

## PCR法を用いた植物性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDOの識別

中川良二 §

### Distinguishing *Lactobacillus plantarum* Hokkaido by PCR analysis

Ryoji Nakagawa

*L. plantarum* HOKKAIDO, a lactic acid bacteria isolated from Japanese pickles, is a good fermenter of beans, vegetables and fruits. When the HOKKAIDO strain is applied as a starter, contamination by other types of lactic acid bacteria must be prevented. A RAPD-PCR method was used with multiplex PCR to distinguish between the HOKKAIDO strain and other types of lactic acid bacteria. PCR analysis was found to be effective for such distinguishing.

乳酸菌は糖を発酵し、主として乳酸を産生する細菌の総称で、グラム陽性の桿菌または球菌で、カタラーゼ陰性という特徴をもつ。また、ヨーグルト、チーズ、キムチ、漬物など様々な発酵食品の製造で使用され、人間の生活に深く関係している細菌でもある。現在、このような有用な乳酸菌はスタータとして純粋培養され、製造および品質の安定化のために広く用いられている。スタータを使った発酵食品などでは、他の微生物の汚染、特に同種の細菌や同種異株のコンタミネーションが問題となる。

*Lactobacillus plantarum* は、桿菌に分類される乳酸菌であり、広く発酵食品中から分離される。また、化学分類的手法では *L. pentosus*, *L. paraplantarum* と区別することができない。これらは Dellaglio ら<sup>1)</sup>により、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの解析結果に基づいて区別された。さらに、Torriani ら<sup>2)</sup> はこれらを迅速かつ容易に識別する方法として、*recA* 遺伝子領域をマーカーとして用いる PCR 法を提案した。また、同種異株の識別には PAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法が有効である<sup>3, 4)</sup>。本研究では、我々がこれまでに漬物から分離した乳酸菌で、俗に植物性乳酸菌と呼ばれる *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO (以下、HOKKAIDO 株と略す)<sup>5, 6)</sup> の産業利用の過程で問題と

なるコンタミネーションを迅速にチェックすることを目的として、RAPD 法などを用いた HOKKAIDO 株と幾つかの *Lactobacillus plantarum* 株間の識別法について検討した。

#### 1. 実験方法

##### (1) 供試菌株

*L. plantarum* HOKKAIDO 株, *L. plantarum* JCM1149<sup>T</sup>, *L. plantarum* IFO3070, *L. plantarum* AHU1413, *L. pentosus* IFO12011, 雪印種苗より分与された *L. plantarum* FG-1 (FG-1 株と略す), 市販の食品より分離した *L. plantarum* 株 (FOOD 株と略す), 漬物から分離した *L. sake* の近縁種 (SK-2 株と略す) を供試した。

##### (2) DNA の抽出

供試菌株を *Lactobacilli* MRS Broth (GIBCO) により 35°C, 2 日間培養した。培養液 10μl をエッペンチューブに取り、遠心分離 (15,000rpm, 5 分間) で上清を除去した後、Nagashima ら<sup>7)</sup> の方法に従って DNA 試料を調製した。すなわち、菌ペレットを 500U/ml のアクロモペプチダーゼ (和光純薬) を含む Tris-NaCl-EDTA 溶液 {10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM NaCl, 1mM

EDTA (pH8.0) 50 $\mu$ l に懸濁した。55 $^{\circ}$ C, 10 分間インキュベーションした後, 100 $\mu$ l のインスタジーン (BioRad) を加え, さらに 56 $^{\circ}$ C, 15 分間インキュベーションした。10 秒間ボルテックス攪拌機で激しく攪拌した後, 100 $^{\circ}$ C の沸騰水槽に 8 分間浸けた。10 秒間ボルテックス攪拌機で激しく攪拌した後, 遠心分離 (10,000rpm, 3 分間) し, 上清を DNA 試料とした。

### (3) 遺伝子解析

上記方法で調製した DNA 試料を用いて, *L. plantarum* グループの検出には Sandra Torriani ら<sup>2)</sup> が報告した *recA* gene をターゲットとした multiplex PCR 分析により, *L. plantarum* 株間の識別はシングルプライマーを用いた RAPD 法<sup>3, 4)</sup> により行った。RAPD プライマーは Dautle ら<sup>3)</sup> が設計したプライマー (以下では LacRAPD-1 と記す) または Spano ら<sup>4)</sup> が設計したプライマー (以下では LacRAPD-2 と記す) を用いた。RAPD 試薬は Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (Amersham) を用い, 添付マニュアルに準じて測定した。

## 2. 実験結果および考察

### (1) *L. plantarum* グループの識別

Torriani ら<sup>2)</sup> が報告した *recA* gene をターゲットとした multiplex PCR 分析では, *L. plantarum* は約 320bp に, *L. pentosus* は約 240bp にバンドが検出される。図 1 に示したように, 本研究で使用した 6 株の *L. plantarum*

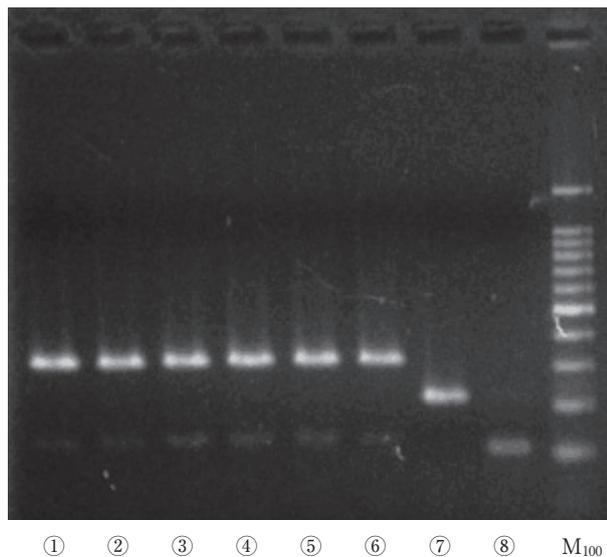


図 1 *recA* gene をターゲットとした multiplex PCR 分析

①: HOKKAIDO 株, ②: FG-1 株, ③: JCM1149T, ④: IFO3070, ⑤: AHU1413, ⑥: FOOD 株, ⑦: IFO12011, ⑧: SK-2 株, M100: 100bp ラダー分子量マーカー,

(レーン①-⑥) と *L. pentosus* (レーン⑦) では予想される位置に単一バンドが認められた。また, *L. sake* の近縁種である SK-2 株では 100bp 付近に薄いバンドがあった (レーン⑧)。以上から, multiplex PCR 分析により本研究で使用した全ての *L. plantarum* に属するとされていた菌株は他菌種と識別することができ, 全て *L. plantarum* であることが示唆された。

### (2) *L. plantarum* 株間の識別

図 2 に示したように, プライマーとして LacRAPD-1 及び LacRAPD-2 を用いた RAPD 法によって, *L. pentosus* (レーン⑦) と *L. sake* 近縁種 (レーン⑧) では 6 株の *L. plantarum* (レーン①-⑥) とは全く異なるバンドパターンを示した。一方, *L. plantarum* 株間では, 非常に類似したバンドパターンを示したが (レーン①-⑥), LacRAPD-1 及び LacRAPD-2 の結果を合わせ比較することにより, それらを識別することができた。したがって, 特異的プライマーを用いた RAPD 法によって HOKKAIDO 株と他の *L. plantarum* 株と識別可能であることが示唆された。

PCR を用いるこれらの方法は, サンプルから分析結果を得るまで 3 日程度と迅速であり, 分析操作も煩雑でないことから HOKKAIDO 株の識別の有効な手法であろうと考えられる。

## 3. 要約

漬物由来の植物性乳酸菌である *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO の産業利用の過程で問題となる同種異株の汚染を迅速にチェックするために, RAPD 法などを用いて幾つかの *L. plantarum* 株間との識別を試みた。その結果, 特定のシングルプライマーを使うことによって識別することが可能であった。

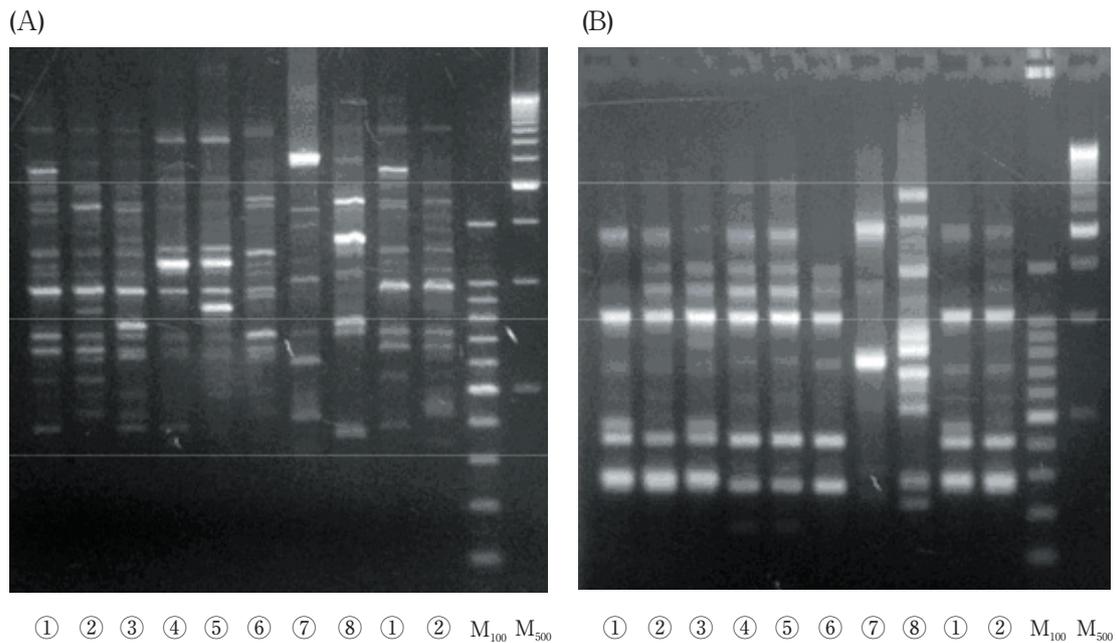


図2 LacRAPD-1 (A)またはLacRAPD-2 (B)を用いたRAPD-PCR分析

①: HOKKAIDO 株, ②: FG-1 株, ③: JCM1149T, ④: IFO3070, ⑤: AHU1413, ⑥: FOOD 株, ⑦: IFO12011, ⑧: SK-2 株, M100: 100bp ラダー分子量マーカー, M500: 500bp ラダー分子量マーカー

#### 参考文献

- 1) Dellaglio, F., Bottazzi, V., and Vescovo, M., Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25, 160-172 (1975).
- 2) Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F., Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA genederived primers, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3450-3454 (2001).
- 3) Dautle, M. P., Ulrich, R. L. and Hughes, T. A., Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification: *J. Clin. Microbiol.*, 40, 414-421 (2002).
- 4) Spano, G., Beneduce, L., Tarantino, D., Zapparoli, G. and Massal, S., Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR, *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 370-374 (2002).
- 5) 中川良二, 八十川大輔, 長島浩二, 新規な乳酸菌とそれを用いて得られる発酵豆乳およびその製造方法, 特願 2004-68091.
- 6) 中川良二, 八十川大輔, 長島浩二, *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO を用いた豆乳ヨーグルトの製造およびその機能性, *食科工*, 52, 140-143 (2005).
- 7) Nagashima, K., Shimizu, T., Takeshi, K., Kawakami, M., Yasokawa, D., Nakagawa, R., and Okumura, Y., A simple and sensitive polymerase chain reaction method for the detection of food-related bacteria, *Food Sci. Technol Res.*, 6, 115-118 (2000).