

ノート

味噌由来乳酸菌のプラスミドの単離と特徴

池田隆幸・八十川大輔・中川良二・長島浩二

Isolation and Characterization of Plasmids in Lactic Acid Bacteria Extracted from Japanese Soybean Paste (Miso)

Takayuki IKEDA, Daisuke YASOKAWA, Ryoji NAKAGAWA and Koji NAGASHIMA

乳酸菌は多くの発酵食品製造に関与する重要な菌の一つである。北海道では各種乳製品、味噌、醤油、漬物などの乳酸菌関与食品の生産額が食品工業出荷額の約15%を占めており、これら食品の付加価値をさらに高めるために、乳酸菌改良技術の確立は極めて重要な研究課題の一つである。中でも、味噌、醤油、漬物などの農産品発酵食品に極めて重要な役割を果たしている *Pediococcus* 属と呼ばれる乳酸菌の育種改良技術は、乳関係の乳酸菌に比べて非常に研究が遅れている。さて、遺伝子組換え技術は近年急速に発展した育種改良技術であり、新規食品の開発や食品製造プロセスの改善のためには必要不可欠な技術となりつつある。このような観点から、我々は *Pediococcus* 属を中心とする乳酸菌の育種改良のための宿主ベクター系の開発と有用形質の探索導入技術の確立を目指している。ここでは遺伝子組換えに必要なプラスミドベクターを構築するために、自然界から乳酸菌プラスミドの検索を行ったので報告する。

まず、乳酸菌の分離源として北海道内の味噌を製造している企業4社から発酵途中の味噌10サンプルを提供していただいた。それぞれの味噌サンプルを、滅菌水で10倍に希釈後、15%のNaClと1%のCaCO₃を含むGYP寒天培地¹⁾に塗布し37°C 2~3日間培養した。寒天培地上に生育してきたコロニーの内、CaCO₃を溶かしてハローを形成しているコロニーを好塩性乳酸菌として分離保存した。その結果、10種類の味噌サンプルから合計約200株の好塩性乳酸菌を分離した。

次に、分離した菌の中からプラスミドを確認する目的で、それぞれの菌を10%のNaClを含むGYP液体培地で培養した。集菌後、プラスミドを以前報告した方法²⁾に従って分離精製した。プラスミドの検出は0.75%のアガロースゲル電気泳動で行った。その結果、供試した200株

の乳酸菌の内40株がプラスミドを保持していることが明らかとなったが、プラスミドの分子量パターン等からFig.1に示す8つのタイプに分類されることが明らかとなった。このうち、B18株は1種類のプラスミドを保有しており、そのサイズもプラスミドベクターとして適当であると考えられたので、このプラスミドをベクター候補として選択し、pSKPB18と命名し以後の解析を行った。また、この分離したB18株は顕微鏡観察や生化学的諸性質およびリボソームRNAの塩基配列から *Pediococcus halophilus* と同定された。

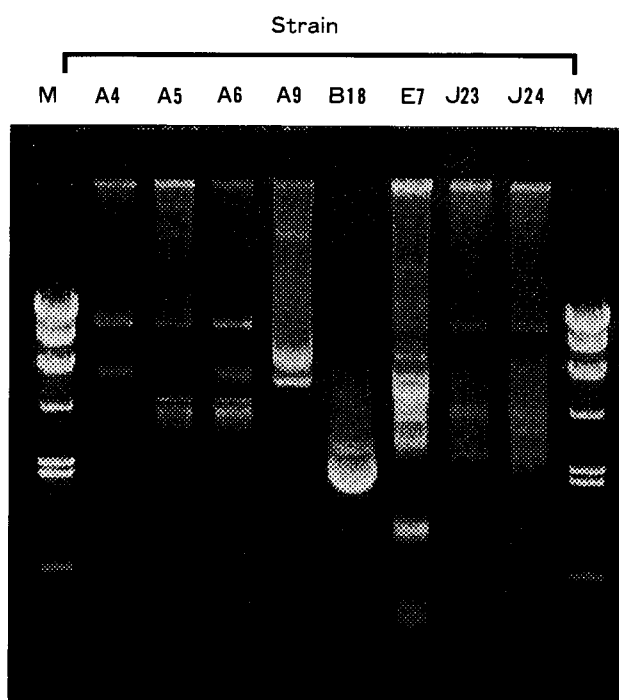


Fig.1 Agarose gel electrophoresis of plasmids from halophilic lactic acid bacteria
M: λ -HindIII marker. 1: Strain No. A4; 2: A5; 3: A6; 4: A9; 5: B18; 6: E2; 7: J23; 8: J24

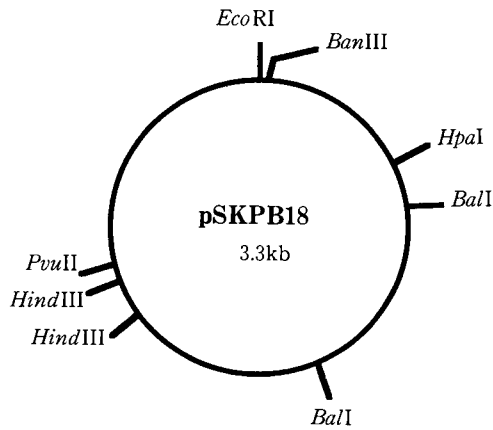


Fig.2 Restriction map of pSKPB18

pSKPB18を液体培養したB18株から分離精製した後、超遠心機を用いた平衡密度勾配遠心法³⁾でさらに精製した。このpSKPB18を制限酵素 *BalI*, *BamHI*, *BanIII*, *BglII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HpaI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *PvuII*, *Sall*, *SmaI*, *SphI*, *XbaI*, *XhoI*(いずれも宝酒造(株)製)で、切断反応した。反応条件は、それぞれの酵素の最適条件で行った。その結果、*EcoRI*, *PvuII*, *HpaI*, *BanIII*で1カ所ずつ、*HindIII*, *BalI*で2カ所切断されることが明らかとなり、アガロースゲル電気泳動

による泳動距離と、 λ -*HindIII* マーカーとの比較から長さ3.35キロベースペア(kb)と推測した。2種類及び3種類の酵素で同時に切断して切断部位間の距離を測定し、Fig.2に示す制限酵素切断地図を作製した。

pSKPB18は、3.35 kbと比較的小型のプラスミドで、塩基配列の解析などが容易に行うことができると考えられた。また、外来遺伝子のクローニングサイトとして6塩基認識の制限酵素 *EcoRI*, *PvuII*, *HpaI*, *BanIII* の切断サイトを有しており、プラスミドベクターとして有望であると考えられた。今後は、さらにこのpSKPB18の解析を進めると共に、宿主菌の形質転換法の開発を検討する予定である。

文 献

- 1) 小崎道雄監修：乳酸菌マニュアル—分離から同定まで—(朝倉書店、東京)、p.15 (1992)。
- 2) 池田隆幸・八十川大輔・長島浩二：北海道立食品加工研究センター研究報告、1、67 (1994)。
- 3) MANIATIS, T., FRITHCH, E.F., and SAMBROOK, J.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.), p.90 (1992)。