

DNA シーケンサーを用いた微生物の菌種同定

キーワード：DNA シーケンサー、微生物、菌種同定

はじめに

種々の製品あるいはその製造工程での異物（微生物）の発生は、生産管理上、大きな問題です。そのため、原因となる微生物の単離及び菌種同定は、異物混入の原因究明に必要不可欠です。従来、微生物の同定方法は、微生物の形態観察や生理・生化学性状解析等を組み合わせる方法が広く用いられてきましたが、この方法は、専門的な知識や経験が必要な上、多大な時間が必要でした。また、表現形質による微生物同定用キットも市販されていますが、微生物の種類によっては同定できない場合があります。

DNA シーケンサーを用いた菌種同定

近年、遺伝子解析技術の進展により、微生物分類学において、リボゾーム RNA (rRNA) の塩基配列をもとに、系統発生的に区分する手法が採用されています。従って、DNA の塩基配列を読み取る装置 (DNA シーケンサー) を用いて、微生物の rRNA 等の特定領域の塩基配列を自動解析し、データベースと照合することにより、微生物の菌種を迅速に同定ないし推定することが可能です。

DNA シーケンサーの仕様

当所では、微生物の同定等を目的とし、新規に DNA シーケンサー (ベックマン・コールター(株)製、GenomeLab GeXP) を導入しました (図 1)。主な仕様は以下の通りです。

- ・分離方法：キャピラリー方式
- ・レーザー：半導体レーザー
- ・データ解析能力：700 塩基/100 分
- ・シーケンス解析：4 色蛍光検出、8 サンプル同時解析



図 1 DNA シーケンサー

(ベックマン・コールター(株)製、GenomeLab GeXP)

実施例

微生物が原因と考えられる異物の発生から、原因微生物の同定までの流れを図 2 に示します。

具体的には、異物混入したサンプルから、微生物の分離培養を行い、原因となる微生物を単離します。微生物を単離しただけでは、DNA シーケンサーで解析するための DNA 量が不足しますので、分離した菌の DNA を鋳型として、細菌の場合では、16S rRNA の前半部分 (約 800 塩基)、真菌の場合には、18S rRNA と 5.8S rRNA 間のスペーサー領域 (約 150～470 塩基) の DNA 断片を Polymerase Chain Reaction (PCR) を行うことで、増幅生成させます。

次に、得られた増幅産物の確認、精製及び定量を行った後、DNA シーケンサー及びそのプログラムに合った標識試薬を用いて、増幅産物を標識します。このサンプルを用いて、DNA シーケンサーで自動的に塩基配列を読み取ります (図 3)。

最後に、得られた塩基配列をデータベースと照合することにより、菌種の同定を行います。

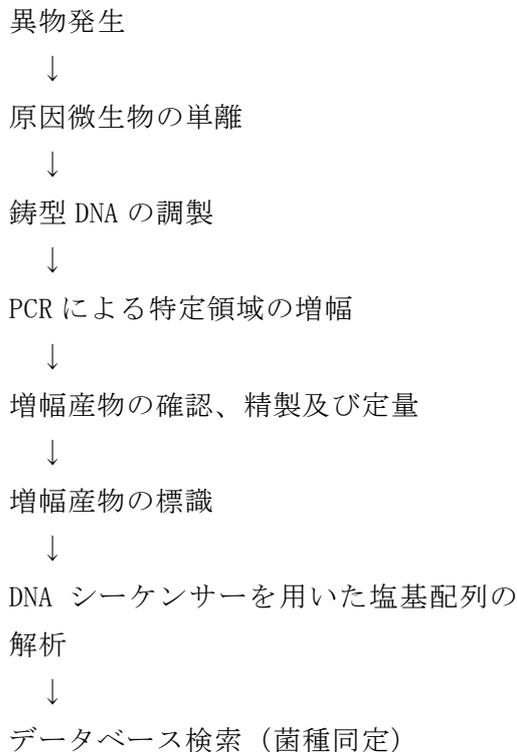


図2 微生物の同定手順

実際に、単離した微生物について、DNA シーケンサーを用いて塩基配列を決定し、相同

性解析を行った結果を表1に示します。この結果から、*Pseudomonas aeruginosa* と相同性が 99% と高く、本分離株は、*Pseudomonas aeruginosa* と同一種あるいは近縁種であると推定できました。

表1 16S rRNA 領域の相同性解析

菌種	一致率 (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	95
<i>Pseudomonas putida</i>	94
<i>Pseudomonas entomophila</i>	94

まとめ

本稿で示した様に、DNA シーケンサーを用いた塩基配列解析による微生物の菌種同定は、微生物の単離後、PCR を用いた特定領域の増幅反応等の前処理が必要となりますが、従来の生理・生化学性状解析による同定法に比べて、短時間で迅速に同定が可能となります。当所では、微生物が原因となる異物の分離培養から、その原因微生物の菌種同定まで対応可能ですので、ぜひご利用ください。

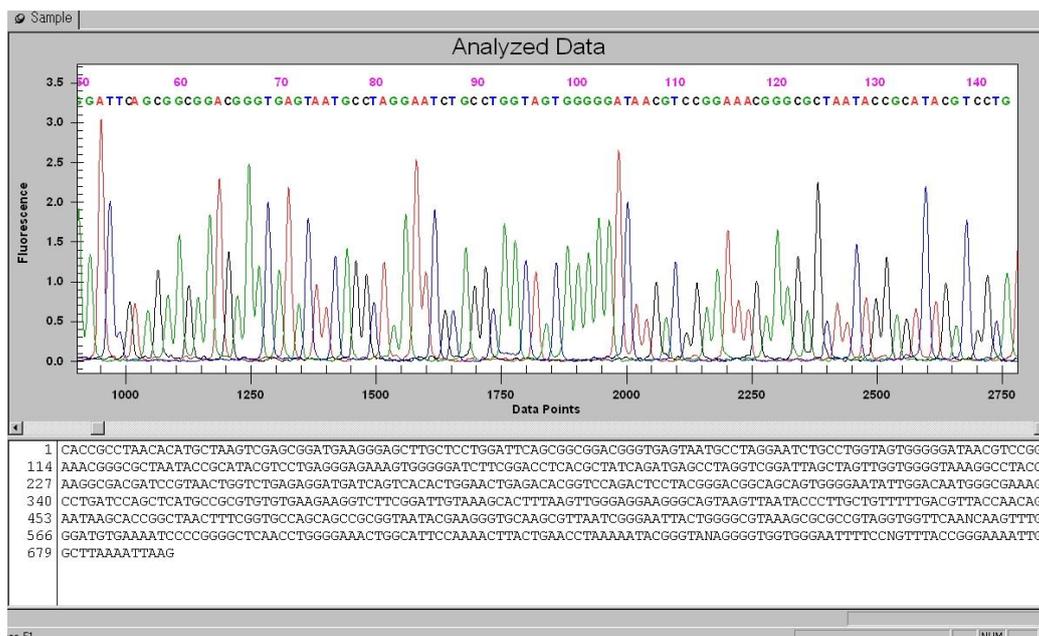


図3 波形データ及び解析塩基配列