

(7) 生物情報の有効活用と地域バイオマス資源の高付加価値化に関する研究開発 (平成20年度～平成22年度)

研究のねらい

北海道において食品製造は重要な産業であるが、近年、消費者から食の安心・安全が強く求められるようになった。食の安心・安全を確保することは地域のバイオマス資源を活用した北海道の食品の信頼性を高め、付加価値を高めることとなる。食品製造業では、微生物危害を防止するために、迅速な微生物の検査法を求めているが、様々な食品において、カビや酵母の繁殖による消費者からのクレームの発生事例が多く、これらの迅速な検査を求めている。しかし、従来の微生物の検査は培養法により行われ、数日間の時間を要するが、カビや酵母の検査では一週間を要し、時間がかかるのが問題である。そこで、本研究では、生物情報を有効活用して設計された DNA プローブを用いた培養併用 FISH 法による迅速な真菌(カビ・酵母)測定法を開発する。

研究の方法

1) プローブデザイン

rRNA を標的とする真菌の特異検出の可能性のある蛍光オリゴヌクレオチドプローブとして、Goncalvesらの報告(Rev. Iberoam. Micol. 23, 194-198 (2006))を参考に、5'末端を TAMRA 標識した EUK516 (5'-ACC AGA CTT GCC CTC C-3')を合成した。

2) FISHFC による真菌の検出

真菌として、酵母は *Saccharomyces cerevisiae* JCM 2223 を、カビは *Aspergillus niger* ATCC 16404 を用いた。各菌株懸濁液を PP メンブレンフィルター(直径 47mm、ポアサイズ 0.45 μm、GH Polypro、Life Sciences 社)で吸引ろ過し乾燥させた。フィルターを PYD 培地に置き、25℃ で貼付培養を各時間(8～48 h)行った。次に、固定としてエタノールに 30 分浸した後乾燥した。ハイブリダイゼーションとして、次の操作を行った。PP フィルターにハイブリダイゼーションバッファー(0.9M NaCl、20% ホルムアミド、20mM Tris-HCl(pH 7.4)、0.01% SDS) 160 μl を加え、5 μM の EUK516 を 20 μl 添加した。46℃ で 3 時間ハイブリダイゼーション反応させた。次に洗浄を次の通り行った。46℃ にて洗浄液(0.9M NaCl、20mM Tris-HCl、0.02% SDS、0.05M EDTA)に上記フィルターを移し 20 分間浸して洗浄した。その後、DW ですすぎ、ろ紙にのせ暗所で乾燥させた。次に同フィルター中の蛍光マイクロコロニーを蛍光顕微鏡(対物レンズ×4 または×40、CCD カメラ)下にて観察した。

研究成果の概要

Saccharomyces cerevisiae JCM 2223 と *Aspergillus niger* ATCC 16404 をそれぞれ用い真菌の FISHFC 法を実施し次の結果が得られた。

Saccharomyces cerevisiae JCM 2223 においては、貼付培養後形成されたマイクロコロニーは、EtOH 固定で脱落するため、蛍光信号が認められなかった。そこで、マイクロコロニーの脱落防止のため 8 時間・24 時間、貼付培養した PP フィルターに 0.3% ローカストビンガムを添加した後、固定・ハイブリダイゼーション・洗浄を行った。その結果、8 時間以上の貼付培養により EUK516 プローブで蛍光を示したコロニーが観察された。

Aspergillus niger ATCC 16404 においては、*S.cerevisiae* に比べ生育が遅く、8 時間では菌糸は観察されなかった。24 時間、48 時間では、ローカストビンガムを添加しなくとも PP 上で観察された。特に 48 時間では裸眼で菌糸形成がみられた。また、菌糸は EUK516 プローブで強い蛍光を示した。

以上より、*A.niger* は *S.cerevisiae* より貼付培養時間を長く要すること、*S.cerevisiae* は、FISHFC 工程でコロニーが剥れないようにする処理を行う必要があることがわかった。

担当者 大坪雅史、斉藤美帆、林志保、青木央、宮崎俊一、鳥海滋