCP)と呼ばれ、PLP の相補鎖配列が数千から数十万回繰

り返しになっています。RHa-RCA —FISH 法は、この繰り返し配列の相補鎖を持つ蛍光標識オリゴ DNA を、RCP に多数ハイブリダイズさせる、という原理に基づいています（図２）。

本研究ではまず初めに、薬剤で緑色蛍光タンパク質（GFP）の発現誘導可能なプラスミド DNA を保持した大腸菌を基に条件検討を行いました。GFP 非誘導および誘導した大腸菌を用いて RHa-RCA—FISH を行ったところ、非誘導の大腸菌では蛍光は一切確認できませんでしたが、GFP を誘導した大腸菌では蛍光プローブ（Alexa-568, 赤色）のシグナルが確認され、拡大したところ、蛍光がドット状に観察されていることがわかりました(図３)。非誘導の大腸菌も GFP 遺伝子をプラスミド DNA として保持していることから、本方法では GFP mRNA のみを特異的に検出していることが確認されました。

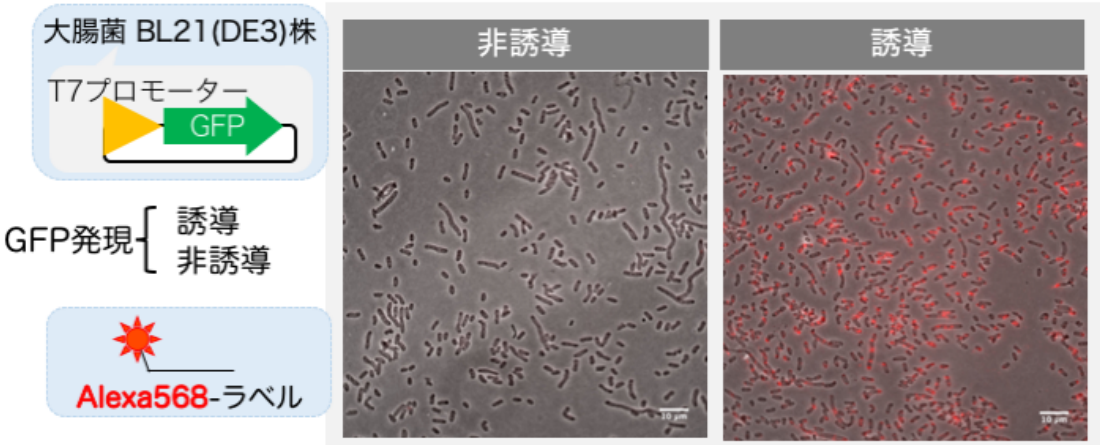

図３．大腸菌内で発現している GFP mRNA の検出

大腸菌は細胞壁を構成するペプチドグリカン層が薄いグラム陰性菌に属していますが、細菌叢にはペプチドグリカン層が厚いグラム陽性菌も含まれています。そこで、本 RHa-RCA—FISH 法が、グラム陽性菌でも行えるかどうか確認しました。グラム陽性菌としては、赤色蛍光タンパク質(DsRed)が発現できるプラスミドを保持した、ブレビバチルス菌（*Brevibacillus choshinensis* HPD31）を用いました。DsRed の発現は薬剤等では誘導できないため、培養開始から 12, 24, 48, 72 時間目に菌体を回収して、DsRed 発現を蛍光顕微鏡下で確認したところ、24 時間目から DsRed タンパク質由来の赤色蛍光が観察され、72 時間目にはほとんどの菌体で赤色蛍光が観察されました(図４，上段の写真)。これらの菌体を用いて、RHa-RCA—FISH 法により mRNA の発現を確認したところ、12 時間目に既に蛍光プローブ（Alexa-488, 緑色）のシグナルが確認でき、24 時間目では mRNA 発現している菌体の数は頂点に達しますが、その後は発現している細胞が少なくなっていくことが観察されました(図４，中段の写真)。さらに、蛍光プローブのシグナルが観察できる細胞を拡大して確認すると、ドットの数量から、細胞毎の mRNA 発現量の違いも比較できる可能性が高いことも明らかとなりました(図４，下段の写真)。

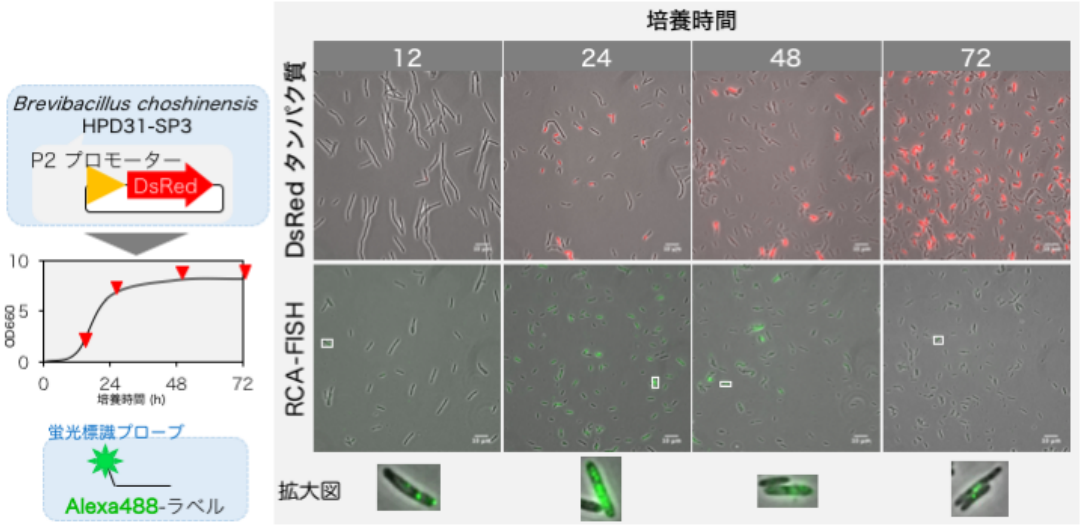

図４．グラム陽性菌(ブレビバチルス)内の DsRed タンパク質(上段、赤)とその mRNA の検出(中段、緑)。拡大図(下段)は、中段の四角で囲んだ位置にある菌を拡大した。シグナルがドット状に観察されていることが解る。

次にこれら蛍光タンパク質を発現する大腸菌とブレビバチルス菌を混合して、擬似的な細菌叢状態を作成し、RHa-RCA―FISH 法同時検出を行いました。大腸菌とブレビバチルス菌は、どちらとも桿菌であり細胞の形状が細長い棒状または円筒状を示すため、形状比較では区別が付きません。RHa-RCA―FISH 後に蛍光顕微鏡で観察すると、大腸菌は GFP mRNA 検出用の赤色蛍光プローブ、ブレビバチルス菌は DsRed mRNA 検出用の由来の緑色蛍光プローブで綺麗に染め分けられ、グラム陰性菌およびグラム陽性菌のそれぞれの mRNA を、同一手順で同時検出することにも成功しました(図５)。

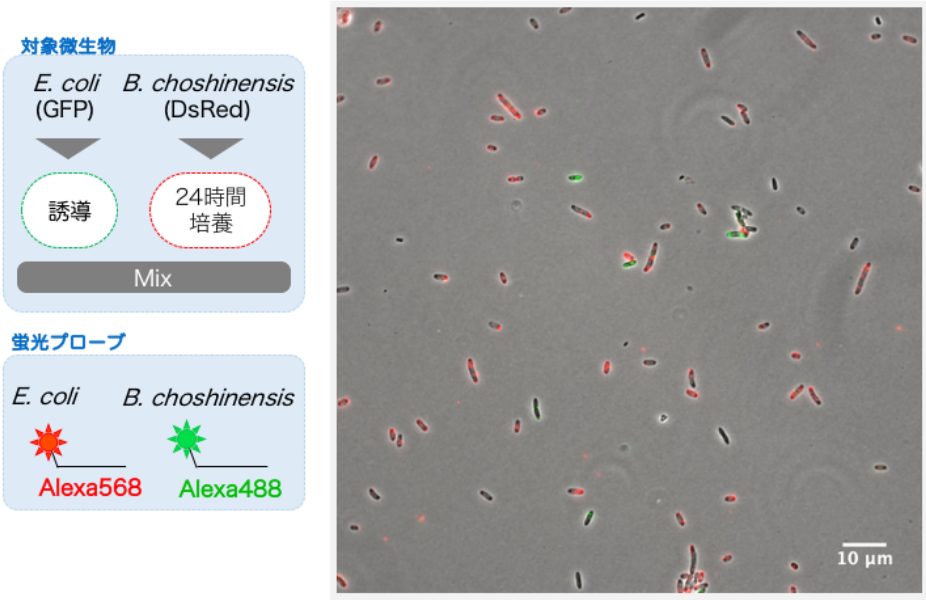

図５. 混合したグラム陰性および陽性菌における蛍光タンパク質 mRNA の同時特異的検出

最後に、RHa-RCA を用いた FISH により、外部から導入した遺伝子ではなく、内在性 mRNA の発現が確認できるかどうか、ヨーグルトを用いて試みました。今回使用したヨーグルトは、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 2038（*L. bulgaricus* 2038, 桿菌）と *Streptococcus thermophilus* 1131（*S. thermophilus* 1131, 球菌）という２つのグラム陽性菌で発酵させています。この二つの菌は栄養共生関係にあり、またマイクロアレイ解析により得られたトランスクリプトームデータが既に存在したため選びしました（参考文献２)。しかし、発酵初期（3.5 時間）を除き、培地として使用した牛乳に含まれるカゼインが凝集して、我々ではこれらの微生物をうまく回収することができませんでした。そこで、*S. thermophilus* 1131 のピルビン酸リアーゼ活性化酵素（*pflA*）の発現が確認されたのは発酵初期のみであったため、*pflA* 遺伝子を標的 mRNA として選択し、RHa-RCA―FISH 法を試みました。その結果、*S. thermophilus* 1131 である球菌では赤色蛍光（Alexa -568）が観察されたのに対し、*L. bulgaricus* 2038 である桿菌では無蛍光が観察されました（図 6)。この結果は、RHa-RCA を用いた FISH により、内在的な mRNA の発現が特異的に確認できることが明らかとなりました。

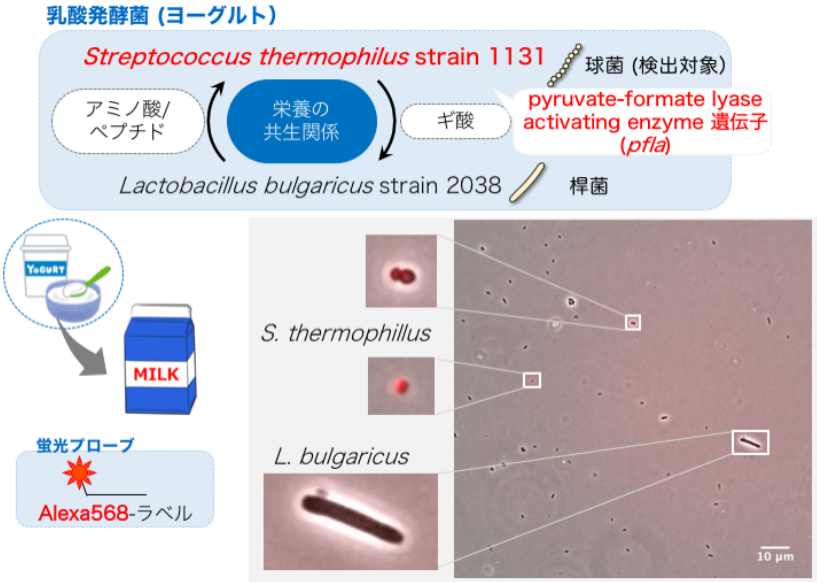

図 6. ヨーグルトの混合培養物中の *S. thermophilus* mRNA（*pflA*）の検出。

【今後の展開】

今回開発した FISH 方法は、多種多様な微生物から構成されている微生物叢において、発現している mRNA の有無で該当微生物を標識することが可能です。そのため、存在量が極わずかでも、代謝や病気・免疫・感染防御・脳機能など、人の健康な生活にとって重要な事象に直接または間接的に関与する腸内細菌の特定し、特定された菌による新たな創薬開発や臨床応用への可能性が高まります。さらに、蛍光標識された微生物は、様々な方法で単離が可能なため、単離後に全ゲノム解析を行うことによって、当該微生物の詳細な特性を解析できるかもしれません。

さらに、原理的には原核微生物のみならず、ヒトを含む真核生物の mRNA やウイルスの RNA も含めた全ての RNA 種でも利用できます。

また、細菌が死滅すると RNA は速やかに分解されることを利用して、食品等の試料から「生きた微生物」のみを速やかに検出できるため、培養法に変わる新しい検査方法の開発にも利用可能です。

【用語解説】

注１）次世代シークエンサー

これまで使用されていたＤＮＡ配列決定装置（シークエンサー）と比較して、安価かつ短期間で大量の配列解析が可能な装置の総称。

注 2）細菌叢または微生物叢

ある特定の場所(腸内、口腔内、土壌など)に存在する、多数の種が含まれる微生物集団全体を指さす呼称。英語ではマイクロバイオータ(microbiota)。以前はマイクロフローラとも呼ばれていたが、現在学術用語としては使用されていない。

注 3）ゲノム DNA と mRNA

生物は、ゲノム DNA 配列中の遺伝子配列を mRNA に転写し、mRNA 配列を元に細胞の活動に必要な酵素等のタンパク質を作成する。そのため、ゲノム DNA(厳密にはゲノム DNA 中の 16S rDNA)配列を解析することで構成生物種が特定でき、mRNA 配列を解析することで、その細菌叢で行われている生命活動が推定可能となる。

注 4）優占種と希少種

メタ解析では、どうしても優占種からの DNA や mRNA の提供量が多くなるため、解析結果では優占種に注目が集まります。しかし、近年、優占種では無く希少種が、浄化水層において水質改善における効率を上げること等が分かってきました。

注５) RHa-RCA 法

RNase H-assisted rolling circle amplification 法の略称で、当研究室で開発された新しい RNA 検出方法。RCA 法は DNA 合成方法の 1 つで、環状の鋳型 DNA を鎖置換型 DNA 合成酵素を用いて、まるで糸巻きから糸を取り出すように等温で 1 本鎖 DNA を合成する方法。これまでの RNA 検出方法とは異なり、逆転写反応という RNA を DNA に変換する工程を行わずに、標的 RNA のみを検出できる。また、一般的な遺伝子検出方法とは異なり、検出メカニズムに RNaseH と言う酵素を使用しているため、コンタミネーション等による擬陽性が原理的に起きにくいことも特徴。

【参考文献】

１．H. Takahashi, M. Ohkawachi, K. Horio, T. Kobori, T. Aki, Y. Matsumura, Y. Nakashimada, Y. Okamura. RNase H-assisted RNA-primed rolling circle amplification for targeted RNA sequence detection, *Scientific Reports*, **8**, 7770. (2018)

2. Sieuwerts, S. *et al.* Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 7775-7784 (2010).

【掲載論文】

タイトル：Direct detection of mRNA expression in microbial cells by fluorescence *in situ* hybridization using RNase H-assisted rolling circle amplification

著者名：H. Takahashi, K. Horio, S. Kato, T. Kobori, K. Watanabe, T. Aki, Y. Nakashimada, Y. Okamura

掲載雑誌： *Scientific Reports*, doi：10.1038/s41598-020-65864-7

【お問い合わせ先】

岡村 好子（オカムラ ヨシコ）
広島大学 大学院統合生命科学研究科　教授
〒 739-8530 広島県東広島市鏡山１－３－１
Tel：082-424-4583　Fax：082-424-4583
E-mail：okamuray@hiroshima-u.ac.jp

発信枚数：Ａ４版　７枚