

PCR-DGGEとDNA塩基配列解析を利用した発酵食品の菌叢解析

東京都農林総合研究センター・食品技術センター
細井知弘

発酵食品の製造時には、添加・利用する微生物のほかに、意図せず他の微生物が発酵容器等に混入・作用して、製品の品質を変化させている可能性がある。

そのため、原料や中間・最終製品に含まれる微生物集団の構成（菌叢）やその変化を解析することには意義がある。菌叢解析の方法には種々の方法があるが、本稿では、最近利用が増加しているPCR-DGGE [ポリメラーゼ連鎖反応-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)] とDNA塩基配列解析 (DNAシーケンシング) を組み合わせる方法、及び本法を利用した味噌と酒粕の「細菌叢」の解析例について紹介する。

1. さまざまな菌叢解析方法と解析対象

培地を用いて試料から複数菌種の純粋分離と性状試験による同定を行い、試料の菌叢を解析する方法は、現在においても、非常に重要な方法である。しかしながら、培養が困難な場合や菌数の相対比が大きく異なる場合、またコロニー形態が類似する菌種が共存している場合などには、菌叢解析は困難になりがちである。また解析に日数を比較的多く要する点も欠点といえよう。

一方、培養に代わり、微生物が有する遺伝情報、あるいはタンパク質等の菌体成分を利用した菌叢解析の方法には、PCR-DGGE¹⁾、T-RFLP、クローニングによる遺伝子ライブラリーの作製

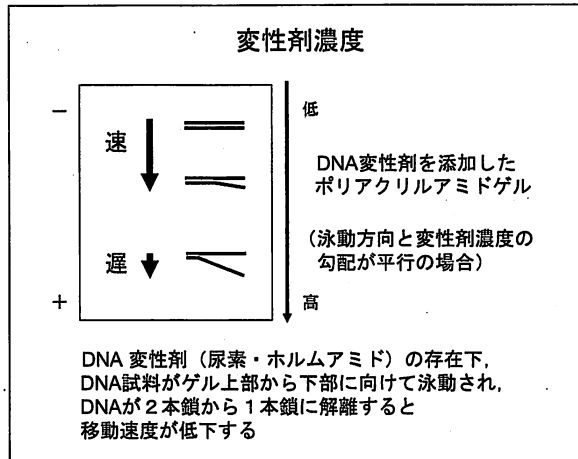
と解析、菌種特異的プライマーを複数利用したPCR (リアルタイムPCRを含む)、菌種特異的なDNAプローブを用いたマイクロアレイ、菌種特異的に反応する抗体を用いたFISHやフローサイトメトリーなどによる方法がある。またさらに多くのコストと労力を必要とするものの、PCRを介さないメタゲノム解析による菌叢解析法も現在注目を浴びている。

PCR-DGGEは、昨今、その比較的高い検出力・分解能と簡便性が評価され、元来の塩基配列の変異検出のみならず、さまざまな発酵食品 (味噌・醤油・酒類・酢・発酵乳・パン・くさや汁・馴れずし・ソーセージ等) やスターター、土壌、海・湖沼・河川水、温泉、腸管内容物、サイレージ、コンポスト等の菌叢解析に利用されて大きな成果をもたらしている。食品分野でのDGGEの利用に関しては、各種原料や製品の菌叢の把握、発酵食品製造工程中の菌叢変化の把握、製品間の菌叢比較などに活用されている。

2. PCR-DGGEの原理と実際

DGGEはDNAの電気泳動法の一つで、DNA断片試料間の塩基配列の部分的な差異 (変異) を比較的容易に検出可能な解析方法であり、分子量の差を検出するアガロースゲルを利用したDNA電気泳動法とは目的が大きく異なる。

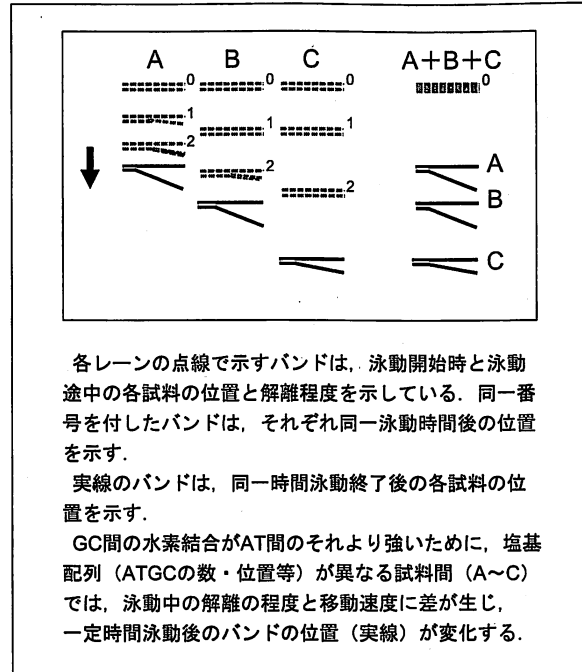
DGGEで使用するゲルには特徴があり、ポリアクリルアミドゲルをベースに、二本鎖DNAを一本鎖DNAに開裂させる作用を有する変性剤 (ホルムアミドと尿素) を含んでおり、変性



第1図 DGGEの原理の概念図

剤には濃度勾配を持たせる。変性剤の濃度勾配は、試料の泳動方向に対して平行と垂直の場合の2種類があるが、多用されるのは前者である(第1図)。変性剤濃度の幅は、予備試験の実施により分解能が高くなるように設定するのが望ましい。これは、DNA試料のアガロースゲル電気泳動において、試料の分子量にあわせて分解能を高めるためにアガロース濃度を変化させることや、タンパク質のアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにおいてアクリルアミド濃度に濃度勾配を持たせることと類似している。

核酸のG-C間の水素結合はA-T間よりも強いことから、DNA断片試料間のGC含量やその配列の差などにより、泳動開始後、あるゲル上の位置で、DNAが部分的に一本鎖に解離する程度が試料間で異なる(第2図)。部分的に一本鎖に解離すると、ゲル中を進む速度が抵抗の増加により遅くなるために、その解離の程度が異なる試料間では泳動速度に差が生じる。その結果、一定時間泳動後のバンドの位置が異なることになり、塩基配列の異なる試料を分離比較することが可能となる。塩基配列が互いに異なる単独試料を同時に別レーンで泳動すれば、各レーンには異なる位置に1本ずつバンドを生じることとなり(第2図左, A~C), また塩基配列が異なる試料の混合物を1レーンで泳動すれば、その同一レーン内に複数のバンドを生じる(第2図右, A+B+C)。なお、泳動の際には、



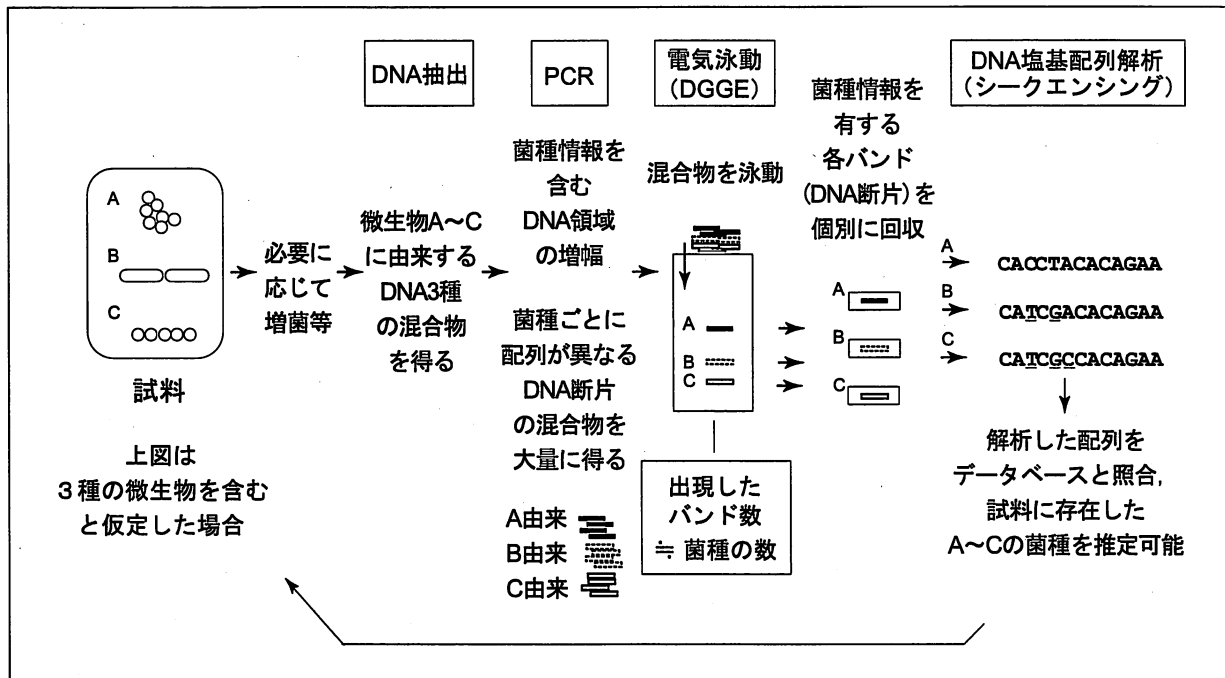
第2図 異なる塩基配列を含むDNA試料(A~C)とその混合物についてDGGEを実施した場合の概念図

DGGE用のマーカーを同時に使用すると、複数の泳動結果の比較が容易となる。泳動時のバッファの温度は、DNA試料の二本鎖が部分的に一本鎖に解離するように、60°C前後の恒温で行なわれるのが一般的である。

また、ゲル上で泳動が進み完全な一本鎖になってしまう変性剤濃度の位置まで達すると泳動速度が再び速くなってしまふことを防ぐために、PCRの際に用いるプライマー対のどちらか一方の5'末端側に、GC clampと呼ばれる30-40 bps程度のG-Cが豊富な解離しにくい配列を、通常結合させる²⁾。PCRによる増幅範囲は、増幅した配列中に開裂する領域を少なくとも1つ、多くとも2つの領域になるように設計する。

3. PCR-DGGEとDNA塩基配列解析による菌叢解析の流れ

第3図に解析の流れを示す。解析に十分な菌数が試料に含まれていない場合や生菌を主な解析対象とする場合などには、最初に試料の増菌



第3図 PCR-DGGE及びDNA塩基配列解析による菌叢解析の流れ

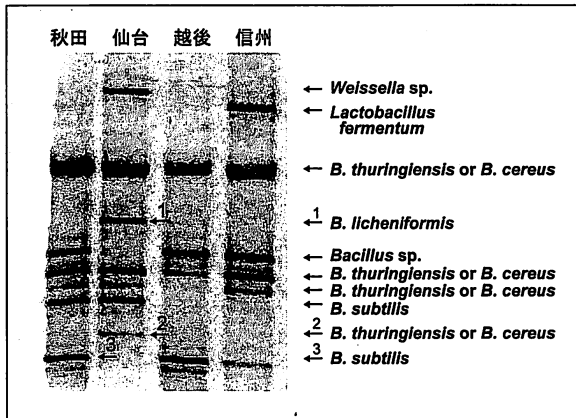
培養等を行い、のちのPCR実施時のDNA増幅産物量を増加させる。しかしながら、このときに使用する培地や培養条件（温度・酸素濃度・培養期間）により、試料の元の菌叢とは変化した解析結果を生じさせる可能性が存在する。続いて試料からDNAを抽出し、試料間に塩基配列の差が存在する領域、一般的には、細菌ならば16S rRNA gene, 真菌ならば18Sまたは26S rRNA geneなどをPCRにより増幅する。増幅産物の解析に望ましい塩基数は500 bp程度までとされる。前述のGC clampを最も開裂し易い領域に隣接するように付加させるために、GC clamp付プライマーを片側に使用する²⁾。細菌や真菌の菌叢解析用のプライマーは、すでに数多くの報告がなされているが^{1,2)}、例えば同じ細菌用のプライマーであっても、用いるプライマーの種類により、PCRにおける増幅の良否やDGGE実施時のバンドの分離程度に差が生じ、異なる解析結果を生じさせる可能性がある。次に、DGGEの実施にあたり、適当な濃度範囲の変性剤濃度勾配ゲルを作製する。その作製には市販の専用ゲル製造装置を利用すると比較的容易である。作製したゲルの長期保存は困難であ

り、泳動の都度作製し使用するのが一般的である。電気泳動は、サンプルをロード後、恒温(60°C前後)で泳動する。ゲル中の変性剤に濃度勾配を持たせて恒温で泳動するDGGEの代わりに、泳動温度を随時変化させながら泳動するTGGE(温度勾配ゲル電気泳動)も存在するが、後者はDGGEと比較して分解能が劣るとされる。泳動後のゲルの染色は、ゲルの破壊に留意しつつ、エチジウムブロマイドなどによる染色を行ない、UV照射装置を用いてバンド像を確認する。菌種の推定まで行う際には、続いてバンドを個別に切り出して回収し、DNA塩基配列解析用にさらに試料を調製したのちにDNA塩基配列解析を行い、塩基配列データベースと照合を行なう。

これらの解析作業は、未知の微生物の検出にも発展しうる。またこの解析の結果判明した塩基配列を利用してプローブを作製し、特異的検出に応用することも可能である。

4. PCR-DGGEを利用した菌叢解析例

(1) 味噌4品の細菌叢



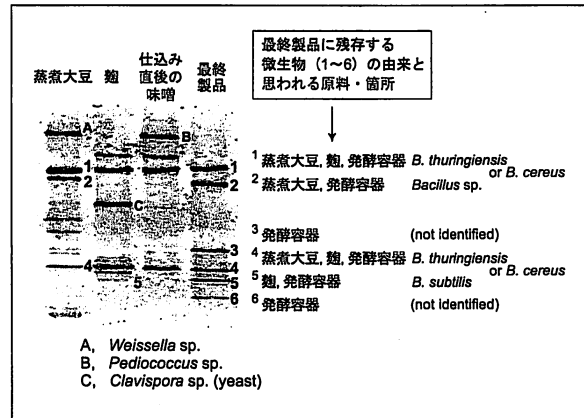
第4図 味噌4品のPCR-DGGE解析の結果

無加熱・アルコール無添加の市販味噌製品4品(秋田・仙台・越後・信州)について検討したところ、製品により細菌叢が異なっていた(第4図)。これらの菌叢の差異は、得られた菌種名から、各味噌の製造法上の特色というよりも、各製造所、ひいては原料や発酵容器の菌叢の特色を表しているものと思われる。

なお本法により別の味噌を解析した場合には、嫌気性 *Clostridium* 属細菌の存在も検出可能であった。

方法の概略は、最初に、50mL遠沈管を使用して各味噌約4gについて10倍量の Trypticase Soy Broth, MRS, 及び YM 培地を用いて35°C, 48時間、好氣的に静置して増菌培養後に、培地ごとにDNAを抽出した。次に、大腸菌 *Escherichia coli* において16S rDNA position 341-534に相当する領域(菌種により配列に特異性を有するDNA領域)を、一方にGCクランプを結合させたプライマー対(5'-CGCCC GCCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 及び 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')を用いてPCRにより増幅した^{1,2)}。

PCRのサイクリング条件は、熱変性を94°C, 45秒間、アニーリングを52°C, 60秒間、伸長反応を72°C, 180秒間、40サイクルとした。各増幅産物を精製後、各酒粕ごとに2種の増菌培地由来のPCR増幅産物を混合した試料を用いて、DGGE(150V, 4h)を行った。泳動ゲルの条



第5図 味噌の原料及び製品のPCR-DGGE解析の結果

件は、Acrylamide/bis 8%, 変性剤 Formamide/Urea 20-60%とした。泳動後にバンドの切り出しとDNA抽出を行い、再び前述のプライマー対を用いてPCRを行った。さらに、DNAシーケンサーを用いて各DNA断片の塩基配列を解析した。解析結果を遺伝子データベース DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>)のBLASTで相同検索を行い、菌種推定を行った。

(2) 味噌製造工程中の細菌叢の変化

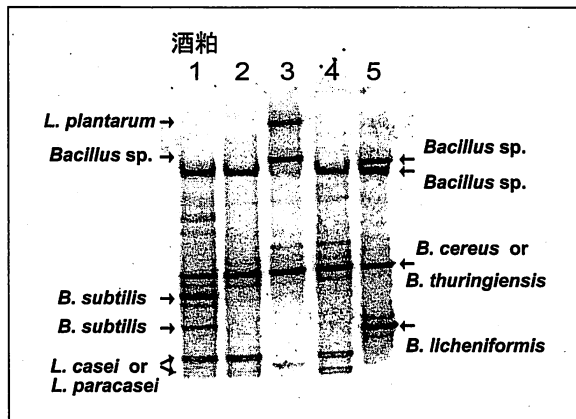
味噌の原料と製品(仕込み直前の蒸煮大豆, 麴, 仕込み直後の味噌及び熟成後の最終製品)について解析したところ、各試料間で存在する菌種が異なっていた(第5図)。仕込み直前の蒸煮大豆や麴にも、さまざまな細菌が存在していた。

煮豆, 麴, 及び味噌発酵容器に存在する菌には、最終製品に移行して生存するものと、その途中の段階で減少・死滅するものとが存在することが示唆された。

一般に味噌の製造時には、仕込みや発酵終了後の塩やアルコールの添加及び加熱により、菌叢が大きく変化するものと思われる。なお菌数のレベルは、生菌数測定の結果、蒸煮大豆が 10^8 cfu/g, 麴が 10^5 cfu/g, 最終製品が 10^1 cfu/g程度であった。

(3) 酒粕5品の細菌叢

市販酒粕5品の細菌叢をPCR-DGGEとDNA塩基配列解析により解析した。



第6図 酒粕5品のPCR-DGGE解析の結果

その結果、酒粕の種類により細菌叢が異なること、また糖やタンパク質の分解能が高く酸やアルコールに耐性の高い胞子を形成する *Bacillus* 属や、腐造や火落ちの原因となり得る *Lactobacillus* 属細菌がときに存在することが明らかとなった(第6図)。このような細菌叢の差異が、実際の酒の品質(風味・色・保存性など)にどのように影響を及ぼしているかについては、興味を持たれる。

なお、解析は、各酒粕について Trypticase Soy Broth 及び MRS 培地を用いて増菌培養を行ない、DGGE用ゲルの条件を Acrylamide/bis 8%、変性剤 Formamide/Urea 20-50% としたほかは、上記の味噌の場合と同様の方法で行なった。

5. PCR-DGGEの特徴を踏まえた食品分野における効果的利用法

PCR-DGGEの長所として、従来からの多種類の培地を用いた培養と純粋分離による菌叢解析よりも、菌叢全体像の把握が比較的容易に可能という点が挙げられる。DGGEでは、原理的には同一菌種はひとつのバンドとして出現するが、培養法では、同一菌種でも培地ごとにコロニー形態が異なることがあり、解析が困難になりがちである。また DGGEでは、好気性、嫌気性、あるいは死滅、難培養性の微生物が混合しているような試料についても、菌数が高くDNAまたはRNAが十分に得られれば、理論上解析

可能である。反対に、生菌を対象とする解析を目的とする場合には、増菌培養後に実施することや、RNA抽出からの解析実施も考慮すべきと思われる。

PCR-DGGEの短所としては、試料中の菌数が少ない、あるいは存在比率の低い菌については、DGGE後のバンドが痕跡程度になったり出現しなかったりして、検出力が低くなる点が挙げられる。また1菌種からバンドが複数出現したり、細菌用プライマー使用のPCRでも真菌由来のバンドが出現したりこともある。通常頻繁に行われる rRNA gene を対象としたPCRから DGGEを行なう場合には、同一菌種ではその配列も同一であることが多いことから、同一菌種で性質の異なる株が複数存在することを DGGEで検出することは困難となる。さらには試料中の全ての微生物のDNAを、使用するプライマーにより増幅できる保証はない。また DGGEでは菌数を正確に求めたり、各菌の菌数比を調べたりすることは容易ではない。DNA抽出やPCRの過程が検出感度に与える影響は、通常のPCRによる微生物検出の場合と同様の問題を抱えている。PCR-DGGE実施後のDNA塩基配列解析による菌種推定の作業はやや煩雑であり、日常的に多サンプルの塩基配列解析を全て行うことは、コスト面からも困難であろう。

以上のPCR-DGGEの特徴を踏まえつつ、食品分野においては、菌叢が未知の食品に関して、製造時の経時的变化や製品ごとの差異の解析にPCR-DGGEを利用することが適当と思われる。また含まれる菌種が既知のスターターや製品の菌叢解析にもPCR-DGGEの利用は効果的と思われ、出現すべきバンド以外に異なるバンドが検出されれば、通常とは菌叢が異なっており、問題が発生しているといった判断も可能である。

解析の目的に応じて、培養法とPCR-DGGEなどの分子生物学的手法を適宜組み合わせる微生物検査を実施し、製品の品質管理とその向上を図ることが重要と考えられる。PCR-DGGEの適切な活用は、食品企業、とくに発酵食品を取り扱う企業にとって、強力な味方となるはず

である。

文献

- 1) Ercolini, D., PCR-DGGE fingerprinting : novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods*, 56, 297-314 (2004).
- 2) Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700 (1993).