

Title	遺伝子プローブを用いた水系感染症起因菌の迅速・網羅的モニタリング
Author(s)	一條, 知昭
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/49195
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	いちじょうともあき 一 條 知 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 1 9 6 5 号
学位授与年月日	平成 20 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	遺伝子プローブによる水系感染症起因菌の迅速・網羅的モニタリング
論文審査委員	(主査) 教授 那須 正夫 (副査) 教授 八木 清仁 教授 高木 達也 教授 土井 健史

論 文 内 容 の 要 旨

安全・安心な水を確保することは、人の健康を保証するうえで重要である。しかしながら、途上国では細菌性の水系感染症が頻発し、その対策が求められている。水系感染症のアウトブレイクは起因菌により汚染された水の摂取により発生する。したがって、起因菌の存在を迅速に明らかとすることにより、感染症発生のリスクを低減することが可能となり、アウトブレイクの防止につながる。

従来、水環境中からの水系感染症起因菌の検出には、培養法や PCR 法が広く用いられている。しかしながら、培養法は迅速性や感度が克服すべき課題とされている。また、PCR 法は検出感度で優れている一方、複数の細菌検出を行うには技術的制約が残されている。水系感染症起因菌は多種存在し、水環境中からの検出にあたっては単一菌種のみを標的とするのではなく、複数種の病原細菌の網羅的な検出が必須となる。すなわち、水環境中の病原細菌を迅速かつ網羅的に検出可能な手法が求められている。

本研究では、rRNA 遺伝子を標的とした遺伝子プローブを用い、水環境中の水系感染症起因菌を迅速・網羅的に検出するための検討を行った。rRNA 遺伝子はタンパク合成に必須なハウスキーピング遺伝子である。遺伝子上には、ほぼ全ての細菌間で相同性が見られる保存領域と、近縁属種間で相同性が見られる可変領域が存在する。可変領域を詳細に検討することで細菌の属種を区別することができるため、細菌の系統分類の基礎となる遺伝子として利用されている。

複数の遺伝子プローブをガラス基板上に固定化したオリゴヌクレオチドマイクロアレイ法は、細菌の rRNA 遺伝子上の属や種に特異的な塩基配列を標的とすることにより、複数の属種の細菌を同時に検出することができる手法であり、新たな微生物検出法として環境微生物学分野で期待されている。しかし、検出までに時間を要すること、また検出感度が低いことが解決すべき課題となっている。本研究では、まずオリゴヌクレオチドマイクロアレイ法を用いて、水環境中の細菌を迅速に検出するための系の構築を試みた。

従来のオリゴヌクレオチドマイクロアレイ法の遺伝子増幅過程では、16S rRNA 遺伝子の全長を PCR により増幅する方法が用いられている。本研究では、細菌から抽出した DNA 上の 16S rRNA 遺伝子を増幅する過程において、multiplex PCR と in vitro 転写反応の併用を試みた。16S rRNA 遺伝子上の重複しない 4 つの領域に対し multiplex PCR を行うことにより、16S rRNA 遺伝子の全長を増幅させるとともに、増幅産物を約 300 bp に断片化でき、二次構造の形成を抑制することができる。また、増幅産物の長さが約 300 bp と短いことから、遺伝子増幅に要する時間

を大幅に短縮できる。さらに、マイクロアレイで標的とする核酸を一本鎖 DNA でなく、一本鎖 RNA とすることで熱力学的安定性が向上し、検出感度が上昇する。したがって、これらのことより multiplex PCR により増幅した産物を *in vitro* で RNA に転写し、標的核酸とすることで、迅速化、高感度化が期待できると考えた。その結果、試料調製から結果観察まで大幅な時間短縮を図れたうえ、検出感度を 10 倍改善した。すなわち、multiplex PCR による標的遺伝子の断片化が、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法による迅速かつ高感度な水環境中の細菌検出に有効であることを示した。

次に、12 種類の水系感染症起因菌を網羅的に検出するための遺伝子プローブの設計を行った。世界保健機関の資料より選択した 12 種類の水系感染症起因菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を遺伝子データベースより入手し、それぞれの細菌を特異的に検出可能な遺伝子プローブを *in silico* で設計した。設計した遺伝子プローブをガラススライドに固定化しマイクロアレイを構築したうえで、標準菌株を使用して反応特異性を評価した。このことにより、11 種類の遺伝子プローブのうち、8 種が特異的な検出に使用できることを示した。以上のことから、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法を用いて水系感染症起因菌の迅速かつ高感度、網羅的な検出が可能であると推測した。

さらに、設計したプローブの反応特異性を高めるため、プローブ中の数塩基のヌクレオチドを人工核酸 BNA に置換した BNA/DNA キメラプローブを用いた検討を行った。また、遺伝子プローブを用いた細菌検出の汎用性を高めるため、設計した BNA/DNA キメラプローブをポリスチレン製マイクロスフィアに固定化したビーズアッセイを検討した。熱解離解析法により実験的に求めた熱解離温度をもとに、BNA/DNA キメラプローブの反応特異性を評価した。DNA プローブでは偽陽性を生じた ES プローブの BNA/DNA キメラプローブである ES-b-nh プローブでは、標的とする大腸菌と標的としない細菌のそれぞれから得られる熱解離温度の差は 10°C 以上と大きく、大腸菌のみの特異的検出を可能とした。

最後に、環境試料を用いて BNA/DNA プローブを使用したビーズアッセイの有効性を確認した。その結果、河川水に添加した複数の細菌をオリゴヌクレオチドマイクロアレイ法と同等の感度で検出できることを示した。すなわち、BNA/DNA キメラプローブを使用したビーズアッセイを用いることで、水環境中の複数の水系感染症起因菌の迅速かつ特異的な検出を可能とした。

本研究では、遺伝子プローブを使用して、迅速かつ高感度・網羅的な水系感染症起因菌の検出を可能とした。また、ビーズアッセイが水環境中の水系感染症起因菌の検出に応用可能であった。ビーズアッセイはアレイスキャナーのような特殊な検出装置を必要とせず、蛍光顕微鏡やマイクロプレートリーダー、フローサイトメーターなどの既存の検出装置を使用することができるため汎用性が高く、普及が容易となる。すなわち本法を普及させ、水系感染症起因菌の迅速・網羅的モニタリングに使用することにより、感染症発生のリスクの迅速な評価が可能となり、水系感染症アウトブレイクの防止に寄与できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

安全・安心な水を確保することは、人の健康を保証するうえで重要である。水系感染症発生の第一段階は起因菌による水環境汚染である。したがって、迅速に起因菌の存在を明らかとすることにより、感染症発生のリスクを低減することが可能となり、アウトブレイクの防止につながる。さらに、水系感染症起因菌は多種存在し、水環境中からの検出にあたっては、単一菌種のみを標的とするのではなく、複数種の病原細菌を網羅的に検出することも必須となる。そのために、培養に依存せず、水環境中の細菌を迅速かつ高感度、網羅的に検出可能な手法が必要とされている。

本研究は、複数の 16S rRNA 遺伝子を標的とした遺伝子プローブを用い、水環境中の水系感染症起因菌を迅速・網羅的に検出するための検討を行ったものである。まず、複数の属種の細菌を同時に検出することができるオリゴヌクレオチドマイクロアレイ法を選択し、水環境中の病原細菌の迅速かつ高感度な検出を試みた。標的とする 16S rRNA 遺伝子の増幅法を検討することにより、従来法と比較して迅速、高感度化を可能とした。次に、12 種類の水系感染症起因菌を網羅的に検出するための DNA プローブの設計を行い、標準菌株を用いてその反応特異性を評価した。その結果、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法が水環境中の病原細菌の網羅的検出に有効であることを示した。

さらに設計した遺伝子プローブの特異性を向上させるため、人工核酸 BNA を導入した遺伝子プローブ (BNA/DNA キメラプローブ) を用いた検討を行った。また遺伝子プローブを用いた細菌検出の汎用性を高めるため、プローブを微小粒子に固定化したビーズアッセイを作製した。この結果、DNA プローブでは特異的な検出ができなかった細菌種の検出が可能となった。また、河川水に添加した複数の水系感染症起因菌を同時に検出することができ、本手法が水環境中の病原細菌のモニタリングに応用できることを示した。

本研究は遺伝子プローブを用いて迅速かつ高感度、特異的、網羅的な水系感染症起因菌の検出を可能とし、さらにビーズアッセイにより汎用性を高めている。本手法を水系感染症起因菌のモニタリングに使用することにより感染症発生のリスクを低減し、水系感染症対策に寄与しうることから、本論文は博士 (薬学) の学位に値するものと判断する。