

イカ塩辛微生物相の解析における T-RFLP 法の利用

清水健志、加藤佑基

Utilization of T-RFLP Method for Microflora Analysis of Squid Shiokara

Takeshi Shimizu and Yuki Kato

要 旨

イカ塩辛中の微生物相解析のための技術開発を目的に、T-RFLP 法の塩辛試料への利用について検討を行った。その結果、塩辛 1g 当たり数十から数百個の微生物を検出可能であり、菌数の低いイカ塩辛の微生物相解析に利用可能な手法と考えられた。また本手法を用いて市販のイカ塩辛製品 3 点の微生物相を解析した結果、塩辛中に良く見られる *Tetragenococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Kocuria* 属と推定された。一方、データベースの菌種に該当しないピークも検出されており、原因究明については今後の課題である。まだ改良の余地はあるものの、本研究において、T-RFLP 法によるイカ塩辛の微生物相解析に関する基礎的な条件は構築できたと考えている。

1. はじめに

食品の発酵、熟成、腐敗には、複数の微生物（微生物相）が関与しており、微生物相を構成する菌種により品質や保存性が異なることから、微生物相を把握することは重要である。函館地域の伝統食品のひとつであるイカ塩辛も、熟成期間中の微生物相の変化について報告されている¹⁾。

しかしながら従来の培養法では、微生物相を解析するのに多大な労力と時間を要するため、より迅速に評価できる新たな技術の開発が求められている。

近年では、様々な微生物の遺伝子情報がデータベース化され、特に量的に充実している 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) 情報は、菌種の同定に良く利用されている。この情報を利用した微生物相の解析手法も開発されている。そのひとつに T-RFLP 法 (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) が挙げられる²⁾。

本手法の原理は、まず試料中の微生物群集から DNA を抽出し、蛍光標識したプライマーにより

全ての微生物に共通な遺伝子配列を増幅する。ここで生じる増幅 DNA は、末端が蛍光標識されており、続いて行う制限酵素分解及び DNA シークエンサーを用いた電気泳動により蛍光標識された末端を含む DNA 断片が検出される。最後に検出された DNA 断片の数や各々の蛍光強度を測定することにより、微生物相の解析を行う (図 1)。

本手法の利点は、複数の微生物を単離培養せずに同時検出が可能であり、迅速な手法として腸内

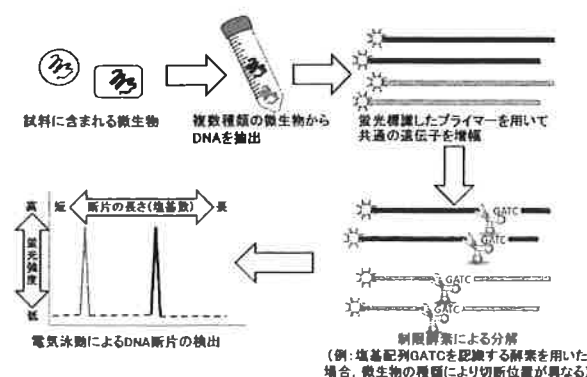


図1 T-RFLP法の原理

細菌相の評価解析に利用されている³⁾。

そこで本研究では、イカ塩辛中の微生物相の解析が可能な技術の開発を目的に、T-RFLP法の塩辛試料への利用について検討した。

2. 実験方法

2.1 イカ塩辛試料の調製

T-RFLP法によるイカ塩辛の分析条件を構築するため、単純なモデル試料を調製して用いた。函館市内の量販店で購入したイカ塩辛製品100gに対し、90 mlのリン酸緩衝生理食塩水を加え、ストマッカーを用いて均質化した希釈液を調製した。さらに121℃、15分間の条件でオートクレーブ滅菌した後、*Escherichia coli* (グラム陰性菌) 及び *Staphylococcus epidermidis* (グラム陽性菌) を塩辛希釈液1ml当たり数個から数百万個となるよう接種し、モデル試料とした。

また、構築した分析条件を基に、市販のイカ塩辛製品3点についてT-RFLP法を用いた微生物相の解析を行った。なお、全ての試料は等量のリン酸緩衝生理食塩水を加えた後、ストマッカーにより均質化して用いた。

2.2 微生物DNAの抽出

0.5mlの均質化した希釈試料について、ビーズによる菌体破碎及びDNA抽出が可能なISOIL for Beads Beating (株ニッポンジーン)を用いて塩辛中の微生物DNAの抽出を行った。なお菌体破碎条件は、ボルテックスミキサーにて約2,500rpmで30分間とした。

2.3 T-RFLP解析のための試料調製

抽出したDNA試料を10ng用い、PCRにより16S rDNA部分配列(約1,000bp)を増幅した。増幅プライマーには、蛍光色素で標識したフォワードプライマー (FAM 5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3') と リ バ ー ス プ ラ イ マ ー (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用い、DNA polymeraseであるHotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN)を用いてDNAを増幅した。PCR条件は、95℃ -15分間のプレヒート後、増幅反応(95℃ -30秒間、50℃ -30秒間、72℃ -2分間)を35回繰り返し、最終伸長反応を72℃

-10分間とした。PCRにより得られた増幅DNAはQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製した後、50～100ngの精製DNAを10Uの制限酵素Sau3AI (タカラバイオ(株))で、37℃、3時間の分解処理を行った。

2.4 微生物相解析用データベースの作成

公共データベースであるRibosomal Database Projectを基に、微生物の16S rDNAについて、WEB解析ツールであるMicrobial Community Analysis III (MiCA 3)⁴⁾を用いて解析を行い、Sau3AIによる分解DNA断片の長さに関するデータベースを作製した。

2.5 T-RFLP法による微生物相の解析

T-RFLP解析用試料に蛍光標識DNAサイズマーカーであるMapMarker X-Rhodamine Labeled 50-1000bp (BioVentures)を添加し、DNAシーケンサーである3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン(株))を用いて解析を行った。また菌種の推定には、本研究で作製したデータベースを用いた。

3. 結果と考察

3.1 イカ塩辛微生物相解析におけるT-RFLP法の適応性

モデル試料をPCR増幅し、アガロースゲル電気泳動による増幅DNAのサイズ測定を行った結果、全ての試料から目的のDNA領域を増幅されていることを確認した。さらに増幅DNAをT-RFLP法で解析した結果、数個/0.5mlを除く全てのモデル試料で約189bp及び約259bpの2本のメインピークが検出された。本解析に用いた*E.coli*及び*S.epidermidis*の16S rDNAのSau3AI消化断片はそれぞれ189bp及び260bpであり、測定サイズには僅かな誤差が見られたものの、接種菌由来のピークであると判断した(図2)。この結果から、本研究で設定したDNA抽出及びT-RFLP解析の条件は、イカ塩辛の微生物相解析に適していると考えられた。

また、各試料間で検出ピークの蛍光強度を比較したところ、数十個/0.5mlの試料では蛍光強度が急激に減少していたことから、検出限界付近であると考えられた(図3)。本解析に用いた試料

(0.5 ml) は 0.25 g の塩辛を含んでいることから、理論上、塩辛 1g 当たり数十から数百個の微生物を検出可能であり、菌数の低いイカ塩辛の微生物相解析にも利用可能と考えられた。

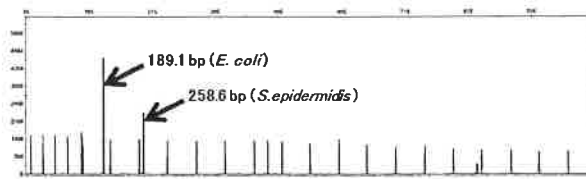


図2 イカ塩辛モデル試料の T-RFLP 解析結果

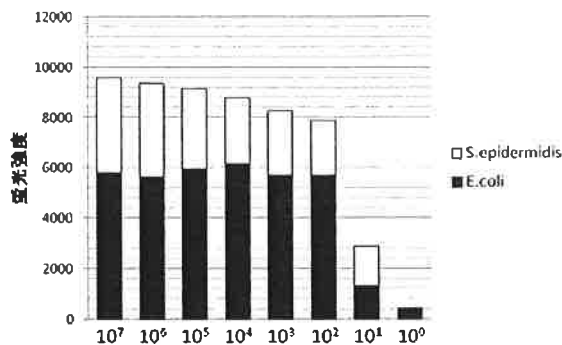


図3 モデル試料で検出された各ピークの蛍光強度

3.2 作製したイカ塩辛微生物相解析用のデータベース特性

塩辛から分離の報告があるグラム陽性菌 (*Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属、*Tetragenococcus* 属、*Kocuria* 属) 及びグラム陰性菌 (*Acinetobacter* 属、*Moraxella* 属、*Vibrio* 属) について、MiCA 3 を用いて作製したデータベースを確認した結果、グラム陽性菌は、それぞれの断片長が異なっており T-RFLP 法による識別は可能であると判断した。一方、グラム陰性菌は 3 属全てが 190bp 前後であり、それぞれを見分けることは困難であることが分かった (表 1)。

表 1 作製したデータベース中のイカ塩辛関連微生物

微生物種	Sau3A II による蛍光標識側の DNA 断片長 (bp)
グラム陽性菌	
<i>Staphylococcus</i> 属	259~261
<i>Micrococcus</i> 属	112~113
<i>Tetragenococcus</i> 属	129~130
<i>Kocuria</i> 属	492~491, 792~794, 842~845
グラム陰性菌	
<i>Acinetobacter</i> 属	189~191
<i>Moraxella</i> 属	189~190
<i>Vibrio</i> 属	189~191

3.3 イカ塩辛製品における微生物相解析の結果
設定した条件を用いて市販のイカ塩辛製品 3 点の微生物相を T-RFLP 法により解析した結果、試

料間で検出ピークのパターンに違いが確認された (図 4)。データベースと照合した結果、塩辛から分離される *Tetragenococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Kocuria* 属及びグラム陰性菌と推定されるピークが検出された。本解析手法では、ピークのパターンが微生物相を反映していることから、製品ごとの特徴は得られていると考えられた。

一方、データベースの菌種に該当しない 235.7bp 及び 302.7bp のピークも検出されている。原因は不明であるが、微生物由来のピークであるのかを確認するには DNA 断片について塩基配列の解読等が必要と考える。



図4 市販イカ塩辛製品の T-RFLP 解析

4. おわりに

本研究において、T-RFLP 法によるイカ塩辛の微生物相解析に関する基礎的な条件は構築できたと考えている。しかしながら、設定したデータベースでは、グラム陰性菌の種類を識別できなかったため、今後、制限酵素の再選定等によりデータベースの改良を行い、微生物相の解析精度の向上を図りたいと考えている。また、イカ塩辛以外の食品への利用も期待できると思われることから、今後の検討課題したい。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、T-RFLP 法に関する助言を頂きました株式会社テクノスルガ・ラボ、試料の収集にご協力して頂きました有限会社カネサク大出博三商店に心から感謝いたします。

参考文献

- (1) 藤井建夫. 水産発酵食品の製法と微生物・酵素の役割. 温故知新. 34 巻, 9-17 (1997)
- (2) Liu, W.-T., T. Marsh, H. Cheng, and L. J.

- Forney. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 63, 4516-4522 (1997)
- (3) K. Nagashima et al., Phylogenetic Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Sequences from Human Fecal Microbiota and Improved Utility of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling, *Bioscience and Microflora*, Vol. 25, No. 3, pp.99-107 (2006)
- (4) Shyu, C., Soule, T., Bent, S.J., Foster, J.A., Forney, L.J. A Web-Based Tool for the Analysis of Microbial Communities Based on Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S and 18S rRNA Genes. *Journal of Microbial Ecology* Vol. 53, 562-570 (2007)