

有用微生物の分子生物学的解析に関する研究（第 2 報）

田畑 恵* 長谷川 裕正*

1. はじめに

発酵食品にはさまざまな微生物が用いられており、食品に独特の風味や成分を与えている。例えば日本酒・味噌などの製造には麹菌 *Aspergillus oryzae* が、日本酒・ビール・ワイン・パンなどの製造には酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が、ヨーグルト・漬物などの製造には *Lactobacillus* 属や *Lactococcus* 属の乳酸菌が、そして納豆の製造には納豆菌 *Bacillus subtilis* var. *natto* が用いられている。

現在これらの有用微生物に対し、ゲノム解析が盛んに行われており、微生物の特性解明がすすめられている。例えば麹菌については、酵素の生成に関与している有用遺伝子が多数解明されたことにより、酒・味噌等の伝統的発酵食品に利用される麹づくりのノウハウが遺伝子レベルで解明され、有用菌株の開発や醸造技術の改善に活用されている。また納豆菌についても、有用遺伝子の解明により得られた知見をもとに、食品だけでなく化粧品や化成品への応用研究が行われるようになっており、さまざまな微生物について、遺伝子レベルでの特性解明が求められている。

2. 目的

近年、日本でも大豆発酵食品としてテンペが注目されはじめている。テンペは大豆を *Rhizopus* 属の糸状菌である *R. oligosporus* を用いて発酵させた、インドネシアの代表的な発酵食品の一つである。しかし、*R. oligosporus* については、菌株ごとの特性解明も不十分であり、また大豆発酵過程における成分変化を始め、どの酵素が関与しているのか、またその酵素を作る遺伝子が何であるのか、などについての研究がほとんど行われていない。そこで、*R. oligosporus* の特性について解明することを目的とした。

第 1 報¹⁾では、テンペ製造に用いられている主な *R. oligosporus* 5 株を用い、外観の比較、炭素源の資化性の比較、テンペを製造した際のアミノ酸含量の比較等の結果について報告した。GABA 生成量に大きな違いが見られたために、今年度は GABA の生合成に関与していると考えられる GAD 遺伝子に注目し、GAD 相同遺伝子の取得を目的とし、研究を行った。

3. 実験方法

3.1 供試菌株

テンペ製造に用いられている主な菌株を表 1 に示した。これらを供試菌株として、以下の実験を行った。なお、培地は市販ポテト培地を用い、必要に応じて寒天 1.5% を添加した。

表 1 テンペ製造に用いられている主な菌株

No.	菌株名	属種
1	NBRC 8631	<i>R. oligosporus</i>
2	NBRC 31987	<i>R. oligosporus</i>
3	NBRC 32002	<i>R. oligosporus</i>
4	NBRC 32003	<i>R. oligosporus</i>
5	IK 001*	<i>R. oligosporus</i>

*特許微生物 FERM AP-20492

(くめ・クオリティ・プロダクツ㈱と共同出願)

3.2 ゲノム抽出

液体ポテト培地 10ml に菌体 1 白金耳を接種し、30°C で 24-48 時間振とう培養した。ろ過により菌体を集菌し、洗浄した後、ISOPLANT (日本ジーン社製) を用い、マニュアルに従ってゲノム DNA を抽出した。

3.3 GAD 相同遺伝子断片の取得

NCBI および *Rhizopus oryzae* の遺伝子のデータベースを基に、GAD 相同遺伝子増幅用のプライマーを設計し、PCR を行った。PCR 条件は、94°C で 45 秒、55°C で 45 秒、72°C で 2 分を 35 サイクル行い、72°C で 7 分の伸張反応を行った。使用したプライマーの一部を表 2 に示した。反応液の一部を取り、アガロースゲル電気泳動 (ゲル濃度 1.2%, 1 × TAE buffer) を行った。目的のバンドが確認されたら、SUPREC (タカラバイオ社製) により精製し、表 2 のプライマーを用いたダイレクトシーケンス法または TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen 社製) を用い、DNA シーケンサー CEQ8000 (Beckman Coulter 社製) により塩基配列を決定した。

表 2 PCR およびシーケンスに使用したプライマー

プライマー名	配列
3-23F	GGTTTTCTTTCCAACGCTAT
412-432F	GATCAAGGATGACTTGGCTGT
911-930F	GAGGCCCGTGAAGTAGAATG
1418-1437F	AGGCCTCGTTCACACTCAAC
1338-1357R	TCCAGATACACCAACCCACA
1992-2012R	TGGAGTCTTCGGTTGATTCTG

4. 結果及び考察

4.1 GAD 相同遺伝子断片の取得

第 1 報では、麹菌や大腸菌等の GAD 遺伝子のアミノ酸配列をもとに混合塩基プライマーを作成し、IK001 株の DNA を鋳型として degenerate PCR を行った結果を報告した。残りの 4 株についても、degenerate PCR 法により数百 bp の遺伝子断片が得られたが、ゲルからの目的断片の切り出しや精製に手間がかかってしまっ

*食品バイオ部門

た。そこで、今回さらに効率よい遺伝子取得法として、*Rhizopus oryzae* の遺伝子データベースを利用することとした。

R. oryzae は、テンペの製造に利用される *R. oligosporus* と同じ *Rhizopus* 属の糸状菌であるが、真菌症を引き起こす菌株が存在することがわかっているために遺伝子解析の研究が進んでおり、遺伝子のデータベースがインターネット上で公開されている。*R. oryzae* と *R. oligosporus* は同属であるために、大腸菌や麹菌と比較すると、遺伝子や塩基配列が似ていることが予想される。

麹菌の GAD 遺伝子の塩基配列 (AB025422)²⁾ を *R. oryzae* のデータベースで検索したところ、*R. oryzae* の GAD 相同遺伝子と考えられる遺伝子の塩基配列約 2000bp が見つかった。そこで、この塩基配列をもとにプライマーを設計し、*R. oligosporus* の DNA を鋳型に PCR を行い、PCR 産物を電気泳動した。PCR 条件を検討したところ、アニーリング温度を 55℃にすることにより、約 2000bp の単一のバンドが得られることが確認された。電気泳動の結果は図 2 のとおりである。

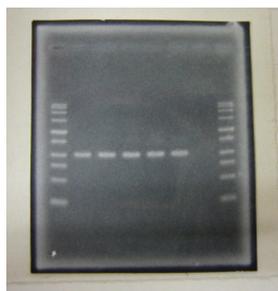


図 1 アガロースゲル電気泳動

(左からレーン 1, レーン 1, 8 は 0.5-12kb Marker, レーン 2-6 は菌株 No. 1-5, レーン 7 はブランク)

4.2 塩基配列決定

PCR により約 2000bp の遺伝子が得られたので、表 2 のプライマーを用いたダイレクトシーケンス法または TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen 社製) を用い、DNA シーケンサー CEQ8000 (Beckman Coulter 社製) により塩基配列を決定した (未決定の部分があるため、データ未掲載)。

5. まとめ

テンペの製造に用いられる *R. oligosporus* 5 菌株について、GABA 生成量に大きな違いが見られたために、GABA の生合成に関与していると考えられる GAD 相同遺伝子断片の取得を試みた。*R. oryzae* の遺伝子データベースを利用してプライマーを設計し、PCR を行ったところ、約 2000bp の遺伝子が得られた。*R. oryzae* の GAD 相同遺伝子が 2035bp、麹菌の GAD 遺伝子 (*gadA*) が 1874bp である²⁾ ことから、ほぼ全長の遺伝子が得られていると推定される。

今後は各 5 菌株について、約 2000bp の塩基配列をすべて決定し、比較を行うとともに、この遺伝子の発現

量が最大となる条件を明らかにしていく予定である。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました (独) 食品総合研究所糸状菌研究室の皆様にご感謝いたします。

参考文献

- 1) 茨城県工業技術センター研究報告第 35 号, 16-17, 2007
- 2) Y. Kato et al., Cloning and Nucleotide Sequence of the Glutamate Decarboxylase-encoding Gene *gadA* from *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(12), 2600-2605, 2002