

今月の内容 ● トピックス

- 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）による微生物叢の解析

トピックス

● 科学技術振興機構（JST）による研究助成に採択されました

科学技術振興機構は大学・公的研究機関等で生まれた研究成果を基に実用化を目指すため研究成果最適展開支援事業（A-STEP）を実施しています。このたび、同事業のFSステージ・探索タイプに、当センターが提案した下記2課題が採択されたので、今年度の研究テーマとして取り組んでまいります。

黒麹菌発酵小豆（小豆麹）を利用した新規小豆発酵食品の開発 提案者 主任研究員 山本晃司
乳酸菌による食品洗浄水の再資源化 提案者 主任研究員 石川健一

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE）による微生物叢の解析

1. はじめに

発酵生産物の研究や食品の品質管理などのために微生物叢（特定サンプル中に存在する各微生物の種類や割合）を解析する方法として、近年、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法

（Denaturing Gradient Gel electrophoresis：DGGE）が注目されています。従来、微生物叢の解析は主に培養法により行われていましたが、微生物の培養に時間を要することや、用いる培地によって生育する微生物が異なるために複数種類の培地で試験を行う必要があることから、多くの時間と労力が費やされてきました。しかし、DGGEでは微生物を培養せずに検出できるため、従来法よりも手軽に微生物叢を解析することができます。更に、培養が困難であった微生物を検出することも可能です。

2. DGGEの原理

DGGEは尿素やホルムアミドなどの変性剤（DNAの二本鎖を一本鎖に解離させる試薬）の濃度勾配があるアクリルアミドゲルを用いることにより、同じ長さのDNAでも塩基配列の違いにより分離されることを利用した電気泳動法です。DGGEを行うには、泳動装置、ゲル作成装置、ポリメラーゼ連鎖反

応装置（Polymerase Chain Reaction：PCR）などの機器が必要です。

DNAはG（グアニン）、C（シトシン）、A（アデニン）、T（チミン）の4種類の塩基からなり、DNAの二本鎖中ではGとC、AとTがそれぞれ塩基対を形成します。食品等から微生物のDNAを市販のDNA抽出キットなどにより抽出し、GC含量が高い配列であるGCクランプのついたプライマーを用いてPCR反応を行います。それにより増幅されたサンプルDNAは端にGC含量の高い配列が存在することから、泳動が進行して特定の変性剤濃度の領域に達すると、GCクランプ以外の部分が解離してY字型になってゲル中を移動する際の抵抗が増大し、泳動が進行しにくくなります。GC含量が低いDNAを泳動すると二本鎖が早く解離してY字型になり、移動スピードが落ちて泳動距離が短くなります（図1）。一方でGC含量が高いと、二本鎖間の結合が強いことからY字型になることなく泳動する距離が長いため、泳動距離が長くなります。その結果、GC含量が異なるDNAを違うバンドとして検出することができます。

増幅したサンプルDNA（ぬか床、チーズ、キムチなどの発酵生産物由来のもの）をDG

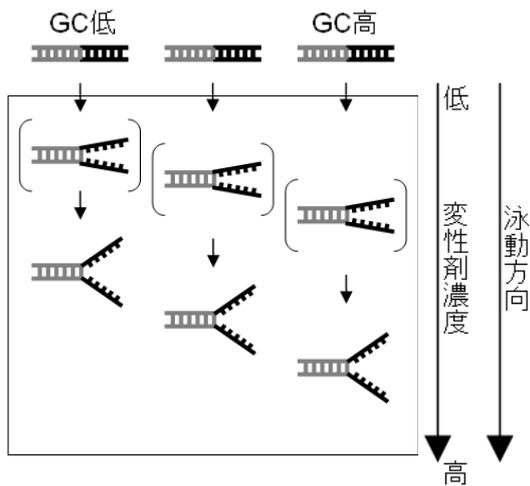


図1 GC含量と泳動距離

グレーの部分はPCRの際に付与した高GC配列

DGGEで泳動すると、例えば図2のようなDNAバンドのパターンが得られます。各DNAバンドの塩基配列をDNAシーケンサーで解析し、日本DNAデータバンクなどのインターネット上のデータベースと照合することにより、そのバンドが由来する微生物を知ることができます。

3. DGGEの実施例

1990年代後半から、ぬか床やチーズ、キムチ、パン種、ワイン酵母、日本酒粕、味噌等の食品中の微生物叢についてDGGEを用いた研究が盛んに進められています。DGGEを用いたぬか床の熟成過程の解析から、熟成した段階での優勢な微生物として、培養法では検出が困難であった *Lactobacillus acetotolerans* が検出されています¹⁾。モッツァレラチーズについてはDGGEで解析したスターターの微生物叢が香り成分と密接に関係しており、かつ産地特異的であったとの報告がされています²⁾。また、つぼ酢の微生物叢の変化を調べた研究もあり、仕込み後の経時変化と、米麴、つぼの内壁を解析した結果、発酵初期の主要微生物である *Lactococcus lactis*、*Pediococcus acidilactici*、

Lactobacillus fermentum は米麴から、発酵後期の主要微生物である *Lactobacillus acetotolerans* と *Acetobacter pasteurianus* はつぼ内壁をから発酵過程に入ることが推測されています³⁾。

今後、DGGEによる微生物叢の解析が、発酵生産物の高品質化や品質管理などに役立てられていくことが期待されています。

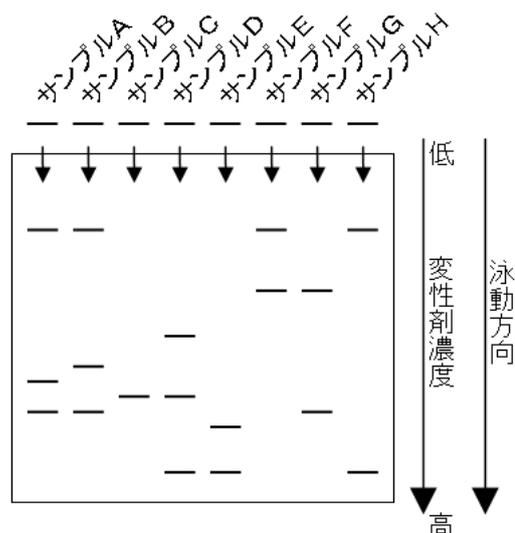


図2 DGGEで解析したバンドパターンの例

引用文献

- 1) Nakayama J. et al. : Molecular Monitoring of Bacterial Community Structure in Long-Aged Nukadoko : Pickling Bed of Fermented Rice Bran Dominated by Slow-Growing Lactobacilli., J. Biosci. Bioeng., **104**, 481-489 (2007)
- 2) Mauriello G. et al. : Relationships Between Flavoring Capabilities, Bacterial Composition, and Geographical Origin of Natural Whey Culture Used for Traditional Water- Buffalo Mozzarella Cheese Manufacture, J. Dairy Sci., **86**, 486-489 (2003)
- 3) 石井正治ら, 日本の発酵醸造食品, 生物工学会誌, **84**, 352-354 (2006)

保蔵技術室：森 昭博

研究テーマ：有用微生物の利用について

担当分野：農産加工品の製造技術

愛産研食品工業技術センターニュース

(平成22年10月25日発行)

編集・発行

愛知県産業技術研究所食品工業技術センター

〒451-0083 名古屋市西区新福寺町2-1-1

TEL 052-521-9316 FAX 052-532-5791

URL : <http://www.aichi-inst.jp/shokuhin/>

E-mail: shokuhin@aichi-inst.jp