

## 16S rDNAを対象としたPCR-RFLP解析による 容器・包装詰食品の変敗原因菌の迅速同定

遠田 昌人, 松井 智江

### 16S rDNA PCR-RFLP Analysis for Rapid Identification of Causal Bacteria of Spoilages of Packaged Foods and Drinks

Atsuhito Enda and Tomoe Matsui

An application of 16S rDNA PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) for identification of causal bacteria of spoilages in canned, bottled or packaged foods and drinks were described.

RFLP patterns using *Hae* III, *Hha* I, *Msp* I and *Afa* I were investigated on 99 strains of 12 species of heat resistant bacteria (*i. e.* *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *A. acidiphilus*, "*Sporolactobacillus laevis*", *Sporolactobacillus inulinus*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Moorella thermoacetica*) and 20 strains of *Aeromonas hydrophila* as a typical causal organism via secondary contamination.

No enzyme provided unique patterns for individual species. The integration of results with four restriction enzymes, however, enabled us to identify these organisms. And the minimum procedure required for the identification was found to be observations of RFLP patterns with *Hha* I and *Msp* I or *Afa* I.

It was demonstrated that 16S rDNA PCR-RFLP is useful for investigation of isolates from spoiled foods, drinks or raw materials.

**Key words** : 16S rDNA, PCR-RFLP, rapid identification

容器・包装詰食品および飲料の微生物学的な変敗事故においては、いち早い原因調査が求められる。原因調査に際しては発生状況や容器の密封状態の評価、製造時の殺菌記録の検証なども重要であるが、おおまかには原因微生物の同定により原因が推定される場合が多い。

原因菌の同定は近年、分子遺伝学的手法が主流となり、特に分子系統マーカーとして有用な16S rRNA遺伝子(16S rDNA)を対象とする場合が多いが、塩基配列の解析による場合、オートシーケンサーのような解析装置が必要である。そこで、われわれは16S rDNAを解析対象としながらも、手技としても、設備の点からも非常に簡便なPCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; 制限酵素断片長多型)解析<sup>1)</sup>により、変敗原因菌を同定することを試みた。PCR-RFLPによる同定において必要な参照データとして、これまで変敗原因菌として分離された菌株におけるRFLPパターンを取得したのでこれらについて報告する。

#### 実験材料および方法

##### 1. 使用菌株

当研究室で容器・包装詰食品および飲料の変敗原因菌として、変敗品あるいは汚染原料より分離・同定された

*Alicyclobacillus acidoterrestris* 4菌株, *Alicyclobacillus acidiphilus* 5菌株, "*Sporolactobacillus laevis*" 5菌株, *Sporolactobacillus inulinus* 4菌株, *Bacillus subtilis* 11菌株, *Bacillus licheniformis* 7菌株, *Bacillus cereus* 11菌株, *Bacillus coagulans* 13菌株, *Geobacillus stearothermophilus* 7菌株, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 13菌株, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* 6菌株, *Moorella thermoacetica* 13菌株および *Aeromonas hydrophila* 20菌株を用いた。

##### 2. PCR

寒天培地上に培養した供試菌の菌苔を綿棒で掻き取り、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁して、遠心分離(6,000×g)によりペレットを洗浄した。得られたペレットから、DNeasy Tissue Kit (Qiagen)を用いて、DNAを抽出した。抽出の手順は、キット添付マニュアルのグラム陽性菌用プロトコルに従った。

プライマーはWeisburgら<sup>2)</sup>のfD1およびrP2を基に、リンカー部分を除いて、上流側F; 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'および下流側R; 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'とした。

PCRはTaKaRa ExTaqを用いた。反応条件は基本的に製品

添付のマニュアルに従った。反応スケールは100  $\mu$ lとし、1反応あたり、プライマーは各50pmol加え、DNA抽出液5  $\mu$ lをテンプレートとして用いた。増幅反応にはTaKaRa Thermal Cycler MP-3000を用いた。温度プログラムは、94 $^{\circ}$ C 1分間の後、94 $^{\circ}$ C - 1分間、50 $^{\circ}$ C - 1分間、72 $^{\circ}$ C - 1.5分間を1サイクルとし、これを30サイクル繰り返した。最終伸長反応は72 $^{\circ}$ C - 2分間とした。

### 3. RFLP

16S rDNA増幅産物の制限酵素による切断にはHaeIII, Hha I, Msp I およびAfa I (いずれもTaKaRa) の4種類の制限酵素を用いた。制限酵素反応は40  $\mu$ lのスケールで行い、PCR反応液8  $\mu$ lに対し、酵素を20units加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間から一晩静置した。

### 4. 電気泳動

4.0%のNuSieve 3 : 1 Agarose (Combrex) ゲルを用い、TAE (Tris-Acetate-EDTA) 緩衝液中で100Vの定電圧

で2時間電気泳動した。泳動後のゲルは、0.5  $\mu$ l/mlの臭化エチジウムで染色後、洗浄し、トランスイルミネーター (UVP, TFML-20E) による302nmの紫外線照射下でバンドを観察した。電気泳動像の記録および解析にはKodak EDAS 290FFを用いた。

### 結果

プライマーFおよびRを用い、アニーリングを50 $^{\circ}$ CとしたPCRによって、12菌種におよぶ耐熱性の変敗原因菌99菌株、および代表的な二次汚染型変敗原因菌である *Aeromonas hydrophila* 20菌株を含め、計119菌株のいずれもからも、16S rDNAのほぼ全域にあたる領域の増幅産物が得られた。約1.5kbの増幅産物をHae III (GG/CC), Hha I (GCG/C), Msp I (C/CGG) およびAfa I (GT/AC) 4種類の制限酵素で切断し、得られたRFLPパターンを同一菌種の菌株同士で比較した結果、菌種ごとに一定のパターンを示すことが認められた。そこで、1菌種につき1菌株ずつを選定し、標準パターン菌株とした。

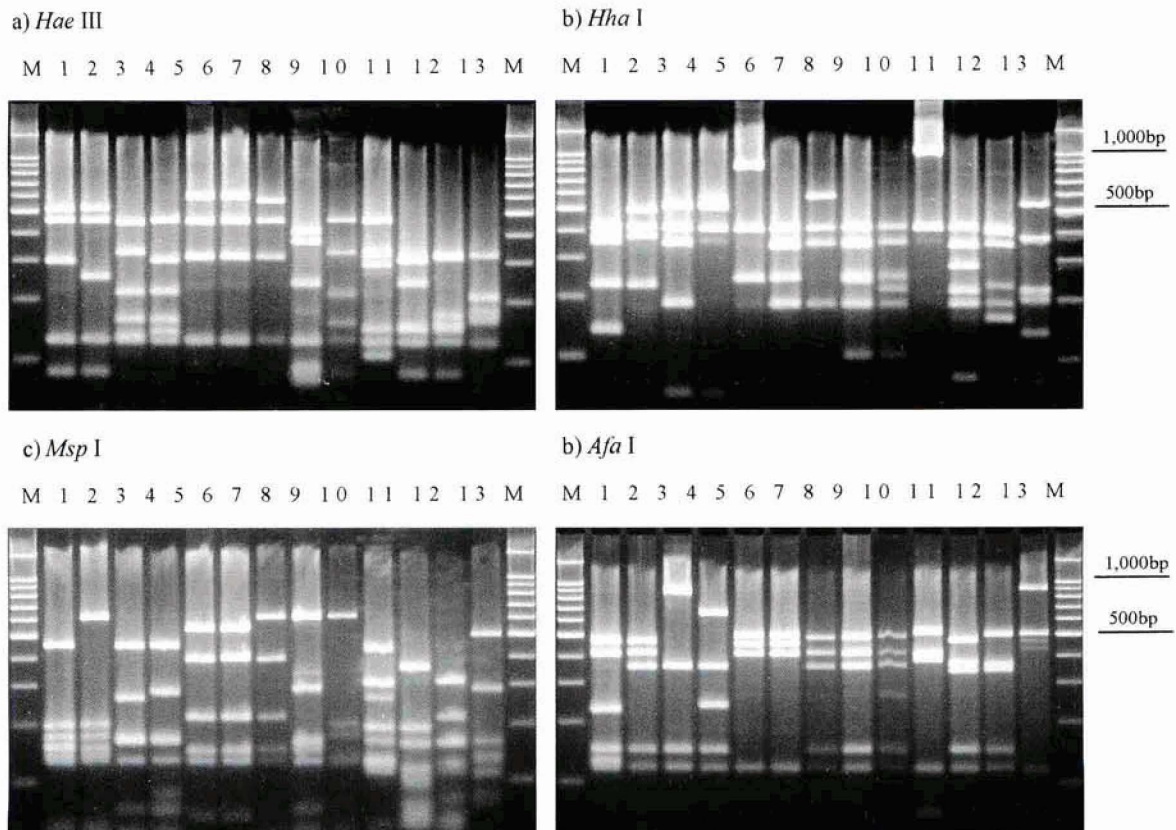


Fig. 1 RFLP patterns of standard isolates for each species. Lane 1 : TIFT161001 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*), 2 ; TIFT162001 (*A. acidiphilus*), 3 ; TIFT142006 (" *Sporolactobacillus laevis*"), 4 ; TIFT142009 (*Sporolactobacillus inulinus*), 5 ; TIFT111016 (*Bacillus subtilis*), 6 ; TIFT112009 (*B. licheniformis*), 7 ; TIFT114001 (*B. cereus*), 8 ; TIFT115008 (*B. coagulans*), 9 ; TIFT121001 (*Geobacillus stearothermophilus*), 10 ; TIFT221001 (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*), 11 ; TIFT231001 (*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*), 12 ; TIFT241001 (*Moorella thermoacetica*), 13 ; TIFT420001 (*Aeromonas hydrophila*) ; M; 100bp DNA ladder (TaKaRa).

**Table 1** Approximate base length of fragments in RFLP. Minor fragments were noted in parenthesis. The analysis was given by Kodak 1D software.

a) <i>Hae</i> III												
Strain												
161001	162001	142006	142009	111016	112009	114001	115008	121001	221001	231001	241001	420001
540	540	460	470	600	600	580	420	470	460	315	320	320
470	470	340	310	470	470	470	370	340	340	300	175	210
310	265	230	230	320	320	320	250	(230)	290	245	155	185
(230)	135	170	170	(240)	(240)	135	(180)	170	155	155	130	170
135		135	150	135	135		135	135	135	130		130
			135						110			
b) <i>Hha</i> I												
430	510	530	600	890	420	590	420	420	1070	420	420	530
390	430	430	540	820	370	420	370	370	430	350	400	370
360	380	360	420	420	350	360	350	255	(360)	285	350	215
240	240	190	(370)	255	255	190	255	225		225	230	200
150				190	190		190	190		190	190	140
							110	110		(165)	165	
c) <i>Msp</i> I												
460	620	460	460	560	560	630	630	630	440	370	320	510
200	200	270	285	400	400	400	(350)	200	310	195	220	380
180	180	175	175	220	220	220	295	185	270	165	170	290
155	155	140	140	155	155	155	175	145	195	125	135	170
140	140			140	140	140	160	135	170	105	115	140
							135		135			115
									115			
d) <i>Afa</i> I												
480	480	930	670	500	500	500	500	500	530	480	500	930
410	420	860	370	460	460	420	420	420	420	380	370	510
240	360	370	250	410	410	360	360	360	390	345	345	(470)
155	155	155	155	125	125	(270)	(270)	(270)	125	155	155	(440)
140	125	125	125			155	155	155		125	125	125
120						125	125	125				

標準パターン菌株としたのは *Alicyclobacillus acidoterrestris* TIFT161001 (TIF1701<sup>21</sup>), *A. acidophilus* TIFT162001 (TIF1705<sup>11</sup>), "*Sporolactobacillus laevis*" TIFT 142006 (SL-6<sup>41</sup>), *Sporolactobacillus inulinus* TIFT142009, *Bacillus subtilis* TIFT111016, *B. licheni-*

*formis* TIFT112009, *B. cereus* TIFT114001, *B. coagulans* TIFT115008, *Geobacillus stearothermophilus* TIFT121001, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* TIFT221001, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* TIFT231001 (1022<sup>31</sup>), *Moorella ther-*

*moacetica* TIFT241001 (24-1<sup>6</sup>), *Aeromonas hydrophila* TIFT420001である。

各々の菌株についての*Hae* III, *Hha* I, *Msp* Iおよび*Afa* IでのRFLPの結果を、電気泳動像として図1に示した。*Bacillus*属菌は互いに類似したパターンを示す場合が多く、特に*B. subtilis*と*B. licheniformis*は*Hha* Iによる切断でのみ識別が可能で、その他の3種類の酵素では同一のパターンであった。*Msp* I切断では*B. subtilis*, *B. licheniformis*以外に*B. cereus*が同じパターンを示し、また、*Hha* Iでも*B. licheniformis*, *B. coagulans*および*G. stearothermophilus*が同一のパターンであった。*Hae* IIIでは*S. inulinus*と*G. stearothermophilus*とが、*Afa* Iでは*A. acidiphilus*, *B. cereus*, *B. coagulans*および*G. stearothermophilus*が区別できなかった。

### 考察

PCR-RFLPによる同定に際しては、参照データとの照合は、目視によりパターン自体を比較してもよいが、各断片についてサイズを解析して数値化したものについての比較ができればより確度の高い運用が可能である。表1に、各標準パターン菌株で得られた泳動像から、断片サイズを解析した結果を示した。弱いバンドが散見されたが、16S rDNAは細菌の染色体上に複数存在し、それらが互いにある程度の多型性があるために生じるものと考えられた。シグナル強度としては明らかに判別がつくため、主要な断片と混乱する可能性は低いと考えられた。

4種類の制限酵素のいずれにおいても、菌種間で同一の、あるいは類似したパターンが出現しており、一種類のみで同定の可能な制限酵素はなかった。*Bacillus*属の4菌種、*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*および*B. coagulans*, また、ともにフラットサワー菌として知られる*B. coagulans*および*G. stearothermophilus*では同一のパターンを示す場合が多かった。ことに*B. subtilis*と*B. licheniformis*の識別ができたのは*Hha* Iのみであった。

同定に必要な最小限の解析を考えると、*B. subtilis*と*B. licheniformis*識別には*Hha* Iでのパターンは必須であるが、*Hha* Iは*B. licheniformis*, *B. coagulans*および*G. stearothermophilus*が区別できないため、これらを識別できる*Hae* IIIあるいは*Msp* Iのどちらかでの切断パターンが必要である。

16S rDNA PCR-RFLPは、サーマルサイクラー、サブマリン型電気泳動槽およびトランスイルミネーターといった、基本的にPCRに必要な設備だけで行うことができる。反面、塩基配列のホモロジーによる同定とは異なり、公表されたデータが不十分であることは否めないが、容器包装詰食品・飲料で問題となる耐熱性の変敗原因菌は非常に限られるため、本研究で示したように、バックデータを用意することはそれほど困難なものではない。多数の検体に対して行うのも容易なため、原料検査においても非常に有効な手法と考えられた。

### 要約

容器・包装詰食品および飲料の耐熱性変敗原因菌12菌種、二次汚染型変敗原因菌1菌種について、16S rDNA RFLPパターンを取得した。制限酵素*Hha* Iでの切断パターンに加え*Hae* IIIあるいは*Msp* Iでの切断パターンを得ることで迅速同定が可能であることが示された。

### 文献

- 1) Hiraishi A., Inagaki K., Tanimoto Y., Iwasaki M., Kishimoto N., Tanaka H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43**, 295-304 (1997)
- 2) Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J.: *J. Bacteriol.*, **173**, 679-703 (1991).
- 3) 松井智江, 遠田昌人, 中尾浩, 吉本周: 東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書, **22**, 123-127 (1998)
- 4) 池上義昭, 橋本京子, 大田智子: 東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所研究報告書, **16**, 84-92 (1985)
- 5) 遠田昌人, 池上義昭, 中尾マリ, 村山寿美江: 缶詰時報, **68**, 101-107 (1989)
- 6) Akihiko Nakayama and Sumiko Samo: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 1117-1123 (1980)