



@ High School

福井県立藤島高等学校 (SSH 指定校)

宇都宮まなみ、黒川広樹、清水萌子、坪川桂子、水上春菜 (顧問：富永英之)

DNA レベルでの有害菌の検出 PCR プライマー設計の試み

スーパーサイエンスハイスクール (SSH) 指定校で行なわれた本研究は、平成 18(2006) 年度日本農芸化学会大会 (開催地京都) から始まった高校生による第 1 回「ジュニア農芸化学会」において優秀ポスター賞を受賞した。現在、食中毒の未然防止や食品製造現場の安全性確保のため、PCR 法による様々な高感度検出法が開発されている。本研究は、食品中の有害菌 (サルモネラ菌) を PCR 法で検出するため、それに必要なプライマー設計の問題点を DNA の構造との関連から考察した内容である。

本研究の目的、方法および結果 (講演要旨集を部分的に改変転載)

【目的】 有害菌を検出することを目的として、PCR プライマーを設計した。通常的设计方針に従って作製したプライマーに加えて、従来、PCR には不適とされている構造 (分子内高次構造やプライマーダイマー) をもつプライマーも敢えて設計した。これらと比較することで、PCR 増幅に対するプライマーの構造の影響を調べた。

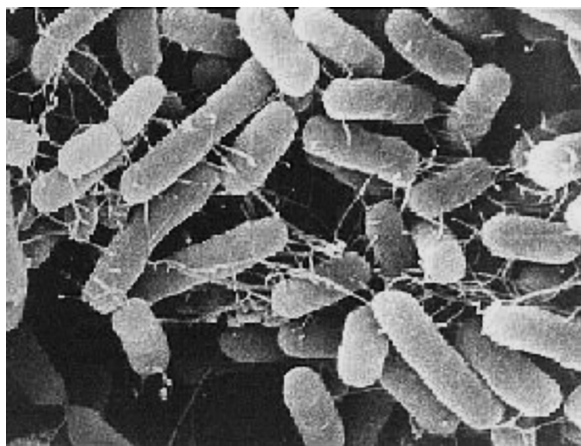


図 1 ■サルモネラ菌 (ポスターより転載)

【方法】 *Salmonella typhimurium* (図 1) を LB 培地で培養し、DNA 抽出キットによりゲノム DNA を抽出した。次に、PCR 増幅する *S. typhimurium* に特異的な遺伝子領域を、塩基配列データベース DDBJ を用いて探索し、相同性検索を行なった後に決定した。それらの塩基配列をもとにしてプライマーの設計を行なった。同時に、ステムループ、ヘアピンおよびプライマーダイマー形成をひき起こす可能性のあるプライマーを意図的に設計し、それらについても PCR を行ない、反応産物をアガロースゲル電気泳動により確認した (図 2)。

【結果】 実験の結果、通常的设计方針に従って作製したプライマーでは、標的とした遺伝子領域の増幅が見られた (図 2-3)。また、分子内高次構造やプライマーダイマーを狙って設計したプライマーについては、標的とした遺伝子領域のみの増幅が見られた場合 (図 2-5) と、標的としていない非特異的な遺伝子領域でも増幅が見られた場合 (図 2-1, -2, -4) とがあった (「ジュニア農芸化学会」要旨集より一部改変転載)。

【協力】 福井大学 工学研究科 生物応用化学専攻 生命機能工学研究室

本研究の意義と展望

本研究では、食品汚染の原因菌のひとつ *S. typhimurium* の PCR による検出法に取り組んでいる。感心した点は、本菌に特異的な遺伝子領域を DDBJ や BLAST を用いて決定したことである。インターネットのお陰で公的データベースへのアクセスも容易になり、高校生でも専門性の高い信頼のおける仕事ができるものだ時代を進歩を感じた。また、プライマー設計に関し

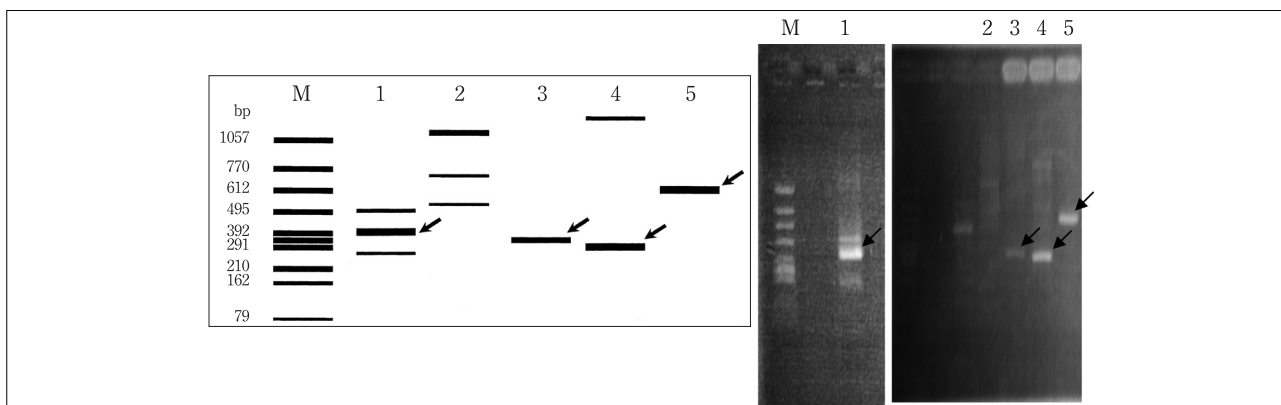


図2 ■ PCR産物のアガロースゲル電気泳動パターン(右)とその模式図(左)(ポスターより転載)

M: マーカー, 1: プライマーダイマーを狙って作製したプライマー (宇都宮設計: 増幅遺伝子領域 *fli* Y 376 bp), 2: ステムループを狙って作製したプライマー (黒川設計: 増幅遺伝子領域 DNA metabolism 899 bp), 3: 通常の設計方針に従って作製したプライマー (清水設計: 増幅遺伝子領域 *vip* R 291 bp), 4: プライマーダイマー・ヘアピンを狙って作製したプライマー (坪川設計: 増幅遺伝子領域 *mig-3* 311 bp), 5: プライマーダイマーを狙って作製したプライマー (水上設計: 増幅遺伝子領域 *fli* C 590 bp). 標的とした遺伝子領域が増幅されて現われたバンドを矢印で示す.

でも、敢えてセオリーに反して、プライマーダイマー、ステムループ構造、ヘアピン構造を形成するプライマーの設計を行ない、PCR増幅に対するプライマー構造の影響を調べている点も高校生らしい着眼点と感心した(大学、企業の研究室では通常許されない行為であろう)。

結果として、これらセオリーに反したプライマー使用により、予想通り(?)目的産物が増幅しない、あるいは複数のバンドが形成された場合もあったが、目的どおり増幅した場合もあった。一方で、ポスターのデータ(図2には未記載)によると、セオリーに従って設計したプライマーを使用しても、複数バンドが増幅してしまうという事例も見られた(つまり、実際の研究現場でも経験する事例である)。また、プライマーダイマー構造をとるように設計したプライマーの使用にもかかわらず、プライマーダイマーは形成されなかったようであった。このように、PCR増幅に対するプライマー構造の影響の評価に関しては、大まかな傾向は得られたものの、すっきりしない部分が残ったようである。高校生達にとっても、すっきりしないものを感じながらのポスター作製だったのかもしれない。

また、フォワードとリバースの両プライマーを用いたPCR反応のみを行なったようであったが、コントロール(片方のみのプライマーで行なうPCR反応)も設定したほうがより好ましかったと思う。目的の反応産物の増幅が、より明確になるからである。ゲノムDNAを鋳型として用いているだけに、非特異的増幅によりたまたま増幅してしまった(目的産物と近い分子サイズを示す)擬陽性産物を、目的産物と誤ってみなしていないかと危惧が残った。さらに、特に複数本のバンドが増幅し



写真1 ■ 優秀ポスター賞の前で

た場合、コントロールは多くの情報を与えてくれる。たとえば、どちらのプライマーがその非特異的増幅の原因であったのかを特定できる場合もある。これにより、プライマー構造のPCR増幅に対する影響をより深く考察することも可能であったと思う。なお、著者のこのコメントは、発表当日会場にて演者(高校生)に伝えた。納得して感謝してくれたことを覚えている。

このように気になる細かい点は残るにせよ、本研究により、PCR法の威力のみならずプライマー設計の奥深さが理解されたものと思う。実際に自分で手と頭を動かして、PCR産物を電気泳動し、DNAを観察した経験も有意義であったであろう。最近、新聞紙上やテレビでもDNA鑑定などの言葉をよく耳にするが、それが如何なるものか実感として理解できたのではないだろうか。

表彰状を持った生徒たちの誇らしげな表情も印象的である(写真1)。本研究を通じて、中堅ならびに老研究者

が置き忘れてしまっているかもしれない「瑞々しい研究の喜び」を高校生が感じてくれたのであれば、その気持ちを忘れず、将来に活かして欲しいものである。最後に、研究においては、その表現および発表も重要であるが、

美しく見やすいポスターが丁寧に作製されており大いに好感がもてた。有害菌の安全な取り扱いも含め、指導された先生方の努力にも敬意を表したい。

(文責：京都大学大学院農学研究科 河井重幸)