

ノート

Pediococcus halophilus からのプラスミド分離方法

池田隆幸・八十川大輔・長島浩二

Minipreparation Method of Plasmid DNA from *Pediococcus halophilus*

Takayuki IKEDA, Daisuke YASOKAWA and Koji NAGASHIMA

乳酸菌 *Pediococcus halophilus* からプラスミドを分離する方法を開発した。本方法を用いることで、味噌及び醤油などに生息する乳酸菌からプラスミドを容易に分離することができ、新規ベクターの開発や製品中の乳酸菌分布調査などへの応用が期待できる。

乳酸菌 *Pediococcus halophilus* は耐塩性に優れ、わが国における代表的発酵食品である味噌、醤油等の製造に重要な役割を果たしてきた。これらの製品は、従来いわゆる「蔵付き」の乳酸菌によって発酵が自然にコントロールされてきたが、最近では、選択された *P. halophilus* をスターターとして加えることも試みられている。

しかし、本菌の生化学的、遺伝学的な解析は始まったばかりで、遺伝子解析のための宿主ベクター系も構築されていない。そこで、*P. halophilus* からプラスミドを分離解析しベクターとして開発することが必要となるが、従来の方法ではあらゆる種類の *P. halophilus* 分離菌から安定にプラスミドを分離することは困難であった。そこで、*P. halophilus* に適したプラスミドの分離方法を従来の大腸菌のアルカリ溶菌法⁽¹⁾及び高橋らによる乳酸菌細胞壁の溶解条件⁽²⁾をモデルとして開発した。

- ① 分離した *P. halophilus* を GYPN 白亜寒天培地*1 (GYP 白亜寒天培地⁽³⁾に 7%NaCl を添加し、NaOH で pH 8.0 とした寒天培地) に塗布し、30°C で 2 日間静置培養する。
- ② 得られたコロニーを、1%グリシンを添加した GYPN 液体培地(GYPN 白亜寒天培地から、CaCO₃ と寒天を除いた液体培地) 10 ml に植菌し、30°C で 2 日間静置培養する。
- ③ 培養液を 4°C、3,300 回転、10 分間遠心して集菌し、

得られた菌体を 1 ml の 100 mM グリシン-NaOH (pH 11.0) 緩衝液に懸濁後、37°C で 20 分間静置する。

- ④ 4°C、4,000 回転、5 分間の遠心分離で菌体を回収する。
- ⑤ 菌体を 150 μ l の溶菌液 (10 mg/ml リゾチーム、5 mg/ml N-アセチルムラミダーゼ SG、25 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、50 mM グルコース、10 mM エチレンジアミン-4-酢酸-2-ナトリウム (EDTA)) に懸濁後、37°C 30 分間静置し溶菌させる。
- ⑥ 溶菌した液に 300 μ l の 0.2 N NaOH、1% SDS 溶液を加え攪拌後 0°C 5 分間静置する。
- ⑦ 225 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え十分攪拌後 0°C で 10 分間静置する。
- ⑧ 4°C、15,000 回転、10 分間の遠心分離で沈殿を除き上清を回収する。
- ⑨ 上清にフェノール-クロロホルム 1:1 溶液を 500 μ l 加え激しく攪拌後、20°C、15,000 回転 5 分間の遠心分離で水層 (上層) を回収する。
- ⑩ 水層に 1 ml のエタノールを加え攪拌後室温で 10 分間静置する。
- ⑪ 15,000 回転 5 分間の遠心分離で沈殿を回収する。
- ⑫ 沈殿に 70%エタノールを加えさらに 15,000 回転 5 分間の遠心分離後、沈殿を乾燥し、100 μ l の TE 溶液 (10 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、1 mM EDTA) に溶解する。
- ⑬ 2 μ l の 1 mg/ml リボヌクレアーゼ A 溶液を添加し 37°C で 1 時間静置後、20 μ l の 5 M NaCl と 40 μ l の 40%ポリエチレングリコール溶液を加え氷上で 2 時間静置する。
- ⑭ 4°C、15,000 回転、5 分間の遠心分離で沈殿を回収

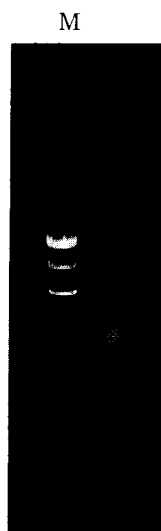


図1 *Pediococcus halophilus* JCM5888 株由来
プラスミドのアガロースゲル電気泳動
M: λ ファージ DNA を制限酵素 *Hind* III で切断
した分子量マーカー

し、100 μ l の TE 溶液に溶解する。

- ⑮ 100 μ l のフェノール-クロロホルム 1:1 溶液、
100 μ l のクロロホルムでそれぞれ 1 回ずつ除タンパクする。
- ⑯ 水層に 10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と
300 μ l のエタノールを加え -20°C に 10 分間放置する。
- ⑰ 4°C 、15,000 回転、5 分間の遠心分離後、沈殿を 70%
エタノール溶液で洗浄しアスピレーターによる減圧下
で乾燥する。
- ⑱ 沈殿を 50 μ l の TE 溶液に溶解しプラスミド DNA
溶液とする。 -20°C で保存。

例として *P. halophilus* JCM 5888 株を用いて以上の一連の操作を行い、得られた DNA 溶液 10 μ l を 0.7% アガロースゲル電気泳動した結果を図 1 に示した。若干の染色体 DNA が認められるが、制限酵素解析などには十分な量と純度のプラスミド DNA サンプルが得られた

と考えられる。

ここで報告したプラスミド DNA の分離方法を用いることによって、味噌及び醤油などから分離した *P. halophilus* のプラスミド検索を容易に行うことができるようになり、乳酸菌 *P. halophilus* の遺伝的解析が一層進むと考えられる。さらに、味噌醤油製品中の乳酸菌分布をプラスミドをマーカーとして調べることができるとともに、スターターとして添加した乳酸菌にプラスミドが存在すれば、プラスミド存在比からスターター乳酸菌の添加効果を確認することも容易に行うことができると期待される。

* 1 GYPN 培地	
グルコース	1.0 g
酵母エキス	1.0 g
ペプトン	0.5 g
肉エキス	0.2 g
酢酸 Na \cdot 3 H ₂ O	0.2 g
塩溶液	0.5 ml
MgSO ₄ \cdot 7 H ₂ O	4.0 g
MnSO ₄ \cdot 4 H ₂ O	2.0 g
FeSO ₄ \cdot 7 H ₂ O	2.0 g
NaCl	2.0 g/ℓ
50 mg/ml Tween 80 溶液	1.0 ml
NaCl	70.0 g
CaCO ₃	0.5 g
寒天	1.2g/100ml (pH8.0)

文 献

- 1) MANIATIS, T., FRITCH, E.F. and SAMBROOK, J.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold
Spring Harbor, N.Y.), p.90(1982).
- 2) 高橋正明・岡田早苗・内村 泰・小崎道雄・駒形
和男: 1993 年度日本農芸化学会大会講演要旨集,
p.320, 仙台(1993).
- 3) 小崎道雄監修: 乳酸菌実験マニュアル — 分離か
ら同定まで — (朝倉書店, 東京), p.15(1992).