

# 有用微生物の分子生物学的解析に関する研究（第 3 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利用されている。例えば日本酒・味噌・醤油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* が用いられており、食品に独特の味や成分変化を与えている。

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<sup>1)</sup>。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ます。テンペは大豆を *Rhizopus* 属の糸状菌である *R. oligosporus* (写真 1) 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。



写真 1 *R. oligosporus* IK001

第 1 報<sup>2)</sup> では、テンペ製造に用いられている主な *R. oligosporus* 5 株 (表 1) 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。

第 2 報<sup>3)</sup> では、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試みた結果を報告した。

そこで今回は、GAD 相同遺伝子取得のための条件を再検討し、その塩基配列を決定するとともに、*R. oligosporus* 5 株について分子生物学的手法を用いて判別することを目的として研究を行った。

## 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>

\* 当センター分離菌

特許微生物 FERM AP-20492

(くめ・クオリティ・プロダクツ(株)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 (ニッポン・ジーン) を用い、マニュアルに従ってゲノム DNA を抽出した。

### 3.3 GAD 相同遺伝子の取得 (PCR 条件の再検討)

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および *Rhizopus oryzae* の遺伝子のデータベース ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/rhizopus\\_oryzae/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html)) を基に、GAD 相同遺伝子増幅用のプライマー (表 2) を設計し、テンプレートとして表 1 の No. 1-5 の菌株および比較として *R. oryzae* NBRC4707 株を用いて PCR を行った。

表 2 PCR に使用したプライマー

プライマー名	配列
1-21F	ATGGTTTTCCTTTCCAACGCT
1992-2012R	TGGAGTCTTCGGTTGATTCTG

PCR 酵素として、既報<sup>3)</sup> で用いた TaKaRa Ex Taq Hot Start version (タカラバイオ) のほかに、Hi Fidelity の PCR 酵素として、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ) および KOD-Plus- ver.2 (TOYOBO) を用い、各酵素の基本プロトコルに従って反応溶液を調製し、PCR 反応を行った。PCR は Gene Amp 9700 (アプライドバイオ) を用いた。反応液の一部を取り、アガロースゲル (Agarose H14 または SeaKem GTG Agarose, タカラバイオ) を用いて電気泳動 (ゲル濃度 1.0%, 1×TAE buffer) を行った。

電気泳動により目的のバンド (~2000bp) が得られていることを確認し、単一バンドの場合は SUPREC-PCR (タカラバイオ) で精製した。複数のバンドが得られた場合は SUPREC-EZ (タカラバイオ) で目的のバンドを切り出し精製した。

### 3.4 GAD 相同遺伝子の塩基配列の決定

表 2 のプライマーを用いたダイレクトシーケンス法を用い、DNA シーケンサー CEQ8000 (ベックマンコールター) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとにさらにプライマーを設計し、約 2000bp の塩基配列の決定を試みた。最終的に用いたプライマーは表 3 のとおりである。

表 3 シーケンスに使用したプライマー

プライマー名	配列
1-21F	ATGGTTTTCTTTCCAACGCT
490-509F	GCCTTGAATCTTGCCACATT
798-817F	GGCAAAACGCTCGTAAAGAA
1033-1052F	ATTTTATTGGCTGGGTGCTG
1257-1276F	TGAGCTTGAATGGGATTCC
1992-2012R	TGGAGTCTCGGTTGATTCTG

### 3.5 菌株判別法の検討

表 4 のプライマーを用い、テンプレートとして表 1 の No. 1-5 の菌株および比較として *Rhizopus oryzae* NBRC4707 株または *Aspergillus oryzae* RIB40 を用いて RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 法による解析を行った。PCR 条件は 94°C で 45 秒、40°C で 45 秒、72°C で 2 分を 35 サイクルまたは 94°C で 1 分、36°C で 1 分、72°C で 1 分を 30 サイクル行い、72°C で 7 分の伸張反応を行った。反応液の一部を取り、アガロースゲル (NuSieve 3:1, Cambrex) を用いて電気泳動 (ゲル濃度 3.5%, 1×TAE buffer) を行い、バンドパターンを比較した。

表 4 RAPD 解析に使用したプライマー

プライマー名	配列
BT41	GAGCTGGTTC
BT42	CAGAGTTGCG
021	CAGTGGATCCCATGGTCCACTTATCGAGAGTG
022	GTACAAGCTTGTGAGCATAACCATGCGTCTTC

## 4. 結果及び考察

### 4.1 GAD 相同遺伝子断片の取得 (PCR 条件の再検討)

既報<sup>2)</sup> では GAD 相同遺伝子の取得を目的としていたために反応性や増幅効率を重視し、PCR 酵素として TaKaRa Ex Taq Hot Start version を用いて PCR を行っていたが、今回は塩基配列の決定を目的としていたために特異性と正確性を重視し、Hi Fidelity の PCR 酵素を用いることとし、PCR 条件の再検討を行った。

PrimeSTAR HS DNA Polymerase の基本プロトコルに従い、98°C で 10 秒、55°C で 5 秒、72°C で 2 分を 30 サイクル行って電気泳動を行ったところ、*Rhizopus oryzae* のみバンドが確認された。そこでアニーリング時間を 5 秒から 15 秒にのばして PCR 反応を行ったが、この場合も *R. oryzae* のバンドのみが確認された。そこでさらにアニーリング温度を 55°C から 53°C に下げて PCR 反応を行ったが、この場合もやはり *R. oryzae* のバンドのみが確認された。

これは、*R. oryzae* の遺伝子のデータベースをもとにプライマーを設計したため、Hi Fidelity の PCR 酵素を用いた場合、遺伝子の塩基配列が *R. oryzae* とは多少異なる *R. oligosporus* をテンプレートにしているの、PCR 反応がうまく進まなかったことが原因と考えられる。

つぎに、同じく Hi Fidelity の PCR 酵素である KOD-Plus- ver.2 を用いて PCR 反応を行った。基本プロトコルに従い、98°C で 10 秒、60°C で 30 秒、68°C で 2 分を 35 サイクル行い、68°C で 7 分の伸張反応を行った。反応溶液の一部を取り、アガロース電気泳動を行ったところ、目的のバンド (~2000bp) が得られていることが確認された。しかし、一部の菌株については複数のバンドが検出されたため、副生成物を減らす目的でアニーリング温度を 60°C から 61°C に上げたところ、目的のバンドも得られなくなってしまうことが明らかとなった (写真 2)。



写真 2 アガロースゲル電気泳動

(左 : アニーリング 60°C, 右 : アニーリング 61°C)  
(1 : 0.5-12kb Marker, 2-6 : 菌株 No. 1-5,  
7 : *R. oryzae* NBRC4707, 8 : ブランク)

そこで、アニーリング温度は 60℃とし、目的のバンドを切り出して塩基配列の決定に用いることとした。

#### 4.2 GAD 相同遺伝子の塩基配列の決定

IK001 株の GAD 相同遺伝子について、表 2 に示したプライマーを用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。決定された塩基配列をもとにさらにプライマーを設計し、最終的に表 4 に示したプライマーを用いて、約 2000bp の GAD 相同遺伝子の塩基配列を決定した。さらに表 4 のプライマーを用いて、残りの菌株についても塩基配列を決定し、比較を試みたが、大きな違いは見られなかった。5' 末端, 3' 末端の配列については詳細な解析を行っていないため、5' RACE, 3' RACE 等によりさらに解析を進め、遺伝子全体を明らかにするとともに、麹菌等の既知の GAD 遺伝子<sup>4)</sup> 等と比較し、その働きを解明する必要がある。

#### 4.3 菌株判別法の検討

*R. oligosporus* 5 株について、表 3 に示したプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動によりバンドパターンを比較した。その結果、プライマー BT41 を用いることにより、菌株 1 と菌株 3 で異なるバンドパターンが得られた。また、プライマーセット 021 および 022 を用いることにより、各菌株で異なるバンドパターンが得られた (写真 3)。従って、5 菌株が遺伝子的に異なる菌株であることが明らかとなった。

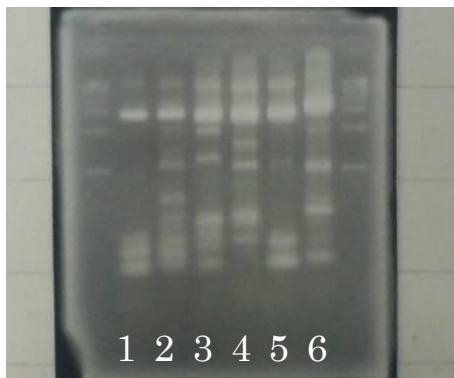


写真 3 RAPD 法による解析

(1-5 : 菌株 No. 1-5,

6 : *Aspergillus oryzae* RIB40)

#### 5. まとめ

*R. oligosporus* 5 菌株について、GABA の生成能が異なっていたことから、GABA の生合成に関与していると考えられる GAD 相同遺伝子を取得し、塩基配列を決定した。今後、麹菌等の既知の GAD 遺伝子との比較を行っていくとともに、今回得られた遺伝子が本当に GABA の生合成に関与しているか確認を行う必要がある。

また、液体培地における GABA 生成のための最適条件の検討を行ったが、窒素源として大豆ペプチドを、炭素源としてスクロースを用い、40℃で培養することにより、より多くの GABA が得られることが確認された

<sup>5)</sup>。そこで、これらの条件において GAD 相同遺伝子の発現量を調べるとともに、さらに GABA を多く生成するような条件の検討を行っていく。

IK001 株に関しては特許が公開されている (公開番号: 2007-110946) が、分子生物学的手法を用いることにより、テンペに使用されている既存菌株との判別が可能となった。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 糸状菌ユニットの楠本憲一ユニット長ならびに糸状菌ユニットの皆様へ深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 分子麹菌学, 財団法人日本醸造協会, 2003
- 2) 茨城県工業技術センター研究報告第 35 号, 16-17, 2007
- 3) 茨城県工業技術センター研究報告第 36 号, 2008
- 4) 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
- 5) 平成 19 年度 食品試験研究成績・計画概要集 (公立編), 83-84, 2007