

RAPD 法を用いた株の識別について

1. はじめに

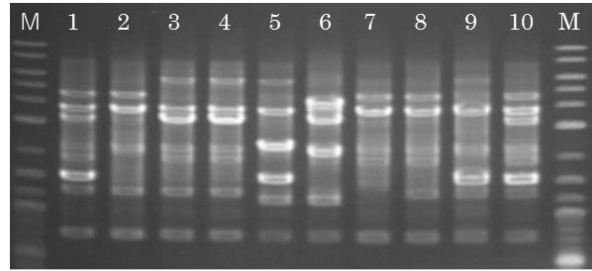
微生物は形態や生理的特徴、遺伝子の塩基配列等によって表 1 のように階層的に分類されます。ある微生物がどの分類群に含まれるか決定することを同定といいます。分類学上の基本単位である種まで同定できれば、その微生物について、多くの情報を得ることができます。また、種は様々な株で構成されます。例えば、*Tetragenococcus halophilus* は醤油醸造に寄与する耐塩性乳酸菌ですが、醤油諸味には性質が異なる多様な株が共存していることが知られています。一般的に細菌の同定に用いられる 16S rDNA シークエンスは種の同定までが限界であり、株に関する情報は得られません。本稿では株の識別に利用される RAPD 法を紹介します。

表 1 微生物の分類と具体例（大腸菌）

階級	大腸菌の場合
ドメイン	<i>Bacteria</i>
門	<i>Proteobacteria</i>
綱	<i>Gammaproteobacteria</i>
目	<i>Enterobacteriales</i>
科	<i>Enterobacteriaceae</i>
属	<i>Escherichia</i>
種	<i>coli</i>

2. RAPD 法の原理

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法では対象生物のゲノム DNA を鋳型とし、ランダムな配列をもつプライマーを利用して PCR により DNA 断片を増幅します。電気泳動法により、その出現パターンを比較することで、対象生物が同じ株であるか否かを識別します。当センターが保有する 10 株の *T. halophilus* について RAPD 法の実施結果を図 1 に示しました。レーン 3 と 4 の株は同じパターンを示すことから、同一株である可能性があります。同一株であるか否かは、別のプライマー¹⁾を用いた場合のパターンも比較し、判断する必要があります。



M : マーカー遺伝子 (2-log Ladder)

図 1 *T. halophilus* の RAPD 法による株の識別

3. 食品業界における RAPD 法の利用例

乳酸菌等の特定の株を利用して製造する発酵食品の製造現場では、同種異株の混入が問題となることがあり、そのチェックに RAPD 法が利用されます²⁾。また、バクテリオファージ（細菌に感染して増殖するウイルス）の発生による発酵不全が問題となることがあります。同じ株を使用し続けると発生しやすくなるため、バクテリオファージへの感受性が異なる株を複数株用意し、ローテーションで使用することが行われます。乳酸菌は株が異なれば、感受性が異なると言われていました³⁾。優れた発酵特性を有する株を分離し、RAPD 法により異なる株を見分けて使用することで、バクテリオファージ対策が可能になります。

4. おわりに

RAPD 法の長所は簡便・迅速に結果が得られる点です。しかし一方で、再現性が問題となることがあります。明瞭な DNA バンドが得られるプライマーの選択や、高純度な鋳型 DNA を得るための精製方法の検討などが必要となることがあります。STS (Sequence Tagged Site) 化プライマー⁴⁾の利用も有効です。当センターでは、食品微生物に関する技術相談に応じています。お気軽にお問合せ下さい。

参考文献

- 1) 脇山ら：醤研, 43, 395-404 (2017)
- 2) 中川：北海道立食品加工研究センター報告, 7, 47-49 (2007)
- 3) 清水ら：Milk Science, 66, 39-44 (2017)
- 4) 大坪ら：醸協, 97, 843-848 (2002)



食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 間野博信 (052-325-8092)

研究テーマ：豆味噌、溜醤油の高品質化技術の開発

担当分野：味噌、醤油などの醸造食品の製造技術