

Title	gyrB 遺伝子を指標とした水圏における細菌の増殖活性評価
Author(s)	小林, 剛
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44806
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、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	こばやし 小 林 剛
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 6 4 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学 位 論 文 名	<i>gyrB</i> 遺伝子を指標とした水圏における細菌の増殖活性評価
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 那 須 正 夫 (副査) 教 授 田 中 慶 一 教 授 西 原 力 教 授 宮 本 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

微生物生態学分野における技術的な発展に伴い、環境中には多様な細菌種が存在し、さらにそれらのうち、高い生理活性を示す細菌はその一部であることが、基質の取り込み能、呼吸活性の測定から明らかとされてきた。多くの細菌種は、物理的、化学的、および生物的な環境の変化に素早く応答し、その生理状態と増殖速度を調節していると考えられる。特に、増殖速度の変化は細菌の消長に直接関わる重要な要素であることから、細菌の現存量に加え、その増殖活性を知ることができれば、その細菌種の環境中における挙動、またはその生残に影響を及ぼす要因についてのより詳細な検討を行うことが可能となる。

gyrB 遺伝子は DNA 複製に必須の遺伝子群の一つであり、細胞周期に密接に関連してその転写が調節されていると考えられることから、その mRNA の発現は細胞増殖の優れた指標となることが期待できる。また、*gyrB* 遺伝子は細菌分類の指標として有用な遺伝子の一つであり、特定細菌検出のための標的遺伝子として利用できる。本研究ではまず *gyrB* 遺伝子を標的とした real-time PCR の細菌定量における有用性を確認し、つづいて、その mRNA 発現量と *E. coli* 増殖速度との関係を明らかにするための研究を行った。

rRNA 配列データベースの充実に伴い、rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法は、環境中における特定細菌種の存在を知るための手法として様々な場面で利用されるようになりつつある。細菌定量の検討においては、新たにデザインした *E. coli*、*Shigella* の *gyrB* 遺伝子を標的としたプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブ (FRET プローブ) を用いた real-time PCR と同時に、*E. coli* 16S rRNA 遺伝子を標的とした real-time PCR を行った。さらにこれらの手法を用いて河川表層水、バイオフィームおよびセディメントにおける *E. coli* の分布を調査し、細菌定量における real-time PCR 法の有用性について検討した。

河川水中の *E. coli* 16S rRNA 遺伝子および *E. coli*、*Shigella* の *gyrB* 遺伝子の定量結果は、培養法によりもとめた *E. coli* の MPN に比べて明らかに大きな値であった。この差異は河川水中の *E. coli* の大部分が、用いた培地により培養できなかった、あるいは培養できない状態にあったことを示している。このことから、環境中において培養可能な *E. coli* は全体のごく一部に過ぎず、real-time PCR による定量は、正確な細菌数をもとめる上でより優れた手法であることが示された。しかしながら、16S rRNA 遺伝子の定量に当たっては、用いたプライマーセットにより捉えることのできる標的遺伝子のコピー数は、細菌株間において異なっていたため、その定量結果から細菌数を正確に知ることができなかった。一方、*gyrB* 遺伝子の定量に当たっては、標的とする配列はほとんど全ての細菌ゲノム上におい

で1コピーである。*gyrB*遺伝子の定量結果は細菌ゲノム数を示しており、細菌同定の指標として *gyrB* 遺伝子を用いることで、水圏における細菌数を正確に知ることが可能である。

さらに、細菌増殖活性の指標としての *gyrB* 遺伝子の有用性を検討するに当たり、*gyrB* mRNA コピー数を定量するため real-time RT-PCR を用いた。まず *E. coli* の growth phase と *gyrB* mRNA 発現量 (コピー数) との関係調べた。さらに、その発現量から細菌の増殖速度をもとめることを目的とし、*E. coli* の増殖速度と発現量との関係を明らかにするための検討を行った。標準菌株 (*E. coli* K12 W3110) を用いた検討の結果、*gyrB* mRNA の発現は増殖している細胞 (対数増殖期) で顕著に見られ、その発現が細菌の増殖活性を知るための優れた指標となることが明らかとなった。また、その発現量は *E. coli* の比増殖速度との間に正の相関が見られたことから、*gyrB* mRNA の発現量から細菌の増殖速度をもとめることが可能であることが分かった。

さらに標準菌株を用いた検討により得られた知見に基づき、河川の表層水およびセディメントにおける細菌の増殖活性を知るための検討を行った。その結果、セディメント試料において、*E. coli gyrB* 遺伝子1コピーあたりの *gyrB* mRNA コピー数は、河川表層水についての結果に比べて明らかに高く、*E. coli* がセディメント中において活発に増殖していたことを示していた。水圏環境における *E. coli* の生残にとって、懸濁粒子、バイオフィームまたはセディメントは、流水中に比べ基質となる有機物および栄養塩に富み、*E. coli* の増殖に適していると考えられる。しかしながら、これまで環境中において *E. coli* が増殖していることを直接証明した報告はなく、現存量の変化から増殖の有無を知る試みが行われているだけであった。本研究においては *gyrB* mRNA 発現量に基づく解析により、セディメント中において *E. coli* が活発に増殖していたことを示した。

gyrB 遺伝子は細菌同定の指標として用いられる遺伝子の一つであり、種々の細菌種について特異的プライマー、ハイブリダイゼーションプローブのデザインを行うことが可能である。*gyrB* 遺伝子の発現に基づく解析は、それら個々の細菌種の環境中における増殖活性を知る上で有効であるといえる。今後、細菌の同定および増殖活性の指標遺伝子としての *gyrB* 遺伝子の利用が、病原細菌を含む衛生学的に重要な細菌等、種々の細菌種について期待でき、それらの水圏における生態を解明する上で大きく貢献できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

我々の健康な生活環境を保障するにあたっては、水環境の衛生徹生物学的な安全性を確保する必要があり、そのためには衛生上重要な微生物について、その水圏における生態を知ることが重要である。

そこで申請者は、細菌の定量における新たな指標遺伝子として *gyrB* 遺伝子に着目した。まず大腸菌の *gyrB* 遺伝子に特異的なプライマーを設計し、その特異性を確認した。そしてリアルタイム PCR 法により、従来用いられているリボゾーム RNA を標的とした場合よりも正確に大腸菌数を測定できることを明らかにした。また *gyrB* 遺伝子の発現は増殖している菌体で顕著であることより、その発現量から増殖速度を推測することを可能にした。さらにこれらの成果をもとに、都市近郊河川の底泥において大腸菌が活発に増殖していることを示した。

以上、細菌の定量および増殖活性の指標遺伝子としての *gyrB* 遺伝子の利用は、病原細菌をはじめとする様々な細菌種に可能であると考えられ、それらの水圏環境における生態を解明する上で貢献できるものと期待される。したがって、博士 (薬学) の学位を授与するにふさわしいと考える。