

A-14

16S-23S rDNA スペーサー領域のハイブリダイゼーションによる
グラム陽性細菌菌種の識別

かわにしひろかず ひさだたかよし おかむらけいこ ひらいし あきら
 ○河西啓量・久田貴義・岡村恵子・平石 明
 豊橋技術科学大学 エコロジー工学系

【目的】現在、細菌の近縁種間識別のための最終手段として DNA-DNA 交雑形成法が用いられているが、この手法は試験操作が煩雑であり、時間を要すること、十分な精製 DNA を取得するために比較的大量の培養を行わなければならないこと、また、必ずしも高い再現性を得られるとは限らないこと、といった問題点を含んでいる。そこで、本研究では、DNA-DNA 交雑形成法に代替する手法の確立を目的として、従来よく研究されている 16S-23S rDNA スペーサー領域 (ITS:16S-23S rDNA internal transcribed spacer) に着目した。これまでの我々の研究によって、光合成細菌において DNA-DNA 交雑形成法の結果と、PCR 増幅 ITS 領域を用いた ITS-ITS 交雑形成法の結果が高い相関性を持つことが示された¹⁾。そこで本研究では、ITS 領域を利用した微生物分類の有用性をさらに検証することを目的として、グラム陽性菌を対象として実験を行った。

【方法】分類目的で ITS 領域が全ゲノム構造を反映できるかどうかを確認するため、現段階で全ゲノム配列が決定している細菌 85 菌株の ITS 情報をデータベースから入手した。1 ゲノム上の全 ITS 領域の G+C 含量とゲノム DNA のそれとを比較し、相関分析を行った。DNA 交雑形成実験には *Lactobacillus* 8 菌株を含む低 G+C グラム陽性細菌を用いた。全ゲノム DNA は常法により抽出精製し、ITS は PCR 増幅したのものをを用いた。交雑形成実験は、耐熱性アルカリフォスファターゼ標識プローブおよびナイロンメンブラン固定の標的 DNA を交雑させるドッド・プロット法で行い、検出には化学発光を用いた。

【結果・考察】ITS 領域の G+C 含量とゲノム DNA の G+C 含量の比較では、全体として ITS 領域の G+C 含量が全ゲノムの G+C 含量より若干低いものの、両者の間には高い相関性が確認された ($R^2=0.7776$)。一方、例外的に超高熱性菌種では全ゲノムに対する ITS 領域の G+C 含量の比は、中温性菌種よりも高かった。これらの結果は、少なくとも G+C 含量の点からは ITS 領域は全ゲノム構造をある程度反映できる可能性が示唆された。ITS-ITS 交雑形成法においては、DNA-DNA 交雑形成法と同様に、標的 DNA とプローブ DNA が近縁であるほど強い発光シグナルを検出したことから、ITS-ITS 交雑形成法は DNA-DNA 交雑形成法に代替し得る手法である可能性が示された。

1) 岡村、平石：第 23 回日本微生物系統分類研究会講演要旨集，p. 18 (2003)
kawanishi@bio.eco.tut.ac.jp (発表者)