



Title	乳酸生成型Rhizopus oryzaeの選択的PCR法による迅速選抜法
Author(s)	阿部, 歩
Citation	北海道大学大学院農学研究科技術部研究・技術報告, 10, 7-10
Issue Date	2003-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/35444
Type	bulletin (article)
Note	研究・技術発表
File Information	10_p7-10.pdf



[Instructions for use](#)

乳酸生成型 *Rhizopus oryzae* の 選択的 PCR 法による迅速選抜法

応用生命科学専攻分子生命科学講座 阿部 歩

Rhizopus oryzae は乳酸やフマル酸など有機酸を生成する菌株として古くから知られている。しかし、どの様な有機酸を生産するかということは菌株ごとに異なっており、それぞれ培養を行ってみなければ、どの様なタイプの菌株であるかわからないのが現状である。一方で、乳酸はその汎用性のため需要は大きくなっている。そのため、乳酸を生成する *R. oryzae* を効率的にスクリーニングすることは大変重要と考えられる。

R. oryzae はポテトパルプを用いた発酵試験で主に乳酸を生成するタイプとフマル酸を生成するタイプに分かれることがわかっている(これらタイプ分けされた菌株をそれぞれ A グループ、B グループとする)。我々は、主に乳酸生成を行う菌株をスクリーニングする方法の開発を目指してこれら菌株の乳酸生成能と遺伝学的特徴の比較を行うこととした。そのために、*R. oryzae* の培養及び DNA 抽出法を確立し、ITS 領域を PCR 法で増幅後、その塩基配列の決定を行い、両グループ間での明確な塩基配列の差異を発見した。さらに、その差異を基にプライマーを設計し、迅速に乳酸生成型の *R. oryzae* を探索する方法を開発した。

[方法及び結果]

培養及び DNA 抽出法

DNA 抽出を行うための菌体を得るために液体培養を行った。一度に大量の菌体を得ようと試み、坂口フラスコにて培養を行ったが、生育が悪かったため、試験管に 10ml の培地(Malt extract broth)を用いて培養を行った。3 日間、27°C で振とう培養を行い、菌体を減圧濾過にて得た。菌体は -80°C で凍結した後、減圧乾燥を行った。その後、乳鉢で菌体をすりつぶし、その 50mg を DNA 抽出に用いた。

DNA 抽出は Phenol-Chloroform 抽出を用いた。

ITS 領域の増幅

18S と 28S の間にある 5.8S を含む全領域を増幅するためにプライマー ITS4 と ITS5 を用いて PCR を行った。PCR 条件は 94°C 2 分変性を行った後、94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 35 回行った後、さらに 72°C 5 分間の伸長反応を行った。その結果、全 62 菌株中、57 株で約 650 塩基対の断片が増幅された。これらの断片については塩基

配列の解析を行った。残り 5 株のうち 3 株からは 650 塩基対より長い断片、2 株からは複数の断片が増幅されたが、これらの菌株はすべてポテトパルプを用いた発酵試験においてどちらの有機酸生成タイプか判別できないグループ(C)であったため、今回は塩基配列の解析を行っていない。

PCR 法にて増幅した ITS 領域の塩基配列の解析を行った。その結果、4 箇所 5 塩基で乳酸生成能と関連があると思われる変異が検出された(Fig. 1)。これらは A 及び B グループに分けられた菌株について例外なく一致した。ポテトパルプでの発酵試験ではどちらのタイプか判別できなかったもの(C)や、発酵試験を行っていないグループ(D)の菌株は A または B と同じ配列を持つものがあつた。

乳酸生成型 *R. oryzae* の選択的 PCR 法の開発

ITS 塩基配列の解析で変異のあつた箇所を 3'末端になるようなプライマーを作成し、乳酸生成型の *R. oryzae* のみを選択的に増幅する PCR 条件を検討した。

まず、アニーリング温度とプライマーの組み合わせの検討を行った。その結果からプライマーの組み合わせは F2-R1 の組み合わせを用いることとした。また、アニーリング温度の上昇に伴い非特異的バンドは見られなくなった。次に、鋳型 DNA 濃度とアニーリング温度の検討を行った。前の実験で非特異的バンドが見られなかった 65°C では DNA 量が多くなるとフマル酸型のものでも増幅してしまうことがわかつた。アニーリング温度を 66°C に上げるとフマル酸タイプの増幅は見られなくなったため、この条件で他のすべての菌株について PCR を行った。その結果、フマル酸タイプの菌株(B)でも増幅するものが見られたため、さらに検討を行った。

特異的な PCR を行うための方法はいくつかあるが、そのなかで touch down PCR 法を行った。この方法はアニーリング温度を通常より高い温度から始めてサイクル毎に温度を下げていくことで非特異的増幅を抑える方法である。今回は次のような条件で反応を行った。94°C 2 分間変性を行った後、94°C 15 秒、69°C で 30 秒(1 サイクル毎に 1°C ずつ温度を下げる)、72°C 1 分のサイクルを 8 サイクル行った後、94°C 15 秒、61°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 20 回行い、さらに 72°C で 5 分間伸長反応を行った。この条件で PCR を行った結果、はっきりと乳酸生成型のみを増幅することが可能となつた(Fig. 2)。

食品サンプルからのスクリーニング

Rhizopus 属の菌株を用いた発酵食品として有名であるインドネシアの発酵食品、タペ及びテンペとそのスターターから乳酸生成型 *R. oryzae* をスクリーニングできるか実験を行った。これらの食品サンプルからの DNA 抽出は土壌からの DNA を抽出するキットである UltraClean Soil DNA Isolation Kit を用いて行った。抽出した DNA を直接今回開発した選択的 PCR 法で反応を行った結果 (Fig. 3)、タペ及びそのスターターであるラギタペにおいて増幅が見られた。このことからこれらのサンプルには乳酸生成型 *R. oryzae* が含まれていることが考えられたので、菌株を分離しその性質を調べた。その結

果、Clamydospore を多く作る点など形態学的に *R. oryzae* とは異なっており、糖の資化性の結果から *Amylomyces rouxii* であることがわかった。そこで、*A. rouxii* の標準株を取り寄せその ITS 領域を比較したところ、*R. oryzae* の乳酸生成型株と全く同じであることが確認された。また、その乳酸生成量を HPLC で経時的に測定したところ、培養 5 日目で 25mg/ml の乳酸を生成し、フマル酸はほとんど生成していなかった。

[考察]

rDNA の ITS 領域の解析を行い、*R. oryzae* の間での有機酸生産の違いと相関があるか調べた。ポテトパルプを用いた発酵では、乳酸を生産する型とフマル酸を生産する型に分けられた。ITS 領域の塩基配列の結果は、ポテトパルプでの発酵を行った時のグループ分けと全く同じ結果を示した。このことは、ITS 領域の違いと有機酸生産の違いに相関があることを示唆しており、この違いを利用することで乳酸生産タイプのみをスクリーニングすることができると考えられた。

ITS 領域の違いを利用してプライマーを設計し、touch down PCR 法により、乳酸生成型のみを選択的増幅に成功した。この条件を用いて、インドネシアの発酵食品からスクリーニングを試みたところ、タペおよびラギタペにその存在が認められたので、実際に菌の分離を行った。その結果、*R. oryzae* ではなく *A. rouxii* が分離されたので、*A. rouxii* の ITS 領域の塩基配列を調べたところ、乳酸生成型の *R. oryzae* と全く同じであることがわかった。また、実際にその有機酸生成量を測定してみたところ、明らかに乳酸を生成しており、フマル酸はほとんど生成しないことが確かめられた。今回の方法では、乳酸生成型の *R. oryzae* と *A. rouxii* は区別できないものの、これら 2 種の菌株は形態観察を行うことによって、簡単に見分けがつくので、スクリーニングに用いる方法としては有用であると考えられる。

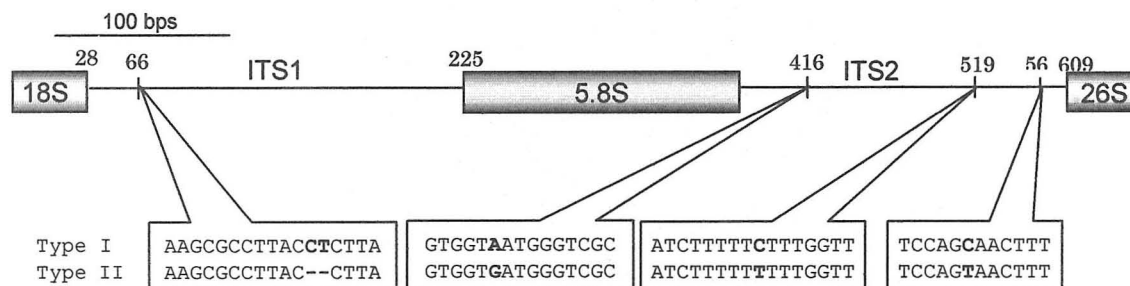


Fig. 1 Aグループ菌 (TypeI) と Bグループ菌 (TypeII) の rDNA ITS 塩基配列. 太字で示した配列に相違がある.

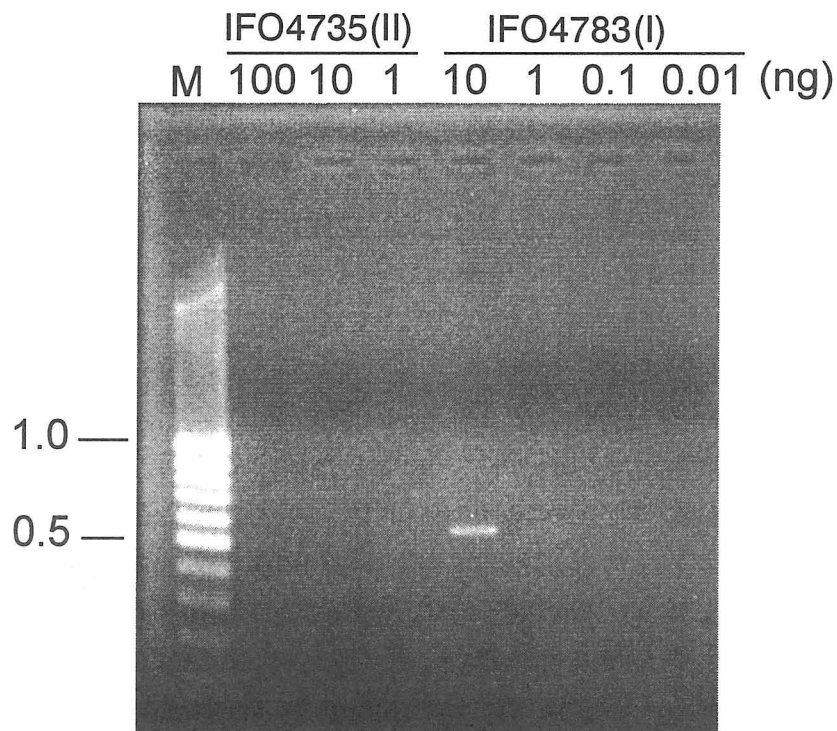


Fig. 2 touchdown PCR 法による増幅結果. 少量の DNA からでも A 型菌の選択的な増幅が可能である.

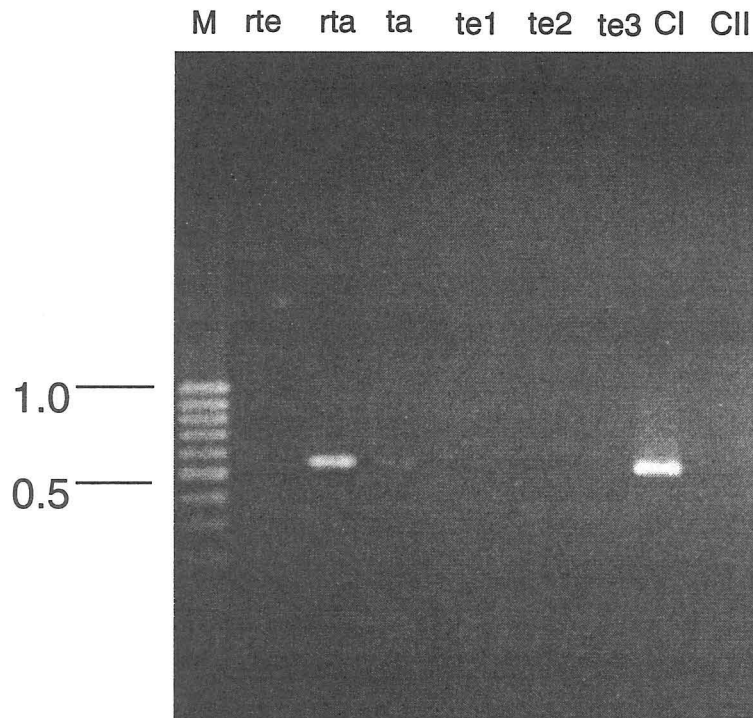


Fig. 3 食品サンプルから抽出した DNA を用いた touchdownPCR 法での増幅結果. M:DNA サイズマーカー, rte:ラギテンペ, rta:ラギタペ, ta:タペ, te:テンペ, CI:ポジティブコントロール, CII:ネガティブコントロール.