

rDNAの配列を利用した微生物の同定法

食品工業試験場

近年、従来のような専門的な知識と経験を必要とせずに、rDNA(リボゾーマルDNA)の配列を遺伝子解析装置(DNAシーケンサー)により解析し、インターネットを通じてデータベースを検索、比較することにより、迅速かつ容易に微生物の属種を同定することが可能になりました。ここではその概要を紹介します。

背景

近年、食品の安全性への関心が非常に高まっていますが、食品製造において品質管理上、微生物制御はごく基本的な概念です。当场には、食品等の微生物汚染について相談を持ち込まれることがあり、中には汚染微生物がどのようなものなのか、その種類を分類・同定して欲しいという依頼もあります。

従来、微生物の属種同定は、形態観察、培養試験、生化学試験等によって行われており、高度かつ専門的な知識と経験が必要なため、同定機関でないとい非常に難しく、しかも多大な時間を要する作業でした。

近年、従来のような専門的な知識と経験を必要とせずに、迅速かつ容易に微生物を同定する方法として、rDNA(リボゾーマルDNA)の配列を解析し、インターネット上でデータベースを検索、比較することが普及しはじめています。

rDNAの構造

細胞内にはリボゾームという構成成分があり、遺伝情報をもとにタンパク質を合成しています。リボゾームはタンパク質とRNAから構成され、大きさの異なる複数の構成単位(原核生物は5S、16S、23S、真核生物は5S、5.8S、18S、28S; Sは沈降速度の単位)の集合体です。各構成単位のRNAに相当する鋳型DNAがrDNAですが、リボゾームはタンパク質合成という生命に関わる基本的かつ重要な働きをしているため、あらゆる生物においてrDNAの配列は非常に類似しています。図1に真核生物のrDNAの構造を示しますが、このように構成単位に対応するrDNAが直鎖状に断続的に連なり、一連の配列を一組として何回も繰り返す構造です。18Sと5.8S、5.8Sと28Sの間にはそれぞれ介在配列ITS1、ITS2があり、これらの配列は生物の属種によって保存性が高いため、比較することにより、属種の分類・同定に利用できます。

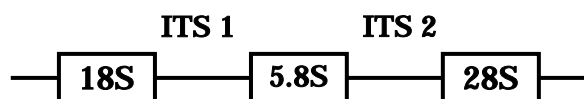


図1 真核生物のrDNAの構造

同定の手順

目的とする微生物が単一かつ大量に生育しており、楊枝や綿棒などで採取可能な場合は良いのですが、そうでなければ、抗生物質等を加えた適当な培地で微生物を培養することにより、単一のコロニーとして単離、増殖させます。次に細胞溶解液を調整するか、染色体DNAを抽出します。これを鋳型に用い、介在配列を含むrDNAの一部の配列をプライマーとして、PCRによりプライマー間のDNAを増幅します。増幅DNAを精製後、遺伝子解析装置によりrDNAの配列を読み取ります。インターネットを通してNCBI(米国バイオテクノロジー情報センター)等のデータベースを検索し、得られた配列データとの相同性を比較することにより、微生物を同定します。

現在、当场には、本同定法に必要な遺伝子増幅装置や遺伝子解析装置が導入され、試薬等も揃っていますので、原理的には本法による同定が可能です。ただし、真核生物用プライマーのみ保有していますので、真核生物のみ対応が可能です。実際、製品に付着した異物として、企業からカビや酵母の同定を相談され、実施した実績があります¹⁾。

本法は、迅速かつ容易なことから大変有意義な方法ですが、まだ公定法としては認められていません。また、厳密に分類・同定する場合は、信頼性の点から従来する方法と本方法を併せて判断する必要があると考えられます。

食品工業試験場 生物工学部 戸井田仁一
TEL 026-227-3131 FAX 026-227-3130
E-mail toida-jinichi@pref.nagano.jp

(参考文献)

1) 蟻川ら :平成15年度研究発表会テキスト, p1-2

(用語説明)

rDNA(リボゾーマルDNA) : 細胞内のリボゾームに存在するRNAの鋳型DNA

PCR : DNA合成酵素により連鎖的に起こるDNAの増幅反応

プライマー : PCRの開始点となるDNA