

技術報告

変性剤濃度勾配電気泳動法 (DGGE) による大豆麹中の乳酸菌等の微生物相解析

太養寺 真弓¹, 安藤 聡², 島 純^{2§}¹新潟県農業総合研究所食品研究センター, ²食品総合研究所酵母研究室

Analysis of microbial community in soy-bean koji using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Mayumi Taiyoji¹, Akira Ando², Jun Shima^{2§}¹Food research center, Niigata Agricultural Research Institute, 2-25 Shin-ei, Kamo, Niigata 959-1381²National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

Microbial community in fermented soy-bean (soy-bean *koji*) was analyzed by non-culture-based method using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). All of 102 bacterial strains isolated from 13 soy-bean *koji* were classified into 15 groups by PCR-DGGE using PCR primers for amplification of V7-V8 region in 16S rDNA. We have constructed the methods for DNA extraction from soy-bean *koji* and fermented rice paste (*miso*) containing soy-bean *koji*, where the extracted DNAs were functional as templates for PCR-DGGE.

米辛口味噌は米を麹化して製造されているが、高品質化および他製品との差別化を目的として、大豆を麹化した大豆麹を数%の割合で添加する場合がある。大豆麹は豆味噌で周知のとおり、プロテアーゼやヘミセルラーゼ等の酵素力価が高いと考えられており、大豆麹の米味噌への添加は味噌の味や色調の改善に効果的である^{1, 2)}。また、大豆麹は乳酸菌等の発酵細菌に富んでいるため^{3, 4)}、味噌中の微生物相や乳酸含量等にも影響を与えていることが推定される。

一般的に発酵食品や自然環境等における複合的微生物環境からの微生物の検出は従来から培養を介して行われてきた。しかしながら、近年になって培養法によらないDNAフィンガープリントを指標とした微生物検出手法が数多く開発され、汎用されるようになっていく。中でも複合系からの包括的な微生物検出手法として知られている変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)

を用いたりボソームDNA部分領域のフィンガープリンティング法 (PCR-DGGE) は、微生物相の特徴付けに極めて有効である^{5, 6)}。本法は塩基配列の相違によって生じる二本鎖DNAの融解特性の違いを利用したDNA断片分離法であり、同じ分子量のDNA断片であっても、僅かな塩基配列の相違による分離を可能とするものである。

そこで、本研究では大豆麹からの乳酸菌類を主体とした細菌類の検出、並びに大豆麹および大豆麹を添加した米味噌中の微生物相評価を目的として、PCR-DGGE法による解析を行った。

実験方法

試料:

新潟県内の味噌メーカー13社が製造した大豆麹13種

2005年10月26日受付, 2006年1月13日受理

§連絡先 (Corresponding author)

表1 大豆麹試料および分離菌株のPCR-DGGEに基づく分別

試料名	乳酸菌数 (CFU/g)	グループ別の菌株数															計
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
S01	2x10 ⁷	7	1														8
S02	5x10 ⁶		2	2	1	3											8
S03	7x10 ⁷	7					1										8
S04	2x10 ⁴	2						3	3								8
S05	2x10 ⁸	3					1			4							8
S06	5x10 ⁵														6		6
S07	5x10 ⁷	2			2					4							8
S08	3x10 ⁴		4		2							2					8
S09	3x10 ⁴		2		1	1	1						1	2			8
S10	5x10 ⁶					4									3	1	8
S11	3x10 ⁷	1			7												8
S12	2x10 ⁶	8															8
S13	5x10 ⁵	5			3												8
グループ合計		35	9	2	16	8	3	3	3	4	4	2	1	2	9	1	102

表2 本研究で使用したPCRプライマー

プライマー	塩基配列 (5'→3')	rDNA内の部位 ^b	参考文献
GM5F ^a	CCT ACG GGA GGC AGC AG	352 - 368	8
907R	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	916 - 935	8
Lac1	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	364 - 382	9
Lac2 ^a	ATT TCA CCG CTA CAC ATG	690 - 707	9
WBAC1	GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG A	1069 - 1090	10
WBAC2 ^a	CCC GGG AAC GTA TTC ACC GCG	1374 - 1394	10
WLAB1	TCC GGA TTT ATT GGG CGT AAA GCG A	565 - 589	10
WLAB2 ^a	TCG AAT TAA ACC ACA TGC TCC A	951 - 972	10

^a DGGEによる分離能を向上させるため5'末端側にGCクランプ (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C-3') を付加した。

^b *Lactobacillus. plantarum* 16S rDNAにおける部位を塩基番号により示した (アクセッション番号 AJ27185)。

類 (表1), および各大豆麹を5%添加し, 30℃で50日間熟成させた13種類の味噌を使用した。味噌には同一の米麹および大豆を用い, 塩分12%, 麹歩合8歩, 水分48%となるように調製した。

大豆麹からの乳酸菌の分離:

試料を1%ポリペプトンを含む生理食塩水に懸濁し, 10μg/ml (w/v) ナリジキシ酸および10μg/ml (w/v) アジ化ナトリウムを添加したMRS寒天培地 (Difco) に懸濁液を塗布した。30℃, 2日間の嫌気培養にて生育したコロニーから, 各試料当たり8菌株を分離した。

DNA抽出:

分離菌株からのDNA抽出にはInstaGene Matrix (Bio-Rad)を用いた。説明書に従って寒天培地上のコロニーからDNAを抽出し, 得られたDNA溶液2μlをPCRの鋳型として用いた。

大豆麹および味噌からのDNA抽出には, 塩化ベンジル法⁷⁾ およびQIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いた。塩化ベンジル法によるDNA抽出は以下のように行った。5gの試料に20mlの生理食塩水を加え, ストマッカーにて1分間攪拌後, 懸濁液2mlを遠心分離 (14,000 rpm, 3分間, 4℃) し, 上清を除去した。沈殿に500μlの抽出バッファー (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 40 mM EDTA), 100μl 10% SDS, 300μl 塩化ベンジルを加

表3 PCR反応条件

プライマーセット	初期変性	35サイクル			最終伸長
		変性	アニーリング	伸長	
Lac1-Lac2	94 , 5 min	94 , 30 sec	61 , 1 min	72 , 1 min	72 , 7 min
GM5F-907R	94 , 5 min	94 , 30 sec	61 , 1 min	72 , 1 min	72 , 7 min
WBAC1-WBAC2	94 , 5 min	94 , 1 min	60 , 30 sec	72 , 1 min	72 , 7 min
WLAC1-WLAC2	94 , 5 min	94 , 1 min	61 , 30 sec	72 , 1 min	72 , 7 min

え、50 で30分間保温した。保温中5分毎に混合した。300 μ lの3 M酢酸ナトリウム (pH 5.3) を加え、氷中に15分間放置後、遠心分離 (14,000 rpm, 3分間, 4) し、上清を新たなチューブに移した。定法に従いクロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿、エタノール洗浄を行い、得られたDNAを100 μ lのTE緩衝液に溶解した。50倍希釈したDNA溶液2 μ lをPCRの鋳型として用いた。

QIAamp DNA Stool Mini KitによるDNA抽出は以下の様に行った。塩化ベンジル法と同様に試料懸濁液を調製し、1.5 ml懸濁液より得られた沈殿を用いて、キットの説明書に従いDNA抽出を行った。得られたDNA溶液0.2 μ lをPCRの鋳型として用いた。

16S rDNAのPCRによる増幅:

16S rDNAの部分領域を標的とした4組のプライマーセット (表2) を用いて、PCR増幅を行った。20 μ lの反応液 (0.25 μ M 各プライマー, 0.2 mM dNTP混合液, EX Taq buffer (Takara), および0.5 unit EX Taq polymerase (Takara)) を用いて、表3に示した温度条件で反応を行った。反応終了後、3 μ lの反応液を用いて、1.5% アガロースゲル電気泳動による増幅産物の確認を行った。

DGGEによるPCR産物の分離:

3 μ lのPCR反応液に等量の色素液 (20 mM Tris, 20 mM EDTA, 0.05% キシレンシアノール, 0.05% プロモフェノールブルー, 70% グリセロール) を加えて、DGGEに供した。DGGEには微生物群集解析システムDCode (Bio-Rad) を用い、8% アクリルアミド、30-60%変性剤濃度勾配ゲル (100%変性剤は7 M尿素, 40%ホルムアミドに相当) で、60 にて4.5時間、150V定電圧で泳動を行った。泳動後、ゲル中のDNAをエチジウムブロマイドで染色した。

実験結果および考察

大豆麹からの乳酸菌の分離

ナリジキシ酸およびアジ化ナトリウムを含む培地を用いた嫌気培養によって、13種類の大豆麹からグラム陽性の嫌気性細菌を選択的に生育させた。大豆麹中の生菌数は 2×10^4 から 2×10^8 CFU/gであり、大豆麹の種類によって大きな差異が認められた (表1)。大豆麹の熟成期間や塩濃度の違いが生菌数に影響を及ぼしているものと考えられる。生育した株のほとんどは乳酸菌類であると考えられたことから、各大豆麹から8株ずつを分離培養し、以降の実験に供した。

PCR条件の検討

分離菌株のPCR-DGGE法による分類に先だって、表2および表3に示した条件によってPCR条件の検討を行った。ここに示したPCR条件では、麹菌、酵母および植物を含む多くの真核生物のrDNAは増幅されることが報告されているため¹⁰⁾、これらの条件は大豆麹および味噌中の細菌相評価に有効であることが期待された。しかしながら、分離菌株より抽出したDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、Lac1-Lac2およびGM5F-907Rの条件を用いた場合には一部の株において特異的増幅が観察されなかった (データ非表示)。また、WLAC1-WLAC2条件においては1株を除いて全ての株で増幅がみられたが、全株からの増幅が可能な条件はWBAC1-WBAC2のみであった (データ非表示)。WBAC1-WBAC2プライマーは、多くの乳酸菌16S rDNAのV7-V8領域の増幅に適していることが報告されており¹⁰⁾、乳酸菌に対する特異性も高いものと期待されたことから、以降のPCRはWBAC1-WBAC2条件に従って行った。

PCR-DGGEによる分離菌株の分別

上述のPCR条件によって得られた増幅産物をDGGEに

よって分離し、分離菌株の16S rDNA配列に基づく分別を行った。まず、単一の大豆麹より分離された8株内での比較を行ったところ、図1に例示したように、大豆麹S07から分離された8株は3グループ、S13から分離された8株は2グループに分別することが可能であった。DGGE法は僅か1塩基の差異をも分離することが可能な手法であることから、同一の移動度を示すDNA断片は全く同一の塩基配列を持っている可能性が高い。従って、同一グループに分別された株は同一種あるいは極めて近縁な系統関係にあるものと考えられる。このような各試料由来の分離株内グループを試料内グループと定義して、他的大豆麹試料から得られた株につ

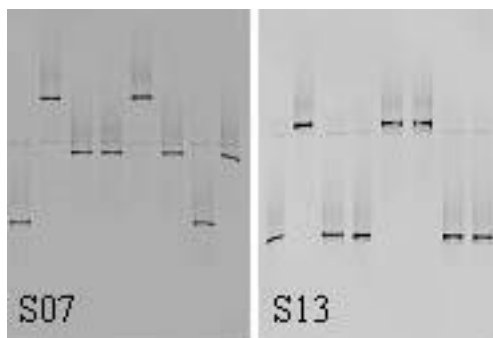


図1 単一の大豆麹から分離された菌株のPCR-DGGEによる分別の一例
大豆麹S07およびS13から分離された各8菌株よりDNAを抽出し、PCR-DGGEを用いて試料内グループ(本文参照)の分別を行った。

いても同様な比較を行ったところ、各試料由来の分離株は1から6つの試料内グループに分別されることが判明した(データ非表示)。また、多くの株において単一の明瞭なバンド以外にもマイナーなバンドが増幅される傾向が認められたが(図2参照)、プライマー配列の不一致あるいはrDNA配列の菌株内変異等に起因しているものと思われる。

次に、各試料由来の試料内グループから各々1株を抽出し、同一ゲル中において全ての試料内グループ間での比較を行った(図2)。近接した移動度を示すバンドについては、隣り合ったレーンで再泳動することにより比較を行った(データ非表示)。その結果、全ての試料内グループはAからOの15グループに集約されることが明かとなった。すなわち、13種類の大豆麹から分離された102菌株は、AからOの15グループに分別することが可能であった(表1, 図2)。グループAは多くの試料から最も高い頻度で分離されていることから、大豆麹中の発酵環境において広く分布しているものと思われる。

大豆麹および味噌からのDNA抽出条件の検討

大豆麹および大豆麹を添加して熟成させた味噌中の細菌相評価にPCR-DGGE法を適用させるために、まず、DNA抽出条件の検討を行った。その結果、塩化ベンジル法およびQIAamp DNA Stool Mini Kitを用いた抽出法により、PCRの鋳型として使用可能な純度のDNAが得られることが明らかとなった。また、各々の方法で抽

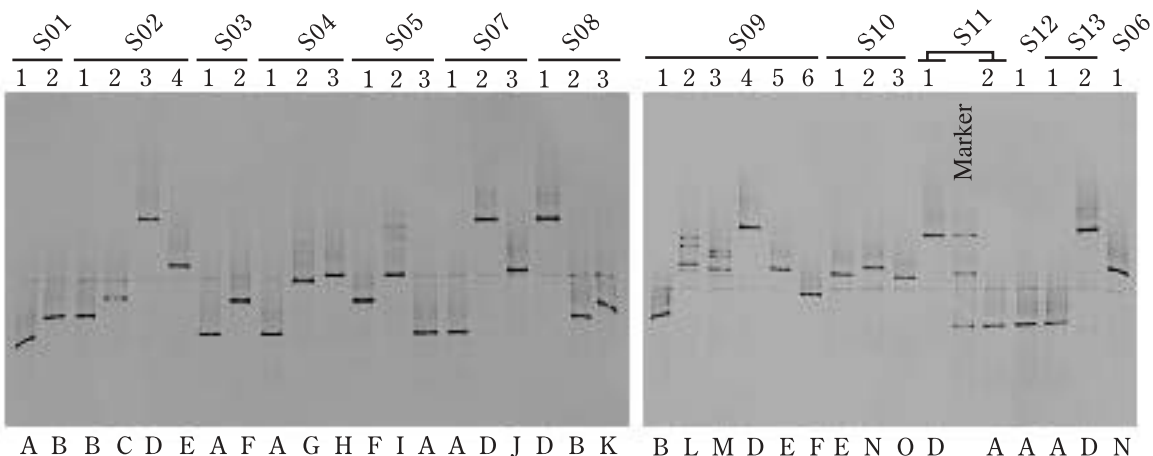


図2 大豆麹から分離された全菌株のPCR-DGGEによる分別
各試料由来の試料内グループ(ゲル上部1~6, 本文参照)をPCR-DGGEプロファイルに基づいて、AからOの15グループ(ゲル下部A~O)に分別した。A, D, Eグループに由来するPCR産物の混合物を比較対象として泳動した(左側ゲル, Markerレーン)。

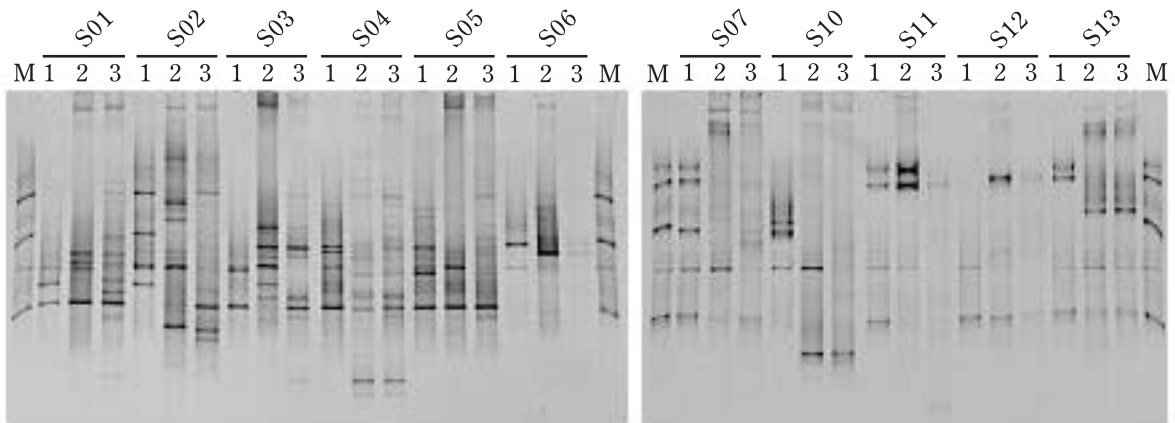


図3 PCR-DGGEによる大豆麹および味噌中の細菌相解析

大豆麹および大豆麹添加味噌よりDNAを抽出し、PCR-DGGEによる細菌由来rDNAバンドのプロファイリングを行った（順にレーン2および3）。各大豆麹から分離された菌株由来のPCR産物を混合して比較対照とした（レーン1）。また、グループA、D、E由来のPCR産物を混合したものをバンド移動度のマーカーとした（レーンM）。

出したDNAをPCR-DGGEに供したところ、QIAamp DNA Stool Mini Kitを用いた場合に、より明瞭なバンドパターンが得られる傾向があった（データ非表示）。このため、大豆麹および味噌からのDNA抽出にはQIAamp DNA Stool Mini Kitを採用した。

PCR-DGGEによる大豆麹および味噌中の細菌相解析

大豆麹および大豆麹添加味噌よりDNAを抽出し、PCR-DGGEによる細菌由来rDNAバンドのプロファイリングを行った（図3）。各大豆麹から分離された菌株由来のPCR産物を混合して比較対照とした（レーン1）。また、グループA、D、E由来のPCR産物を混合したものをバンド移動度のマーカーとして両端のレーンに流した（レーンM）。大豆麹S08とS09、およびそれらを含む味噌からは明瞭なバンドが得られなかったが、これは表1に示したように大豆麹中の菌数が少ないことが原因であると考えられる。多くの大豆麹および味噌において、分離菌株に由来しない複数のバンドが検出された。このことから、大豆麹および味噌中には分離された株以外にも多くの細菌類が生息している可能性が示唆された。一方、分離菌株に由来するバンドが大豆麹および味噌試料からは得られない場合もあった。この理由として、本研究では各試料当たりの分離菌株が8株と少ないため、比較的稀少な菌株を分離株として選抜してしまった可能性が考えられる。大豆麹および味噌に由来するrDNAプロファイルと比較すると、大豆麹S01、S04、S13等から得られたバンドの多くは味噌の場

合においても検出されていた。これらのバンドは、味噌への定着性が高い種に由来するものと考えられる。特に、グループAに分類される株は高頻度で分離されただけでなく、同グループに由来すると考えられるバンドが、比較的強いバンド強度で大豆麹および味噌の両試料から得られた。これらの結果より、グループAの株が大豆麹および味噌中に広く分布しているだけでなく、多くの大豆麹および味噌において優占的に生育している可能性が示唆された。味噌から多く分離される乳酸菌として *Pediococcus halophilus* や *Enterococcus faecalis* 等が報告されているが¹¹⁾、本研究で分別されたグループと種との関係を明らかにするためには更なる解析が必要である。

本研究によって、PCR-DGGE法が大豆麹および味噌中の微生物相の解析に有効であることが示された。また、本法は実験労力や解析時間の削減という観点からも従来の培養法と比べて優れた手法であると評価できる。今後は、グループAに分類された菌株など優占種の種同定や、大豆麹および味噌の成熟過程における同種の動態を追跡することで、発酵過程における同種の役割を明らかにすることができると期待される。

謝 辞

本研究の一部は農林水産省食品総合研究プロジェクトの助成を受けて行われたものである。

要 約

大豆麹中の微生物相を，培養を介さないPCR-DGGE法によって評価する手法の検討を行った．16S rDNAのV7およびV8領域を標的とするプライマーセットを用いたPCR-DGGEによって，13種類の大豆麹より分離培養した102菌株を15グループに分類することが可能であった．また，大豆麹および大豆麹を使用した味噌から直接DNAを抽出する手法を確立し，得られたDNAを用いてPCR-DGGE解析を行うことが可能となった．

文 献

- 1) 大池昶威，米山正，村松信之，宮崎忠雄，根岸幹雄，大豆麹，納豆を利用した味噌の試醸，長野県食品工業試験場研究報告，**11**, 30-35 (1983).
- 2) 松本伊左尾，今井誠一，大豆麹の赤味噌への添加効果，味噌の科学と技術，**35**, 422-428 (1987).
- 3) 好井久雄，きれいな味噌用麹のつくり方，日本醸造協会雑誌，**75**, 709-716 (1980).
- 4) 今井学，安平仁美，信州の伝統的味噌玉味噌の解明，日本醸造協会雑誌，**77**, 702-705 (1982).
- 5) Ferris, M.J., Muyzer, G., and Ward, D.M., Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 340-346 (1996).
- 6) Muyzer, G., and Smalla, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**, 127-141 (1998).
- 7) Zhu, H., Qu, F., and Zhu, L. H., Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5279-5280 (1993).
- 8) Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., and Jannasch, H. W., Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments, *Arch. Microbiol.*, **164**, 165-172 (1995).
- 9) Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., and Hammes, W. P., Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2578-2585 (2001).
- 10) Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., VanderGheynst, J., and Mills, D. A., Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6801-6807 (2003).
- 11) 岡田早苗，味噌の乳酸菌，「乳酸菌の科学と技術」，乳酸菌研究集談会編，(学会出版センター，東京)，pp 255-256 (1996).