

Development of mRNA visualization method specific to microbes within consortium (微生物コンソーシアム解析に向けた mRNA 特異的微生物可視化技術の開発)

広島大学大学院統合生命科学研究科統合生命科学専攻
生物学プログラム
堀尾 京平 (海洋生物学研究室)

第一章 緒論

バイオテクノロジーは現代社会に医薬品や食品など有用物質をもたらしてきてだけでなく、近年は持続可能な開発目標 (SDGs) の多くの目標達成に貢献することが期待されている。従来の微生物研究は培養に基づいて発展してきたが、一方で環境中の微生物は 99%以上が難培養性であることが知られている。これらの微生物資源は未知機能の宝庫であることが予想され、培養に依存しない手法で多様な微生物を解析し、利用可能な微生物資源・遺伝子資源を拡充することは、今後のバイオ戦略と持続可能な社会の実現に貢献し得る。近年、次世代シーケンサーを用いたメタトランスクリプトーム解析による培養非依存的な微生物コンソーシアム解析が可能になり、環境微生物の機能や微生物間相互作用の推定が行われている。しかし、メタトランスクリプトーム解析では抽出した mRNA を解析するため、得られる配列データの持ち主は実際には不明である。そのため、有用機能の担い手の解明や、単菌分離できたとしても元の機能を示すとは限らない微生物が、コンソーシアム内でどのように機能しているのかを正確に把握するには、mRNA を微生物細胞内で可視化し、個別に解析することが必要となる。本研究では、メタトランスクリプトームデータを元に mRNA を細胞内で可視化する技術を開発し、微生物機能や微生物間相互作用の推定に有用であるかどうか検証することを目的とした。

本章では、メタ解析を利用した微生物コンソーシアム解析と、細胞内核酸検出技術に関する既往の知見をまとめ、現状の技術的課題と本研究の意義を明らかにした。

第二章 微生物細胞内 mRNA 直接検出法 RHa-RCA-FISH 法の開発 (参考論文 1)

筆者らはこれまでに RNA 直接検出法 RNase H-assisted rolling circle amplification (RHa-RCA) 法を開発した。RHa-RCA では、 ϕ 29 DNA ポリメラーゼによる RCA 反応をシグナル増幅に利用しているため、1 fmol という微量の RNA 分子も検出可能である。また、RNA を直接プライマー化するため、RNA 中の任意の位置を検出標的とすることができ、原理上 DNA を検出しないという利点がある。そこで、ゲノムや細胞質成分が混在する細胞内で mRNA を高感度かつ特異的に検出することを目的とした。グラム陰性菌のモデルには大腸菌を、グラム陽性菌のモデルにはブレヴィバチルスを用いて、プラスミドで標的遺伝子を導入し、発現誘導させた mRNA を標的とした。菌体内で RHa-RCA を行い、RCA 産物を fluorescence *in situ* hybridization (FISH) で可視化した。顕微鏡観察の結果、視野中の 80%~90%の細胞内から特異的蛍光が得られ、mRNA を細胞内検出することに成功した。また、プラスミド上の遺伝子 (DNA) からのノイズは発生しなかった。さらに、2 種細菌の混合物での特異的同時検出にも成功した。以上の結果より、広範な細菌種に適用し得る *in situ* mRNA 検出技術 RHa-RCA-FISH の開発に成功した。

第三章 単菌叢ヨーグルト中の乳酸菌を用いた RHa-RCA-FISH 法の微生物コンソーシアム解析への利用可能性の検証 (参考論文 2)

モデル細菌に強制発現させた遺伝子とは異なり、実際の微生物コンソーシアムでは個々の細菌

の遺伝子発現は不均一に起こり、細胞内の mRNA 量も少ないことが予想される。そこで、バルクでの遺伝子発現解析が既知のコンソーシアム「ヨーグルト」中の乳酸菌に対して RHa-RCA-FISH を適用し、細菌の自然な遺伝子発現を本方法により可視化できるか検証することを目的とした。市販のヨーグルトを無脂肪乳に添加して 42°C で 3.5~8.0 時間培養したのち、生育した乳酸菌を取得した。この際、多量のタンパク質を含む乳成分が菌体取得の妨げとなったが、RNAprotect® Bacteria Reagent を添加することでタンパク質を分散でき、遠心分離により容易に菌体を回収できることを見出した。ヨーグルト内での乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* と *Lactobacillus bulgaricus* の遺伝子発現を可視化するため、トランスクリプトーム解析により培養前期での高発現が報告されている *S. thermophilus* のピルビン酸-ギ酸リアーゼ活性化酵素遺伝子 *pflA* と、恒常発現が報告されている *L. bulgaricus* の D-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *ldhD1* の mRNA を標的に反応を行った。その結果、2 種の乳酸菌の遺伝子発現を既報の培養フェーズで特異的検出することに成功したため、RHa-RCA-FISH により実際に微生物が機能する際に発現する mRNA を可視化できることが示唆された。よって、本技術は微生物コンソーシアムの機能解析に利用可能であると結論した。

第四章 結論

本研究では、微生物コンソーシアム解析のための mRNA 特異的可視化技術を開発した。標的 mRNA を高発現させたモデル細菌ではほぼ全ての細胞を検出でき、新たな微生物 mRNA 特異的可視化技術の開発に成功した。また、ヨーグルト中の乳酸菌のトランスクリプトームデータに基づき、RHa-RCA-FISH を適用したところ、標的 mRNA が持ち主の微生物の細胞内で発現している様子を可視化することに成功した。本研究で開発した技術は、バルク解析で推定した微生物コンソーシアムの個々の微生物の機能を明らかにし、相互作用を個々の微生物単位で検証することを可能にする。これにより、本技術は微生物コンソーシアムでのみ発現する有用機能の分子メカニズムを解明する手法としての利用が期待され、複合微生物系での利用のみならず、単菌分離培養に向けた重要知見を提供する。以上のことから、本研究は利用可能な微生物資源・遺伝子資源の拡充に貢献することが期待され、学術及び社会的意義のある研究である。

参考論文 (学位要件論文)

[1] Hirokazu Takahashi*, **Kyohei Horio***, Setsu Kato, Toshiro Kobori, Kenshi Watanabe, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura, Direct detection of mRNA expression in microbial cells by fluorescence *in situ* hybridization using RNase H-assisted rolling circle amplification, *Scientific Reports*, **10**, 9588 (2020). *: equally contributed. DOI:10.1038/s41598-020-65864-7

[2] **Kyohei Horio**, Hirokazu Takahashi, Toshiro Kobori, Kenshi Watanabe, Tsunehiro Aki, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura, Visualization of gene reciprocity among lactic acid bacteria in yogurt by RNase H-assisted rolling circle amplification-fluorescence *in situ* hybridization, *Microorganisms*, **9**(6), 1208 (2021). DOI:10.3390/microorganisms9061208

関連論文

Hirokazu Takahashi, Masahiko Ohkawachi, **Kyohei Horio**, Toshiro Kobori, Tsunehiro Aki, Yukihiko Matsumura, Yutaka Nakashimada, Yoshiko Okamura, RNase H-assisted RNA-primed rolling circle amplification for targeted RNA sequence detection, *Scientific Reports*, **8**, 7770 (2018). DOI:10.1038/s41598-018-26132-x