

遺伝子パターンニング化技術を応用した微生物の遺伝子レベルでの品質管理及び安定供給に資する迅速スクリーニング用基盤データベースの作成と基幹検索ソフトウェアの開発研究



円岡瞳 (1)



赤坂真理子 (2)

岡本真由美 (3)

柴田浩臣 (4)

藤城圭輔 (5)

(1),(3),(4) ヤマト科学チーム (2),(5) NITE

< 背景 >

産業界においては、その活動の様々な現場で、微生物の判別・同定検査が行われている。例えばそれは製薬会社や食品会社における品質管理のためであったり、河川・湖沼の環境汚染調査のためであったりと目的は様々であり、それらの目的に対して数多くの微生物判別・同定法が考案され、利用されている。しかし、それらの既存の手法で判別・同定できる微生物は限定されている場合が多く、また、その精度も必ずしも高くない。一方、微生物研究で多く用いられている16S rRNA遺伝子配列による系統分類手法は、多様なニーズに応えることができるものの、迅速性、簡便性やコストなどの面から、産業活動における様々な微生物検査に利用することは困難である。これらの理由から、従来法に代わる微生物の判別・同定法の開発が望まれていた。

< 共同研究の目的 >

機器メーカーであるヤマト科学株式会社は、日本のベンチャー企業である株式会社アドジーン(現G&Gサイエンス株式会社)において開発された遺伝子パターンニング化技術(ジェノパターン法)という遺伝子解析手法を用いて微生物を判別・同定する解析装置を開発したが、実用化にあたっては、多種多様な微生物に適用できるかの検証、ジェノパターン法の解析原理の分子メカニズムの実証、さらには解析精度を明らかにするための検証が必要であった。

そこで我々は、上記の問題を解決するため、NITEが保有する多種多様な微生物を用いて、ジェノパターン法を利用した微生物の判別・同定手法を確立させるとともに、実用化のためのデータベースを構築することを目的とした共同研究事業を、平成16年10月より開始した。

< 成果 >

我々は、以下に述べるように、本事業の中でジェノパターン法の原理や判別能力、解析精度を検証した。

<ジェノパターン法の原理>

当初より、ジェノパターン法の原理については仮説が提唱されていたが、その実験的根拠は十分ではなかった。そこで我々は、微生物のジェノパターン産物を用いて様々な検証を行い、その原理の一端を明らかにした。

ジェノパターン法は、DNA増幅反応と蛍光強度測定との2つのステップで構成される方法である。

まず、微生物から抽出したDNAを特定のプライマーを用いて *in vitro* で増幅させる。プライマーは、検体となるDNA上の複数の配列とアニーリングし、複数領域のDNAが増幅される。その結果得られた増幅産物は、DNA上の様々な領域の配列を含む様々な長さのDNA断片の混合物で構成され、その構成は検体となるDNAの配列ごとに異なる。

次に、DNA断片の二本鎖部分に取り込まれて蛍光を発する物質(インターカレータ)を用いて蛍光強度測定を行う。

DNAは温度を上昇させると二本鎖が解離して一本鎖になる性質があること

ことから、増幅産物の温度を上昇させていくと、産物中のDNA断片が徐々に解離し、蛍光が消光するにつれ蛍光強度が減少していく。

この蛍光強度の減少曲線を微分すると、急激な蛍光の減少が起こる温度がピークとして示される波形が得られる。この波形は、増幅産物を構成するDNA断片の違いによって様々なパターンを形成することから、このパターンによって、検体となるDNAの違いを確認することができる。

以上の増幅反応から蛍光強度測定までの一連の作業を自動化し、さらに波形パターンの違いを解析できるソフトウェアをパッケージ化したシステムが、ヤマト科学株式会社製のジェノパターン法波形解析装置GP1000であり、本共同研究における検証については、本装置を用いて行った。

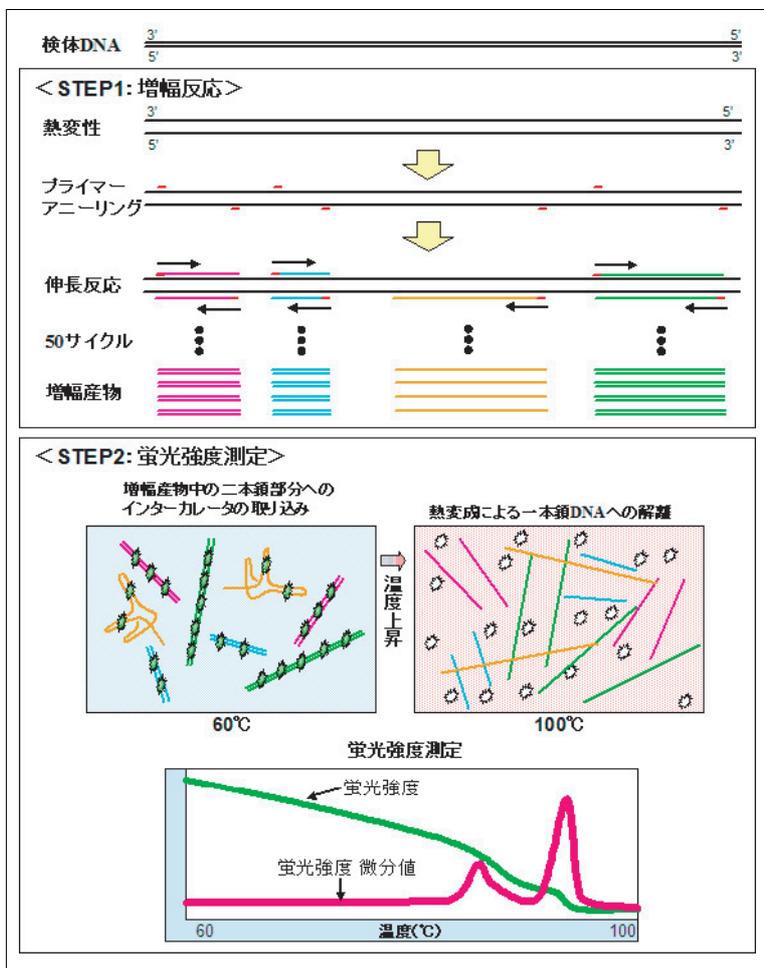


図1. ジェノパターン法の原理



<細菌群についての判別能力>

NITE保有微生物の中から、系統的に多様な分類群を持つ *Flexibacter* 属、市場ニーズの高い *Bacillus* 属及び *Staphylococcus* 属の菌株約150株を選定し、ジェノパターン法を用いて波形を取得し、属、種、株レベルでの判別能力を確認した。

図2は *Flexibacter* 属の波形の一部である。16SrRNA遺伝子配列による系統樹と比較すると、種や種内の系統関係の遠近に関わらず株ごとに異なる波形が得られていることが判った。

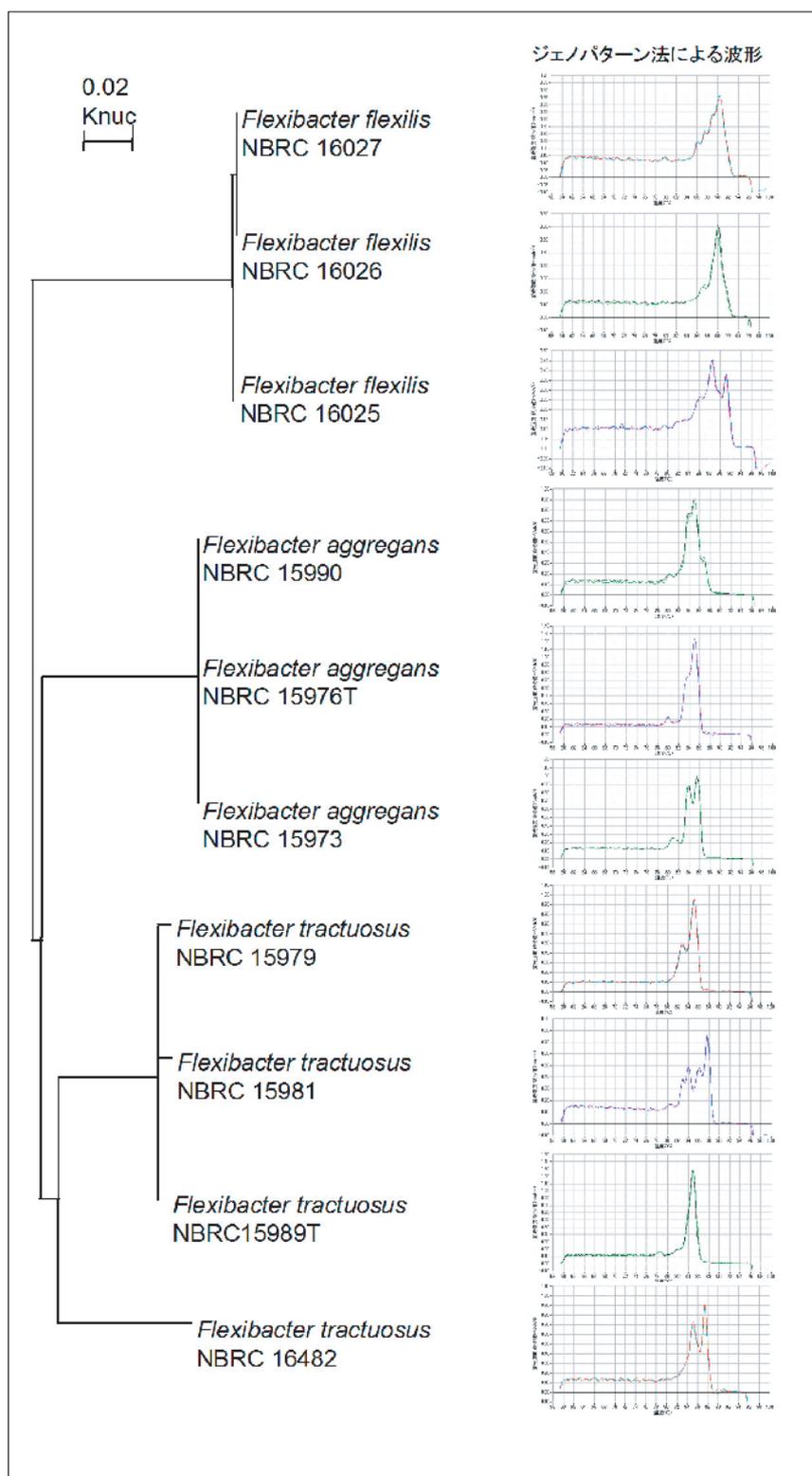
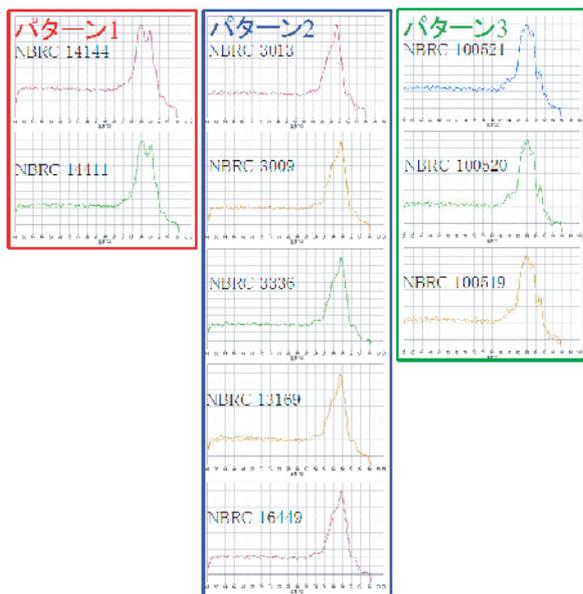


図2. *Flexibacter* 属細菌の16S rRNA遺伝子配列に基づく系統樹及びジェノパターン法による波形

また、図3は *Bacillus subtilis* subsp.*subtilis* 亜種に属する系統的に近縁な株(16SrRNA遺伝子配列99%以上) 相同の波形及び波形解析ソフトウェアによる解析結果の一部である。波形パターンは目視によってほぼ3つのグループに分けられ、波形解析ソフトウェアによる解析でもほぼ同様の3つのグループに分けられた。このことから、亜種内の近縁な株については、異なる株で同一の波形が得られる場合もあることが判った。



		マスターデータ									
		14144	14411	3013	3009	3336	13169	16449	100521	100520	100519
検体	14144-1	95.4	94.5	62.0	55.7	62.8	58.6	64.4	58.5	57.0	56.3
	14144-2	97.7	90.4	67.6	57.7	61.6	62.1	61.1	66.7	60.4	64.0
	14411-1	89.6	97.3	60.6	56.5	59.3	60.7	63.3	56.5	59.5	59.2
	14411-2	86.1	97.3	57.8	58.6	61.6	61.9	70.0	44.9	48.1	50.7
	3013-1	50.9	56.9	97.2	84.3	81.2	89.5	75.3	53.6	49.4	53.5
	3013-2	49.7	55.6	97.2	87.4	82.4	84.2	77.5	53.6	49.4	54.9
	3009-1	57.5	63.0	90.1	96.9	93.8	93.1	92.2	46.4	43.0	47.9
	3009-2	57.5	61.6	91.6	99.0	95.5	93.1	93.3	46.4	43.0	47.9
	3336-1	56.1	60.3	94.4	95.9	95.5	95.4	93.3	44.9	41.8	46.5
	3336-2	53.8	60.3	93.1	95.9	98.6	94.2	91.1	43.5	41.8	45.1
	13169-1	52.9	61.6	93.0	87.6	90.7	95.4	95.6	44.9	46.8	47.9
	13169-2	56.3	60.3	90.1	97.6	90.0	97.7	96.7	43.5	41.8	45.1
	16449-1	56.3	64.4	89.0	86.6	91.9	90.8	94.4	42.0	40.5	46.5
	16449-2	60.9	68.5	88.7	91.8	93.0	90.6	95.6	46.4	43.0	47.9
	100521-1	61.4	59.7	63.4	36.1	38.8	39.2	36.0	97.1	100.0	95.0
	100521-2	61.4	54.2	62.0	39.3	40.0	40.4	37.1	97.1	91.1	95.0
100520-1	62.6	54.2	59.2	36.1	37.7	42.7	34.8	91.3	97.5	87.3	
100520-2	59.1	59.7	50.7	36.1	40.0	39.2	37.1	84.1	93.7	83.1	
100519-1	54.4	56.9	60.6	40.3	42.4	45.0	39.2	94.2	88.8	95.8	
100519-2	57.9	56.9	54.9	36.2	38.8	41.5	34.9	90.4	90.6	91.6	

図3. *Bacillus subtilis* subsp.*subtilis* 亜種の波形及びソフトウェア解析結果

< 波形再現性 >

ジェノパターン法は、波形によって判別を行う手法であることから、同一菌株については、常に同一の波形が得られる必要がある(再現性の確保)。しかし、15の異なる属の菌株を用いて検証を行ったところ、再現性が得られない場合があることが判明した。そこで我々は、再現性に影響を及ぼす因子を明らかにするとともに、再現性確保のための対策の検討を行った。

再現性に影響を及ぼすことが明らかになった主な因子は、使用する機器の誤差や、培養条件、DNA抽出法、プライマー配列、検体DNAのGC含量、および人為的誤差であった。そして、これらが個別であるいは複合して波形の再現性を損なうことが判明した。そこで我々は、それぞれの因子がどのように再現性に影響を与えるのかについての傾向を明らかにし、再現性を確保するための対策を検討した。

まず、機器の誤差については定期的なキャリブレーションやメンテナンス体制の構築により問題を解消できることを明らかにするとともに、培養条件の違いや人為的誤差の影響を最小限に抑えるDNA抽出法を確立した。また、検体DNAのGC含量あるいは他の様々な因子による影響についても、反応液の組成や反応条件により改善できることを明らかにした。現在、最適な条件設定について検討を進めており、プライマー配列についても、その規則性およびプライマーを選定するための指標の設定について検討を行っているところである。

<まとめ>

ジェノパターン法は、亜種よりも詳細なレベルで菌群を判別できる技術であり、16SrRNA遺伝子配列による判別よりも判別能力が高いことから、ある株が特定の株と同一あるいは分類学的に非常に近縁であるかを見極めるのに適している。

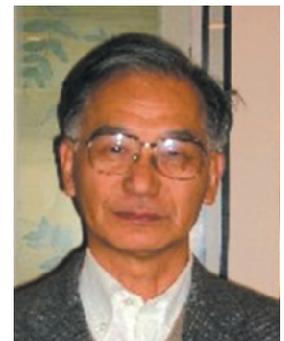
ジェノパターン法と同程度の判別能力を持つであろうものとして、Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法が挙げられる。ゲノム情報が存在しない菌群についても、特定のプライマー群からプライマーを選択するのみで解析を行うことが可能である点で両者は共通しているが、簡便性についてはジェノパターン法の方がはるかに優れている。更に、RAPD法の場合、そのゲル電気泳動の結果を数値化し過去のデータと比較することは困難であるが、波形パターンは数値データであることから蓄積が容易であり、過去のデータとの比較が容易に行えること等のメリットがある。

ジェノパターン法は、熟練や知見がなくとも、誰もが簡単な操作で解析を行うことができることや、解析時間が3時間弱と、高い判別能力に対して比較的短時間で結果が得られる方法であることから、企業の生産ラインにおけるルーチン的な品質管理や、微生物が混入した場合の汚染経路の特定、あるいは研究所などにおける微生物のコンタミネーションチェック等の品質管理等に利用できると考えている。

また、ジェノパターン法は、微生物のみならず、遺伝子を有するあらゆる生物に活用できる可能性があることから、利用対象がさらに拡大することも想定される。

本共同研究事業においては、既にジェノパターン法の有用性・優位性を示すことに成功しているが、微生物の同定手法としてより確実な技術に仕上げるため、本年9月のプロジェクト終了までにさらなる検討を進める予定である。

ジェノパターン法の分子的メカニズムについては、更なる解析を実施中である。これについてはG&Gサイエンス株式会社 池田日出男先生他の研究者の方々よりアドバイスをいただいている。



池田 日出男
薬学博士、基盤技術研究所 所長
G & Gサイエンス株式会社