

3. T-RFLP 法による食品中の菌叢解析に関する検討

食品技術科	○清水 健志
企画事業部	宮崎 俊一
研究開発部	吉岡 武也
バイオテクノロジー科	大坪 雅史

1. はじめに

イカ塩辛を代表とした熟成期間を要する食品では、品質の変化に微生物が関与することが良く知られている。しかしながら微生物種を特定するには、微生物を単離した後に様々な条件で培養し、形態的な特徴（コロニーの色や形状、細胞の形）と生理生化学的性状（生育温度・pH、栄養源となる糖の種類）について検査しなければならず、結果が出るまでに多くの日数を必要とする。

分子生物学の発展により DNA 分析を利用した様々な特定方法が開発されており、培養法を伴う検査法に比べて迅速性に優れることから多くの分析機関で利用されている。そのひとつである T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: 末端制限酵素断片長多型) 法では、複数種類の微生物を同時に推定できることから環境中や腸内の菌叢解析に利用されている。

そこで、本研究では食品中の菌叢解析を目的に、DNA 分析法のひとつである T-RFLP 法の利用について塩辛を例に検討したので報告する。

2. T-RFLP 法について

全ての微生物に共通して存在する遺伝子のひとつとしてリボソーム (rRNA) があり、微生物種により塩基配列が異なっている。通常の DNA 分析では、試料中から分離した一種類の微生物から DNA を抽出し、rRNA 遺伝子の塩基配列を解読して種類を特定する。一方、T-RFLP 法では、試料に含まれる複数の微生物を分離せずに DNA を一度に抽出した後、rRNA 遺伝子を蛍光色素で標識し、制限酵素で切断することで蛍光色素が付いている断片の長さの違いから種類を特定する。制限酵素は特定の塩基配列部位を切断する性質を持つ酵素である。例えば今回の研究で用いた *Sau3A I* という制限酵素は、塩基配列中の GATC の部分を認識して G の前で切断する。種類によって塩基配列中に存在する GATC 配列の場所が異なるため、微生物種由来の遺伝子を異なる長さの断片として検出することができる (図 1)。制限酵素は種類により切断する配列が異なるため、対象とする微生物種を特定するには、適切な酵素を選択することが重要となる。

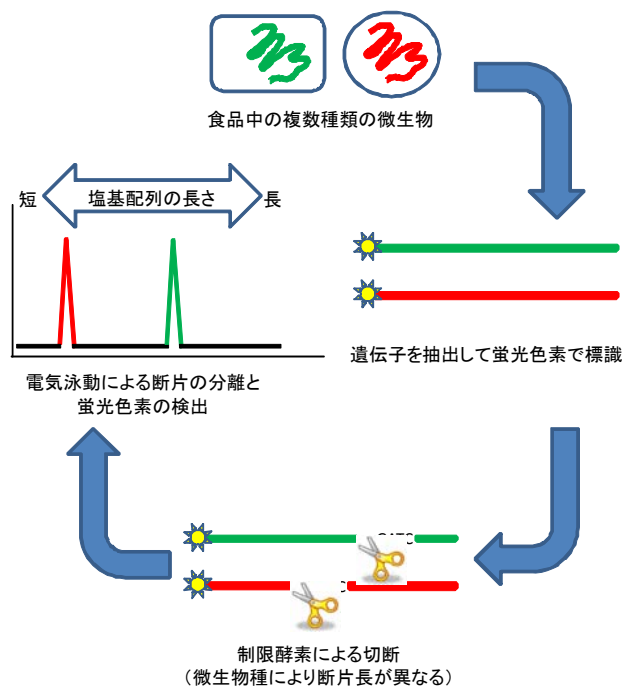


図 1 T-RFLP 法の原理

3. 実験方法

3.1 実験試料

函館市内で購入した地元企業のイカ塩辛製品及びリン酸緩衝液で 1/2 に希釈したイカ塩辛液をオートクレーブ滅菌し、グラム陰性菌である *Escherichia coli* とグラム陽性菌である *Staphylococcus epidermidis* をそれぞれ約 10^7 個/g となるように添加したモデル試料を用いた。

3.2 塩辛中の微生物

市販の塩辛製品について、3% NaCl 添加標準寒天培地を用いた塗抹培養法により出現した複数のコロニーを大きさや色調を指標に分類し、それぞれの 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を解読した後、公共の DNA データベースである GenBank とのホモロジー検索から微生物種の簡易同定を行った。

3.3 制限酵素の選択

塩辛に含まれる微生物種の検出に適した制限酵素を選択するため、文献等で塩辛からの分離の報告がある *Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属、*Acinetobacter* 属、*Moraxella* 属、*Vibrio* 属及び市販塩辛中で検出された *Kocuria* 属、*Tetragenococcus* 属を対象に、コンピュータ上で 16S rRNA 遺伝子の約 60 種の制限酵素での切断シミュレーションを行った。

3.4 T-RFLP 法による解析

E. coli 及び *S. epidermidis* を添加したモデル試料及び市販イカ塩辛を用い、市販の DNA 抽出キット (ISOIL for Beads Beating、(株)ニッポンジーン) により DNA を調製した後、蛍光標識プライマー (5'-TGCCAGCAGCCGCGTA-3' と 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') を用いた PCR により微生物由来の 16S rRNA 遺伝子の後半 (約 1,000 塩基) を増幅した。標識された 16S rRNA 遺伝子を精製後、制限酵素 *Sau3AI* により切断した後、DNA シーケンサーを用いて T-RFLP 法の解析を行った。

4 実験結果と考察

4.1 DNA 分析による塩辛中の微生物種の同定

市販の塩辛から検出された 3% NaCl 添加標準寒天培地上のコロニーについて DNA 分析による簡易同定を行った結果、選択したコロニーの多くは *Staphylococcus* 属と *Kocuria* 属に分類される微生物であった。その他、耐塩性の乳酸菌である *Tetragenococcus* 属が検出された (図 2)。コロニーの大きさと色調を指標に異なるものを選択したが、DNA 分析による同定結果との相関が見られなかったことから、コロニーの外観から種類を特定するのは難しいと考えられた。

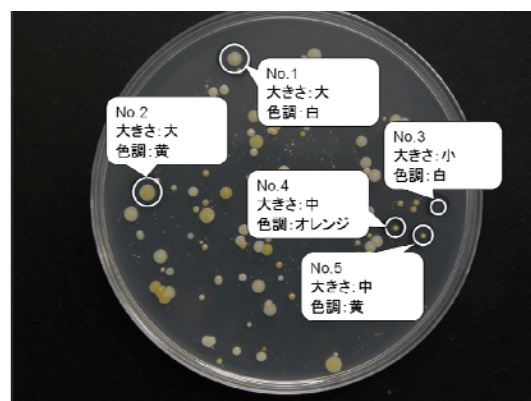


図 2 塩辛中のコロニーの同定結果

1、2 : *Staphylococcus* 属、3 : *Tetragenococcus* 属、
4、5 : *Kocuria* 属

4.2 制限酵素の選択

コンピュータシミュレーションの結果、制限酵素 *Sau3AI* を使用するとグラム陰性菌である *Acinetobacter* 属、*Moraxella* 属、*Vibrio* 属は全て約 190 塩基の長さに切断されてしまうが、グラム陽性菌である *Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属、*Kocuria* 属、*Tetragenococcus* 属は比較的良好に識別できることが分かった。

4.3 T-RFLP 法による塩辛中の菌叢解析

E. coli 及び *S. epidermidis* を添加したモデル試料を T-RFLP 法で解析した結果、*E. coli* 及び *S. epidermidis* 由来の断片と思われる約 189 塩基と約 259 塩基のピークが検出された。

また、市販塩辛の解析では、菌数の少ない試料 (10^3 個/g 以下) では該当する微生物種が不明な複数のピークが検出される傾向が見られたが、 10^4 個/g 以上の試料では *Tetragenococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Kocuria* 属、グラム陰性菌と推定されるピークが検出されたことから、塩辛中の微生物叢の解析が可能と考えられた (図 3)。



図 3 T-RFLP 法による市販塩辛中の菌叢解析結果

4. まとめ

本研究により、比較的菌数の多い塩辛について微生物叢を構成する主要な微生物種を特定できる T-RFLP 法の基礎的な条件は構築できたと考えられた。微生物種の識別感度の向上や他の食品への適応などの課題は残っているが、今後、食品の品質変化 (発酵・熟成・腐敗) に関与する微生物種の探索などへ利用し、地域食品の高品質化に繋がりたいと考えている。