

発表番号 30

食塩および塩食品中における好塩菌コンタミネーション検出法の確立

寺東 宏明

広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻

①研究目的

海水から生産される天日塩やそれを利用した塩蔵品には多数の好塩菌が含まれていることが知られている。自然食品ブームおよび塩製品の輸入自由化により、国内外の自然塩を食する機会が増えた今日、塩製品の食品衛生および保存管理において、混入する好塩菌の検出は極めて重要な課題である。本研究では塩製品中の好塩菌の検出法としてポリメラーゼチェーンリアクション (Polymerase Chain Reaction : PCR) 法をベースにした迅速・簡便な方法を確立することを目的に検討を行った。

②結果と考察

(1)好塩菌特有な挿入配列 (Insertion Sequence of Halophile : ISH) による PCR 検出法の検討

Halobacterium sp. NRC-1 のゲノム中には 12 種類の ISH が存在しており、これらを標的遺伝子として *Halobacterium* sp. NRC-1、*H. salinarum*、*Escherichia coli* K-12、*Deinococcus radiodurans* の染色体 DNA をテンプレートに PCR を行った。まず、これまで詳細な報告がなされている ISH2、ISH3、ISH8 について検討を行ったところ、ISH2F1-R1、ISH8F1-R1、ISH2LC-RC のプライマーセットによる PCR で好塩菌特異的な増幅が認められたことから、これらのプライマーセットを用いた PCR により好塩菌の特異的な検出ができることが分かった。また ISH1、ISH4、ISH6、ISH10、ISH11 でも好塩菌特異的な増幅バンドが検出され、特異的検出における標的遺伝子の候補であることが分かった。

(2)特有な構造遺伝子配列からのプライマー探索と PCR 条件の検討

DNA 修復活性は、生命維持において根源的なものであり、それにかかわるタンパク質をコードする遺伝子は幅広い生物種で保存されている。酸化塩基損傷を除去する OGG タンパク質は古細菌と真核生物にのみ存在する酵素であることから、原核生物との分離同定の指標となる。そこで *Halobacterium* sp. NRC-1 染色体 DNA より、本遺伝子をクローニングし、PCR 検出法に利用できるかどうかを検討した。

(3)塩混入 PCR のための好塩菌 DNA ポリメラーゼの探索と活性条件検討

実際の検出では塩製品をサンプルとして直接 PCR にかけることから、高塩濃度条件下で機能することができる DNA ポリメラーゼが必要となる。そこで、まず市販の PCR 用 DNA ポリメラーゼがどの程度の塩濃度まで活性をもつかを検討した。その結果、100 mM の塩濃度ですでに増幅能が消失した。現在、高塩濃度で機能する DNA ポリメラーゼのクローニングと PCR 反応に用いるサンプル塩濃度を下げる方法の検討を行っている。

18

助成番号 0249

食塩および塩食品中における好塩菌コンタミネーション
検出法の確立

寺東 宏明 (広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻)

①研究目的

海水から生産される天日塩やそれを利用した塩蔵品には多数の好塩菌が含まれていることが知られている。また岩塩中にも好塩菌が存在していることが報告されている (1)。自然食品ブームおよび塩製品の輸入自由化により、国内外の自然塩を食する機会が増えた今日、塩製品の食品衛生および保存管理において、混入する好塩菌の検出は極めて重要な課題である。天日塩 1 g には 10^3 - 10^5 個の好塩菌が含まれるが、その多くが高度好塩性細菌 *Halobacterium* 属である (2)。*Halobacterium* は細胞中に多量のカロチノイドを含有し赤い色を呈することから、古くは肉眼で赤い色を確認することから始まり、近年では、好塩菌特異的な膜脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography : TLC) 分析により検出することで、その混入を確認する方法がとられてきた (2)。しかし、これらの方法は確実な方法とはいえ、いずれもサンプル中にある程度大量の細胞数が存在しなければできない方法であり、塩類中に微量に存在する混入菌を検出するには、その試料から単離・培養する必要があり、時間と手間がかかるという難点がある。近年、目的の DNA 配列を増幅するポリメラーゼチェーンリアクション (Polymerase Chain Reaction : PCR) 法が確立し、医療や食品工業の分野において、感染また混入微生物の簡便な検出法として用いられてきている。特に食中毒で注意が必要な大腸菌 (*Escherichia coli*) O157 株や腸炎ビブリオ等の細菌種に関しては検出キットが市販され、すでに応用されている。このように PCR 法は微量なサンプルから DNA を増幅・検出することができる有用なツールである。そこで、本研究では塩製品中の好塩菌の検出法として PCR 法をベースにした迅速・簡便な方法を確立することを目的に検討を行っていく。

②研究方法

材料としては天日塩に混入する率が最も高く、かつ全ゲノム配列が公表されていて (3)、PCR 法で特異的に増幅させる標的配列を探索するのに有利な *Halobacterium salinarum* を用い、以下の3項目について検討を行うこととした。

(1)好塩菌特有な挿入配列 (Insertion Sequence of Halophile : ISH) による PCR 検出法の検討

公表された *Halobacterium* sp. NRC-1 株の全ゲノム配列データによると、そのゲノム中には 12 種類の ISH が散在している。これらの配列を標的遺伝子としてプライマーを設計し、PCR を行う。PCR 産物はサンプル中、すなわちゲノム中の ISH の存在比に応じた DNA

断片として、検出することができ、混入菌の識別に利用できる。よってこれら ISH に基づいたプライマーを各種設計して PCR を行い、好塩菌の検出と同定の可能性を探る。

(2) 特有な構造遺伝子配列からのプライマー探索と PCR 条件の検討

好塩菌特有の形質は、その活性を担う酵素タンパク質の一次構造、すなわち遺伝子配列に由来する。そこで好塩菌特有タンパク質の遺伝子配列から本種 DNA だけを特異的に増幅する配列を探索する。そして、それに基づいたプライマーを設計し、PCR 法による好塩菌の検出と同定の手段を検討する。用いる配列は全ゲノム配列から適当なものをピックアップするが、候補配列として好塩菌の特徴であるカロチノイド生合成系の HMG-CoA レダクターゼ遺伝子や、古細菌に特徴的なクエン酸回路の酵素である 2-オキソ酸フェレドキシンオキシドレダクターゼがあげられる。また同じ古細菌であるメタン細菌には特徴的なシグネチャー配列があるとされており、分類に利用できることが知られていることから (4)、好塩菌のシグネチャー配列も合わせて検討し、より適当な PCR プライマーを設計する。また(1)と(2)については、定量的 PCR の方法についても検討し、混入した細菌数の推定法についても考察する。

(3) 塩混入 PCR のための好塩菌 DNA ポリメラーゼの探索と活性条件検討

塩製品からの PCR では、塩が存在する条件下で DNA ポリメラーゼが働く必要があるが、その場合、あまり塩濃度が高いと活性が出なかったり、活性が出たとしても正確性が損なわれたりする可能性がある。好塩菌由来の DNA ポリメラーゼであれば、モラーレベルの塩濃度での DNA 複製活性が期待できる。そこで polA1、polB1、polC 等の DNA ポリメラーゼ候補遺伝子をクローニングし、その活性を検討し、検出への応用をはかる。

③ 研究結果

(1) 好塩菌特有な挿入配列 (Insertion Sequence of Halophile : ISH) による PCR 検出法の検討

公表された全ゲノム配列によれば 12 種類の ISH が存在する (Table 1) (3)。

Table 1: Insertion Sequence of *Halobacterium* sp. NRC-1

Insertion Sequence	Size (bp)	Accession Number
ISH1	1118	J01725
ISH2	520	J01726
ISH3	1389	NC_002607
ISH4	1004	NC_001869
ISH6	1448	NC_002607
ISH7	3303	NC_001869
ISH8	1402	NC_001869
ISH9	938	NC_001869
ISH10	1584	NC_001869
ISH11	1068	NC_001869
ISH12	1899	NC_002607
ISH28	938	U42220

このうち、ISH2、ISH3、ISH8 については、古くから検討が行われており、特異的なプラ

イマーが報告されている (5)。そこで、最初にこの 3 種の ISH について検討を行った。プライマーは文献 5 で用いられている ISH 内部の配列を用いたものと、それぞれの ISH の DNA 配列から 5'端および 3'端 20 mer のものをホスホルアミダイト法により作製した (Table 2)。これらのプライマーを用いて PCR を行った。

Table 2: Primers of PCR for ISHs

Primer	Sequence
ISH2F1	5'-CATTTCGTCTTTAGTTAAGAA
ISH2R1	5'-CATTTCGTCTTTAGTTAAGAG
ISH3F1	5'-AGTACCTCACAAAGCATCGC
ISH3R1	5'-TCAGTACATCACAAAGCCGC
ISH8F1	5'-CATCCGTCTTTAGTTAAGCG
ISH8R1	5'-CATTTCGTCTTCAGTTAAGAC
ISH2LC*	5'-GGCTGAGATCTCTTT
ISH2RC*	5'-GTAGGGCTGAACAGT
ISH3-1C*	5'-GGTGGCCGGTTCGCG
ISH3-2C*	5'-ACCAGCTCCTTAACT
ISH8-1C*	5'-TACACTGTTTCCCTC
ISH8-2C*	5'-TGCTTGTGGATCTTT
ISH1F1	5'-TGCCTTGTTTTGCCACCGAT
ISH1R1	5'-TGCCTCGTTGAATCACAAAGA
ISH4F1	5'-CGCTCTTGTGGCGGAGATTG
ISH4R1	5'-CGCTCTTGGGTAGAGGATTG
ISH6F1	5'-TGGTCGTGTCGCAAAGCGGT
ISH6R1	5'-GTCGCGTCGCAAAGCGGTCT
ISH7F1	5'-GCTGATGTTGCGAAGATAGG
ISH7R1	5'-GACGTGTTGCGAAGATAGGG
ISH9F1	5'-GGCTCTGGTGAATCGCTGGA
ISH9R1	5'-GGCTCTGGTGAATCGCCAGA
ISH10F1	5'-TACGTGTTTAGCCCCAGTGA
ISH10R1	5'-GGTACGTGTTTACCCCGAGG
ISH11F1	5'-GAGGGTGTTCATAGAACGAGT
ISH11R1	5'-GAGGGTGTTCATAGAAGTCTT
ISH12F1	5'-TATCTTGATTCAGCGAGAGA
ISH12R1	5'-AGTGACATCCTCCGCGCCGT
ISH28F1	5'-GGCTCTGGTGAATCGCTGGA
ISH28R1	5'-GGCTCTGGTGAATCGCCAGA

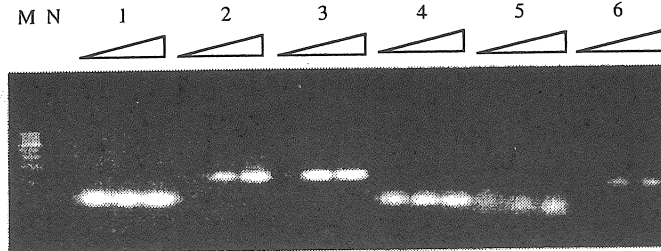
* Sequence from Ref. 5

PCR は、テンプレート DNA として *Halobacterium* sp. NRC-1 染色体 DNA を 0.5、5、50 ng、プライマーは 5'端および 3'端のものをそれぞれ 20 pmol ずつ、PCR 酵素 (AmpilTaq Gold : Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を 2.5 U 加え、1.9 mM MgCl₂ を含む添付反応溶液中 (全容 20 μl) で、95°C、15 分の酵素活性化の後、95°C、30 sec、59°C、30 sec、72°C、30 sec のサイクルを 40 回という条件で行った。PCR 産物は 1/5 容の 6×loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid, 40% sucrose) を加えて反応を停止させた後、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離、エチジウムブロマイド染色後、ゲル撮影装置 (FAS II、東洋紡、東京、日本) で解析を行った。*Halobacterium* sp. NRC-1 染色体 DNA は、本種菌株を Japan Collection of Microorganisms (JCM) より入手、JCM#168 培地により液体培養した本種から、私が *H. salinarum* 染色体 DNA を抽出・精製

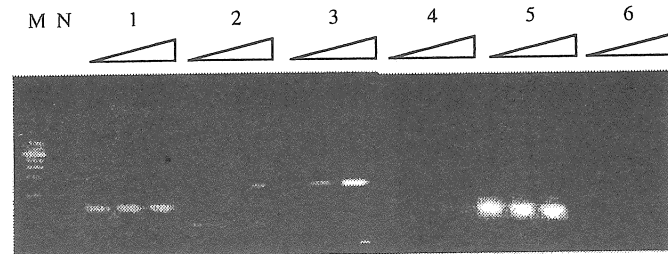
した既出の方法で抽出・精製を行った (6)。

その結果、それぞれ強弱はあるものの全てのプライマーセットにおいて増幅バンドが認められた (Fig. 1A)。バンドの強弱は ISH のシーケンスおよびゲノム中のコピー数に原

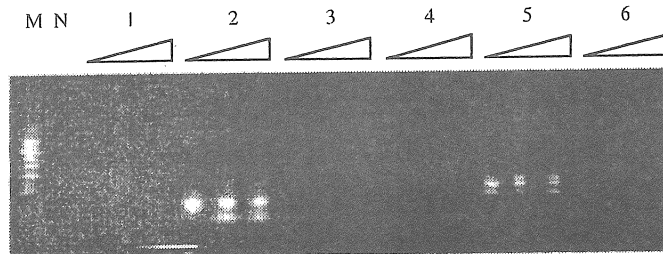
A, DNA of *Halobacterium* sp. NRC-1



B, DNA of *H. salinarum*



C, DNA of *E. coli* K-12



D, DNA of *Deinococcus radiodurans*

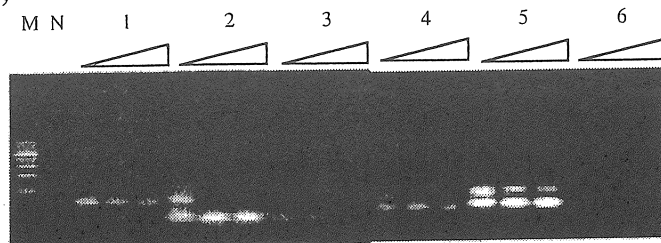


Figure 1: Agarose gel electrophoreses of PCR products. M, molecular marker (10k, 9k, 8k, 7k, 6k, 5k (intense), 4k, 3k, 2k and 1kpbs); N, no template; 1, ISH2F1-R1; 2, ISH3F1-R1; 3, ISH8F1-R1; 4, ISH2LC-RC; 5, ISH3-1C-2C; 6 ISH8-1C-2C. See the details in text.

因があるものと考えられる。PCR での検出では、他種細菌が同様に検出されてくることは避けなければならない。そこで好塩菌以外の細菌の染色体 DNA を用いて、PCR を行った。それぞれ *H. salinarum*、*E. coli* K-12、*Deinococcus radiodurans* を常法通り培養、集菌し、染色体 DNA を抽出・精製した。PCR の結果、*E. coli* K-12 株の染色体がテンプレートの時、ISH3F1-R1 および ISH3-1C-2C をプライマーセットとして用いた場合に増幅バンドが認められた (Fig. 1C)。しかし、*Halobacterium* sp. NRC-1 染色体を用いた場合と比較して、増幅バンドのサイズが異なり、また複数のバンドが出現していることから、容易に識別できることが分かった。またこのようなシグナルの弱い多数のバンドが出現する特徴は特異的な増幅に由来するものではないことを示唆している。また放射線耐性菌 *D. radiodurans* の染色体を用いた場合、弱いシグナルながらも ISH2F1-R1 と ISH3-1C-2C をプライマーセットで使ったときに、*Halobacterium* sp. NRC-1 染色体と同サイズのバンドが検出された。このことは *Halobacterium* 属と *Deinococcus* 属との分類関係の高さを示唆していて興味深い。

さらに、同じ *Halobacterium* 属の *H. salinarum* の染色体を用いて、検討を行ってみた。*Halobacterium* sp. NRC-1 株は、現在、分類学的な検討から *H. salinarum* および *H. halobium* と同種と考えられていることから (7)、同様なパターンで増幅バンドが観察されると予想していた。しかし、ISH8-1C-2C では増幅バンドが認められず、その他のプライマーセットにおいても同じサイズの増幅バンドが検出されたものの、そのシグナルは極めて弱いものであった (Fig. 1B)。このことは ISH の移動性の高さと、それによるゲノムの攪乱が極めて高頻度に行っており、(地球的規模の生育区域や各ラボにおいて) 隔離された *H. salinarum* の種内の多様化を考えるうえで興味深い。

以上の結果をまとめると今回用いたプライマーセットのうち好塩菌特異的な増幅を見せたものは ISH2F1-R1、ISH8F1-R1、ISH2LC-RC であった (Table 3)。またその他のものも増幅バンドのサイズによる識別が可能と考えられた。

Table 3: Amount of PCR products with each primer sets

Primer set	<i>H. sp.</i> NRC-1	<i>H. salinarum</i>	<i>E. coli</i> K-12	<i>D. radiodurans</i>
ISH2F1-R1	+++	+++	-	+
ISH3F1-R1	++	+	+	++*
ISH8F1-R1	++	+++	-	+
ISH2LC-RC	+++	+	-	+
ISH3-1C-2C	++	+++	+	++*
ISH8-1C-2C	+	-	-	-

*The PCR products showed different size to that of Halophiles.

Halobacterium sp. NRC-1 株に存在する残りの ISH を同様に増幅させたところ、ISH1、ISH4、ISH6、ISH10、ISH11 で特異的な増幅バンドが検出されたが、ISH7、ISH9、ISH12、ISH28 では増幅バンドサイズが目的のものとは異なり、特異的な増幅ではないことが分かった (Fig.

2)。現在、他種染色体 DNA をテンプレートに PCR を行っており、*E. coli* k-12 染色体を用いた結果では、いずれも特異的な増幅は認められなかったことから、この中にも好塩菌特異的な増幅を見せる候補が存在することが期待される (data not shown)。

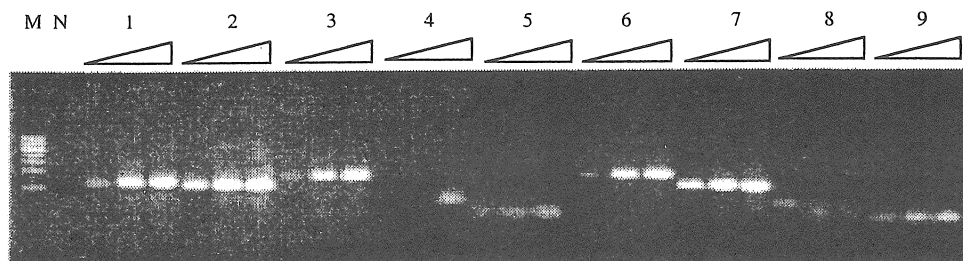


Figure 2: Agarose gel electrophoreses of PCR products. M, molecular marker (10k, 9k, 8k, 7k, 6k, 5k (intense), 4k, 3k, 2k and 1kbps); N, no template; 1, ISH1F1-R1; 2, ISH4F1-R1; 3, ISH6F1-R1; 4, ISH7F1-R1; 5, ISH9F1-R1; 6, ISH10F1-R1; 7, ISH11F1-R1; 8, ISH12F1-R1; 9, ISH28F1-R1. See the deta text.

(2) 特有な構造遺伝子配列からのプライマー探索と PCR 条件の検討

遺伝情報を担う DNA 分子は、不断に損傷を受けており、生物は、一方でその損傷を常に除去し、遺伝情報を正確に保ちながら生存している。故に、この損傷除去と DNA 構造の正確な維持にかかわる活性は、生命維持において根源的なものであり、それにかかわるタンパク質や酵素をコードする遺伝子は幅広い生物種で保存されている。DNA 損傷の中でも酸化塩基損傷は、好気的環境で生育する生物では免れえないものであり、これら損傷は主として塩基除去修復経路で修復される (8)。この塩基除去修復経路の最初のステップで働く DNA グリコシラーゼは損傷塩基を糖から切除する活性をもつが、損傷に対する特異性が極めて高い (Table 4)。

Table 4: DNA-N glycosylases for oxidative base damage

Activity	Archea	Prokaryote	Eukaryote
Oxidative purines	OGG*	Fpg [§]	OGG*
Oxidative pyrimidines	Endo III	Endo III, Endo VIII	NTH [#] , NEIL ⁺

*OGG: 8-oxoguanine glycosylase, [§]Fpg: Fapy guanine glycosylase,

[#]NTH: endo III like protein, ⁺NEIL: endo VIII like protein

これらの DNA グリコシラーゼはホモロジーの面から見ると、また違った様相を見せる。*Halobacterium* が属する古細菌では、酸化プリン損傷を OGG が除去するが、これは原核生

物よりも真核生物に近い特徴である。OGG はホモロジー的には endonuclease III (Endo III) に近いタンパク質であり、原核生物の酸化プリン損傷除去酵素である Fpg とはグループが異なる。このことは OGG をプローブに検出を行うことにより、原核生物ではなく、古細菌すなわち *Halobacterium* の特異的な検出が可能となることを意味する。そこで、公開されている *Halobacterium* sp. NRC-1 の全ゲノムシーケンスから酸化塩基損傷除去にかかわる DNA グリコシラーゼの候補遺伝子を抽出したところ、OGG、NthA1、NthA2、NthB という 4 種類の遺伝子が見いだされた (Table 5)。そこで、これらの遺伝子の 5 端および 3 端を含むプライマーを数種類設計し、PCR クローニングを試みた。PCR の条件は実験(1)に準じた。得られたクローンの DNA 配列を検討した結果、NthA2 遺伝子を単離できた。そこで NthA2 遺伝子を含む DNA 断片を pGEX4T1 発現ベクター (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) に挿入し、発現用宿主 *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI, USA) にトランスフォームし、様々な誘導条件でタンパク質の発現を検討したが、現在のところ、発現をみるに至っていない。この理由は、好塩性細菌由来のタンパク質は、高い塩濃度を活性維持および構造安定に必要とするためではないかと考えられる (9)。現在、更なる条件検討を行っている。他の 3 種類の遺伝子については、1 個あるいは複数個の点突然変異の入ったクローンしか得られていない (data not shown)。これについても、現在、複製時の正確度のより高いポリメラーゼ GeneAmp High Fidelity enzyme (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) に換えて検討を行っている。また、興味深いことに *H. salinarum* 染色体を使った増幅は *Halobacterium* sp. NRC-1 染色体を用いた場合とは異なっていた (data not shown)。このことは、先の ISH の増幅の違いとも合わせて、両者の遺伝的相違がかなり大きなものであり、さらなる分類学的検討が必要であることを示唆している。

Table 5: DNA-N glycosylases for oxidative base damage of *Halobacterium* sp. NRC-1

Enzyme	Size (AA)	Accession Number	Comment
NthA1	265	AAG18952	Endonuclease III like protein
NthA2	227	AAG19103	Endonuclease III like protein
NthB	138	NP_279703	Endonuclease III like protein
OGG	301	AAG19622	8-oxoguanine glycosylase like protein

(3) 塩混入 PCR のための好塩菌 DNA ポリメラーゼの探索と活性条件検討

実際の検出では天然塩およびそれを使った塩製品をサンプルとして直接 PCR にかけることになる。そこで、高塩濃度条件下で機能することができる DNA ポリメラーゼが必要となる。その最初の検討として、市販の PCR 用 DNA ポリメラーゼがどの程度の塩濃度まで活性をもつかを検討した。実験方法は(1)と同様に行い、テンプレートは *Halobacterium* sp. NRC-1 染色体 DNA 50 ng を、プライマーセットは(1)で最も特異的バンドが多く認められた ISH2F1-R1 を用い、反応溶液中に 0、100、250、500、1000、2000 mM の NaCl が存

在する条件で PCR を行った。その結果、100 mM の塩濃度ですでに増幅バンドが消失した (Fig. 3)。このことは市販の PCR 用 DNA ポリメラーゼは塩濃度に対する感受性が高く、このままでは検出に利用できないことが分かった。現在、(2)と同様の手法で *Halobacterium* sp. NRC-1 染色体 DNA より、DNA ポリメラーゼのクローニングを行うとともに、サンプル塩濃度を下げる方法を検討している。

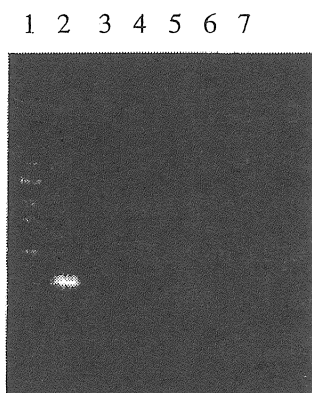


Figure 3: PCR products of *Halobacterium* sp. 1 by ISH2F-R1 with NaCl. 1, molecular marker without NaCl; 3, 100 mM NaCl; 4, 250 mM NaCl; 5, 500 mM NaCl; 6, 1 M NaCl; 7, 2 M NaCl.

④考察

本研究では、塩専売の廃止と消費者の天然素材志向により増加傾向にある天然塩およびそれを用いた塩蔵品中に混在する好塩菌の高感度検出法の確立を目的に、PCR 法をベースとして、様々な検討を行った。実験(1)により、*Halobacterium* sp. NRC-1 ゲノム DNA 中に散在する ISH の増幅を指標に好塩菌特異的な検出が可能であることが分かった。また、いくつかの ISH 増幅プライマーを用いた PCR では、サイズや増幅感度は異なるものの、好塩菌以外の DNA でも増幅バンドが認められた。このことは、ISH の検討により、分類学的な情報も得られることを示している。実験(2)においては ISH 以外に指標となる遺伝子配列を検討し、①1000 bp 以下のサイズで容易に増幅できること、②高度好塩性細菌が属する古細菌特異的な遺伝子であること、③ハウスキーピングな遺伝子で古細菌中で幅広い分布が期待されること等の観点から、DNA 修復酵素の一つである OGG (8-oxoguanine glycosylase) を候補遺伝子として単離することを目的に検討を行ったが、完全な遺伝子を含む断片を得ることはできなかった。これは GC 含量等の問題により、うまく増幅ができなかったものと考えられる。実験(3)では、塩製品特異的な PCR 用 DNA ポリメラーゼの単離を最終目的に、まず市販の PCR 用 DNA ポリメラーゼの塩濃度感受性を検討したが、今回用いた AmpliTaq Gold は 100 mM の塩濃度で、すでに増幅を行えないことが分かった。

以上、すべての結果をまとめると ISH を標的遺伝子として PCR 法による好塩菌混入の検出方法が、実用化できることを示している。しかし、実用化には、高塩濃度存在下で PCR 反応が進む条件を見つける等、解決しなければならない問題もある。今後は、実用化に向けての検討を進めていく予定である。

⑤今後の課題

本研究では、好塩菌染色体 DNA をテンプレートとして用いた PCR により、好塩菌特異的な増幅生成物の検出ができることを示した。しかし、実際には塩製品を直接サンプルとして PCR 反応にかけ増幅生成物を検出しなければならない。そこで、これからの検討課題として以下のような項目があげられる。

(1)直接 PCR における必要細胞数の検討

今回の研究では、単離精製した染色体 DNA による検討しか行っていない。今後は、細胞そのもの、好塩菌を混入させた塩製品をサンプルとして用いて、どの程度の細胞数、またどの程度のサンプル量があれば検出に耐えうるのかを検討しなければならない。

(2)よりよい検出のための PCR 条件の検討

また、今回は1種類の DNA ポリメラーゼを使った一定の条件でしか比較をしていない。他の DNA ポリメラーゼや、温度条件等の変更により、より特異的な増幅が得られる可能性はまだ残っている。これらの条件検討も今後の課題である。

(3)高塩濃度耐性 DNA ポリメラーゼ

今回用いた AmpliTaq Gold は 100 mM NaCl で増幅能を失った。そこで塩製品を直接サンプルとして用いる場合は、その塩濃度に耐えうる DNA ポリメラーゼが必要となる。このポリメラーゼは、やはり好塩菌がもっている可能性が高く、そのクローニングと調製法の確立が求められる。また PCR では高温に対する耐性が必須であり、これら二つの条件を満たした酵素が必要である。

(4)サンプル塩濃度を低下させる方策

他方、PCR 反応液中の塩濃度を下げる方法も考えられる。一つは微量なサンプルで増幅するようになれば、反応液全体に持ち込む塩の量が減少し、塩濃度の低下につながる。そこでより高感度な検出条件を得ることが必要となる。また PCR 反応前に微量サンプルから、サンプルをロスせずに塩だけを除去する方法も検討する必要がある。

⑥文献等

1. Norton, C. F. and Grant, W. D., *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1365-1373 (1988)
2. 古賀洋介、亀倉正博編、"古細菌の生物学"、pp. 61-75、東京大学出版会 (1998)
3. Ng, W. V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12176-12181 (2000)
4. Graham, D. E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3304-3308 (2000)

5. Ng, W. *et al.*, *Syst Appl. Microbiol.*, **16**, 459-577 (1994)
6. Schamohammadi *et al.*, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **37**, 163-164 (1997)
7. Ventosa, A. and Oren, A., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 347 (1996)
8. Friedberg E. *et al.*, "DNA repair and mutagenesis", pp. 135-190, ASM Press (1995)
9. 増井正幹 他編、"好塩微生物"、pp. 216-237、医歯薬出版 (1979)

⑦謝辞

D. radiodurans は斉藤毅博士 (現京都大学) から供与いただいた。井出博教授をはじめとする広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻遺伝子化学研究グループのメンバー各位には、本研究の遂行に対し、様々なサポートをしていただいた。ここに感謝の意を表す。

Highly sensitive and easy procedure to detect contaminated halophiles in food products containing natural salt by polymerase chain reaction

Hiroaki Terato

Department of Mathematical and Life Sciences, School of Science, Hiroshima University

Summary

Since the trade of salt has become free competition until 1997 in our country, we can eat many kinds of domestic and imported food products made by natural salts (including itself). Most of natural salts contain contaminated microorganisms, especially halophiles. From ancient, the reddish color of the products has indicated contaminants, because most of halophiles contain carotenoids in the cells. Also, specific membrane-lipids have been utilized to detect the halophiles in food materials by thin-layer-chromatography. These conventional procedures are still reliable, however they also require both relative large amount of the cells in the material and long time-investigation to obtain result. In this study, I tried to establish the highly sensitive and easy procedure to detect contaminated halophiles in food products containing natural salt based on polymerase chain reaction (PCR).

The whole genome sequence of *Halobacterium* sp. NRC-1 was published in 2000 (*PNAS*, **97**, 12176-12181, 2000). The genome of this organism contains unique insertion sequences (insertion sequence of halophile, ISH) in the genome wide. There are twelve ISHs in the genome (ISH1, ISH2, ISH3, ISH4, ISH6, ISH7, ISH8, ISH9, ISH10, ISH11, ISH12 and ISH28). Since the three ones (ISH2, ISH3 and ISH8) of twelve ISHs have been well studied (*Syst. Appl. Microbiol.*, **16**, 560-568, 1994), the three was tried first for PCR. Two different primer sets were used for each ISH amplification with the purified chromosomal DNA of *Halobacterium* sp. NRC-1, *H. salinarum*, *Escherichia coli* K-12 and *Deinococcus radiodurans*. Between the six primer sets, ISH2F1-R1, ISH8F1-R1 and ISH2LC-RC showed specific amplification of only halophiles. Also, ISH1, ISH4, ISH6, ISH10 and ISH11 were amplified from the chromosomal DNA of *Halobacterium* sp. NRC-1. Thus, ISHs seem to be utilized to detect contaminated halophiles specifically. Additionally, I studied to utilize the sequence of archaeal specific DNA repair enzyme for the detection, and PCR under the high salt condition.

Table 1: Amount of PCR products with each primer set

Primer set	<i>H. sp.</i> NRC-1	<i>H. salinarum</i>	<i>E. coli</i> K-12	<i>D. radiodurans</i>
ISH2F1-R1	+++	+++	-	+
ISH3F1-R1	++	+	+	++*
ISH8F1-R1	++	+++	-	+
ISH2LC-RC	+++	+	-	+
ISH3-1C-2C	++	+++	+	++*
ISH8-1C-2C	+	-	-	-

*The PCR products showed different size to that of Halophiles.