

バクテリオファージの宿主域評価

○岡野弘典^{1,2}、井町寛之²、朴明玉³、大橋晶良¹、渡辺一哉⁴

¹長岡技大・工、²海洋研究開発機構、³富士レビオ、⁴海洋バイオ

Host Range Detection of Bacteriophages

Hironori Okano¹, Hiroyuki Imachi², Myong-Ok Park³, Akiyoshi Ohashi¹ and Kazuya Watanabe⁴

¹Nagaoka Univ. of Tech., ²JAMSTEC, ³FUJIREBIO Inc. and ⁴Marine Biotech. Inst.

Key words: bacteriophage, host range

【目的】バクテリオファージ宿主域評価に用いられている一般的手法はプラークテスト法である。しかし、この手法は純粋培養済みの微生物にのみ適用可能であること（環境中の99%の微生物は純粋培養できていないと考えられている）や溶菌を伴わない感染に対しては適用が困難であるなどの欠点を持っている。このため、従来法では宿主域を実際より狭く評価してしている可能性が高いと考えられる。そこで我々はプラークテスト法を補う手法としてファージの蛍光標識やFISH (fluorescence in situ hybridization) 法等を併用した培養法に依存しない新規な宿主域評価法の開発・適用を試みた。

【方法】提案する新規宿主域決定技術の概要は以下の通りである。(1) 核酸染色済みファージを微生物サンプルに投入・感染させ宿主微生物のみを蛍光標識する。(2) FACS (fluorescence activated cell sorting) 技術により、ファージが感染し蛍光を発する微生物細胞を特異的に回収する。(3) 回収された微生物細胞からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を決定することで、どのような種類の微生物がファージの感染を受けたのかを決定する。(4) クロスチェックとして、回収されてきた微生物細胞の16S rRNAに特異的なDNAプローブをデザインし、先の核酸染色ファージ標識技術と16S rRNAを標的としたFISH法による宿主微生物を2重染色する。

【結果および考察】本手法の開発における最初の試みとして、大腸菌とT4ファージをモデルとして核酸染色済みファージとFISH法を併用した微生物の2重染色による検出が可能かどうかをチェックした。この実験においてファージの核酸染色にはSYBR GoldおよびDAPI、FISH用DNAプローブは細菌を特異的に検出可能なEUB338を用いた。我々は核酸染色済みT4ファージを利用して大腸菌を特異的に検出可能であることを確認した。しかしながらFISH法における固定処理およびハイブリダイゼーションなどの過程で菌体から核酸染色剤が漏出し、特異性が失われたり（宿主以外の微生物が非特異的に蛍光標識されてしまう）、輝度が低下するなどの問題が発生した。しかしながらFISH法適用後、DNAプローブ由来の蛍光は明確に観察された。このことは、ファージが感染した溶菌直前の菌体に対してFISH法が適用可能であることおよび16S rRNAが相当量保存されている事を示唆している。現在、ファージの標識方法の変更やFISH法の改善によって本手法の開発を進めている。

岡野弘典 OKANO Hironori : okanoh@jamstec.go.jp