

新規分類・定量化法による 食品・環境試料の 簡便な微生物性検査

福岡工業大学・工学部・生命環境科学科

教授 渡邊 克二

従来技術と問題点

(塩基配列決定による類縁性検索)

```
aacctggtgatcctgccagtagcatatgcttgtctcaaagattaagccatgcatgtctaagtataagcaacttgactgtgaaactgcgaatggctcattaaatcagttatcgttatttgatagtagtaccttactaca  
tggatacctgtggaattctagagctaatacatgctaaaaaccccgacttcaggaaggggtgtattattagataaaaaaccaacgcccttcggggctccttggtgaatcataataacttaacgaatcgcatg  
gccttgcgccggcgatgggtcattcaaatttctgccctatcaacttctgatgtaggatagggcctaccatgggtggcaacgggtaacggggaattagggttcgattccggagagggagcctgagaaacgg  
ctaccacatccaaggaaggcagcaggcgcaaaattacccaatcccgatcggggaggtagtgaca//
```

特徴

一字ずつ文字が一致するか
検索



問題点

長い配列ほど、データ取得・データ処理に時間・労力がかかる。

複数の配列が上書きされた
状態は解読不能



遺伝子が混ざった状態ではデータ取得不可。

tgatcgatcctaccagtag
tagttgatactccaatag
tgatcgatcctgtcagaag



tgatcgatcctaccagtag

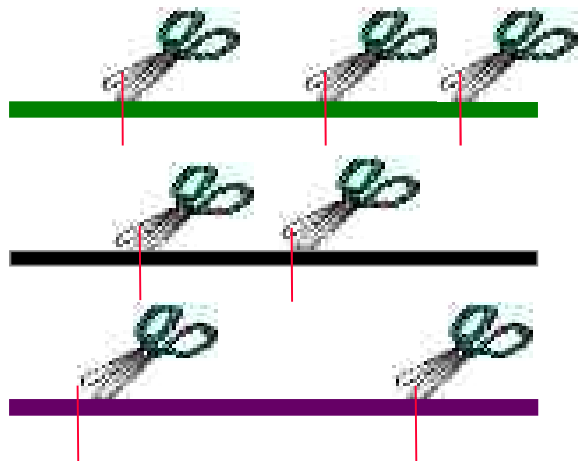
新技術の紹介-1-

(制限酵素断片長による類縁性検索)

特徴

文章を句読点で区切った文節数、文字数(数値情報)に直して類似性検索

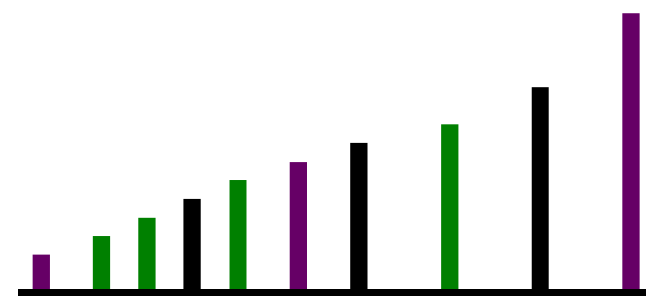
複数の配列が上書きされた状態でも解読可能



利点

配列が長くなっても要する時間・労力は増えない。

遺伝子が混ざった状態でもデータ取得可



純粹分離やクローニングせずに微生物が同定可能

新技術の特徴・従来技術との比較-1-

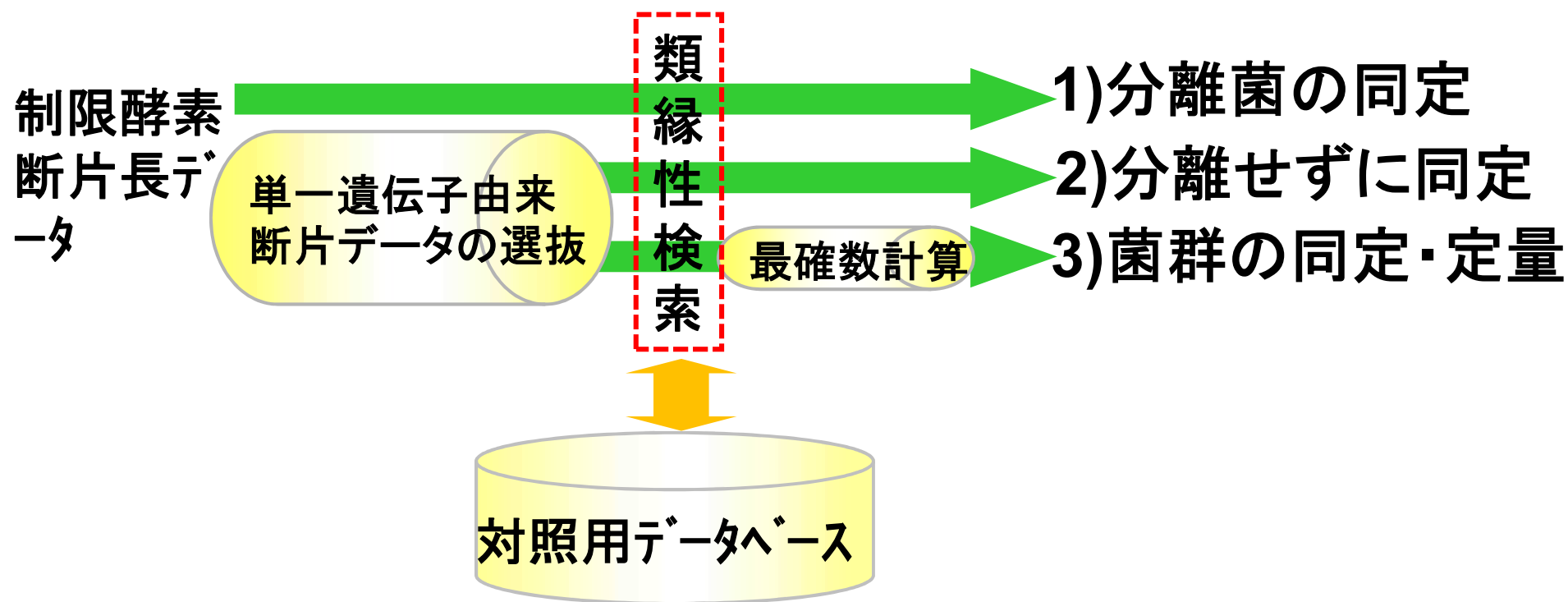
(微生物解析方法として何ができるか)

	塩基配列決定法	制限酵素断片長
微生物の同定法としての利用	純粋分離または遺伝子クローニングが必須	純粋分離または遺伝子クローニングが不要
菌叢解析法としての利用	1)DGGEで個々の遺伝子を分離後解析 2)パイロシーケンス法で網羅的に数万の配列を決定	直接解析可能
定量法としての利用	定量法として利用不可	MPN法で個々の菌群の同定・定量が可能

新技術の特徴・従来技術との比較-2-

(微生物解析方法としてどこが違うか)

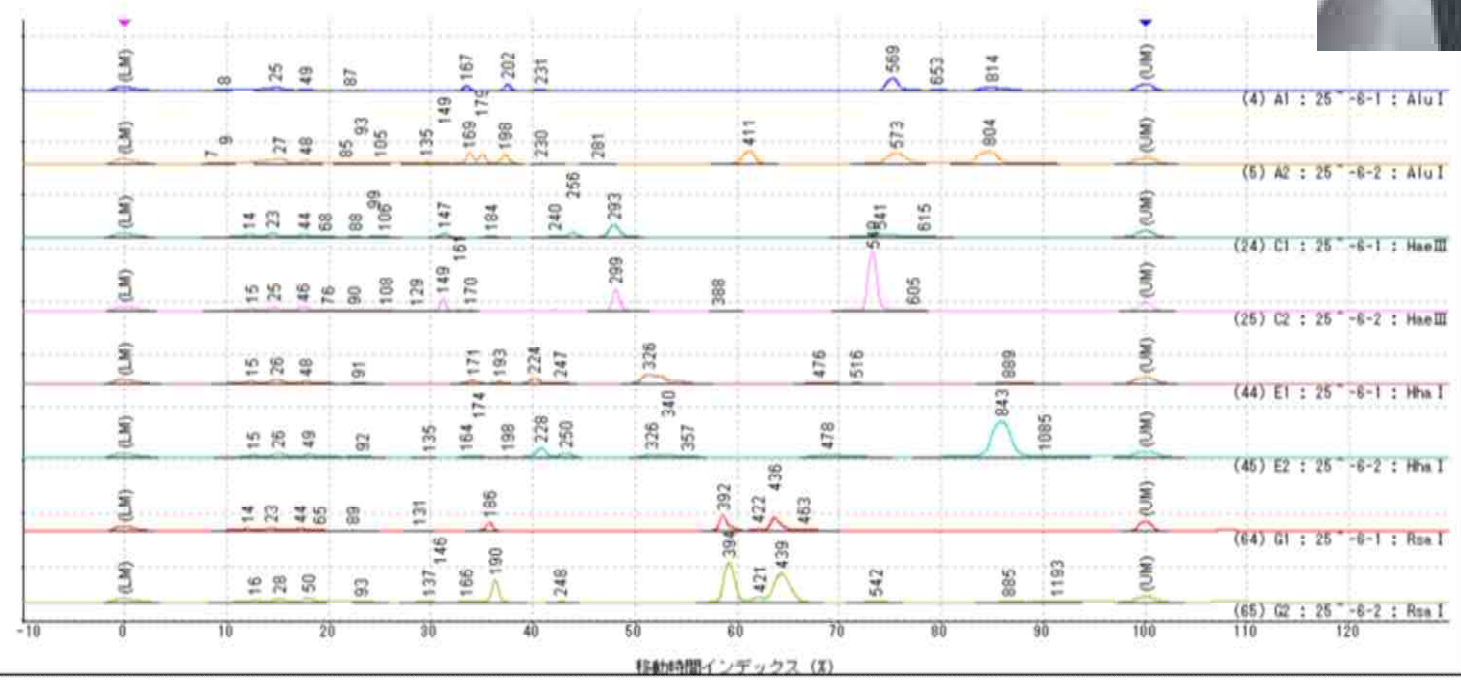
塩基配列決定法	目的に応じて様々な機器・方法を用いる。
制限酵素断片長	同一機器・方法を様々な用途に使用。



新技術の特徴・従来技術との比較-3- (制限酵素断片長データの取得)

全自動電気泳動装置
MCE-202 MultiNA((株)島津製作所)

最大108サンプルまで全自動分析
マイクロチップを繰り返し再利用



切断長と切断片面積データの取得が簡単・迅速・低価格で可能

新技術の特徴・従来技術との比較-4-

(対照用データベースの作成)

制限酵素データベース

Restriction Enzyme	Recognition Site	Cleavage Site
BamHI	GATC	GATC
EcoRI	GAATTC	GAATTC
KpnI	GACCTG	GACCTG
XbaI	CTCGAG	CTCGAG
HindIII	AAGCTT	AAGCTT
PstI	CTGCAG	CTGCAG
SmaI	CCCGGG	CCCGGG
TaqI	TCGA	TCGA
XhoI	CTCGAG	CTCGAG
SacI	TGACCA	TGACCA
HpaI	GTGA	GTGA
HhaI	GTGA	GTGA
EcoRV	ATCGAT	ATCGAT
PvuII	CAGCTG	CAGCTG
XbaI	CTCGAG	CTCGAG
PstI	CTGCAG	CTGCAG
SmaI	CCCGGG	CCCGGG
TaqI	TCGA	TCGA
XhoI	CTCGAG	CTCGAG
SacI	TGACCA	TGACCA
HpaI	GTGA	GTGA
HhaI	GTGA	GTGA
EcoRV	ATCGAT	ATCGAT
PvuII	CAGCTG	CAGCTG

遺伝子の類縁性検索方法及び類縁性検索システム
(渡邊・奥田：国内特許第3431135号、米国特許第7006924号)

プライマーデータベース

プライマー名	上流プライマー配列	下流プライマー配列
41f・1066r	gctcagattgaacgctggcg	acatttcacaacacgagctg
8F・1541R	agagtttgatcctggctcag	aaggaggtgatccagccga
FD1・RD1	agagtttgatcctggctca	aaggaggtgatccagcc

塩基配列公開データベース

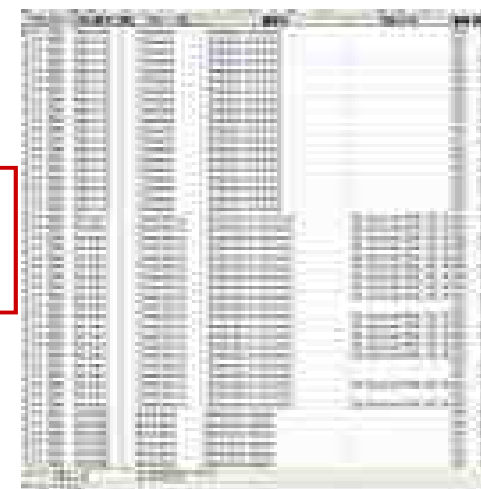


測定条件
に合わせて
編集



数値デー
タに変換

対照用データベース



(汎用性が高い)
目的に応じ様々な使い道がある

想定される用途-1.環境・医療・厚生分野-

環境・公衆衛生

○排水処理施設(好気性活性汚泥法、生物膜法、嫌気性排水処理法)の効率的運用のための微生物叢診断指標

(従属栄養微生物群、脱窒菌群、種々嫌気性細菌群、培養不能菌群の同定・定量法として確認済み)

○河川、湖水、水道水、海水等の衛生管理指標

(大腸菌群を含む従属栄養微生物群集構造の同定・定量法として確認済み)

医療分野

○抗生物質多剤耐性菌の院内・院外環境への拡散状況調査

(抗生物質多剤耐性菌群集の網羅的同定・定量法として確認済み)

卒業論文、修士論文のテーマ課題として確認

- 1) 渡邊克二、堀西直人、松本邦成. *Advances in Microbiology* **5**、p.807-816 (2015)
- 2) 渡邊克二、堀西直人、松本邦成、田中章浩、薬師堂謙一. *Advances in Microbiology*. **5**、No. 1 3、p.832-841(2015).
- 3) 堀西直人、松本邦成、渡邊克二. *Advances in Microbiology*. **6**、No. 2、p.88-97 (2016)
- 4) 渡邊克二、堀西直人、松本邦成、田中章浩、薬師堂謙一. *Advances in Microbiology*. **6**、No.3.p.133-151(2016)

想定される用途-2.食品分野-

食品製造

- 発酵食品(味噌、日本酒、漬物、ヨーグルト等)の製造工程管理
- 発酵食品(味噌、漬物、ヨーグルト等)の微生物成分の表示方法
(麴菌、酵母等真核微生物群集、乳酸菌、*Bacillus*属細菌等の同定・定量法として確認済み)

食品衛生管理

- 飲料、牛乳、生鮮食品、加工食品等の品質管理指標
(流通食品や飲料に含有される食中毒菌を含む種々の微生物群集の同定・定量法として確認済み)

卒業論文、修士論文のテーマ課題として確認

- 1) 松本邦成、嶋田航矢、堀西直人、渡邊克二. *Food and Nutrition Sciences*. 7、No.3、p.163-172 (2016).
- 2) 渡邊克二、堀西直人、松本邦成、曾我部有司. *Food and Nutrition Sciences*. 7、No.4、p.345-354 (2016)

実用化に向けた課題-1-

(操作方法の簡略化 ① DNA調整方法)

これまでの方法

1) 試料

2) 希釈系列の作成
x10⁻¹希釈

x10⁻²希釈

x10⁻³希釈

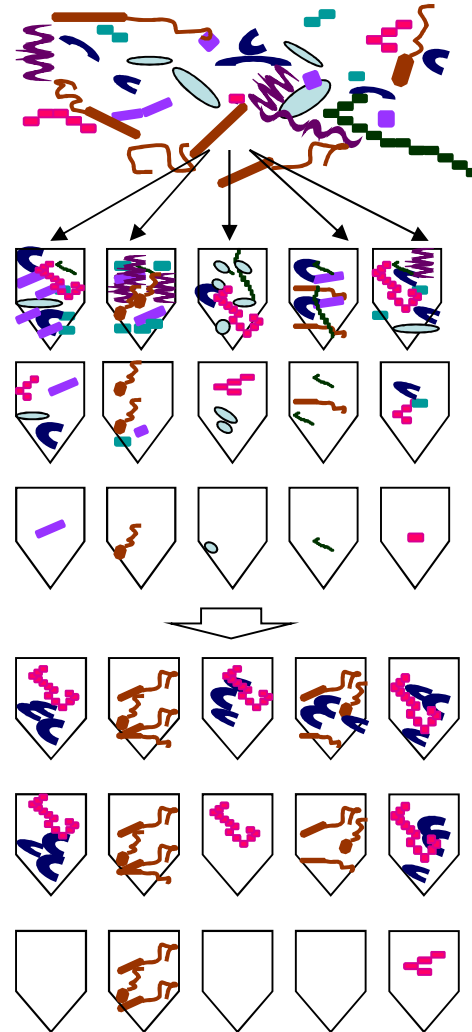
3) 選択培地による培養

x10⁻¹希釈

x10⁻²希釈

x10⁻³希釈

4) DNAの抽出・精製



様々な培養液を用いる
ことで様々な微生物が
解析できる

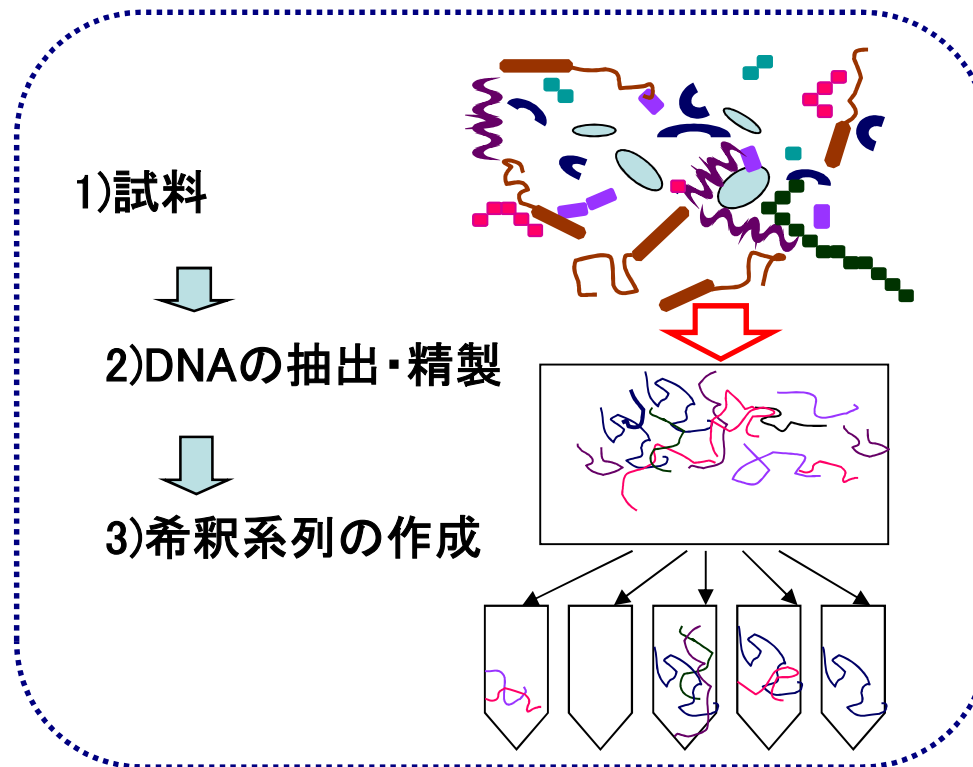
- (1) 抗生物質多剤耐性菌群
- (2) 一般細菌群
- (3) 食中毒菌等有害微生物
- (4) 乳酸菌等の有用微生物
- (5) 硫酸還元菌等の嫌気性微生物
- (6) カビ・酵母等真核微生物
- (7) 脱窒菌

煩雑で時間と労力がかかる

実用化に向けた課題-1-

(操作方法の簡略化 ① DNA調整方法)

- 培養せずに試料からDNAを直接抽出・精製する
- 培養液からDNAを抽出せず直接PCR反応を行う
(アンプダイレクトを用いた直接PCRの検討)



迅速化・簡略化
が可能

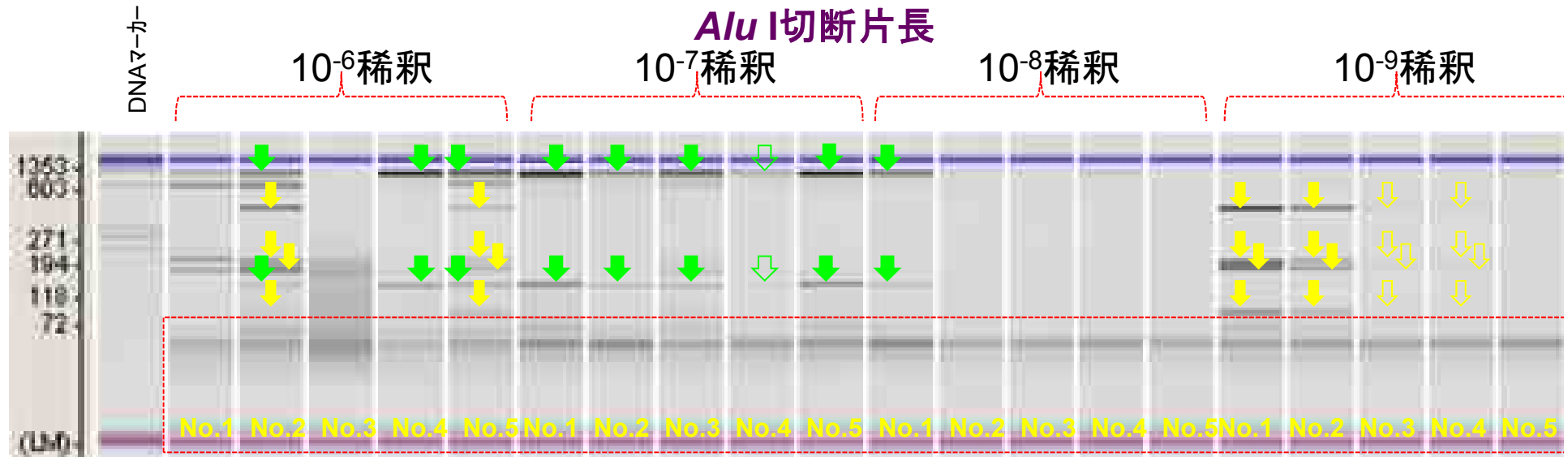


解析精度の低下を招くため改善が必要

2017年度からの科研費に応募中

実用化に向けた課題-1-

(操作方法の簡略化 ② 類縁性検索方法)



現行システム

別個に切断長選抜と類縁性検索を行う。

共通の断片(同一微生物由来)が含まれる

余分な計算処理、
実測値データの選抜ミス
の頻度増加



試料の全希釈段階に含
まれる全切断片から、切
断片データを逐次的に選
抜してゆく方法の開発

2017年度からの科研費に応募中

実用化に向けた課題-2- 解析結果の検証

これまでも結果の検証は行ってきたが、このような同定・定量法はこれまでに実用化例がないため、指標として用いるにはより高精度な検証が必要となる。

- 同定・定量結果の変性剤密度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法及びリアルタイム定量PCR法による検証
- 同定・定量結果の網羅的遺伝子解析方法(次世代型シーケンサー)及びリアルタイム定量PCR法による検証

2017年度からの科研費に応募中

企業への期待

- この同定・定量法は世界的に実用化例がなく汎用性が高い方法で、環境・医療・厚生、食品等の様々な分野で利用できる。
- 現在応募中の科研費が採択されれば実用化に向けた課題は解決するが、採択されない場合は共同でJSTの予算(ステージII;シーズ育成マッチングファンド)に応募できる企業との共同研究を希望する。
- 微生物や遺伝子の依頼分析業務を行っている企業が利用することで、顧客の様々なニーズに応じることができると望ましい。
- 応募中の科研費が採択されれば、この方法を利用希望の企業との共同研究も可能になる。

本技術に関する知的財産権

特許1

1) 発明の名称	遺伝子の類縁性検索方法及び遺伝子の類縁性検索システム
2) 出願番号・特許番号	国内特許第3431135号
3) 発明者	渡邊克二, 奥田 充
4) 出願人	(独)農業・食品産業技術総合研究機構・渡邊克二
5) 権利化の状況	特許権

特許2

1) 発明の名称	Method and system for searching for relationships between base sequences in genes
2) 出願番号・特許番号	米国特許No.7,006,924
3) 発明者	渡邊克二, 奥田 充
4) 出願人	渡邊克二
5) 権利化の状況	特許権

産学連携の経歴

2008年4月 協定研究* 株式会社 サイバービーイング、名城大学
-2010年3月 {最確数・制限酵素断片長多型解析で効率的に類縁性解析と定量を行うシステムの開発と精度検証に関する研究}

*農業・食品産業技術総合研究機構在職時に実施、退職により中断

2013年 平成25度 JST事業 A-STEPフィージビリティスタディ
探索タイプ採択
{マイクロチップ型電気泳動装置を活用した新しい微生物分類・定量化法開発}

2014年6月 株式会社バイコム 共同研究
-2016年3月 {マイクロチップ型電気泳動装置を活用した遺伝子類縁性検索手法による酪農系活性汚泥中の菌叢評価}

2014年8月 (株)島津製作所 秘密保持契約
-2015年7月 {マイクロチップ型電気泳動装置を活用した遺伝子類縁性検索システムの市販化に向けた市場調査及びシステムの改善に係る評価}

お問い合わせ先

福岡工業大学
総合研究機構 産学連携推進室
産学連携コーディネーター
佐藤典秀、大野富生

T E L : 092-606-3236

F A X : 092-606-0636

e-mail: sangaku@fit.ac.jp

住所: 〒811-0295 福岡市東区和白東3丁目30-1