

Title	16S rRNAの系統解析に基づく食中毒起因菌の同時検出とその簡易・迅速化
Author(s)	池田, 昌郁
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47241
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	いけ だ まさ ふみ 池 田 昌 郁
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 1 4 3 4 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	16S rRNA の系統解析に基づく食中毒起因菌の同時検出とその簡易・迅速化
論文審査委員	(主査) 教授 那須 正夫 (副査) 教授 高木 達也 教授 土井 健史 教授 本田 武司

論 文 内 容 の 要 旨

食品衛生検査における食中毒起因菌の検出・同定には、培養法が一般的に用いられている。本方法では、対象となる食中毒起因菌に応じた適切な培地の使用と培養条件に基づいて培養を行わなければならないため、判定結果が得られるまでに長い時間を要する。一方、ハイブリダイゼーション法や PCR 法などによる遺伝学的検査は、食中毒起因菌を迅速に検出することができる。なかでも、マイクロアレイ法は、試料中に存在する多種多様な細菌の中から食中毒起因菌を網羅的に検出できる可能性を有しており、食品衛生検査への本方法の応用が期待されている。

マイクロアレイ法の有効性は、標的遺伝子の選択および遺伝子プローブの設計に大きく左右されるため、食中毒起因菌の同時検出を目的とした場合、系統解析に用いられる 16S rRNA 遺伝子 (rDNA) を標的遺伝子とすることが好適である。16S rDNA の配列比較により、菌種間の共通配列や菌属・菌種などに固有の配列を得ることができ、これら複数の配列を遺伝子プローブとして固定化したマイクロアレイを用いることにより、種もしくは属レベルでの食中毒起因菌の同時検出が期待できる。

現在、10,000 以上の 16S rRNA 配列が日本 DNA データバンク (DDBJ) や Gen Bank などの遺伝子データベースに登録されており、必要となる細菌の 16S rRNA 配列情報を容易に入手し、利用することができる。16S rRNA はタンパク質の合成に関わる重要な RNA であるため、配列の保存性が高く、系統的に離れた菌種間においてもそれらの配列比較が可能である。また、比較的变化に富む配列領域も存在するため、近縁な菌種間の配列の違いを見出すことも可能である。このように、16S rRNA の配列比較から得られる菌種間の共通配列や菌属・菌種などに固有の配列を遺伝子プローブやプライマーとして用いることにより、系統分類に基づいた食中毒起因菌の検出・同定が可能になる。

本研究では、食中毒起因菌およびその近縁菌の 16S rDNA 配列比較により菌種間の共通配列や菌属・菌種などに固有の配列からなる複数の配列を設計し、マイクロアレイ法、さらにビーズアッセイの遺伝子プローブとして用い、食中毒起因菌の同時検出の簡易・迅速化を図ることを目的とした。

まず、13 種の代表的な食中毒起因菌を含む 64 種の細菌由来の 16S rDNA 配列のマルチプルライメント結果に基づき、食中毒起因菌を同時検出するための 20 種類からなるプローブ候補配列を作成した。作成した遺伝子プローブを固定化したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを作製後、細菌の培養液から抽出した全 RNA を用いたハイブリダイゼーションを行ない、食中毒起因菌由来の 16S rRNA に対する作成した各遺伝子プローブの反応特異性を評価した。作成した遺伝子プローブ配列の FASTA を用いた相同性検索による配列の特異性確認とオリゴヌクレオチドマイクロ

アレイを用いたハイブリダイゼーションによる 16S rRNA との反応特異性の評価結果に基づき、*E. coli*/*Shigella* 属菌、*S. Enteritidis*/*S. Typhimurium*、*Y. enterocolitica*、*B. cereus* 群の同時検出に有効な 5 種の遺伝子プローブを得た。

次に、遺伝子プローブを固定化したオリゴヌクレオチドマイクロアレイの実用性を考えた場合、食材中に存在する多種多様な細菌の影響を受けることなく、対象となる食中毒起因菌が検出できなければならない。そこで、設計した遺伝子プローブを固定化したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを新たに作製し、食材中の食中毒起因菌の同時検出を行なった。これまでに海外では食中毒起因菌が様々な野菜から単離されている。研究にあたっては、その中で代表的なモヤシとレタスを食材として選んだ。*S. Enteritidis*、*Y. enterocolitica*、*B. cereus* をそれぞれ添加した試料を調製し、これらの前培養液から抽出精製した全 RNA を用いてオリゴヌクレオチドマイクロアレイ上で直接ハイブリダイゼーションを行ない、その実用性を確認した、今回新たに作製したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いることにより、多種多様な細菌が混在する食材中からの食中毒起因菌の検出を可能にした。

さらに、遺伝子プローブを用いた食中毒起因菌の検出法としての実用性をさらに向上させるためには、ハイブリダイゼーション以降の操作の簡易・迅速化が必要であると考えた。そこで、オリゴヌクレオチド結合蛍光ビーズとマイクロ流路デバイスの併用により、マイクロアレイ法よりも簡易・迅速な食中毒起因菌検出法の構築を試みた。

マイクロアレイ法の場合、一般的に、マイクロアレイ上で標的遺伝子を含む反応液を攪拌しながらハイブリダイゼーションを行なうことが難しく、反応時間を短縮するには限界がある。一方、遺伝子プローブを固定化するための固相としてビーズを用いた場合、マイクロ遠心チューブ内で反応液を攪拌させながら、標的遺伝子とのハイブリダイゼーションを行なうことができるため、反応時間の短縮が期待できる。

マイクロ流路デバイスは、数 cm 四方のマイクロチップ上に刻まれた幅・深さ数十 μm の微小流路を用いて試料を分析する装置である。通常、標的遺伝子と遺伝子プローブ結合ビーズのハイブリッドの検出には、フローサイトメーターを用いることが多い。マイクロ流路デバイスを用いた場合、(1) 少量スケールで分析できるため、従来のデバイスを用いた場合よりも短時間で完了できる、(2) サンプルと試薬の消費量が少ない、(3) 高い再現性を有する分析が自動的に行なわれるなどの利点を有している。このようなマイクロ流路デバイスを 16S rRNA と遺伝子プローブ結合ビーズのハイブリッドの検出に用いることによって、簡易・迅速化を図ることが可能であると考えた。

遺伝子プローブを結合した蛍光ビーズを用いた場合、ハイブリダイゼーションを 2 時間で完了させることができ、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた場合よりも迅速なハイブリダイゼーションを可能にした。また、16S rRNA とオリゴヌクレオチド結合蛍光ビーズのハイブリッドの検出にマイクロ流路デバイスを用いることにより、RNA 抽出以後 3 時間以内に食中毒起因菌を簡易に検出できる方法を構築することができた。

本研究において、マイクロアレイ法、ビーズアッセイとマイクロ流路デバイスを併用した方法をそれぞれ利用することにより、食中毒起因菌の同時検出を可能にした。特にビーズアッセイとマイクロ流路デバイスを併用した方法の場合、ハイブリダイゼーションからハイブリッドの検出に至るまでの一連操作を簡易・迅速に行なうことができ、食中毒起因菌を検出するための時間と労力を削減できるという大きな利点がある。さらに、複数の遺伝子プローブを検出波長の異なる蛍光ビーズに個々に結合させ、一つの反応容器内でビーズアッセイを行なうことにより、複数の食中毒起因菌を検出することが原理上可能である。本法は食品衛生検査における食中毒起因菌の検出手法として、今後その発展性が期待できる。

論文審査の結果の要旨

食品の安全・安心の確保のためには、その衛生検査が重要である。食中毒起因菌の検出・同定には、培養法が一般的に用いられているが、判定結果が得られるまでに長い時間を要する。一方、ハイブリダイゼーション法や PCR 法など遺伝子を指標とした検査法は、食中毒起因菌を迅速に検出することができる。これらの方法は、複数の遺伝子配列を標的とすることにより、試料中に存在する多種多様な細菌の中から食中毒起因菌を網羅的に検出できる可能性を有していることから、食品衛生検査への応用が期待されている。

本研究は、細菌の 16S rRNA 遺伝子 (rDNA) 配列の比較により複数の食中毒起因菌検出用配列を設計し、マイク

ロアレイ法、さらにビーズアッセイの遺伝子プローブとして用いることにより、食中毒起因菌の同時検出の簡易・迅速化を図ったものである。まず、代表的な食中毒起因菌を含む細菌群の 16S rDNA 配列の比較結果に基づき、食中毒起因菌を同時検出するためのプローブ候補配列を選定した。それらの遺伝子プローブを固定化したオリゴヌクレオチドマイクロアレイを作製し、細菌の全 RNA を用いたハイブリダイゼーションを行ない、設計した各遺伝子プローブの特異性を評価した。次に、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて、食材中の食中毒起因菌の同時検出を行うことにより、その実用性を確認した。さらに、実用性を向上させるために、マイクロ流路デバイスを用いたビーズアッセイ系を構築した。その結果、RNA 抽出後 3 時間以内に食中毒起因菌を検出できることを示した。

本研究は、食品衛生検査における食中毒起因菌の簡易かつ迅速な検出手法として、遺伝子プローブとマイクロビーズアッセイの有用性を示した先駆的な研究であり、その成果は食品の衛生管理の向上に大きく貢献しうることから、博士（薬学）の学位に値するものと判断する。