

(8) 微生物情報の有効活用に関する研究開発 (平成17年度～平成19年度)

研究のねらい

我々は、これまでに、迅速で、検出限界が高く、かつ生きている特定細菌の検出・計数できる細菌検査法の開発を目標に、FISH (fluorescence in situ hybridization) 法の応用を検討し、16S rRNA を標的とする DNA プローブを用いる培養併用 FISH (FISHFC) 法を開発した。しかし、16S rRNA 塩基配列には、DNA プローブとのハイブリッド形成が、容易な領域と困難な領域とがある。Fuchs らは、大腸菌 16S rRNA 全長を 171 領域に区分し、各領域における DNA プローブとのハイブリッド形成強度を測定しハイブリッド形成の困難な領域が 55 箇所存在することを見出した (Fuchs, B. M., et al. (1998) Appl. Environ. Microbiol. 64, 4973-4982.)。FISH 法において、DNA プローブとのハイブリッド形成が困難な rRNA 塩基配列領域を、DNA プローブの標的とすることは、FISH 蛍光シグナルが微弱で検出が困難となるため、不適切とされている。従来、DNA プローブの標的として利用できる rRNA 塩基配列はハイブリッド形成が容易な領域に限られていた。しかし、DNA プローブとのハイブリッド形成が困難な rRNA 塩基配列領域には菌種特異的塩基配列が存在し、これらの領域とプローブとのハイブリッド形成を強固にできれば、これまで利用できなかったこれら領域を新たなプローブ標的として利用が可能となる。本研究開発は、DNA プローブとのハイブリッド形成が困難な rRNA 塩基配列領域をハイブリッド形成を容易とする可能性について検討した。平成18年度は、PNA プローブのこの領域への利用を検討した。

研究の方法

1) 供試菌株

Escherichia coli ATCC11775 を用いた。

2) プローブ設計

Fuchs らが、明らかとした DNA プローブとのハイブリッド形成が困難な大腸菌 rRNA 塩基配列領域のうち、3 箇所の領域を用いた (各領域の E.coli 16S rRNA ポジション番号は、次の通り。474-491、585-602、639-656)。次に、各々の領域を標的とするプローブを DNA および PNA により合成した (プローブ名と塩基配列は次の通り。Eco474 / CGGGTAACGTCAATGAGC、Eco585 / TCTGACTTAACAAACCGC、Eco639 / CTCAAGCTTGCCAGTATC)。

3) FISH 法

対数増殖中期まで培養した Escherichia coli ATCC11775 懸濁液に 3 倍量の固定液 (4% paraformaldehyde (pH 7.2)) 等を加え、2 時間室温下で細菌細胞の固定を行った。蒸留水で洗浄後、固定細菌懸濁液の 3 μ l をスライドガラスに塗布し風乾後、各々のエタノール溶液 (50%、80%、100%) に 3 分間順に浸した。これを乾燥させ標本とした。標本に、ハイブリダイゼーション緩衝液 9 μ l と 1 μ l の蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブ (10 μ M) を加え、2 時間ハイブリダイゼーションを行った。温度は 45 ~ 90 の範囲を 5 刻みとした。次に、標本を洗浄緩衝液でハイブリダイゼーションと同じ温度で洗浄した。次に蒸留水ですすぎ乾燥後、画像解析装置付属蛍光顕微鏡を用いて標本の蛍光強度の測定を行った。

研究成果の概要

上記プローブの各々を用い大腸菌に対し FISH 法を行い、FISH 蛍光信号強度を測定した。その結果、Eco474 プローブ (DNA) の FISH 蛍光信号強度は、ハイブリダイゼーション温度 45 から 70 の範囲において、一様に低く (蛍光強度 9 ~ 21) Fuchs らの報告と同様だった。一方、Eco474 プローブ (PNA) の FISH 蛍光信号強度は、ハイブリダイゼーション温度 45 ~ 65 では、約 150 の値を維持し、65 以上で低下し、85 ~ 90 で 11 となり、温度上昇に伴い S 字カーブを描いて蛍光強度が低下した。16S rRNA 474-491 領域を標的とする FISH において、DNA プローブは、いずれの温度でのハイブリッドが非常に弱いため、不適切と推定した。しかし、PNA プローブは、45 ~ 65 では強いハイブリッドが形成され、65 以上ではしだいに弱くなったことから、適切だった。また、Eco585 プローブまたは Eco6396 プローブを用いる FISH の場合も同様の結果となった。以上から、DNA プローブとのハイブリッド形成が困難な rRNA 塩基配列領域を標的とする FISH では、DNA プローブの使用は不適切だが、PNA プローブは、この領域へ利用できる可能性が高かった。

担当者 大坪雅史、青木央、宮崎俊一