

I-4-2 DGGEによる糠床の菌叢解析

応用微生物学研究室 北村義明

概要

埴町の竹資源の有効利用の一つの可能性として、糠漬けの糠床に粉碎した竹粉末（以下、竹パウダー）を添加することが考えられている。竹パウダーの使用により、糠漬けの「漬かり」が速くなるとともに、より美味しく漬かるという経験的な観測があるとされている。そこで、実際に糠床に竹パウダーを添加することにより、糠漬けの発酵に関与する微生物叢がどのように変化するかを検証することとした。

菌叢解析については、PCR-DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）法^{1,2)}や近年次世代シーケンサーの利用³⁾による全DNA解析による手法が多用されている。これは、細菌の16Sまたは、真菌の18SリボゾームRNAが、細菌や真菌に共通な保存塩基配列領域と、種や株ごとに特徴的な可変塩基配列領域が交互に配列していることを利用して、まず、保存領域に対応するPCRプライマーで糠床中の細菌又は真菌の全DNAを増幅し、その後可変領域のわずかな塩基配列の違いを高分解能のDGGEで電気泳動バンドとして解析するか、次世代シーケンサーにより網羅的に配列解析するものである。近年の次世代シーケンサーの発展に伴い、大量のDNA塩基配列を網羅的に解析する手法が中心になってきているが、比較的簡便に総体的に電気泳動バンドの有無や濃淡の差で視覚的に比較が可能なDGGE法による菌叢解析も、引き続き利用されている。

今回、埴町より提供された竹パウダーと通常のみ糠を1:1で混合した糠床と、対照としてみ糠のみの糠床で、きゅうりの糠漬けを作製し、PCR-DGGE法によりその糠床中の細菌叢及び真菌叢の比較を行った。

【材料と方法】

(1) 糠床の作製

平成30年3月12日に埴町から提供されたみ糠と竹パウダーを、使用するまで4℃で冷蔵保存した。平成30年3月13日に表1の配合で糠床を混合作製し、1週間、1日1回かき混ぜた。その後、きゅうりの漬け込みを開始し、13日、20日、および22日の糠床をそれぞれ実験試料とした。

表1 糠床混合処方

| 試料名 | み糠 (g) | 竹パウダー (g) | 水 (g) | 食塩 (g) |
|-----|--------|-----------|-------|--------|
| TN | 500 | 500 | 1,000 | 125 |
| N | 1,000 | - | 1,000 | 125 |

(2) 糠床よりの全 DNA の調製

加工食品試料からの全 DNA 調製用試薬キットである *GM quicker 4* ((株) ニッポンジーン) を利用して糠床中の全 DNA を調製した。本試薬キットは元来加工食品中の食品原料中の遺伝子組換え作物等の検出を目的とした全 DNA の調製用キットであるが、食品原料中の各種供雑物質の存在下での DNA 精製を目的としたものであることから、今回の糠床中からの微生物 DNA 調製にも適していると考え、本キットを使用した。尚、DNA の抽出に当たっては、キットのマニュアルに従い操作したが、初発の試料の粉碎については、2 mL マイクロ遠心チューブ中に 1g の試料に、5mm 径のジルコニア製ビーズ二個を加え、 μ T-12 ビーズ破砕機 (タイテック株式会社) を用いて、3200 rpm で 45 秒の震盪を行うことにより粉碎処理を行った。

(3) PCR による糠床中の全細菌及び糸状菌のリボソーム DNA の増幅。

図 1 の細菌用及び糸状菌用プライマーを用い、0.5 mL 容 PCR チューブにて、耐熱性 DNA ポリメラーゼとして KPD Plus (TOYOBO) を用いて、PC-708 Program Temp Control System ((株) アステック) により PCR を行った。尚、反応は図 2 の反応液組成で、図 3 に示した 2 steps PCR の温度条件で増幅した。1%アガロースゲル電気泳動で増幅バンドを確認後、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) により精製した。

細菌用⁴⁾ :

F984GC 5'- cgcccggggcgcgccccggggcgggggcgggggcacggggggaacgcgaaga
accttac -3'

1378 r 5' - cggtgtgtacaaggcccggaacg -3'

糸状菌用⁴⁾ :

NS1 5'- gtagtcatatgcttgtctc -3'

GCFung 5'- cgcccgcgcgccccgcgccccggccccgcgccccgccccattccccgttaccggtg -3'

図 1 PCR Primer

| | | | | | |
|-------------------------|---------------|--------|-----------------|--------|--------------|
| 10 x KOD buffer | 5 μ L | Step 1 | 95 $^{\circ}$ C | 3 min | x 1 cycle |
| 2 mM dNTP | 5 μ L | Step 2 | 95 $^{\circ}$ C | 30 sec | } x 35 cycle |
| 25 mM MgSO ₄ | 2 μ L | | 60 $^{\circ}$ C | 30 sec | |
| Primer (10 mM) 各 | 1.5 μ L | Step 3 | 60 $^{\circ}$ C | 3 min | x 1 cycle |
| Template DNA | 1 μ L | | | | |
| KOD-Plus (1U/mL) | 1 μ L | | | | |
| 滅菌水 | to 50 μ L | | | | |

図 2 PCR 反応液組成

図 3 PCR 温度条件

(3) DGGE(変性剤濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

DGGE は森本ら⁴⁾の方法に従い、バイオラッド社のユニバーサルミュートーション検出システム DCode を用いて、ゲルサイズ 160 x 160 mm, 1 mm 厚のゲルを用い電気泳動を行った。尚、グラジエントゲルの作成については密度勾配装置円筒型 No.2 ((株) サンプラテック) を利用した。

細菌分析は、アクリルアミド/ビス (37.5:1) 6%, 1 x TAE, 変性剤濃度 50%–70%のゲルで、58 $^{\circ}$ C、50V、18 時間の泳動を、糸状菌分析は、アクリルアミド/ビス (37.5:1) 7%, 1 x TAE, 変性剤濃度 20%–45%のゲルを用いて、50V で 20 時間電気泳動を行った。尚、変性剤濃度 100%は、尿素 7M, ホルムアミド 40%に相当する。泳動後のゲルを GelGreen (富士フイルム和光純薬) で染色し、励起波長 480nm の Visi-Blue トランスイルミネーター (Analytik Jena) を用いて DNA バンドを検出した。

【結果と考察】

1. 糠床 DNA の抽出

2018 年 3 月 13 日に調製した米ぬかみの糠床、竹パウダーを添加した糠床と、原料の米ぬかと竹パウダー、それと 13 日目、20 日目、22 日目の各糠床について、*GM quicker 4-GMO DNA Extraction Kit for Processing food* - キット (ニッポンジーン) にて調製した全 DNA を Agarose (1%) 電気泳動にて純度検定した電気泳動写真を図 4 に示す。糠床の違いにより収量の差は出たが、高分子画分バンドがクリアーに泳動されて、低分子化したシェアバンドが比較的少ない良質な全 DNA が得られた。

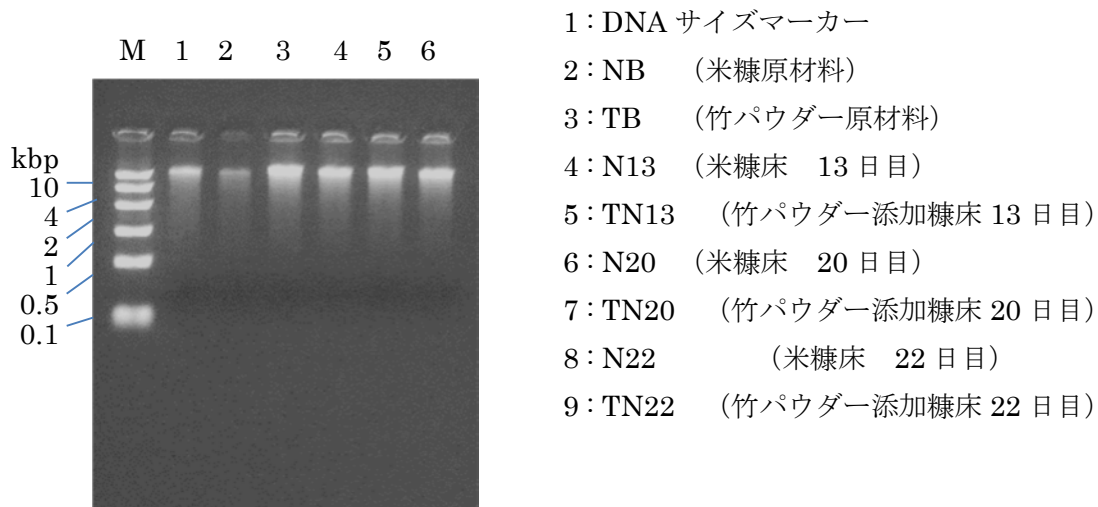
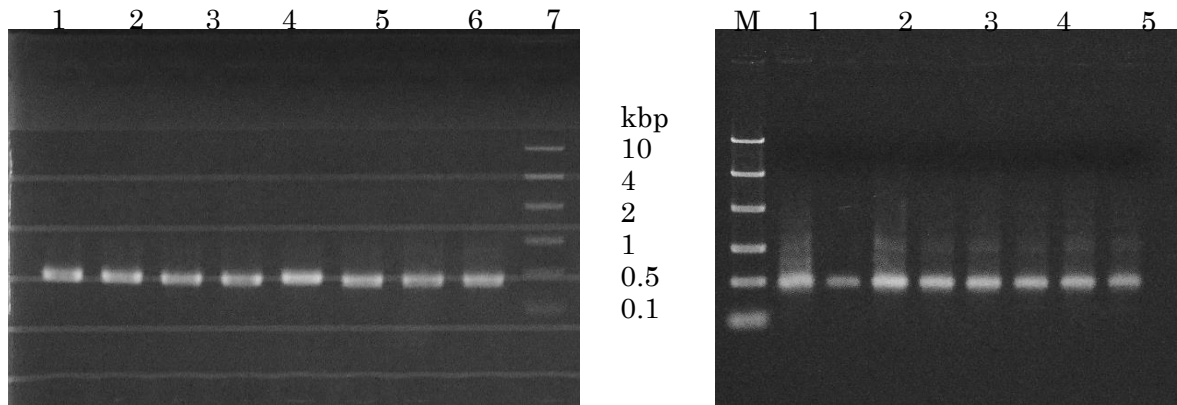


図 4 糠床・竹パウダー添加糠床の全 DNA のアガロース電気泳動

2. 糠床全 DNA よりの細菌、糸状菌リボソーム DNA 領域の PCR 増幅

図 1 の細菌用プライマー及び糸状菌用プライマーを用い、表 2 の KOD Plus DNA ポリメラーゼ反応液組成にて、図 1 の温度条件で増幅を行った PCR 産物の 1%アガロース電気泳動を図 5 に示す。細菌用プライマーセットでは、395bp, 糸状菌用プライマーセットでは 348bp と増幅 DNA サイズが短いため、伸長反応を省略した 2STEP での PCR を行ったところ、全ての試料にて目的サイズの DNA の増幅バンドが得られた。目的サイズの上側に若干の副産物の生成も見られたが、これらの PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用い、プロトコール通りの操作で精製し、以下の DGGE に供した。



糸状菌用プライマーセット

細菌用プライマーセット

図 5 糠床 DNA をテンプレートとした微生物リボゾーム DNA の PCR 増幅

- 1: NB (米糠原材料)
- 2: TB (竹パウダー原材料)
- 3: N13 (米糠床 13 日目)
- 4: TN13 (竹パウダー添加糠床 13 日目)
- 5: N20 (米糠床 20 日目)
- 6: TN20 (竹パウダー添加糠床 20 日目)
- 7: N22 (米糠床 22 日目)
- 8: TN22 (竹パウダー添加糠床 22 日目)
- M: DNA サイズマーカー

3. DGGE による糠床菌叢の解析

糠床より抽出した全 DNA より PCR 増幅した糸状菌 18S リボゾーム DNA 及び細菌 16S リボゾーム DNA の DGGE 結果を図 6 に示す。また、図 6 の各レーンの中心部の拡大を図 7 に示した。

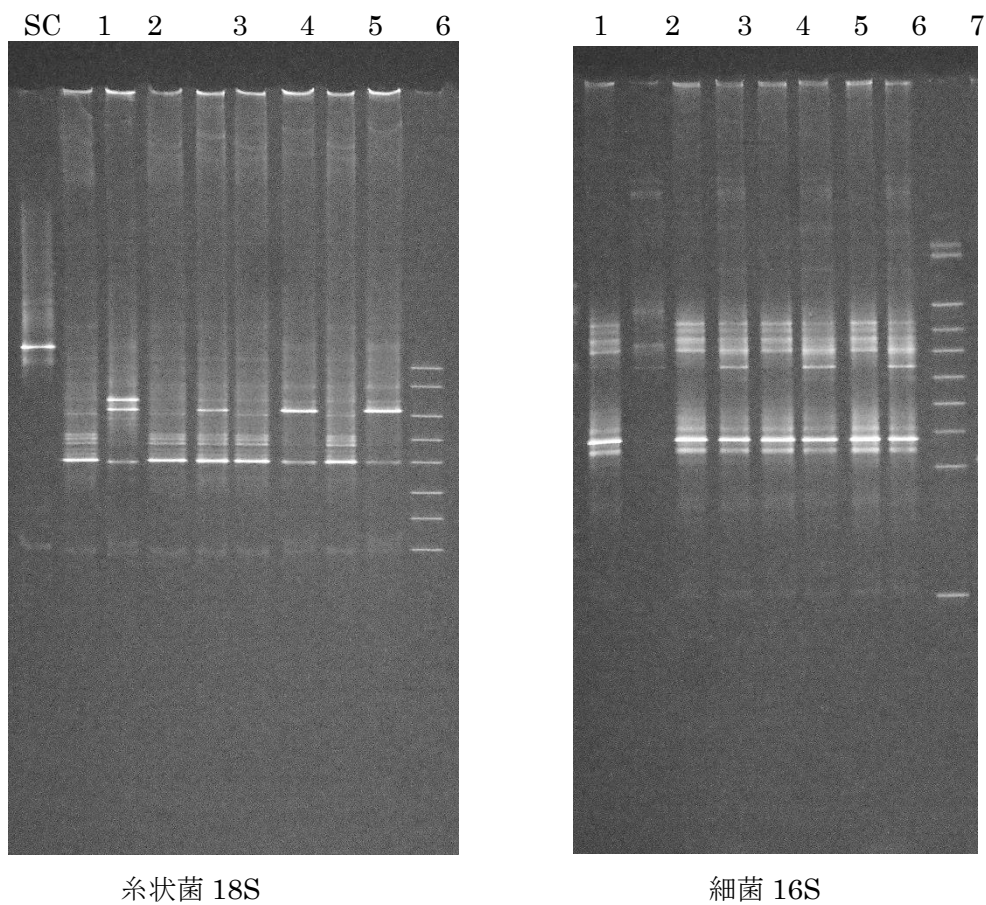
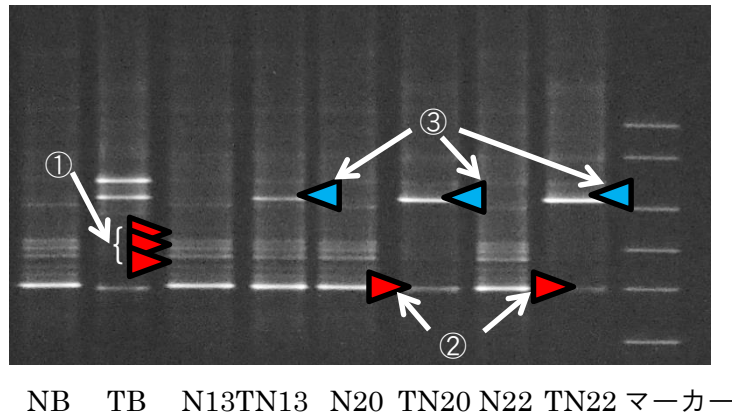


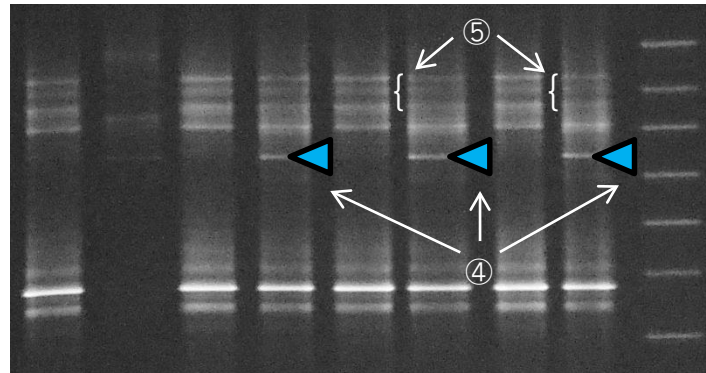
図6 糠床 DNA の糸状菌 18S (左) および細菌 16S (右) リボゾーム DNA の DGGE

- SC : *Saccharomyces cerevisiae* (パン酵母)
- 1 : NB (米糠原材料)
- 2 : TB (竹パウダー原材料)
- 3 : N13 (米糠床 13 日目)
- 4 : TN13 (竹パウダー添加糠床 13 日目)
- 5 : N20 (米糠床 20 日目)
- 6 : TN20 (竹パウダー添加糠床 20 日目)
- 7 : N22 (米糠床 22 日目)
- 8 : TN22 (竹パウダー添加糠床 22 日目)
- 9 : DGGE マーカー (左 : マーカー IV, 右 : マーカー III ((株) ニッポンジーン))

糸状菌叢



細菌叢



- ▶ : 竹パウダー添加により糠床より消失または著しく弱くなったバンド
- ▶ : 竹使用により新たに出現又は著しく強くなったバンド

図7 糸状菌 DGGE バンド (図6左) のバンドの消長

まず、糸状菌用プライマーで増幅した図6左図及び図7上を見ると、米糠原料より検出された3本の特徴的なバンド(図7の①)が13日目の両糠床(N13、TN13)では同様に観察されるが、熟成が進んだTN20、TN22では薄くなっており、これらの菌が熟成によって減少していることがわかる。一方図7中の③のバンドは、竹パウダー原料(TN)にくっきりと観察できるバンドであるが、TN13からTN20、TN22と熟成が進むに従ってバンドの強度が相対的に強くなっており、この菌が竹パウダー入りの糠床中で増加していると考えられる。又、これに反して②のバンドは米糠由来の菌のバンドであるが、竹パウダー添加のもののみ熟成に従って薄くなっており、この菌が相対的に減少している。

一方、細菌用プライマーで増幅したPCRバンドの場合は、④で示した一本のバンド以外は全て原料米糠(NB)由来のものが全てにおいて検出された。また、⑤の領域に見られるバンドが、熟成が進むに従って若干不明瞭となっており、これらの菌株が若干竹パウダー添加の影響を受けているものとみられる。④のバンドは竹パウダーを添加したT13、T20、T22で明確に検出されており、TBにも見られ、竹パウダー由来の細菌であると考えられる。

以上の結果から、竹パウダーの添加により、竹パウダー由来の糸状菌(真菌)

と細菌の糠床中での繁殖が確認されるとともに、米糠由来のいくつかの菌株が竹パウダーの添加により勢力を弱めていることが確認できた。

今回の DGGE 試験にあたり、当研究室では微量 DNA の定量操作を行える機器がないため、DGGE ゲルにアプライする DNA 量が一定にできなかった。このため、TB のバンドが全体的に薄くなっており、これらの厳密なバンド比較はできていない。アプライ DNA 量を正確に一定にすることと、画像解析ソフトウェアの使用によりバンドパターンを正確に比較する必要があると考える。各バンドをゲルから回収した後、再度 PCR 増幅して、シーケンス解析、データベース照合を行うことにより菌種の同定が可能であるので、今後特徴的なバンドについての菌種同定を行う予定である。

【参考文献】

- 1) 須賀有子, 豊田剛己, 土壤中の遺伝子・遺伝子情報・・・何ができるのか, 何がわかるのか 5. 土壤微生物の群衆構造解析 (その1) DGGE, 原理と畑土壤への適用、日本土壤肥料学会誌 76(5), 649-655 (2005)
- 2) MUYZER, G, *et al.*, Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700 (1993)
- 3) 東佳那子, 中山二郎, 進化する次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析、町内細菌学雑誌 29, 135-144 (2015)
- 4) 森本 晶, 星野 (高田) 裕子, PCR-DGGE 法による土壤生物群集解析法 (1) 一般細菌・糸状菌の解析、土と微生物 62,