

T-RFLP法による複合微生物群集解析方法の開発

バイオ応用室 岡 千寿, 飯嶋 直人

Development of Evaluation for Molecular Identification of Bacteria Based on T-RFLP Analysis

Chitoshi OKA and Naoto IJIMA

食酢製造における、木桶もろみと玄米酢もろみをT-RFLP法により解析した。木桶もろみは開放系にもかかわらず、極めて純粋培養に近く、*A. pasteurianus* が主要な菌種であった。

一方、玄米酢もろみでは *A. pasteurianus* の他に、*L. acetotolerans* が発酵の初期から中期にかけて旺盛に活動してしていることが明らかとなった。さらに、16S-23S ITS 領域の塩基配列のわずかな違いを利用して菌株レベルでの解析を行い、玄米酢もろみでは、木桶もろみとは異なる *A. pasteurianus* の菌株が存在していることがわかった。

1. はじめに

T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法は、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法とともに複雑な微生物菌相の解析に用いられ、微生物の16S rRNA遺伝子等の塩基配列の違いを利用して微生物群集の多様性、優先種の変遷などを比較的簡便に把握することができる方法である。

このT-RFLP法を用いて食酢の静置発酵中での微生物の変遷について解析を行い、木桶もろみと玄米酢もろみの微生物菌相について解析した結果を報告する。

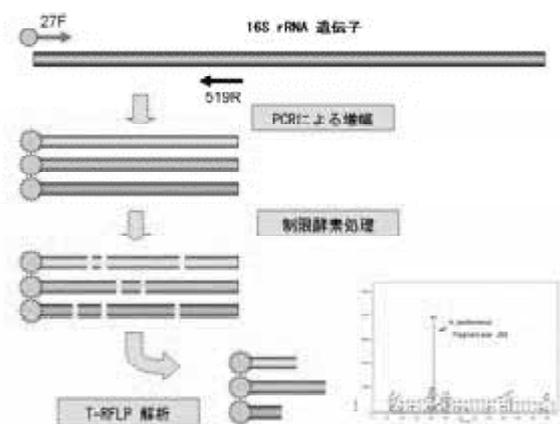


図1 16S rRNA遺伝子のT-RFLP解析の概略

2. 実験方法

2.1 供試菌株

Acetobacter aceti NBRC 3281, *Acetobacter pasteurianus* NRIC 0241, *Gluconacetobacter*

xylinus sp. を実験に供した。

2.2 ゲノムDNAの調製

木桶もろみ、玄米酢もろみ等のサンプルから遠心分離により、微生物菌体を回収し、QIAamp DNA mini kit (キアゲン社製) を用いてゲノムDNAを調製した。

2.3 16S rRNA遺伝子領域のT-RFLP解析

もろみ等のサンプルから調製したゲノムDNAを用いて27F-D4 primer (蛍光ラベル化プライマー: 5'-D4-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と519R primer (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') によりPCRを行った後、PureLink PCR Purification kit (インビトロジェン社製) によりPCR産物を精製し、適当な制限酵素で処理した。これらのサンプルを希釈して分子量マーカールを添加した後、CEQ 8000 Genetic Analysis System (ベックマン・コールター社製) によりフラグメント解析を行った(図1)。

2.4 16S-23S ITS 領域の解析

16S-23S ITS領域の解析は、ゲノムDNAを用いて1492F-D4 primer (蛍光ラベル化プライマー: 5'-D4-AAGTCGTAACAAGGTARCCGTA-3') と22R_23S primer (5'-GTGCCWAGGCATCCACCG-3'), あるいは、K-Specific primer (5'-ATCAACACCAGACATACAAATAC-3') を用いてPCRを行い、16S rRNA遺伝子領域と同様に解析した。

2.5 16S rRNA遺伝子の塩基配列の決定

玄米酢もろみから調製したゲノムDNAを用いて、27F primer と1492R primer (5'-TACGGYACCTTGTTACGACTT-3') でPCRを行い、このPCR産物

をpT7-Blue-tでTAクローニングを行い、得られたプラスミドDNAを用いてCEQ 8000 Genetic Analysis System(ベックマン・コールター社製)により16S rRNA遺伝子の塩基配列を調べた。

3. 結果及び考察

3.1 木桶もろみのT-RFLP解析

まず、*A. aceti*, *A. pasteurianus* 及び *G. xylinus* の16S rRNAの塩基配列をGenBankから入手し、これら塩基配列データから菌種ごとに共通の塩基配列を作成した。これらの菌種間で末端のFragment size(以下F.S.と略す)が異なる制限酵素の組み合わせとして表1に示すものを選択した。

表1 予想されるフラグメントサイズ

16S rRNA 遺伝子 (27F-D4) で予想されるフラグメント・サイズ				
Hpa II and Cla I digestion				
Res. Ezm. : Recog. Seq.	<i>A. aceti</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. xylinus</i>	
Hpa II : CCGG	130	441	442	
Cla I : ATCGAT	246	No cut	246	

Hpa II and Alu I digestion				
Res. Ezm. : Recog. Seq.	<i>A. aceti</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. xylinus</i>	
Hpa II : CCGG	130	441	442	
Alu I : AGCT	142	209	143	

実際に実験を行ってみると、*A. aceti* NBRC 3281では、*Hpa*IIと*Cla*Iで処理するとF.S. 127、*Hpa*IIと*Alu*Iで処理するとF.S. 127のDNA断片が検出された。

A. pasteurianus NRIC 0241では、*Hpa*IIと*Cla*Iで処理するとF.S. 440、*Hpa*IIと*Alu*Iで処理するとF.S. 209のDNA断片が検出され、*G. xylinus* sp.では、*Hpa*IIと*Cla*Iで処理するとF.S. 246、*Hpa*IIと*Alu*Iで処理するとF.S. 142のDNA断片が検出され、ほぼ予想どおりの結果が得られた。

そこで、木桶もろみのサンプルについて実験を行った。木桶もろみ中に存在する微生物は、開放系であるにもかかわらず驚くほど純粋培養に近く、酢酸発酵の全ての期間をとおして*A. pasteurianus*が優先種として常に検出された。

一方、*A. aceti*は全く検出されず、この企業の酢酸発酵の主体は、*A. pasteurianus*が担っていることが推察された(図2~4)。

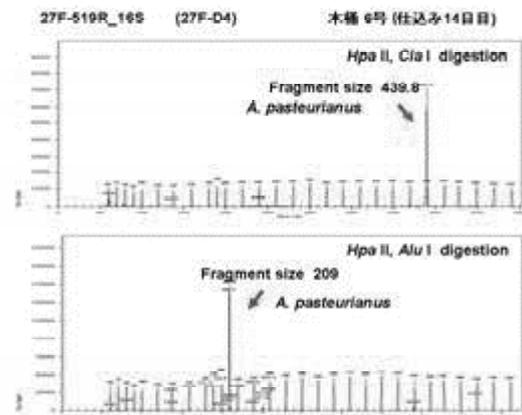


図2 木桶もろみ(14日目)のT-RFLP解析結果

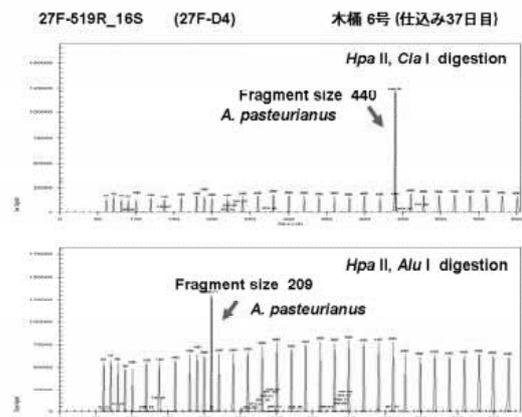


図3 木桶もろみ(37日目)のT-RFLP解析結果

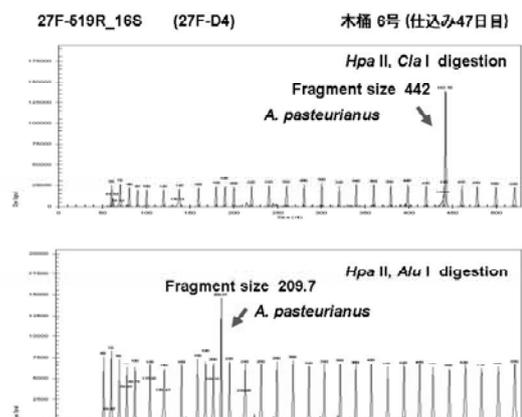


図4 木桶もろみ(47日目)のT-RFLP解析結果

また、木桶によっては、まれに、*G. xylinus*が検出されるものもあった(図5)。

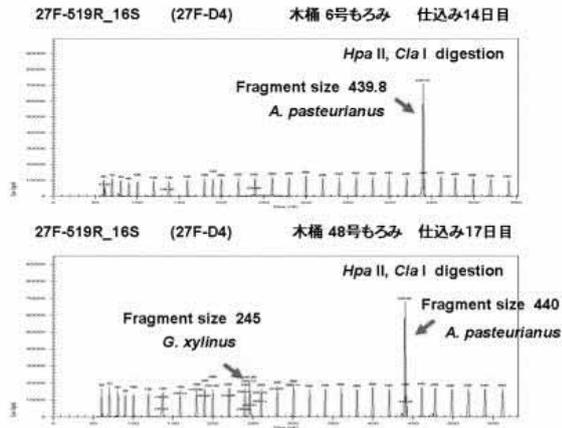


図5 木桶によるちがい

3.2 玄米酢もろみの T-RFLP解析

16S rRNA遺伝子領域で解析を行った結果、玄米酢もろみの発酵の初期から中期にかけては、*Hpa*II、*Alu*I で処理すると *A. pasteurianus* 由来の F. S. 210 のDNA断片の他に F. S. 181の主要なDNA断片が検出された(図6、7)。

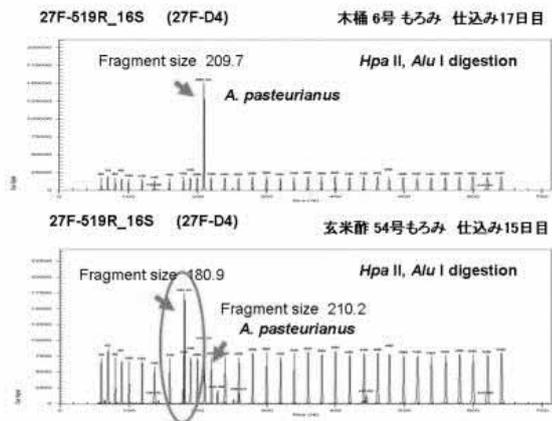


図6 木桶もろみと玄米酢もろみの違い

このDNA断片の由来を調べるために、玄米酢もろみの仕込み15日目のサンプルから16S rRNA遺伝子をPCRで増幅し、このPCR産物をTAクローニングしてプラスミドDNAを調製し、27F~519Rの領域の塩基配列を調べた。

得られたクローンは、2つのグループに分けられ、Blast 検索の結果、*A. pasteurianus* と *Lactobacillus acetotolerans* であることがわかった。*L. acetotolerans* 由来の16S rRNA遺伝子は、*Hpa*II で処理するとF. S. 181、*Alu*I

で処理すると F. S. 229 となり(図8、9)、これらの結果は、*L. acetotolerans* の塩基配列の制限酵素サイトを検索して生じるDNA断片の大きさと良く一致した。

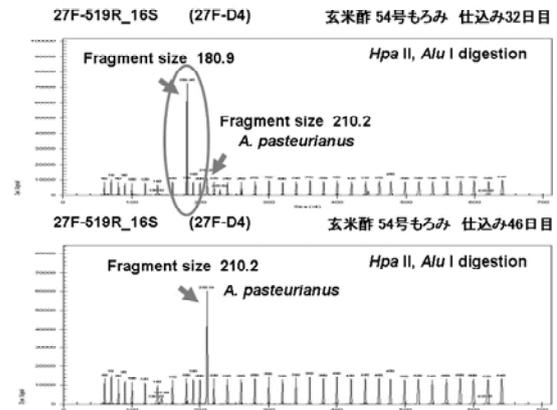


図7 玄米酢もろみ (仕込み中期~後期)

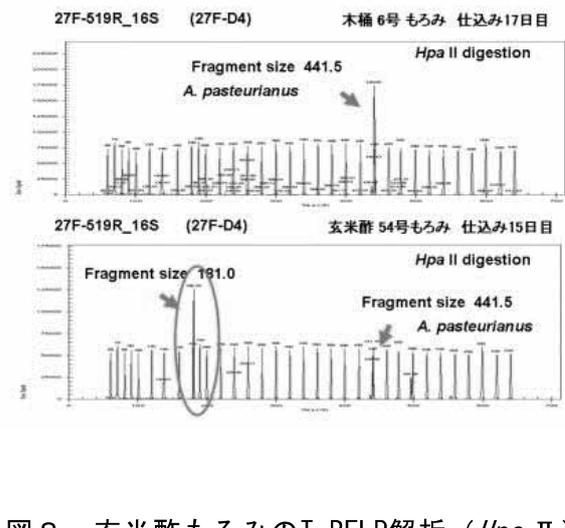


図8 玄米酢もろみのT-RFLP解析 (*Hpa* II)

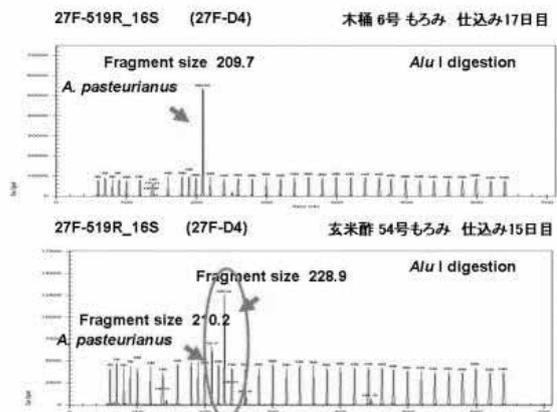


図9 玄米酢もろみのT-RFLP解析 (*Alu* I)

また、16S-23S ITS領域¹⁾²⁾のT-RFLP解析の結果から、玄米酢もろみでは、*Acc*II、*Hae*IIIで処理すると、F.S. 339 の *A. pasteurianus* のDNA断片の他に F.S. 300 のDNA断片が検出され、これは *L. acetotolerans* 由来のものであると思われた(図10)。

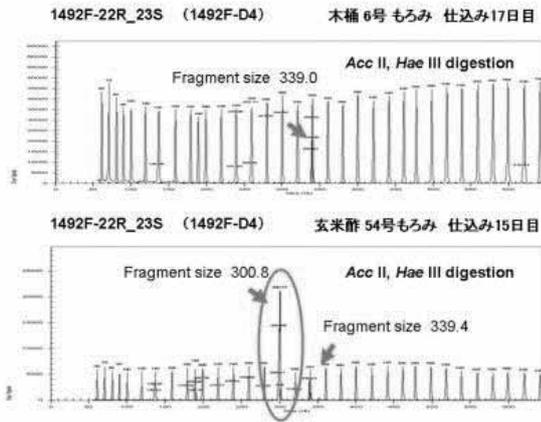


図10 16S-23S ITS領域のT-RFLP解析

L. acetotolerans は、つぼ造り黒酢の製造工程においても *A. pasteurianus* と共存するかたちでその存在が報告されており³⁾、木桶もろみでは検出されなかったことから、おそらく玄米麹由来で、その糖化工程、アルコール発酵を経て増殖してきたものであると思われる。

3.3 玄米酢もろみにおけるK株の検出

K株は、玄米酢もろみから分離された通常の優良菌株(No. 133 株)とは異なる菌株として分離されたもので、16S rRNA遺伝子の塩基配列の検索結果から、*A. pasteurianus* であることがわかった。

しかし、16S-23S ITS領域の塩基配列を比較してみると、木桶もろみから分離された優良菌株(No. 133 株)等とはわずかに異なることが明らかとなった(図11)。

さらに、図12に示すようなK株に特異的なプライマー(K-Specific)を用いることで、もろみ中に存在するK株のみを検出できることを確認した(図13)。



図11 16S-23S ITS領域の菌株による塩基配列の違い

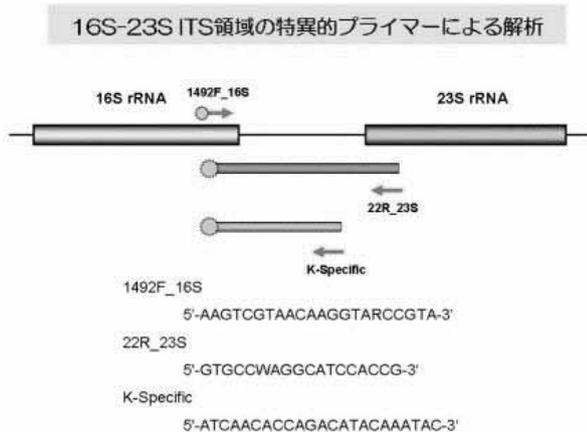


図12 K株の特異的プライマーによる解析

そこで、このK株に特異的なプライマー(K-Specific)を用いて解析をしてみると、この菌株(K株)は、木桶もろみには存在しないことがわかった(図14)。

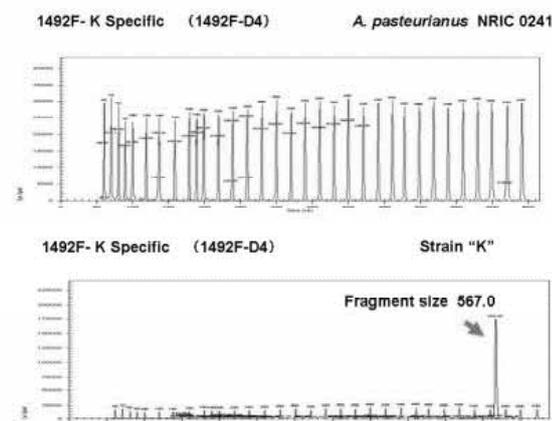


図13 K株の特異的プライマーによる解析

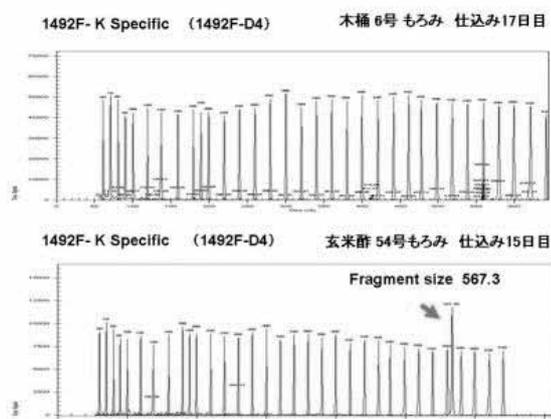


図14 K株の特異的プライマーによる解析

一方、玄米酢もろみをこの特異的プライマーで解析してみると、もろみの初期から後期の酢酸発酵の全ての時期にK株が存在していることがわかった(図14, 15)。

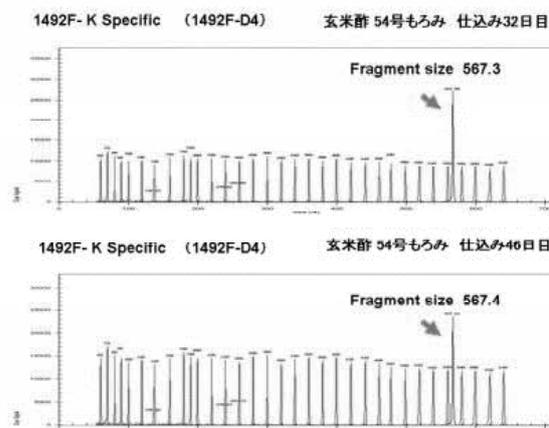


図15 K株の特異的プライマーによる解析

玄米酢もろみでのみ、このK株が増殖してくることは今回の解析で新たに得られた知見であり、仕込み原料の違い等に起因するものと思われる。

4. まとめ

- 1) 木桶もろみは、開放系にもかかわらず純粋培養に近く、*A. pasteurianus* が主要な菌種であった。
- 2) 玄米酢もろみでは、発酵の初期から中期にかけて、*L. acetotolerans* が活動していることが明らかとなった。
- 3) 16S-23S ITS 領域の塩基配列のわずかな違いを利用して、菌株レベルでの解析を行い、玄米酢もろみでは、木桶もろみとは異なる菌株が存在していることがわかった。

本研究を行うにあたり、サンプルの提供、並びに、貴重なご助言を賜りました私市醸造(株)の北 尚武 氏に深謝いたします。

参考文献

- 1) Trcek, J. *et al.* : *FEMS Microbiol. Lett.*, **208**, 69-75 (2002).
- 2) Trcek, J. : *Syst. Appl. Microbiol.*, **28**, 735-745 (2005).
- 3) 石井ら : 生物工学会誌, **84**, 352-354 (2006).