

gyrB 遺伝子発現量よりもとめた環境中における細菌の増殖速度

こばやし たけし たに かっじ やまぐち のぶやす なす まさお
 ○小林 剛, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫

大阪大学大学院 薬学研究科 遺伝情報解析学分野 (衛生化学)

【目的】 環境中における特定細菌種の現存量に加え, その増殖速度を正確に知ることが出来れば, 群集内でのその重要性, 役割についてのより詳細な知見を得ることが可能となる。*gyrB* 遺伝子は細菌種同定の指標遺伝子の一つであり, また, DNA 複製に必須であることから, その発現は細胞周期と密接に関連して調節されていると考えられ, 環境中の特定細菌の増殖速度を知るための優れた指標となることが期待できる。本研究においては, *gyrB* 遺伝子の発現量 (mRNA コピー数) から増殖速度を知るために, その発現量と *Escherichia coli* の増殖速度との関係を調べた。

【材料と方法】 *E. coli* の *gyrB* 遺伝子およびその mRNA コピー数の定量に当たっては, LightCycler (Roche)を用い, 定量的 PCR および定量的 RT-PCR を行った。今回新たに *E. coli* および *Shigella* 属細菌種に特異的なプライマーおよびプローブをデザインした。プライマー, プローブの特異性は, GenBank に登録された *gyrB* 遺伝子配列との比較, ならびに近縁種である *Salmonella* 属の 2 菌種を用いた定量的 PCR により確認した。定量のための検量線の作成においては, *gyrB* 遺伝子の定量には *E. coli* K12 のゲノム DNA, その mRNA の定量には *E. coli gyrB* クローンの *in vitro* 転写産物を用いた。*E. coli* 増殖速度と *gyrB* 発現量の関係を調べるに当たっては, *E. coli* K12 W3110 株を用い, Luria-Bertani (LB) 培地または M9 培地 (0.5 % glucose) で 17 - 37°C で培養を行い, log phase, late log phase, および stationary phase において菌体を回収した。核酸の抽出には QIAGEN RNA/DNA System Midi Kit (QIAGEN)を用いた。

【結果と考察】 今回デザインしたプライマーおよびプローブにより, GenBank に *gyrB* 遺伝子の配列が登録された株の内, 98%以上の *E. coli* および *Shigella* 属細菌株を特異的に捉えることが出来ることを確認した。また PCR 1 反応あたり 5 - 5x10⁷ コピーの範囲で定量が可能であった。このことから複数の細菌種が混在する環境試料においても, これらのプライマー, プローブを用いて解析が可能である。*E. coli* の growth phase と *gyrB* 遺伝子発現量の関係を調べた結果, LB 培地で 37°C で培養したところ, log phase, late log phase, ならびに stationary phase における *gyrB* 遺伝子 1 コピーあたりの mRNA コピー数は, それぞれ 0.87±0.91, 0.005±0.001, < 10⁶ であり, growth phase により明らかな差異が認められ, その発現が細菌増殖の指標となることが分かった。また, 異なる増殖速度での発現量を調べた結果, 1 細胞あたりの mRNA コピー数は増殖速度との間に高い正の相関が認められることが分かり, *gyrB* 遺伝子の発現量から環境中における細菌の増殖速度を知ることを可能とした。

連絡先: 那須正夫 (nasu@phs.osaka-u.ac.jp)