



Title	遺伝子を標的とした自然環境中の特定細菌のモニタリング
Author(s)	黒川, 顕
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40526">https://hdl.handle.net/11094/40526</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	黒川 顕
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 13799 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	遺伝子を標的とした自然環境中の特定細菌のモニタリング
論文審査委員	(主査) 教授 那須 正夫  (副査) 教授 宮本 和久 教授 西原 力 教授 本田 武司

#### 論文内容の要旨

人類の生存基盤である現在の生態系は、産業革命以降の化石燃料の消費による自然環境への影響により、非常に脆弱なものとなっている。生命活動を保持するためには、地球環境の恒常性を維持する必要がある、そのためには生態系の理解やそれらの変化の予測が必須となる。細菌は進化の過程で多様な機能を獲得し、土壌や河川、海洋のみならず、深海や熱水等の極限環境を含むあらゆる環境中に豊富に存在し、生態系の根幹を形成している。さらに、これら細菌は薬剤耐性や化学物質分解等の遺伝子に見られるように、遺伝子の水平伝播などにより、環境の変化に対して速やかに適応する能力をも有している。したがって、生態系の理解のためには、細菌の機能に関する遺伝子に焦点をあて、環境中における分布・動態等の詳細な解析が必要となる。

自然環境中には、培養操作に依存する従来の方法では検出できない細菌が高い割合で存在している。そこで、環境中の細菌を培養操作に依存することなく解析する新たな方法が積極的に開発されている。なかでも蛍光 in situ hybridization (FISH) 法は、細菌の rRNA をターゲットとしたプローブを用いて細菌をシングルセルレベルで解析する手法として幅広い分野で応用が期待されている。しかし、自然環境中の細菌の生態を理解するためには、細菌を種属のレベルで解析するだけでなく、細菌のもつ機能に焦点をあてて解析する必要がある。そのためには、遺伝子自体の動態を理解する新たな視点が必要となる。そこで、細菌を遺伝子を有する粒子と捉えシングルセルレベルで解析する方法と、特定の遺伝子を増幅する PCR 法を組み合わせ、遺伝子を標的として特定機能を有する細菌をシングルセルレベルで解析する in situ PCR 法が有効となる。この in situ PCR 法は真核生物を材料とする生物医学分野で広く用いられ、環境微生物学分野においてもその有用性が高く評価されている。しかしながら、方法論的制約からいまだ実用に至っていないのが現状である。そこで、細菌における in situ PCR 法の開発を試みた。

In situ PCR 法には、菌体内で増幅した PCR 産物を検出する様式により、indirect in situ PCR 法と direct in situ PCR 法がある。In situ PCR 法で最も重要なことは、*Taq* DNA polymerase 等が菌体内に浸透し、かつ PCR により増幅したプロダクトが菌体外へ漏出しないことである。本研究では、菌体の固定条件と菌体の透過処理を最適化することにより、遺伝子を標的として細菌を検出する in situ PCR 法を開発した。特に、HNPP / Fast Red TR 反応系をもちいた direct in situ PCR 法では強い蛍光が得られることから、本方法を応用することにより、自然環境中の細菌を遺伝子を標的として検出することが可能になると考えられた。

この HNPP / Fast Red TR 反応系をもちいた direct in situ PCR 法により得られた結果を客観的に評価するため、

また標的細菌の検出の自動化のために、蛍光顕微鏡像を画像解析する必要がある。さらに、本方法を土壌粒子等の夾雑物を含む環境試料に応用するにあたっては、蛍光色素 HNP / TR 由来のバックグラウンドのために、標的細菌を検出するのが比較的困難となる。そこで、蛍光顕微鏡像から標的のシグナルのみを効率よく抽出するために、色相分解およびクラスタリングの理論をもちいた画像解析法を開発した。さらに、本方法とこの画像解析を組み合わせることによって、河川水中に存在する *E. coli*, *Shigella* 属細菌の検出および定量が可能となった。

大腸菌のなかには *E. coli* O157:H7 のように毒素を産出するものが存在する。これら病原細菌による感染症の拡大の防止や発生の予防のためには、その感染経路および感染源の特定、さらにはそれら細菌の自然環境中での動態を理解しなければならない。そのためにはまず、それら病原細菌を迅速に検出・定量することが重要となる。しかし、自然環境中の細菌の多くは通常の方法では培養困難であり、培養に依存する従来の方法では自然環境中の病原細菌の検出は困難である。

そこで、細菌の表面抗原を標的とし、蛍光ラベルした抗体を反応させることにより、細菌を特異的に検出する蛍光抗体法が一般的にもちいられるようになった。しかし、蛍光抗体法は細菌の抗原に特異的なため、特定の遺伝子を保有するものの抗原性が異なる細菌を同時に検出することはできない。この問題の解決にあたっては、毒素産生遺伝子等の特定遺伝子を標的として細菌を検出・定量することができる direct in situ PCR 法が有効となる。

本研究では、抗 *E. coli* O157:H7 蛍光抗体を用いた *E. coli* O157:H7 の検出、また、Vero 毒素産生遺伝子 *slt I*, *slt II* を特異的に増幅する EVT, EVS プライマーを用い、direct in situ PCR 法による *E. coli* O157:H7 の検出を試みた。さらに、河川の同一地点における病原性大腸菌 O157 および Vero 毒素産生細菌の現存量の季節変動、同一水系の河川において源流から汚染の進行している下流にかけて、それら細菌の現存量の採水地点による変動を検討した。その結果、Vero 毒素産生細菌は、いずれの環境、季節においても普遍的に常在する可能性を示すことができた。今後はこれら細菌の天然での生残のプロセスを明らかにするとともに、生死や感染能の有無、さらには生理状態を評価する必要があると考えられた。

In situ PCR 法により、個々の細菌を培養することなくその機能を遺伝子レベルで解析することが可能となり、生態系における細菌遺伝子の伝播、動態解析への道が開かれた。また、このような手法は分子微生物生態学の確立において基礎となるものであり、生態系を遺伝子自体に焦点をあてて解析するという新たな視点を与えるものとして期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

蛍光 in situ hybridization (FISH) 法等の手法の発達により、自然環境中の細菌をシングルセルレベルで検出・解析することが可能となってきた。FISH 法は細菌の rRNA を標的としており、基本的には種属のレベルでの解析に貢献するものである。しかし、自然環境における細菌の生態を理解するためには、細菌を種属のレベルで解析するだけでなく、細菌のもつ機能に焦点をあてて解析する必要がある。そのためには、自然環境を巨大な遺伝子プールと捉え、細菌の有する遺伝子の動態に焦点をあてて理解する新たな視点が必要となる。

本研究ではこの視点に立ち、特定遺伝子を標的として細菌をシングルセルレベルで検出できる in situ PCR 法を開発した。また同時に、本方法により得られた結果の客観的評価や標的細菌検出の自動化を目的に、蛍光顕微鏡下において標的細菌を効率良く分離する画像の色相分解およびクラスタリングの理論を用いた画像解析法の開発を行った。そして、その応用例として Vero 毒素産生遺伝子を標的に、河川の同一地点における Vero 毒素産生細菌の細菌数の変動、さらに同一水系の河川において上流から下流にかけて Vero 毒素産生細菌の細菌数の変動を検討するとともに、Vero 毒素産生細菌の自然環境中における常在の可能性を示し、また Vero 毒素産生遺伝子の河川水中での遺伝子伝播の存在を示唆した。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認められる。