# 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 IIJIMA

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(<u>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</u>)法は、DGGE(<u>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</u>)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16 S 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。

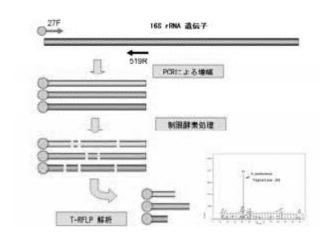


図1 16S rRNA遺伝子のT-RFLP解析の概略

# 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'-ATCAACACCAGACATAC AAATAC-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'-TACGGYTAC CTTGTTACGACTT-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。

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 A. aceti A. pasteurianus Res. Ezm. : Recog. Seq. G. xylinus 441 442 Hpa II : CCGG 130 Clal : ATCGAT 246 No cut 246 Hpa II and Alu I digestion Res. Ezm.: Recog. Seq. A. aceti A. pasteurianus G. xylinus Hpa II : CCGG 130 441 442 143 209 Alul : AGCT 142

表 1 予想されるフラグメントサイズ

実際に実験を行ってみると、A. aceti NBRC 3281 では,HpaII と C1aI で処理すると F. S. 127,HpaII と A1uI 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,HpaII と ClaI で処理すると F.S. 440,HpaII と AluI で処理すると F.S. 209 のDNA断片が検出され,G. xylinus sp. では,HpaII と ClaI で処理すると F.S. 246,HpaII と AluI 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  $2 \sim 4$ )。

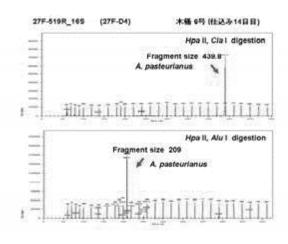


図2 木桶もろみ(14日目)のT-RFLP解析結果

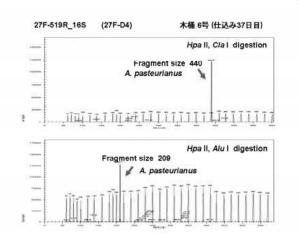
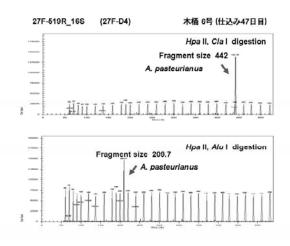


図3 木桶もろみ(37日目)のT-RFLP解析結果



#### 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)。

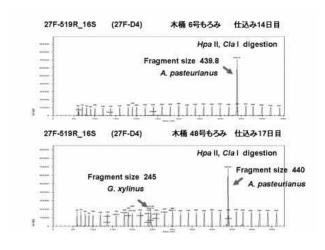


図5 木桶によるちがい

# 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、HpaII, AluI 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)。

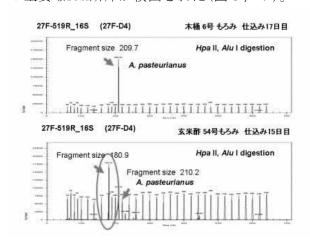


図6 木桶もろみと玄米酢もろみの違い

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、HpaII で処理するとF.S. 181、AluI

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。

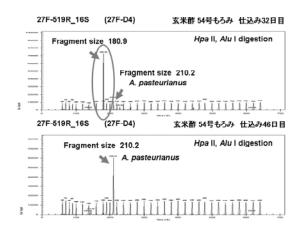


図7 玄米酢もろみ(仕込み中期~後期)

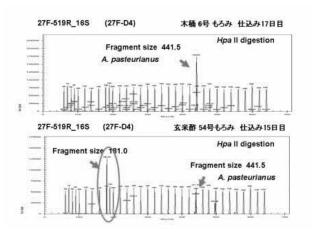


図8 玄米酢もろみのT-RFLP解析(Hpa II)

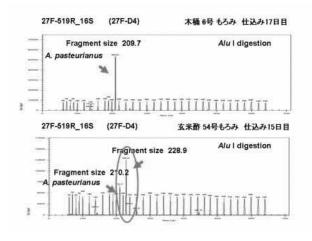


図9 玄米酢もろみのT-RFLP解析 (A/u I)

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、AccII、HaeIII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)。

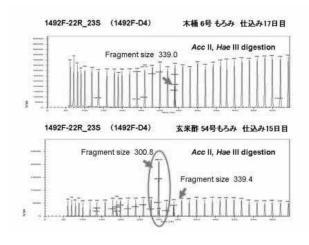


図10 16S-23S ITS領域のT-RFLP解析

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<sup>3)</sup>、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)。

#### TIGOLAGOAGGGGGGTOGGTOGGTTOGGAGCOCGTCTGCAGCGAGGGTTCC 16S-23S ITS 領域の塩基配列の比較 TIGONAGONGGGGGTOGGTTOGANOCOGTCCGTCTCCACCANGGATCC TIGOLAGORGICOSTOGO TOGA ACCOSTOGO TOTOGO ACCAAGO A FOO 1492F CONTROL DE LA CO ANGTOSTANCANOSTAGEOSTAGEOSTACETOEGGET GANTEACET CETT ANGTOSTANCANOSTAGEOSTAGEOSTAGESTACET GEOGET GIA TOACET CETT #\_pastiourianus\_165-235\_170 AGAISTGGFTTTGTGGTGFTGAGAIGTATCTGTTGCAAGGGAGTTTGTGGAT 155 166-256 ITS AGRICTOSTTT TISTOSTICT FOR SAGTATIONS TIGCAN SOCIALITY TOTOGAT W\_166-296\_176 ANSTOSTANCAN SSTANCOST ADESGANCOT SCISCOT SSATONCOT COTT A SALE FROM THE FROM THE PROPERTY OF THE PROPE #\_pastaurianus\_86-235\_175 TOWARDAACTOFTCTGAGTTAATTOGTTTWOTGATTGATTTGGGAATGFTC CREACTTCATTTATGC00CGCTGCQATA0CGGCACGTATGQQTGTGTS757C 133 165-236 ITS TORREGARCT GTT TOT GAST TAX TT GGTT TAX TIGAT TT TIGGRAT GTT TO DOSACT TOAT THAT SO GROUP TO GRAT A GOOGLOOD AST GOOT GOOD TO K\_168-298\_178 TOWARDANCT OF TICTIONS TROUTTING TOWARD AND THE GOAT OF TIC C99ACTTGATSF9GSGSSCSCTGCGATA9CGGCAGGTGFATTTSFATIGC ....... . ................ . K Specific A\_pract our langua\_HHS-238\_FRS 183\_HHS-236\_FTS TGBATRAMAGEOOTTTGCFTATGGBTOGGGBAGGGGCTGFCTGFGAGT figsterfeated transactional operacions to be add at transaction and at transaction and transaction account to the additional and a second at the additional T SANTAAAAA SECCTTT GCTT ATGGAT CGGCAA A GGCGCT IST CTGT CAGT #\_106-596\_176 Transplantage of the Transplan HAD REPORTED TO STORY OF THE PROPERTY OF THE P THE THORIDICACHUM DISCOURT OF THE PARTY OF T 4\_pasteurianus\_165-238\_IRI ASSESTITICO (ATACAACATECO DO CO GO GO GO CASTA TACATA TACATA TO CONTROL ACATA TO CONTROL ACATA TACATA TACATATA TACATA TACATA TACATA TACATA TACATA TACATA TACATA TACATA TAC CASALA TOT SOUTTOGTOT SACSOSTAT TO A SCALAR SASATT TOCT CATG 39\_166-236\_173 THO TOATOT OT OF GOAT OSSON GOOD COLARCATATION OF THE FOLIA DAGAAATGT0QQTTQQTCTGACCCQTATTGAQCAGAGAGAGTTTTQCTCATQ 8\_185-285\_11ti THORGATISTIST TIST GOAT OSSONG COGT CAACAT A TODOT THORGOA CAGAMATIST 9911T0GTCTGROCOGTATTSAGTAGAGAGATTTACFORTG \* 4\_pasteurierus\_989-236\_178 ACAGATGECTGAGTGATTTBGGCTGATGCGTTTTTATGFATTGTCTAGGT OSETIMAGOATTTOTGATGEMIGOGFTCASMAGOGFTTTIGMAGANGEMSAC 100\_145-136\_176 ACAGATIGFOT GAGTIGATT FIGGICS GAT ACGESTS TATTATIGFASS GTOCKAGGS OG/TANGOSTTT OTGATGFANGOGTTCAGANGOGTTT TGANGANGFINGAG #\_169-195\_118 ACASATISTC POSSTGATTTAGGCT ATTACAT PICT AT UTATAGCT TO FOR CSFTAAGGATTTCTGATGFAAGGGTTCAGAAGCGTTTTGAAGAAGTAGAC \*\*\*\*\*\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*\*\* \*\*\* \* \* \* PRESERVE A A pacteur lateur, NE-255\_170 TAIT TO A GOOD STATE TO A GOOD STATE OF THE istactossa Espertia foott tissauch shiftarichsochsaghasst TAIT TO A STOCK OF THE THREE THREE TO A STOCK OF THE TAIL THREE TH 133 169-236 175 GTACTORGAT BOGTCATROTT TREASON OF STITLET AT CROOK TANGER AGE! #\_168-338\_JTS TATTORICTORDETTTTOROCF ACTACCT CHICTTORITT HUNGCAGNOSCET STACTORGAT GOOTT A TROTT TROUGH SOT ATT TREAT OR GOOGLATGE AGEST COMPANIED FOR STREET, #\_pasteur lanus\_195-295\_E1E 138\_160-238\_ET5 CATAGOSCICAGOSTOGAGGI TOMAGTOCTOGO GAZOTAGOAGOATITO #300ATGGTTTCTGTGGATGGGGTGAGTGAGTATCAGGAAGGGCATTCGGT SATAAGOST GEGET GEGGGST TO A GET COOR GEGGGGGGGGGA COA CETTEG A TOGOTT TOTOTOCAT GOOD TOACT SAIGTAT GASAA GOOD ATT COST SATANGOGFGGGGTCGGAGGTTGAAGFCCCCCCCCCCCCATTTG 8\_166-236\_JTG A TOGAT COST TECTOT GCAT REGGE CAGT OF GTAT OW GAAR GOCCATT COST 101010111111111010101 \* Hae III 上段 : NRIC 0241株 #\_pasteurlanus\_985-238\_[78] 129\_169-236\_[79] AGACTG000GFF0CTATGGGGGGGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCT1 BIGATION TANGENTO 中段 : No. 133株 AND LOCATED STATES AND STATES AND LOCATED STATES AND ADDRESS AND A GGATGCCTA/GGCAC 下段 : K株 X\_166-235\_115 ASACTGCCGGTT-0CTATGGGGGCGTAGCTC#GCTGGGAGAGC#CCTGCTT SGATGODTASGRAD CONTRACTOR DESCRIPTION OF THE PROPERTY OF THE PARTY OF TH

図11 16S-23S ITS領域の菌株による塩基配列の違い

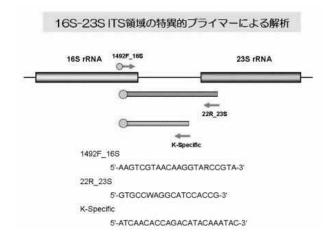


図12 K株の特異的プライマーによる解析

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)。

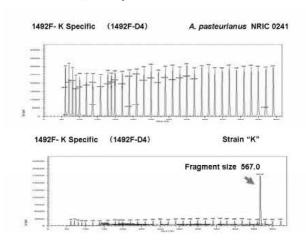


図13 K株の特異的プライマーによる解析

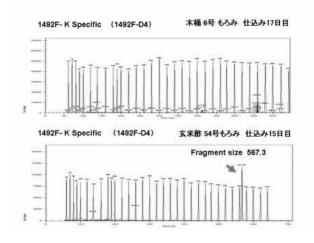


図14 K株の特異的プライマーによる解析

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)。

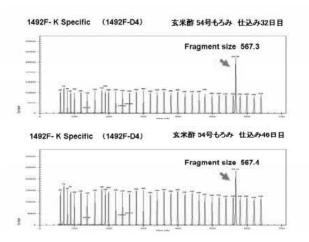


図15 K株の特異的プライマーによる解析

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であると思われる。

# 4. まとめ

- 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).