

829

発光遺伝子を利用した環境変異原の簡便・迅速・高感度検出法 (豊田中研) ○平井正名、今枝孝夫

【目的】環境変異原を検出する多くの手法が開発されている。Amesテストが有名で広く採用されているが、より迅速で低コストの手法が求められている。この目的で、SOS応答による β -ガラクトシダーゼの誘導合成を指標とした新手法（SOSクロモテスト、*umu*テスト）が開発された。我々は、*umu*テストをより簡便・迅速・高感度化することを目的として、レポーターを発光遺伝子とした検出法を開発したので報告する。

【方法】ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子をプラスミドpSK1002の*umuD,C*遺伝子の下流に連結した。本プラスミドで*Salmonella typhimurium* TA1535を形質転換し、形質転換株TL119を得た。発光細菌*Vibrio fischeri*由来の発光遺伝子群*luxA-E*を用い、同様の操作で形質転換株TL210を得た。形質転換株の培養液と各種変異原を2時間反応させ、フォトンカウンターにより発光量を測定した。

【結果】TL119では、変異原と反応後、細胞溶解剤および発光基質を添加することによって、変異原濃度に依存した発光が認められた。発光遺伝子群*luxA-E*にはルシフェラーゼ以外に発光基質を再生するための脂肪酸レダクターゼがコードされている。TL210では、発光基質や細胞溶解剤の添加は必要とせず、変異原と反応させるだけで変異原濃度に依存した安定な発光が認められた。TL210を用いる方法は、*umu*テストより簡便・迅速に変異原を定量することが可能であり、発光試薬等の添加の必要もなくコスト的にも優れている。5種類の代表的な変異原を用い、*umu*テストと感度を比較した結果、発光検出法では最少検出濃度（検体無添加時の2倍のレスポンスを示す検体濃度）が4~29倍低くなり、高感度検出が可能であった。

A simple, rapid and sensitive detection system for environmental mutagens involving bioluminescence assay using luciferase genes.

○Masana Hirai, Takao Imaeda (Toyota Central R&D Labs., Inc.)

【Key Words】bioluminescence, luciferase, *luxA-E*, mutagen, SOS response

830

土壌からのDNAの回収方法ならびにPCRを用いた特定菌の検出 (キヤノン中研) ○矢野哲哉、川口正浩

【目的】土壌中に外来菌を導入し、有害物質の分解・浄化を行っていくためには、導入した外来菌の動態把握、さらにはパブリックアクセプタンスの観点からの導入菌の生残性のトレースが重要な課題となる。特定菌の把握のための技術としては、土壌よりDNAを回収し、PCRを用いて特定菌の遺伝子断片を検出する手法がひろく研究されている。しかしながら多くの土壌において、DNAの回収そのものが困難であったり、回収されたDNAの純度が低いものであったりして、PCRの検出能力を十分に活かしていないのが現状である。本発表は、土壌の種類によらない高効率で再現性のあるDNA回収方法の提供と、本手法により回収されたDNAを用いた特定菌のPCR検出について検討を行うことを目的とする。

【方法および結果】各種土壌試料について、1) RNAを添加してから溶菌処理、2) 通常の溶菌処理、を行い、直接法によりDNAを回収した。DNA量をアガロースゲル電気泳動・エチジウムブロマイド(EB)染色により比較したところ、2)法では有機物含量の比較的高い試料でのみDNAの回収が可能であったが、1)法ではすべての試料においてDNAの回収を確認できた。さらにTCE分解菌をモデルとして、DNAの回収とPCRを用いた検出について検討した。段階的に希釈した*Pseudomonas cepacia* KK01を砂(佐原通し砂)に加え、DNA回収用の試料とした。RNAを加えたものについては、約 10^6 菌体からのDNAの回収を確認できた(EBの可視限界)のに対し、対照では約 10^8 菌体からの回収においてようやくDNAの回収が確認できるとどまった。これらの回収DNAを用いてPCRによりKK01の検出を行ったところ、RNAを加えたものについては約 10 菌体まで、対照では約 10^8 菌体において検出が可能であった。

Novel DNA extraction method from soil and detection of the target strain with PCR

○Tetsuya Yano, Masahiro Kawaguchi (Canon Research Center)

【Key Words】DNA extraction, soil, bio remediation, PCR, RNA, *P. cepacia* KK01