

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		遺伝子配列情報に基づいた複合微生物群集の制御-アンチセンス法による微生物の生育抑制技術の開発-			
研究テーマ (欧文) AZ		Development of bacterial growth inhibition technique using antisense peptide nucleic acid			
研究氏代表名者	カタカナ CC	姓)ハタモト	名)マサシ	研究期間 B	2007 ~ 2008 年
	漢字 CB	幡本	将史	報告年度 YR	2009 年
	ローマ字 CZ	HATAMOTO	MASASHI	研究機関名	長岡技術科学大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		広島大学大学院工学研究科 研究員			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)					
<p>本研究では、人工核酸を用いたアンチセンス技術を環境微生物の分野に導入するため、16S rRNA を標的としたアンチセンス (アンチリボソーム) 技術の開発を目的とした。まず、細菌の細胞壁などの影響を排除し、純粋に Peptide nucleic acid (PNA) のリボソームに対する阻害効果を確認するため、in vitro タンパク質発現系を用いて、PNA の阻害効果を確認した。細菌の 16S rRNA を標的とした 10 から 15 塩基の PNA オリゴを作成し実験に用いた。その結果、PNA オリゴの濃度を増加させると阻害効果が高まる事や、PNA オリゴの配列と標的部位とのミスマッチの数が増えるに従って阻害効果が弱まることが確認できた。そこで次に、この PNA オリゴに細胞膜の透過性を向上させるために細胞膜透過性ペプチドを付加した、peptide-PNA を作成し、peptide-PNA の生育阻害効果を確認するため、モデル微生物として大腸菌 K12 株を用いて増殖阻害実験を行った。一晚培養した大腸菌を MH 培地で希釈し、peptide-PNA を様々な濃度で添加し 37°C で 24 時間の培養実験を行った。peptide-PNA による増殖抑制効果は培養液の O.D. を測定する事により判断し、殺傷効果は大腸菌の CFU を測定することで決定した。実験の結果、16S rRNA の末端にある mRNA 結合部位を標的とした PNA オリゴでは 10μM で大腸菌の生育を完全に阻害した。また in vitro での実験結果と同様に、添加する peptide-PNA の濃度を増加させると阻害効果が高まる事や、PNA オリゴの配列と標的部位とのミスマッチの数が増えるに従って阻害効果が弱まることが確認できた。以上の結果は、16S rRNA を標的とした配列特異的な微生物の増殖抑制が可能である事を示している。</p>					
キーワード FA	16S rRNA	PNA	増殖阻害		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献(この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。)

雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Sequence-specific bacterial growth inhibition by peptide nucleic acid targeted to the mRNA binding site of 16S rRNA						
	著者名 <sup>GA</sup>	Hatamoto et al.	雑誌名 <sup>GC</sup>	Applied Microbiology and Biotechnology				
	ページ <sup>GF</sup>	~	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	0	9	巻号 <sup>GD</sup>
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>							
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>					
	ページ <sup>GF</sup>	~	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>							
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>					
	ページ <sup>GF</sup>	~	発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>
図書	著者名 <sup>HA</sup>							
	書名 <sup>HC</sup>							
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>
図書	著者名 <sup>HA</sup>							
	書名 <sup>HC</sup>							
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>

欧文概要<sup>EZ</sup>

Antisense technology using nucleic acid analogs is currently being investigated as a new therapeutic method for a variety of diseases, including cancer, viral infections and bacterial infections. Among the nucleic acid analogs, peptide nucleic acid (PNA) oligomers are known to form exceptionally strong complexes with complementary strands of DNA or RNA and thus could inhibit both transcription and translation of genes. Therefore, PNA antisense oligomers, which targeted to the mRNA of essential genes, could inhibit cell growth with sequence specificity. However, the antisense techniques with oligonucleotide analogs are mainly focused on clinical fields. We therefore investigated whether the basic concepts of antisense technology could be applied to environmental microbiology. We used 10- to 15-mer PNAs conjugated with cell-penetrating peptide. In primary studies, we used an overnight culture of *Escherichia coli* K12 grown on Mueller-Hinton broth. In antisense experiment, we diluted the overnight *E. coli* cultures to the appropriate cell numbers and added the antisense PNAs at several concentrations into the *E. coli* cultures. To determine the growth inhibition and bacterial killing effects of antisense PNAs, we performed OD measurement and viable cell counting periodically. As a result, we observed dose- and sequence-dependent inhibition of cell growth and bactericidal effects, whereas control PNAs or only cell-penetrating peptide were much less effective than antisense PNAs. These results suggest that PNA antisense technique might have potential applications for environmental microbiology.