

蘇生促進因子を利用した VBNC 状態のサルモネラの検出方法の開発

帯広畜産大学動物・食品衛生研究センター・AGH 助教 楠本 晃子

■ 目的

食中毒原因来を含めた細菌はストレス下で Viable But Non-Culturable (VBNC) 状態に陥ることが知られている。VBNC 状態の細菌は通常生育しうる培地で増殖せず、しかし、生理活性を維持している。VBNC 状態の細菌は病原性を保持し、宿主腸管内などで増殖を再開し、病原性を発現するため、食品衛生上重要な問題である。ゆえに、VBNC 状態の細菌の検出法の開発が求められる。しかし、VBNC 状態の分子メカニズムに関する知見は乏しい状態である。

VBNC 状態の細菌は培地中で増殖できないので、細胞周期があるステップでアレストしている可能性が考えられる。一方、Rpf は VBNC 状態のサルモネラを蘇生させることから、Rpf が細胞周期にどのように作用しているのか明らかにすることで、VBNC 状態の分子メカニズムと Rpf の作用機構の解明を目指した。

■ 方法

実験にはサルモネラ (*Salmonella* Typhimurium LT2 株) を用い、塩ストレスによる VBNC 状態への誘導は Kusumoto et al. に従った。

Fluorescent in situ hybridization (FISH) 法は Niki et al., 1998 に従った。DNA 複製起点に結合する ori プローブはサルモネラ DNA を鋳型として作製し、Cy3 により蛍光ラベルした。染色したサルモネラは共焦点顕微鏡で観察した。

ウェスタンブロッティングによる FtsZ の検出には、抗 FtsZ ウサギポリクローナル抗体 (Agrisera 社)、および、Can Get Signal (TOYOBO 社) を用いた。

■ 結果および考察

VBNC 状における DNA 複製の状態を明らかにするために、FISH 法による DNA 複製起点の可視化を試みた。サルモネラの DNA 複製起点に結合する、Cy3 による蛍光ラベルした ori プローブを作成し、これを用いて対数増殖期のサルモネラの DNA 複製起点を可視化した。1 細胞内に Cy3 のシグナルが 1 あるいは 2 個観察されたものが 70% 程度あった。対数増殖期の細胞のラベリングに成功したので、次に、VBNC 状態のサルモネラについてラベリングを試みたが、非常にバックグラウンドが高く、特異的な DNA 複製開始点のラベルが難しいことが分かった。様々な条件検討を試みたが、この問題を解決することができなかった。

次に、分裂リング構成タンパク質である FtsZ に着目した。細胞分裂時、FtsZ は分裂面に Z リングと呼ばれる FtsZ からなるリング構造を形成する。分裂後は Z リングは脱重合し、次の分裂時には再び FtsZ が重合し、Z リングが形成される。抗 FtsZ 抗体を用いたウェスタンブロットの結果から、VBNC 状態と対数増殖期では、細胞内 FtsZ 量に違いは見られなかった。このことから、VBNC 状態では FtsZ の発現が減少するために分裂ができなくなるのではないことが示唆された。現在、VBNC 状態のサルモネラで、FtsZ が重合し、リング構造を形成しているかを検証するために、抗 FtsZ 抗体を用いた免疫染色、および、BN-PAGE による FtsZ の解析を試みている。

■ 結語

VBNC 状態のサルモネラの FISH 解析はできなかったが、VBNC 状態では分裂リング構成タンパク質 FtsZ の発現量に変化はないことを明らかにすることができた。