

PCR反応による*Lactobacillus paracasei*の識別

高山 清子*¹・水谷 政美*¹・工藤 哲三*¹

Identification of *Lactobacillus paracasei* by Polymerase Chain Reaction

Kiyoko TAKAYAMA, Masami MIZUTANI and Tetsuzo KUDO

これまで宮崎県内の焼酎製造場の焼酎もろみについて生酸菌の分布を調査した。そして63株の乳酸菌を分離、分類し、その性質を調べてきた¹⁻³⁾。ユニバーサルプライマー（5F, 531R）を用いた16S rDNA解析で分類した結果、分離株の約半数が*Lactobacillus paracasei*（以下*L. paracasei*と表記）と分類された。今回、16S rRNA遺伝子のV1領域において*L. paracasei*に特異的なプライマーを用いたPCR反応をおこない同定結果の再確認をおこなった。

キーワード：*Lactobacillus paracasei*, PCR, 焼酎もろみ

1 はじめに

これまで宮崎県内13社の焼酎製造上より24点の焼酎もろみを採取し、生酸菌の分布を調査した結果、焼酎もろみ中には腐造に至らないまでも乳酸菌が存在していた¹⁾。分離した乳酸菌はグラム反応試験、カタラーゼ試験、ユニバーサルプライマーを用いた16S rDNA遺伝子解析およびApiキットによる糖類資化性試験で分類した²⁾。そして焼酎もろみから分離した乳酸菌の多くが*L. paracasei*であることを確認した。

今回、焼酎もろみから最も多く分離された乳酸菌が*L. paracasei*であることを再確認するため、16S rRNA遺伝子のV1領域において*L. paracasei*に特異的なプライマーを用いたPCR反応をおこなったので報告する。

2 実験方法

2-1 DNAの抽出

乳酸菌のDNA抽出は、InstaGene™ Matrix (BIO-RAD製)を用いた。菌体をMilli-Q水1mlに懸濁させ、遠心（13000rpm, 1min）後上清を除いた。InstaGene™ Matrixを200ml加え、湯浴中で15分から30分間56°Cに保った。10秒間かくはん

後、ヒートブロックにて100°Cで8分間加熱した。10秒間かくはんし、遠心（13000rpm, 3min）後の上清をDNA抽出液とした。

2-2 *L. paracasei*に特異的なプライマーを用いたPCR反応

焼酎もろみから最も多く分離された乳酸菌が*L. paracasei*であることを再確認するため、16S rRNA遺伝子のV1領域において*L. paracasei*に特異的なプライマーを用いたPCR反応をおこなった。PCR反応には焼酎もろみから分離し、ユニバーサルプライマーを用いた16S rDNA遺伝子解析およびApiキットによる糖類資化性試験で*L. paracasei*と分類された3株、およびその標準株*L. paracasei* subsp. *paracasei* (JCM 8130), *L. paracasei* subsp. *tolerans* (JCM 1171), その他焼酎もろみから検出された乳酸菌のそれぞれの標準株*L. plantarum* (JCM 1149), *L. pentosus* (JCM 1558), *L. fermentum* (JCM 1173), *L. buchneri* (JCM 1115), *L. parabuchneri* (JCM 1162), *L. hilgardii* (JCM 1155), *L. brevis* (JCM 1059), *P. pentosaceus* (JCM 5890), *P. acidilactici* (JCM 8797)を用いた。

PCR反応はWardらの方法を参考に^{4,5)}, *L. paracasei*に特異的なプライマー（Y2:5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', para:5'-CACC-

* 1 応用微生物部

GAGATTCAACATGG-3') を用いた。PCR反応のサンプルは、TaKaRa Ex Taq™ (タカラバイオ製) を用いて調製した。すなわち、100倍希釈したDNA抽出液15 μ l, Ex Taq 0.1 μ l, 10 \times PCR Buffer 2 μ l, dNTP mix 1.6 μ l, プライマー-Y2 (5pmol/ μ l) 2 μ l, プライマー-para (5pmol/ μ l) 2 μ l, Milli-Q水 7.3 μ l (Total 30 μ l) をPCRチューブに調製した。反応条件は、1cycle 94°C 3 min, 55°C 45s, 70°C 1 min; 30 cycles 94°C 45 s, 55°C 45 s, 70°C 1 min; 1 cycle 94°C 45 s, 55°C 45 s, 70°C 5 min とし、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, U.S.製) にてPCR反応をおこなった。

2-3 PCR反応の確認

PCR反応後、2%アガロースゲルにて電気泳動をおこない増幅を確認した。すなわち、アガロースLO3 (タカラバイオ製) 2gを1 \times TAE buffer 100mlに加熱溶解させた。その後0.2%エチジウムブロマイドを5 μ l加え、アガロースゲルを作成した。

電気泳動におけるDNAサイズマーカーには、 λ -Hin d III digest (タカラバイオ製) を使用した。DNAサイズマーカーのフラグメントとそのサイズ (bp) は、A:23,130, B:9,416, C:6,557, D:4,361, E:2,322, F:2,027, G:564, H:125であった。電気泳動は λ -Hin d III digestのプロトコールに従いサンプルを調製し、100Vで15分間マイナスからプラス方向に泳動した。そして、電気泳動後のアガロースゲルはImage Master VDS (Pharmacia Biotech製) にて紫外線を照射し、バンドを確認した。

3 結果および考察

16S rRNA遺伝子のV1領域において *L. paracasei* に特異的なプライマーを用いたPCR反応後の電気泳動写真を図1に示す。

焼酎もろみから分離した菌株 (lanes 1, 2, 3), および標準株 *L. paracasei subsp. paracasei* (JCM 8130, lane4), *L. paracasei subsp. tolerans* (JCM 1171, lane5) では特異的なバンドが確認された。しかしながら、その他焼酎もろみから検出された乳酸菌の標準株 *L. plantarum* JCM 1149 (lane6),

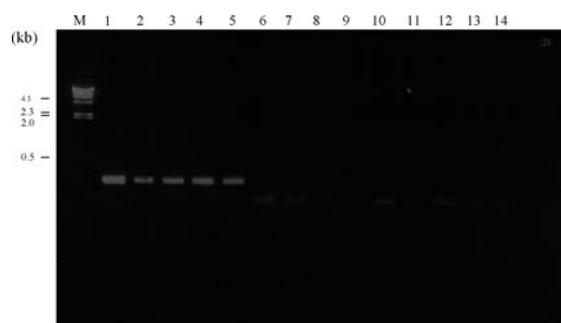


図1 *L. paracasei* に特異的なプライマーを用いたPCR反応後の電気泳動写真

Lactic acid bacteria isolated from *Shochu* mash (lanes 1~3) *L. paracasei subsp. paracasei* JCM 8130 (lane4) *L. paracasei subsp. tolerans* JCM 1171 (lane5) *L. plantarum* JCM 1149 (lane6) *L. pentosus* JCM 1558 (lane7) *L. fermentum* JCM 1173 (lane8) *L. buchneri* JCM 1115 (lane9) *L. parabuchneri* JCM 1162 (lane10) *L. hilgardii* JCM 1155 (lane11) *L. brevis* JCM 1059 (lane12) *P. pentosaceus* JCM 5890 (lane13) *P. acidilactici* JCM 8797 (lane14)

L. pentosus JCM 1558 (lane7), *L. fermentum* JCM 1173 (lane8), *L. buchneri* JCM 1115 (lane9), *L. parabuchneri* JCM 1162 (lane10), *L. hilgardii* JCM 1155 (lane11), *L. brevis* JCM 1059 (lane12), *P. pentosaceus* JCM 5890 (lane13), *P. acidilactici* JCM 8797 (lane14) において、特異的なバンドは確認されなかった。したがって、焼酎もろみから最も多く分離された菌株は *L. paracasei* と相同性が高いことを再確認した。

4 まとめ

これまで焼酎もろみから分離した乳酸菌はグラム反応試験, カタラーゼ試験, ユニバーサルプライマーを用いた16S rDNA遺伝子解析及びApiキットによる糖類資化性試験で分類した結果, その約半数が *L. paracasei* であった。

今回, 16S rRNA遺伝子のV1領域において *L. paracasei* に特異的なプライマーを用いたPCR反応

の結果、焼酎もろみから分離した菌株および *L. paracasei* の標準株において特異的なバンドが確認され、同定結果を再確認した。

5 参考文献

- 1) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, p.127-131 (2004)
- 2) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, p.119-125 (2004)
- 3) 高山清子, 工藤哲三, 水谷政美, 山本英樹, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 50, p.117-119 (2005)
- 4) L.J.H.Ward, M.J.Timmins: *Letters in Applied Microbiology*, 29, p.90-92 (1999)
- 5) L.J.H.Ward, J.C.S. Brown and G.P. Davey: *Letters in Applied Microbiology*, 20, p.204-208 (1995)