

高速液体クロマトグラフィー

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

203

放線菌の化学分類(4)

Chemotaxonomy of Actinomycetes(4)

— GC含量の測定 —

— Determination of G+C Content —

放線菌の菌体成分に基づく化学分類のうち、DNAの塩基組成の分析は、微生物分類学に不可欠であるばかりでなく、DNA交雑実験や類縁性検討の予備情報としても重要です。DNAの塩基組成は、AとT、GとCがおのおの等モルずつ存在することから、通常GC含量としてGとCの合計のモル%で表示されます。この値は、よく確立された分類群においてかなり狭い範囲に収まるため、有用な分類指標になることが期待されています。しかし、GC含量の測定法として広く用いられてきた、Tm法と呼ばれるDNA二重ラセンの解離温度より求める方法では、分析精度が十分であるとはいえ、GC含量が菌株の同定や分類における決め手となる場合は多くありませんでした。そこで、近年になってHPLC法が注目されるようになってきました。HPLC法では、DNAを分解して得たヌクレオシドを直接定量するため、信頼性の高いデータを容易に得ることができます。ここでは、放線菌のDNA塩基組成を逆相HPLCを用いて測定した例について、ご紹介します。

■試料の前処理ならびに測定方法

Methods

試料の前処理は、おおむね以下のとおりとなります。

まず、菌体に対し、除たんぱくやRNaseによるRNAの除去などの精製を行います。つぎに、得られたDNAをヌクレアーゼP₁で加水分解し、さらにアルカリフォスファターゼでヌクレオシドに変化させます。こうして得られた試料を、HPLCに注入して分析を行います。

GC含量測定のためのHPLC条件はTable 1のとおりです。

実験結果からのGC含量の計算は、クロマトバックシリーズの修正百分率を用いることにより、自動的に行うことができ、大変便利です。

なお、試料の処理法を始めとする、実験の手順につきましては『放線菌の同定実験法』(日本放線菌学会編)に詳細が記載されています。

Table 1 GC含量測定用HPLC分析条件
Analytical Conditions

| | |
|--------------|---|
| Column | : Shim-pack ODS(4.6mmI.D.×150mmL.) |
| Mobile Phase | : 0.2M Ammonium Dihydrogen Phosphate /Methanol (10:1) |
| Temperature | : 40°C |
| Flow Rate | : 1.0ml/min. |
| Detector | : SPD-6A Wavelength;270nm |

■検量線の作成

Calibration Curves

実試料の分析に先立ち、検量線の作成のために、ヌクレオシドの標準等モル混合液(ヤマサ醤油製)をアルカリフォスファターゼ処理によってヌクレオシドに変化させたのち、各ヌクレオシド濃度をそれぞれ1と入力してキャリブレーション分析します。また、大腸菌のDNAなどGC含量が既知のものを処理し、これを基準としても定量可能です。Fig.1は、キャリブレーション分析を行った結果の例です。なお、定量は通常ピーク面積を用いて行います。

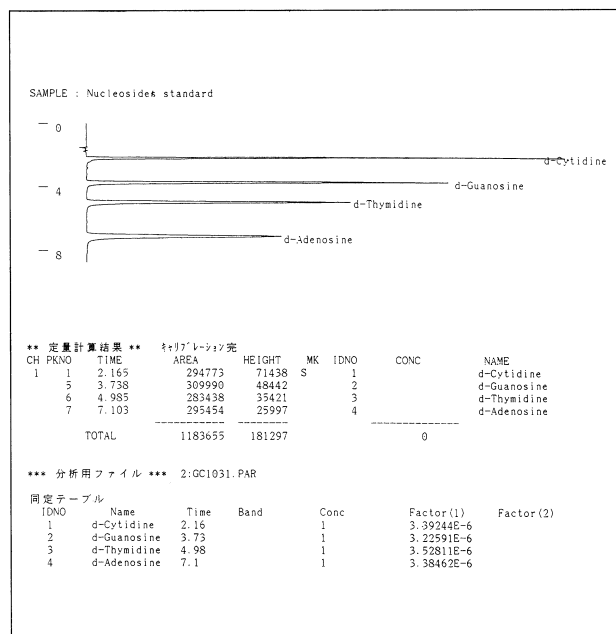


Fig.1 Chromatogram of Nucleoside Standards

■GC含量の測定

Determination of G+C Content Components

理化学研究所製の標準菌体について、おのおの上記の方法に基づいてGC含量の測定を行いました。Fig.2～Fig.4は、*Rhodococcus equi* (JCM1311), *Kitasatosporia setae* (JCM3304), *Streptomyces albus subsp. albus* (JCM4450)の分析例です。いずれも約70%のGC含量を示しましたが、GとCおよびAとTの定量値はきわめてよく一致しており、分析精度の高さを示すものといえます。

この結果からわかるように、HPLC法を用いることにより、従来区別が困難であった、GC含量のわずかな差を明確に区別することが可能となりました。このため、GC含量の菌株の同定や分類における重要性が今後顕著に増すことが予想され、そのためには、HPLCによる測定データの蓄積が積極的に行われていくことが期待されます。

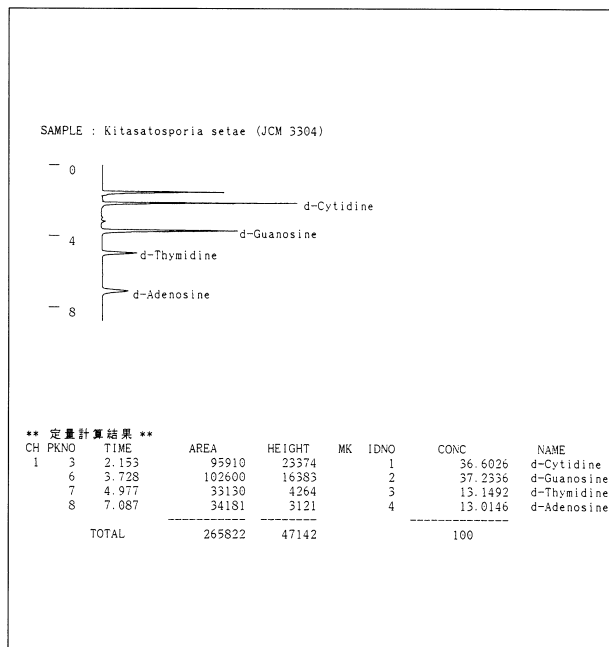


Fig.3 Chromatogram of *Kitasatosporia setae* (JCM3304)

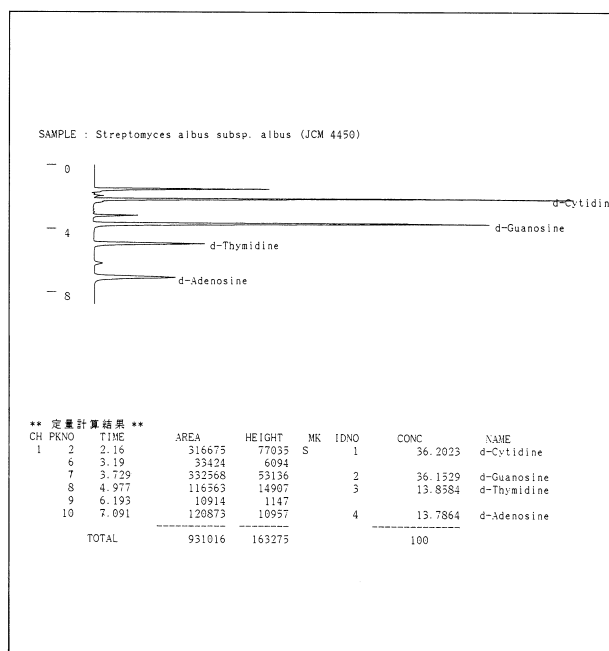


Fig.4 Chromatogram of *Streptomyces albus subsp. albus* (JCM4450)

※本データは、理化学研究所 鈴木健一郎先生にご提供頂きました。

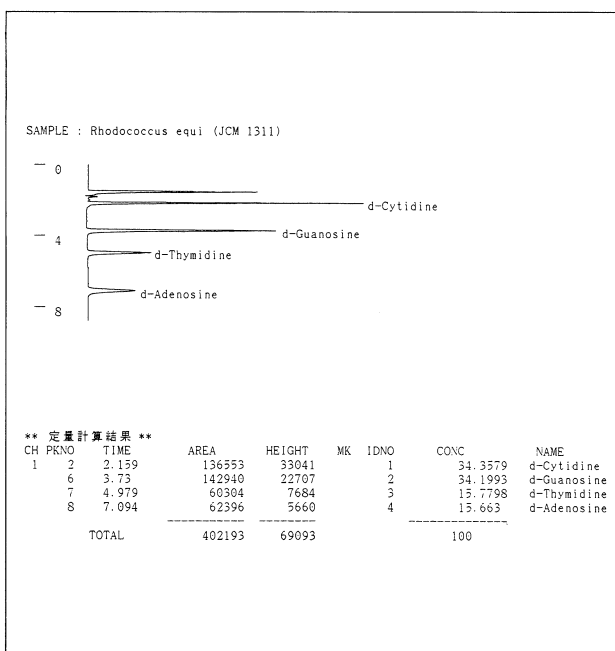


Fig.2 Chromatogram of *Rhodococcus equi* (JCM1311)

初版発行：1990年3月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691(携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなくいろいろな情報サービスが受けられます。