

芽胞形成細菌に特異的に結合する RNAアプタマー

工学部 エコロジー工学系
教授 菊池 洋

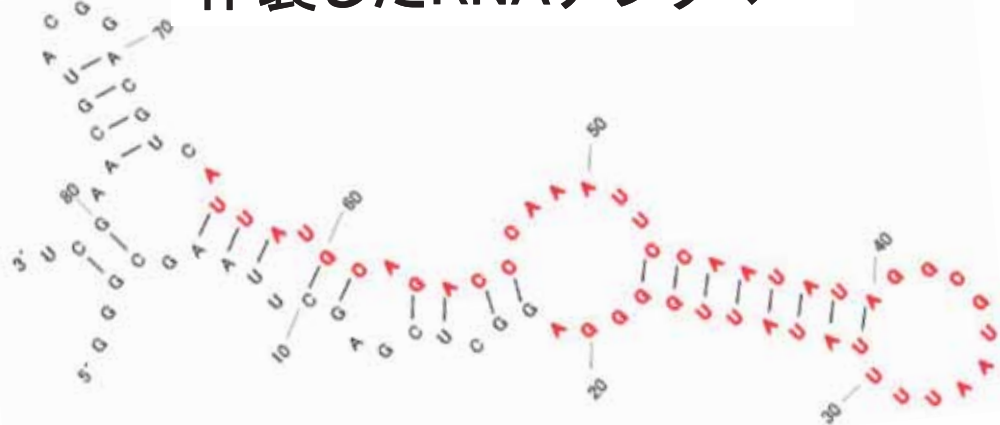
新技術の概要

乳飲料製造の原料(牛乳)中に混入し滅菌困難な芽胞を生成する好熱性細菌を検出するプローブ(RNAアプタマー)を作製した。



蛍光標識

作製したRNAアプタマー



顕微鏡観察

芽胞形成菌検出
迅速な検出

Geobacillus stearothermophilus

芽胞を形成する中等度好熱菌（至適温度55～60℃）

- ・環境、栄養条件が悪化すると芽胞を形成
 - ・物理的、化学的刺激に対して強い抵抗性
 - ・生物活性が見られない



条件が好転すると再び増殖（発芽）



牛乳に存在

乳製品などへの混入が問題

問題

通常の滅菌処理 (120°C、2~3秒)



滅菌不可能 → 製品 → 発芽・増殖 (50~55°C)

- ・滅菌は非常に困難
- ・検出に時間がかかる

迅速な検出法が必要

目的



食品業界全体の課題



広い範囲への応用

RNAアプタマー

- ・標的となる物質に**特異的に結合するRNA**

SELEXによって創製

ランダムな配列を持つRNA集団から標的への
結合能のあるRNAを選択する方法

- ・細菌に対するRNAアプタマー取得の報告は無い



芽胞の迅速、容易な検出は、食品業界全体の課題



広い範囲への応用

RNAアプタマーとは

- 標的分子に特異的に結合する能力を持つRNA
- SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)によって得られる
- 微量な分子を捉えることができる
- 大量合成が容易



抗体を凌駕する利用価値、高まるニーズ

例: pegaptanib, (PEG 化)抗VEGF (vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子)アプタマー, 加齢黄斑変性症治療薬

- 食品・医薬製造過程での原材料等の中の芽胞形成菌汚染の検出。
- さらに改良をすることにより、これらの菌の除去に利用できる可能性もある。
- また、除去が可能になれば芽胞形成病原菌の治療薬そのものとして利用することも考えられる。

- 利用者・対象

食品、特に乳飲料製造メーカーの加工工場、研究所等

医薬品製造メーカー

好熱菌芽胞については、無作為サンプリングによる培養法で検出可能と思われるが、検出には数日かかり、実用的ではなく、実際に行われていないものと思われる。

簡便に素早く検出できるプローブが望まれておりそのプローブとしてアプタマーを提案したい。

新技術の基となる研究成果・技術

G. stearothermophilus

栄養細胞



芽胞形成開始



特異的遺伝子発現

芽胞

母細胞

芽胞完成



母細胞崩壊



芽胞

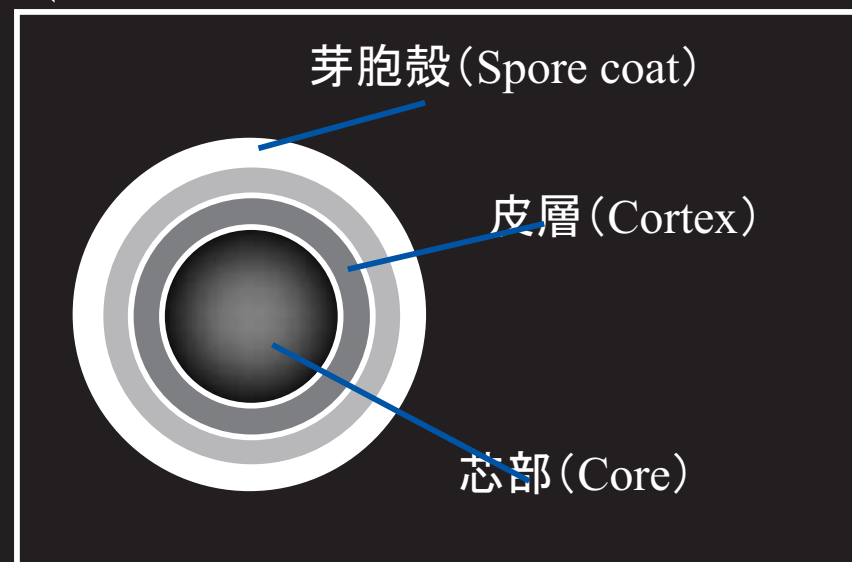
母細胞

標的



芽胞

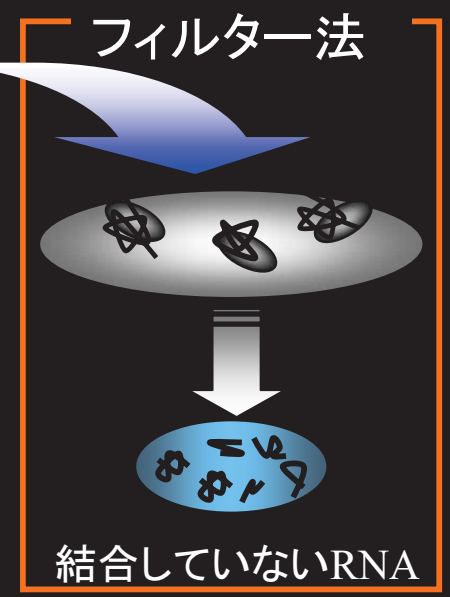
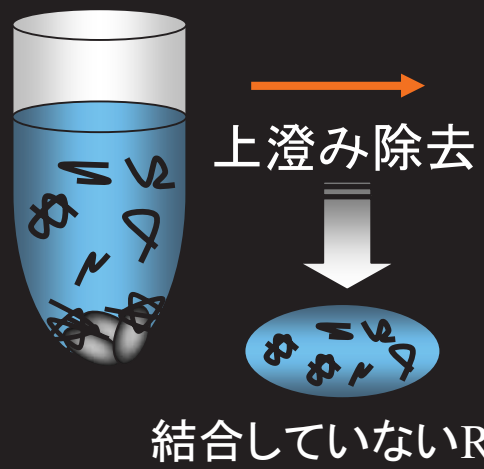
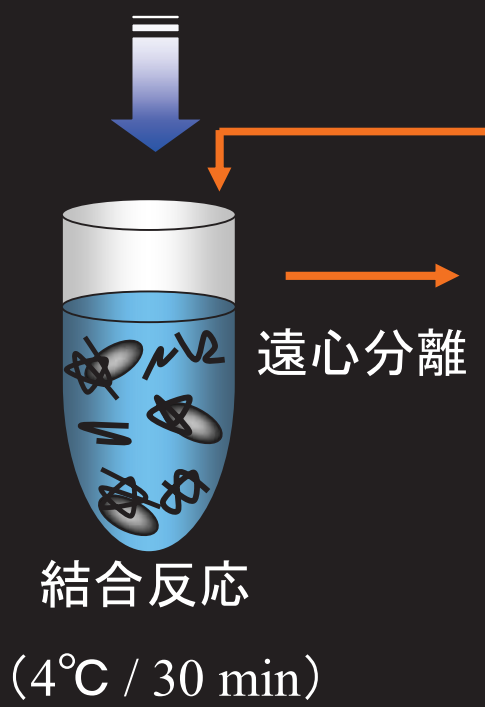
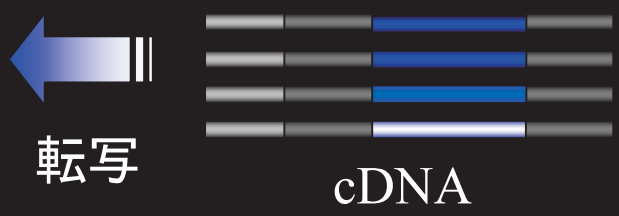
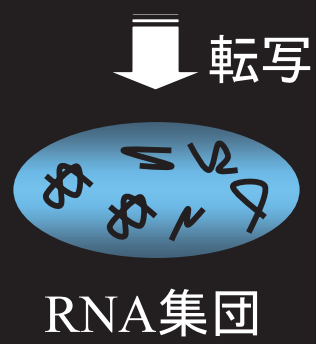
10 μm



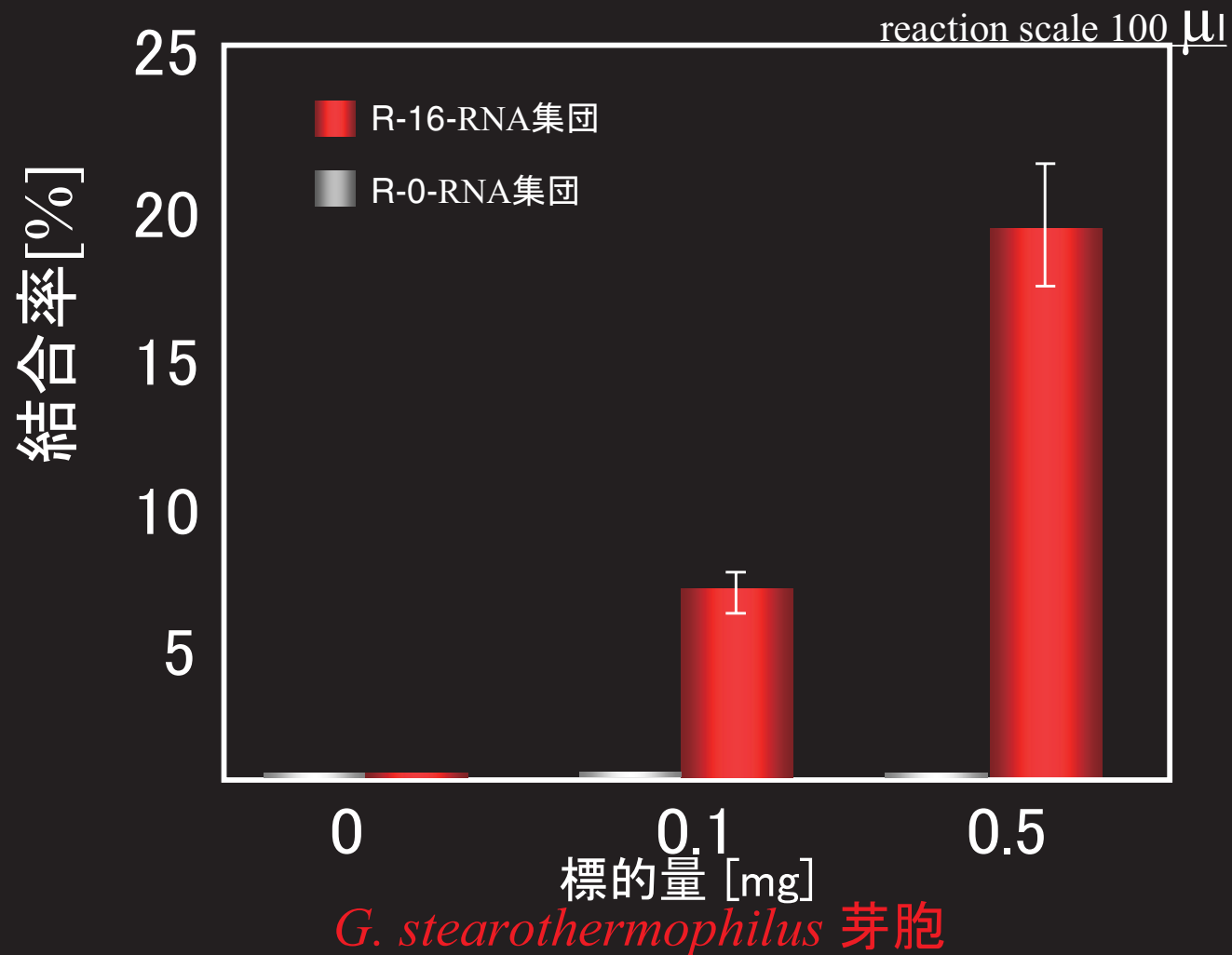
芽胞殻 (Spore coat)

皮層 (Cortex)

芯部 (Core)



結合能評価



G. stearothermophilus 芽胞に対して約20%の結合率を示した

SELEX、結合能評価

G. stearothermophilus 芽胞に結合するRNA集団を取得



クローニング

RNAを単離、それぞれのクローンの結合能を評価



塩基配列決定

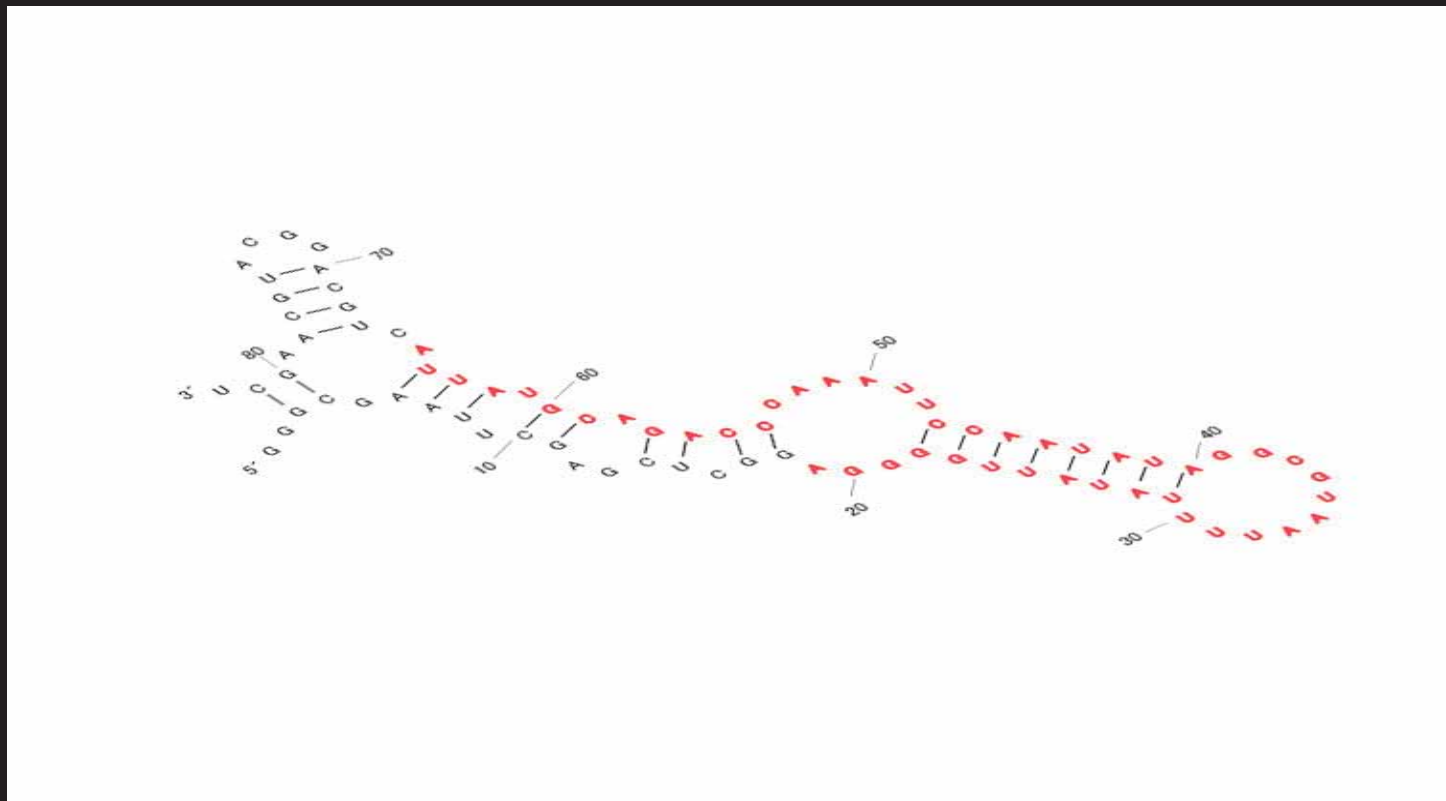
塩基配列決定 (G.st-1)

5' GGGCGAAUUCGAGCUCGG

GGGGUUAUACUUUAAUGCGGAUAUAACCUUAAACCCAGACGUAUUA

CUGCAGGCAUGCAAGCU 3'

太字：ランダム配列由来領域 細字：固定配列由来領域



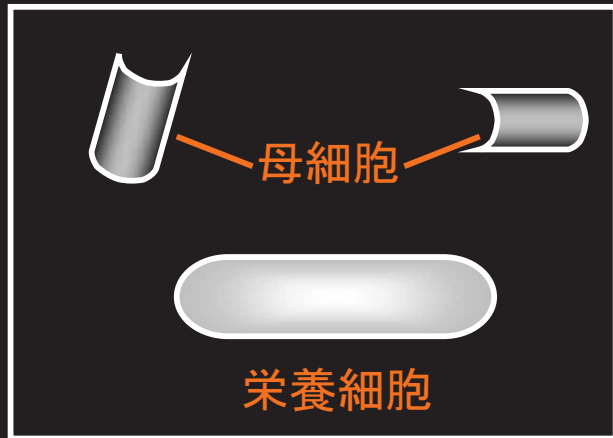
G.st-1の結合能評価

G. stearothermophilus

芽胞発芽

標的

芽胞形成前



G.st-1
結合能評価



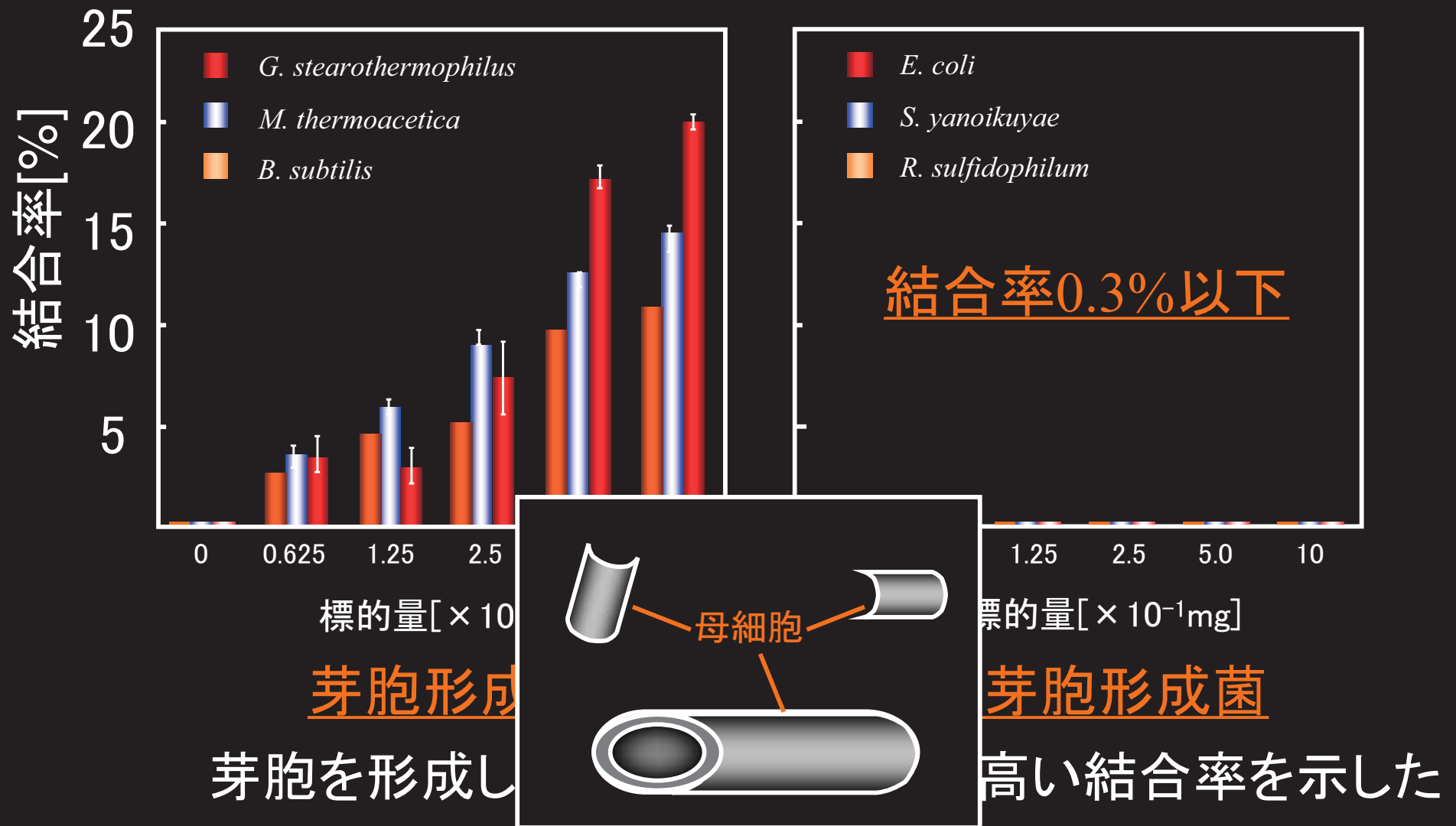
結合能を示す

全く結合しない

芽胞への結合ではない

栄養細胞への結合ではない

G.st-1の結合能評価



芽胞形成に関わる何らかの膜タンパク質への結合

G.st-1の蛍光標識

蛍光標識G.st-1(F-labeled-G.st-1)

5'末端を Fluorescein により蛍光標識

蛍光波長 520 nm ... 緑色の蛍光



結合反応

F-labeled-G.st-1
+
標的

フィルター処理

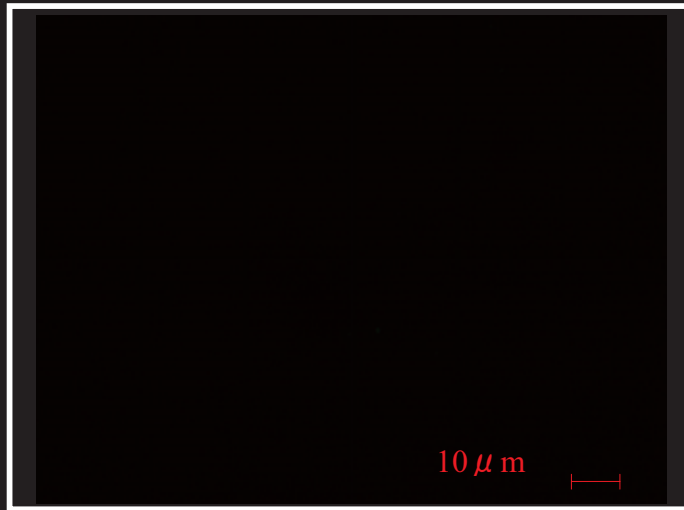


吸引濾過

結合していないG.st-1



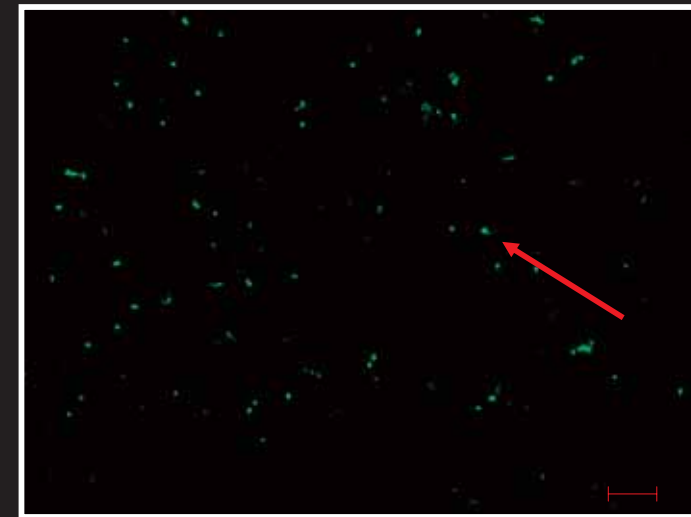
顕微鏡写真



F-labeled-R-0-RNA 集団

非芽胞形成菌

蛍光は観察されない



F-labeled-G.st-1
+
芽胞形成菌

蛍光が観察される

顕微鏡で 芽胞形成菌を検出

結合条件について



混合溶液中でも結合能を保持しなければ実用化は難しい

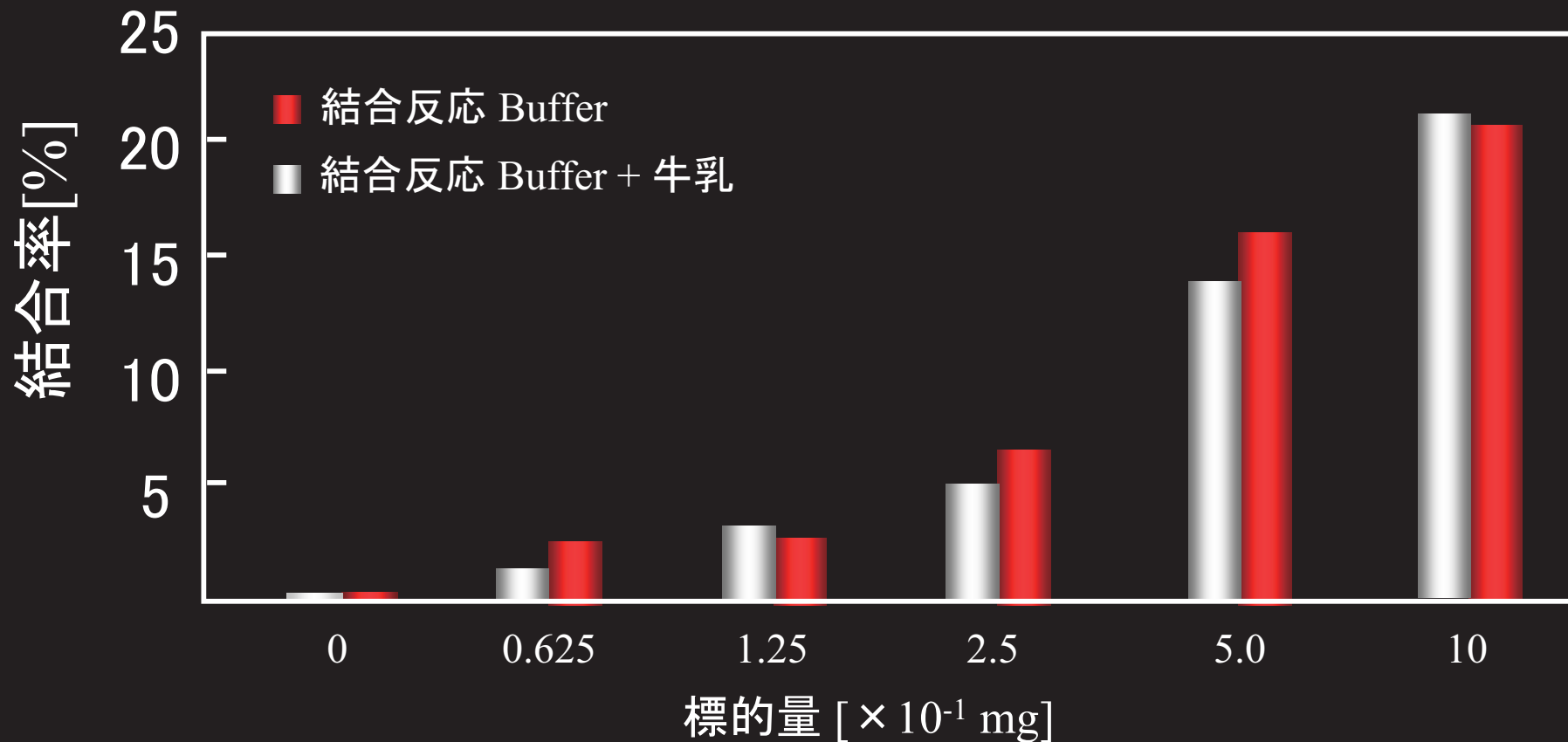
結合反応Buffer
+
牛乳を混合

タンパク質	17 μ g/ml
炭水化物	25 μ g/ml
脂質	20 μ g/ml
ビタミン	1 μ g/ml
金属イオン	2 μ g/ml

結合能評価

結合反応 scale 100 μ l

G.st-1の結合能評価



結合反応 Buffer } 同程度の結合能を示した
結合反応 Buffer + 牛乳 }



タンパク質や糖質などが多量に存在

アプタマーとしての機能を保持

- 従来世の中にまったくなかった技術を開発した。
- 従来は好熱菌芽胞の完全滅菌および瞬時の検出は、実際上不可能なため、諦められており、ある確率で酸敗した製品の出現が見られた。
- 本技術の適用により、リアルタイムでの好熱菌芽胞等の検出が期待される。

- 現在、このアプタマー結合について牛乳等実際の不純物があっても検出が可能なところまで開発済み。しかし、実際の手順として現場で適用可能かは未解決。
- 食品業界で使うには核酸プローブはコストが膨大であり、現実的ではない。
- 提案者らは、一方で、人工RNAの発酵生産法を開発しており、**大幅なコストダウンは将来的に可能。**

- 未解決の実際上の問題、現場での手順や自動化へのシステム開発など。
- 核酸生産の低コスト化に興味を持つ食品、製薬系企業との共同研究。
- また、当研究室は着実な核酸研究の研究室として国際的にも学界で広く信頼を得ているため、核酸ドラッグなどに興味を持つ、製薬企業との共同研究も可能である。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 芽胞形成菌に特異的に結合するRNAアプタマー
- 出願番号 : 特願2007-207318
- 出願人 : 国立大学法人豊橋技術科学大学
- 発明者 : 菊池 洋、田中 照通、梅影 創

お問い合わせ先 : (株)豊橋キャンパスイノベーション(とよはしTLO)

Phone: 0532 - 44 - 6975

FAX: 0532 - 44 - 6980

Mail: ttlo-iten@kktci.co.jp

担当: 科学技術コーディネータ 白川正知

