

## FISH 法のカビ検出への適用

山村 隼志 \*

Yamamura Junji

古泉 綾子 \*

Koizumi Ayako

石井 浩介 \*\*

Ishii Kousuke

カビの迅速検出・同定に、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を適用した。FISH 法は、菌体内に蛍光色素で標識した短い DNA 鎖 (DNA プローブと称す) を取り込ませ、蛍光染色された菌体そのものを蛍光顕微鏡で検出するものである。また、DNA プローブの塩基配列を検出したい菌の遺伝子と特異的に結合できるように設計することにより、菌種の同定も可能である。

これまで FISH 法をカビ検出に適用した例は少なく、特定のカビの分布状況を調べる研究等に限られていた。問題となるさまざまなカビ (特に胞子) が FISH 法で検出可能となれば、迅速で有用な検査手法となり得る。

キーワード：蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション、FISH、カビ検査、迅速検出

## 1. はじめに

カビが及ぼす問題は、食品や住環境等の汚染による品質劣化だけでなく、アレルゲンとして健康への影響も懸念されている。

現在、カビ検査は培養・形態観察によるものが主流であるが、培養に時間がかかるため検査に数日から一週間程度を要し、迅速性という点において課題がある。また、形態観察による同定には豊富な知識と経験が求められる。

培養工程を経ずに微生物を検出する方法の一つに、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション \*1 法 (以下、FISH 法) があり、細菌の検出方法として研究分野で多く用いられてきた。FISH 法は、菌体内に蛍光色素で標識した DNA プローブ \*2 を取り込ませ、蛍光染色された菌体そのものを蛍光顕

微鏡で検出するものである。また、DNA プローブの塩基配列を検出したい菌の遺伝子と特異的に結合できるように設計することにより、菌種の同定も可能である。図 1 に FISH 法の概要を示す。

本稿では、*Trichoderma viride* (トリコデルマ ビリデ、カビの一種) と FISH 法による蛍光染色が可能である *Saccharomyces cerevisiae* (サッカロミセス セレビシエ、酵母の一種) を用い、双方の蛍光染色の強度を比較することで、カビ検出に FISH 法が適用可能か検討した結果の一端を報告する。なお、詳細については別報にて報告する予定である。

\*1：ハイブリダイゼーション (Hybridization)：ハイブリッド形成とも言う。一本鎖の核酸同士が、相補性をもつ塩基対間の水素結合により二本鎖核

\* 計測事業部 化学・環境部

\*\* 株式会社 IHI 技術開発本部 総合開発センター 化学システム開発部 主査、博士 (理学)

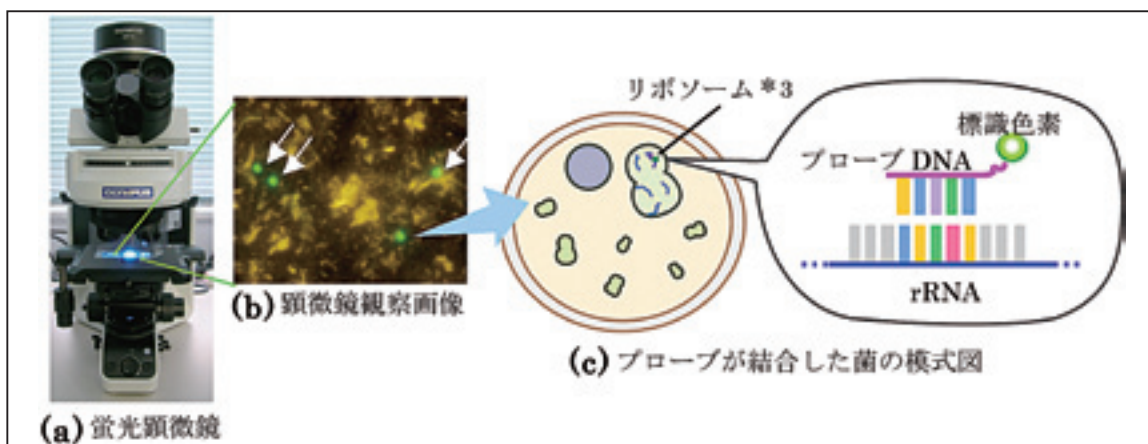


図1 FISH法の概要

酸を形成すること。DNAとDNA、DNAとRNA、RNAとRNAの三つのパターンがある。二本の鎖の相補性が高いほど、二本鎖の形成効率は高くなり、また二本鎖構造の安定性も高くなる。

\*2: プローブ (probe): 核酸はアデニンとチミン (またはウラシル)、グアニンとシトシンが水素結合することによって二本鎖構造をつくる性質がある。結合する相手方の核酸配列に対応する相補的なDNA鎖を合成し (これをプローブとする)、上記の性質を利用して標的配列を探すことができる。

蛍光顕微鏡でサンプルに励起光\*4を照射すると (図1 (a))、プローブDNAの標識色素が蛍光を発する。このとき、顕微鏡では菌全体が光っているのが観察される (図1 (b)、白矢印)。プローブDNAは、塩基配列が相補的なrRNAとだけ結合 (ハイブリダイズ) することができる (図1 (c)) が、塩基配列が相補的でないと結合しない。特定の菌が有するrRNA配列を特異的に認識するプローブDNAを用いれば、選択的な蛍光染色による菌の判別が可能となる。

\*3: リボソーム (ribosome): タンパク質と核酸の一種であるリボソームRNA (rRNA) からなる細胞内小器官。遺伝子の転写産物であるメッセージーRNA (mRNA) に取り付き、その塩基配列に対応したアミノ酸を結合させてタンパク質を合成する役割を持つ。

\*4: 励起光: 蛍光物質を励起状態にする光のこと。蛍光物質は、特定波長の光 (励起光) を照射するとそのエネルギーを吸収して励起状態となり、もとの安定な基底状態に戻る過程で光 (蛍光) を放射する。

## 2. 実験方法

### 2.1 サンプル調製

FISHに供する生物試料には、固定という処理を行う。この処理により、菌を生きていた時の細胞構造を維持したまま保存できるようになる (菌そのものは死んでいる)。培養して得られた菌を、4%のパラホルムアルデヒド溶液で固定した。以後、この固定済みの菌を用いて検討した。実験には、*Trichoderma viride* (トリコデルマビリデ、カビの一種) と *Saccharomyces cerevisiae* (サッカロミセスセレビシエ、酵母の一種) を用いた。

## 2.2 FISH 反応

固定した菌は、直径 25mm、孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のポリカーボネートメンブレンフィルターに吸引濾過して捕集し、そのフィルターを適度な大きさの扇状に裁断してサンプルとした (図 2 (a))。フィルターサンプルはプローブ DNA を含む反応溶液に浸し (図 2 (b))、46°C で 2 時間のハイブリダイゼーションを行った (図 2 (c))。次に、フィルターサンプルを 48°C のウォッシングバッファーに 15 分間浸漬し、余分なプローブ DNA を除去する洗浄を行った。洗浄終了後、フィルターサンプルは、99.5% エタノールに浸して脱水・乾燥させた。

カビと酵母はどちらも真核生物 \*5 である。そこで、今回は真核生物を認識し検出可能なプローブである EUK516 (配列: 5'-ACC AGA CTT GCC CTC C-3') と、どの微生物にも反応しない配列の陰性コントロール用プローブ (配列: 5'-TGA GGA TGC CCT CCG TCG-3', 以下 nonprobe と称す) を FISH に供した。プローブは緑色蛍光色素である FITC (fluorescein isothiocyanate) で標識した。

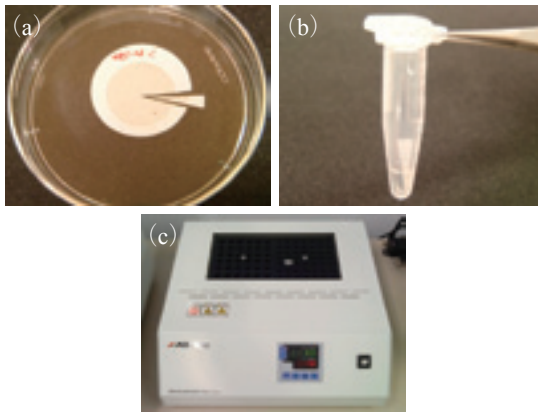


図 2 FISH 操作概要

\*5: 真核生物: 細菌とは異なる、細胞中に核構造を持つ生物。カビ、酵母、キノコと呼ばれる生物は、真核生物の一つの分類群である菌界に属し、総称して菌類と呼ぶ。細菌などと区別するために真菌と呼ばれることがある。

## 2.3 蛍光検出

洗浄・乾燥後、フィルターを蛍光観察用のマウント液に浸してプレパラートを作製した。蛍光観察は、励起光として青色光 (460-495nm) を照射しながら行った。

FITC 等の緑色蛍光色素の励起には、緑色蛍光 (波長: 520nm 前後) より波長の短い青色光を用いる。



図 3 蛍光観察用プレパラート

## 3. 結果と考察

*Trichoderma viride* (カビ) および *Saccharomyces cerevisiae* (酵母) の試料に対し、真核生物用プローブ EUK516 または nonprobe を添加した場合、プローブ未添加の場合で FISH を行った。その結果を図 4 および図 5 に示す。

nonprobe の結果から、ランダムな配列のプローブは菌の rRNA の配列を認識し、ハイブリダイズすることができないため蛍光が検出されなかったことが確認できる (図 4 (b)、図 5 (b))。またプローブ未添加の結果からは、励起光の照射による菌自身の蛍光 (自家蛍光) ではないことが確認できる (図 4 (c)、図 5 (c))。一方、EUK516 プローブ使用のサンプルでは緑色蛍光が検出された (図 4 (a)、図 5 (a))。nonprobe およびプローブ未添加の結果と併せて、プローブが rRNA にハイブリダイズし、FITC 由来の蛍光が検出されたことが示された。

蛍光強度について、*Saccharomyces cerevisiae* と比較して *Trichoderma viride* の胞子も検出に十分

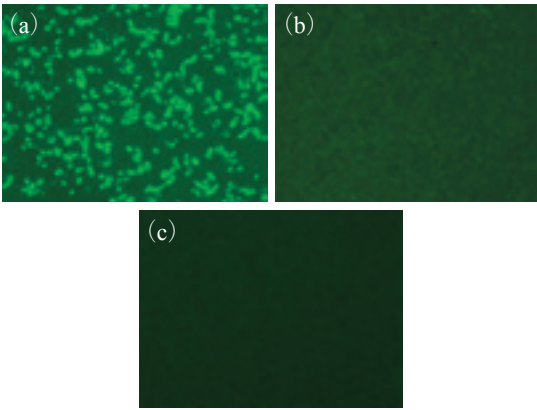


図4 *Trichoderma viride* の蛍光顕微鏡観察画像  
 (a) EUK516 添加、(b) nonprobe、  
 (c) プローブ未添加  
 緑色に光っている粒子が蛍光染色された孢子

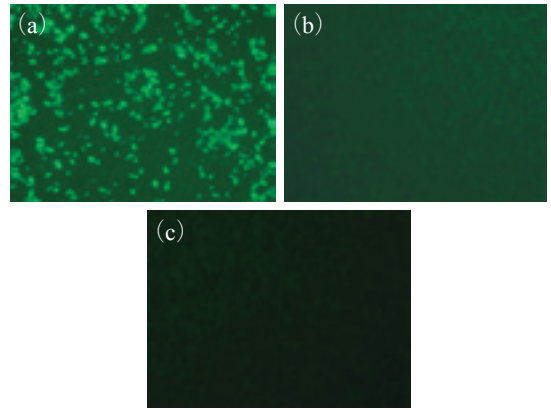


図5 *Saccharomyces cerevisiae* の  
 蛍光顕微鏡観察画像  
 (a) EUK516 添加、(b) nonprobe、  
 (c) プローブ未添加  
 緑色に光っている粒子が酵母の菌体

な強度で蛍光染色されていた。カビは生育の過程でまず菌糸が伸長し、やがて孢子を形成する。成長を続ける菌糸（活発に代謝を行っている）と比較して孢子中には十分な量のリボソームが存在せ

ず、蛍光染色が困難なことが予想された。しかし、今回の結果から、FISH法によってカビ孢子も検出可能であることが確認された。

表1 従来法とFISH法の比較

| 項目          | 従来法   | FISH法                                      |
|-------------|---|--|
| 検査日数        | 培養による孢子形成が必要なため、一週間以上を要する。                            | 培養が不要で、試料調製から検出まで二日程度で可能である。               |
| 判定方法        | 形態観察によるが、形態が類似した菌も多く、判定には経験と知識が必要である。                 | 遺伝子配列に基づいたプローブDNAを使用し、蛍光染色の有無で判定する。        |
| 検出範囲        | 使用した培地に生えた菌のみ検出が可能である。                                | プローブに対応した種類の菌の検出が可能であり、プローブの設計次第で柔軟に対応できる。 |
| 優占種・非優占種の判定 | 種により増殖速度・適した培養条件が異なるため、培養して生えてきた種が元の試料の優占種とは異なる場合がある。 | 培養による選択圧がかからないため、元の試料の菌分布に近い状態での判定が可能である。  |
| 安全面         | 培養により大量に形成した孢子の飛散等のリスクが高まる。                           | 試料を固定処理して扱うため、多量の孢子が飛散することはない。             |
| 費用          | 比較的安価である。   | 従来法に比べ若干高くなる。                              |

#### 4. おわりに

食品等の製造所・貯蔵所における品質管理や居住環境の衛生管理という観点から、迅速なカビ検査は重要である。形態観察を主とする従来の検査では、胞子が形成されるまでカビが成長している必要がある。そのため、観察でカビかどうか容易に判別できないような試料では、一週間以上の培養を行って胞子を形成させる必要があり、迅速な対応が難しいという課題があった。また、試料によっては菌糸の伸長のみで胞子が形成されないことがあり、そのような場合には観察での判定は困難になる。

一方 FISH 法では、菌体内の核酸をターゲットとし菌体を蛍光染色して検出するため、生育初期段階であっても検出・判定ができる。今回、カビ胞子についても FISH 法による検出が可能であることが確認できた。従来法の課題であった培養工程が基本的に不要となる、新たな迅速カビ検査法として FISH 法の有用性が示された。

#### 参考文献

- (1) 高鳥浩介、小菅旬子、李憲俊、村松芳多子、太田利子、田中真紀. カビ検査マニュアル
- (2) 宮治 誠、西村和子. 住まいとカビと病原性、八坂書房
- (3) Rudolf I. Amann, Wolfgang Ludwig, Karl-Heinz Schleifer. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiological Review. 59, 143-169
- (4) Rudolf I. Amann, Brian J. Binder, Robert J. Olson, Sallie W. Chisholm, Richard Devereux, David A. Stahl. (1990) Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919-1925



計測事業部  
化学・環境部  
山村 隼志  
TEL. 045-791-3516  
FAX. 045-791-3541



計測事業部  
化学・環境部  
古泉 綾子  
TEL. 045-791-3516  
FAX. 045-791-3541



株式会社 IHI 技術開発本部  
総合開発センター 化学システム開発部  
主査 博士 (理学)  
石井 浩介  
TEL. 045-759-2872  
FAX. 045-759-2207