

Bacillus coagulans の16S-23S rDNA ITS領域の多型解析

遠田 昌人*, 田口 憲人*

Polymorphism in 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Region of *Bacillus coagulans*

Atsuhito Enda* and Norihito Taguchi*

Bacillus coagulans is a typical organism of heat resistant spore formers cause spoilages in packaged foods and bottled soft drinks. Aiming for rapid identification and detection for *B. coagulans*, sequences of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region of 13 strains of *B. coagulans* were determined.

Five major amplicons were observed at ITS-PCR and only 403 bp amplicon was common for 13 strains. Sequence alignment suggested the largest amplicon contained seven segments and other variants were derived by deletion of several segments. Based on the structure of ITSs, oligonucleotide primers 101-22F and 264-21R were constructed and showed specific single-band amplification with *B. coagulans*.

Key words : *Bacillus coagulans*, ITS, PCR, polymorphism, rapid identification

分子生物学的手法の発展により、食品微生物学の分野においても種々の有害菌の迅速検出法が開発され、これまでのような選択培養法に関する専門的な知識や経験を積まなくても、高い特異性を備えた普遍的な手法での検査が行えるようになった。一方で、ヒトへの危害性は低いが、容器包装詰食品でしばしば問題となる食品を腐敗・変敗させる耐熱性の有芽胞菌に関しては、食中毒菌や経口感染症起因菌とは異なり、基礎的データも十分とは言えない。

有害菌を含め食品製造環境や原料、腐敗品からの分離菌を網羅的に同定する場合には、多くの菌種について集積されてきた16S rDNA領域の配列データを利用することができる。細菌のrDNAは部分的に保存性が高い配列をもつためユニバーサルプライマーを利用できる上に、多くの細菌ではマルチコピー遺伝子である^{1,2)}ため、核酸を利用した微量検出において検出感度の点でも有利である。

しかし、変敗原因菌*Bacillus*属やその近縁属の細菌は16S rDNAでも相同性が高いものがあり、その同定にはより多型性に富んだ配列の利用が必要な場合がある。細菌を含む原核生物では16S rRNA遺伝子 (rDNA) と23S rRNA遺伝子とを隔てるスペーサー領域が存在し、これはITS (Internal Transcribed Spacer; 内部転写領域) と呼ばれている。この領域では種間での多型性が高く、近縁種を識別可能な同定マーカー遺伝子として有用な領域と考えられている³⁾。

*Bacillus coagulans*は容器包装詰食品、飲料における変敗原因菌の典型であり、常温で流通される容器包装詰食

品・飲料の多くの製品で主要な制御対象菌とみなされている。しかし*B. coagulans*のITS領域の塩基配列はINSDC (DDBJ/EMBL/GenBank) においても1件 (AF478062) のみである。そこで、筆者らは*B. coagulans*の迅速簡易同定および検出を行う上での基礎となるデータとして16S-23S rDNA ITS領域について塩基配列を解析した。

実験方法

(1) 使用菌株

本研究で使用した菌株についてTable 1に示した。

(2) DNA抽出

標準寒天培地 (栄研化学) を用い、平板に種菌液を塗抹し、*B. coagulans*は45℃、その他の菌株は35℃で48時間培養後、滅菌綿棒で菌苔を採取し、Qiagen DNeasy Blood and Tissue KitまたはCellEase (バイオコズム) を用いてDNAを抽出した。

(3) プライマー

本研究で使用したプライマーをTable 2に示した。

(4) ITS-PCR

増幅産物に16S-23S ITS領域の全領域を含むPCRはDafonchioら³⁾に基づき、改変して実施した。

PCRはTaKaRa ExTaq Hot Start Version (タカラバイオ) を用い、反応液50 µlのスケールとし、1反応あたりテンプレートDNA溶液を1 µl、プライマー25 pmolを用いた。反応プログラムは94℃ 5分間の変性後、94℃ 1分間-55℃ 1分間-72℃ 1分間を30サイクル繰り返し、さらに

* : 東洋食品研究所 食品科学研究室

Table 1 Strains used in this study.

Species	Strain
<i>Bacillus coagulans</i>	ATCC 8038, ATCC 11014, ATCC 11369, ATCC 12245, ATCC 15949, ATCC 23498, ATCC 31284, ATCC BAA-738, NBRC 3557, NBRC 3886, NBRC 3887, NBRC 12583 ^T , NBRC 12714
<i>Escherichia coli</i>	NBRC 102203 ^T
<i>Staphylococcus aureus</i>	NBRC 100910 ^T
<i>Bacillus cereus</i>	NBRC15305 ^T
<i>Bacillus licheniformis</i>	NBRC 12200 ^T
<i>Bacillus megaterium</i>	NBRC 15308 ^T
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	DSM 1599 ^T
<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 13719 ^T
<i>Bacillus thuringiensis</i>	NBRC 101235 ^T
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	NBRC 15309 ^T
<i>Brevibacillus brevis</i>	NBRC 15304 ^T
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	NBRC 13503 ^T

Table 2 Oligonucleotide primers used in this study.

Primer	Sequence(5' to 3')	Usage
S-D-Bact-1494-a-S-20 ³⁾	GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA	ITS-PCR
L-D-Bact-0035-a-A-15	CAA GGC ATC CAC CGT	
M13 reverse primer (RV)	CAG GA AACAG CTATG AC	Sequencing
M13 forward primer (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA GT	
101-22F	CGA CTG AGA TAA AGG AAA CAC G	<i>B. coagulans</i> specific PCR
264-21R	AAA CTG AAC AAA ACG GAA ACG	

72℃ 2分間の伸長とした。

増幅反応後の反応液 1 µl を TAE バッファー (40mM Tris, 20mM Acetic acid 1mM EDTA, pH8.3) 中で3.0%の NuSieve 3:1 Agarose (Lonza) ゲルで120 Vの定電圧下で40分間、電気泳動した。

電気泳動後のゲルは0.5 µg/mlのエチジウムブロマイド溶液に浸漬して15分間染色, 15分間水洗後, 360 nmの紫外線を照射して増幅産物を検出した。

(5) ITS-PCR増幅産物の塩基配列解析

サイズの異なる増幅産物が複数混在するITS-PCR増幅産物について, おのおのを分離精製し, シークエンシング反応を行って塩基配列を解析した。

1) ダイレクトシークエンシング

アガロースゲル電気泳動後, 紫外線照射下でDNAのバンドを含むアガロースゲルをX-tracta II (LabGadget LLC) あるいはフナ・ゲルチップ (フナコシ) を用いて切片とし

て切り出し, Illusta FX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Bioscience) を用いて, ゲル切片からDNAを回収した。

さらにシーケンシング反応に用いる鋳型DNAとして, ExoSAP-IT (GE Healthcare Bioscience) を用いて精製後, Genomlab CEQ DTCS-Quick Start Kitを用いてシーケンシング反応を行った。反応液をIllusta AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal Kitにより精製した後, CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) で塩基配列を解析した。

2) TAKローニング

混在する産物のサイズが近く, バンドが隣接している場合は, TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いてPCR産物を pCR 2.1ベクターに組み込み, 形質転換体のコロニーを選抜した。形質転換体細胞からillusta plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Bioscience) で組換えプラスミドを抽出し, いったん制限酵素EcoRIで切断し, 電気泳動で挿入DNAの鎖長を確認した。制限酵素反応は20 μ lのスケールで行い, 反応あたり15UのEcoRIを用い, 反応条件は37°C 1時間とした。

目的の鎖長の挿入配列を含む抽出プラスミドを鋳型とし, M13リバースプライマーおよびM13フォワードプライマーを用いて, ダイレクトシーケンス同様にシーケンシング反応, 精製, 解析を行った。

(6) ITS領域を標的とした*B. coagulans* 特異的PCR

シーケンシング解析により得られたITS-PCR増幅産物

の塩基配列を用いて, 同一の鎖長の増副産物同士, および鎖長の異なる産物間で, DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のCLUSTAL Wサービス (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を利用して, 多重整列して比較し, 相同的な部分を検索した。

ITS-PCR増幅産物の塩基配列を基に, その一部を増幅するためのプライマーDNAをPrimer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) を用いて設計した。

結 果

1. ITS-PCR

*B. coagulans*の13菌株について, 抽出した染色体DNAを鋳型として16S rDNAの3'末端近傍と23S rDNA 5'末端近傍の保存的領域に基づくプライマーセットを用いてPCRを行い, 16S-23S rDNA全域を含む増幅産物を得た。供試菌株のPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動像をFig. 1に示した。

いずれの菌株においても2-4種類と複数の増幅産物が認められ, 染色体上に複数存在するrDNA群のアレル間でITS領域の長さにおいても多型性があることが示された。その鎖長に従って増幅産物を層別し, 菌株ごとにその有無をTable 3に示した。

主要な産物は250, 361, 403, 436および589 bpの5種類であった。これらの鎖長は挿入あるいは欠失により菌株間で若干前後した。このとき, 供試13菌株の全てに共通して認められたのは, 403 bp産物のみであった。

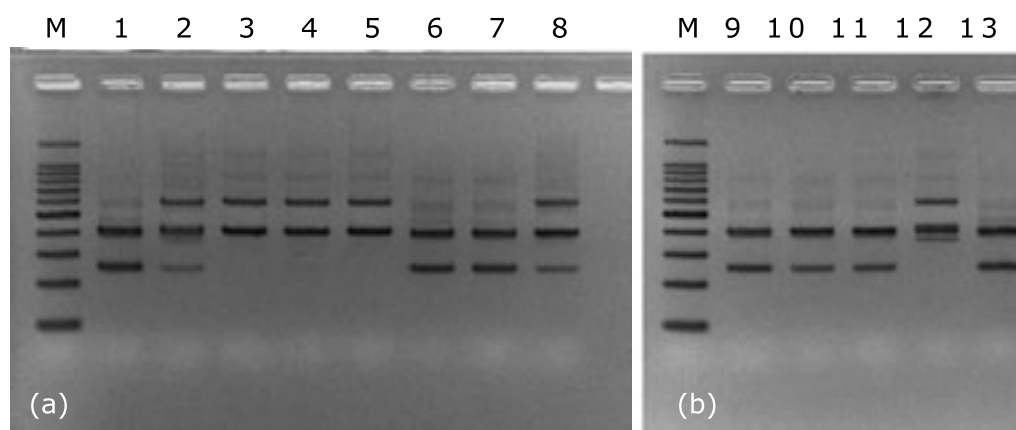


Fig. 1 ITS-PCR patterns of 13 strains of *B. coagulans*.

(a) M: 100bp ladder (TaKaRa), Lane 1: *Bacillus coagulans* ATCC 8038, 2: ATCC 11014, 3: ATCC 11369, 4: ATCC 12245, 5: ATCC 15949, 6: ATCC 23498, 7: ATCC 31284, 8: ATCC BAA-738, (b) Lane 9: NBRC 3557, 10: NBRC 3886, 11: NBRC 3887, 12: NBRC 12583^T, 13: NBRC 12714.

Table 3 Porymorphism in sizes of amplicons with ITS-PCR.

Strains	Size of amplicon (bp)				
	250	361	403	436	589
ATCC 8038	+	-	+	-	-
ATCC 11014	+	+	+	+	+
ATCC 11369	-	-	+	-	+
ATCC 12245	-	-	+	-	+
ATCC 15949	-	-	+	-	+
ATCC 23498	+	-	+	-	-
ATCC 31284	+	-	+	-	-
ATCC BAA-738	+	-	+	-	+
NBRC 3557	+	-	+	-	-
NBRC 3886	+	-	+	-	-
NBRC 3887	+	-	+	-	-
NBRC 12583 ^T	-	+	+	+	+
NBRC 12714	+	-	+	-	-

(+; Existence, -; Absense)

2. ITS産物の塩基配列解析

供試菌株のITS-PCR産物を主要なもの全てについて分離し、塩基配列を解析して、菌株間、産物間の相互の相同性を比較した。異なった菌株に由来する同じサイズの産物同士では塩基配列の類似度は高く、同一サイズの増幅産物が含むITS領域は相同的であった。

さらにサイズの異なる増幅産物同士で、類似した部分配列を検索し増幅産物間の相互関係がないか調べた。アライ

メントによって示された模式図をFig. 2にまとめたが、5種類の増幅産物は計7種類の部分配列の組み合わせによって構成されていることが明らかとなった。

増幅産物のうち、最も長い589bp産物は7種類の部分配列全てを保持しており、これを基準として見た場合、250-436bpの4種類の増幅産物は589bp産物の一部分が欠失した構造となっていた。これらの解析結果に基づいて作成した*B. coagulans* ITS領域の共通配列をFig. 3に示した。

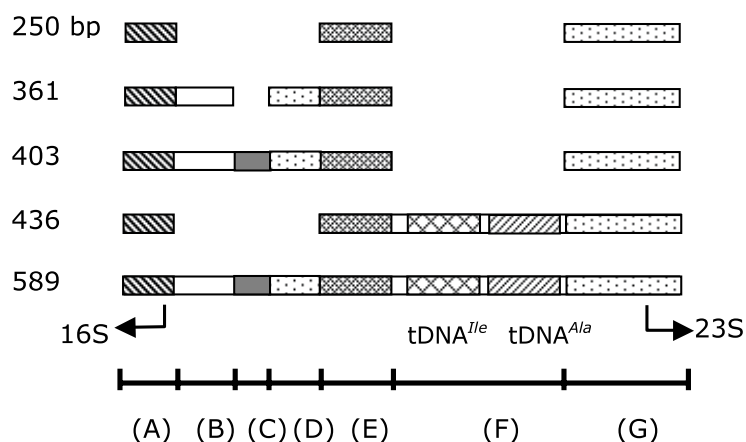


Fig. 2 Schematic diagram of allelic 16S-23S rDNA ITS in *Bacillus coagulans*. Boxes represent regions of homologous nucleotide sequences in ITS-PCR amplicons. Numbers in left show sizes of amplicons in base pairs.

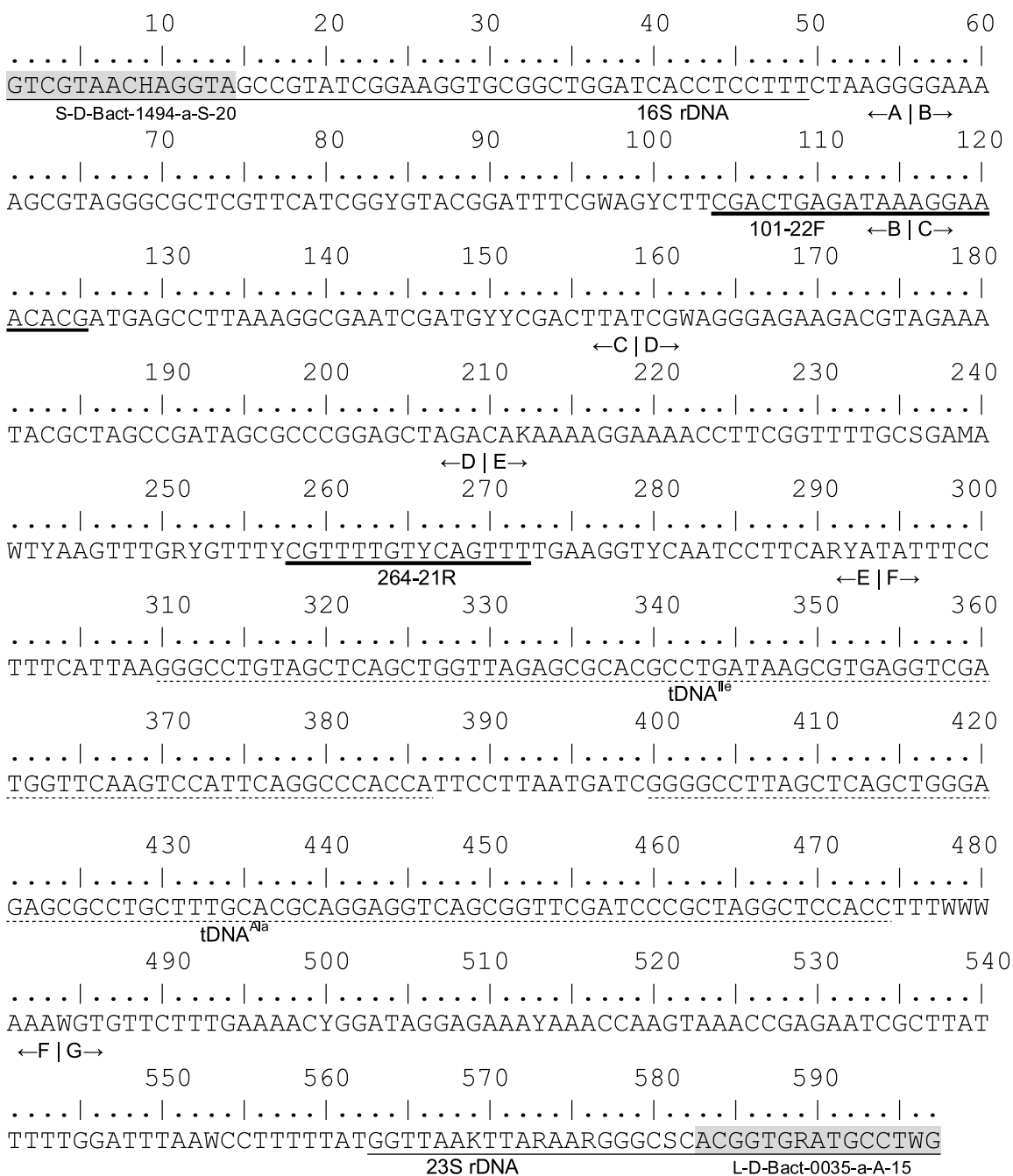


Fig. 3 Consensus sequence of 16S-23S rDNA ITS-PCR amplicons of 13 strains of *Bacillus coagulans*

3. *B. coagulans* 特異的PCR

(1) 特異的PCRプライマーの構築

塩基配列解析により明らかになった*B. coagulans*の16S-23S rDNA領域の各アレルの構造に基づき、ITS領域を標的とし*B. coagulans*を特異的に検出するPCR系を構築した。

出来る限り全ての*B. coagulans*菌株を検出するためには、全菌株が保持しているアレルもしくは部分配列を検出対象とする必要がある。また、より高い検出感度を得るた

めに、全アレルで共通して保持されている領域を対象とする場合A、EおよびG領域が候補となるが、A領域55塩基のうち49塩基は16S rDNAの保存的領域由来であり、同様にG領域は114塩基のうち3'側36塩基は23S rDNAの保存的領域由来であり、特異性に乏しい。

従って、G領域の5'側78塩基およびE領域81塩基が対象となるが、いずれもconventional PCRの標的としては短すぎる。そこで、全ての菌株が保持している403塩基アレルを対象とすることとした。

403塩基アレルを増幅対象として考えたとき、そのC領域を欠いた361塩基アレルを併せ持つ菌株が存在するため、C領域を挟んでプライマーを配置すると菌株によっては42塩基短い増幅産物を生じてしまう。そこで、プライマーのどちらかをC領域の一部にかかるように配置することで、紛らわしい2重バンドを避けることとした。Primer3プログラムを利用して、当該領域にプライマーに適した領域を検索して、プライマー101-22Fおよび264-21Rを設計した。

(2) 特異性の検証試験

設計したプライマーについて、*B. coagulans* 13菌株および偽陽性対照として*Escherichia coli* NBRC 102203^T,

Staphylococcus aureus NBRC 100910^T, *Bacillus cereus* NBRC 15305^T, *Bacillus licheniformis* NBRC 12200^T, *Bacillus megaterium* NBRC 15308^T, *Bacillus sporothermodurans* DSM 1599^T, *Bacillus subtilis* NBRC 13719^T, *Bacillus thuringiensis* NBRC 101235^T, *Paenibacillus polymyxa* NBRC 15309^T, *Brevibacillus brevis* NBRC 15304^Tおよび*Sporolactobacillus inulinus* NBRC 13503^Tの11菌種11菌株の抽出DNAを調製して、検証試験を行った。増幅反応後の電気泳動像をFig. 4に示した。*B. coagulans*では予想された160 bpの増幅産物が単一に認められた一方で、他の菌種では増幅産物は認められなかった。

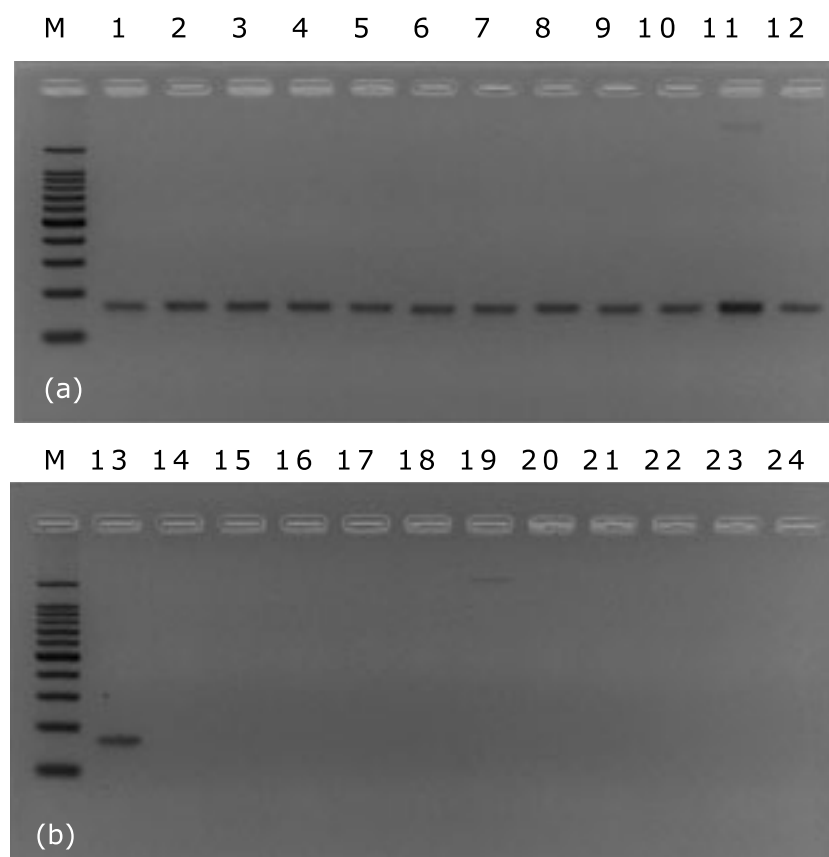


Fig. 4 Construction of *B. coagulans* specific PCR based on sequence alignment of 16S-23S rDNA ITS region.
 (a) M; 100bp ladder (TaKaRa), Lane 1; *Bacillus coagulans* ATCC 8038, 2; ATCC 11014, 3; ATCC 11369, 4; ATCC 12245, 5; ATCC 15949, 6; ATCC 23498, 7; ATCC 31284, 8; ATCC BAA-738, 9; NBRC 3557, 10; NBRC 3886, 11; NBRC 3887, 12; NBRC 12583^T.
 (b) 13; *Bacillus coagulans* NBRC 12714, 14; *Escherichia coli* NBRC 102203^T, 15; *Staphylococcus aureus* NBRC 100910^T, 16; *Bacillus cereus* NBRC 15305^T, 17; *Bacillus licheniformis* NBRC 12200^T, 18; *Bacillus megaterium* NBRC 15308^T, 19; *Bacillus sporothermodurans* DSM 1599^T, 20; *Bacillus subtilis* NBRC 13719^T, 21; *Bacillus thuringiensis* NBRC 101235^T, 22; *Paenibacillus polymyxa* NBRC 15309^T, 23; *Brevibacillus brevis* NBRC 15304^T, 24; *Sporolactobacillus inulinus* NBRC 13503^T.

考 察

細菌のリボソームRNA (rRNA) 遺伝子 (rDNA) 群は多くの細菌ではマルチコピー遺伝子であり、既知の *Bacillus* 属菌ではゲノムあたりのコピー数が7-14コピーと多く¹⁾、鋳型となりうる分子数が相対的に多くなるので検出感度を高めることができる。

rDNA群の中でもITS領域は16S rDNAや23S rDNAと比較して、近縁種同士であっても菌種間の多型性が高く、検出に際して特異性を高めることができる⁴⁾。一方で、ITS領域にはアレル間での多型があるため、対象とする領域を十分に選ばなければ、感度の点でのメリットが小さくなる。アレル間の構造の比較における細菌の16S-23S rDNA ITS領域のモザイク様構造については、*Photobacterium damsela*⁵⁾、*Bacillus amyroliquefaciens*、*Brevibacillus borstelensis*、*B. fusiformis*、*B. licheniformis*、*B. lentus*など⁶⁾で同様の報告がある。

ITS領域を標的として、PCR、DNAマイクロアレイ、リアルタイムPCRなど原理的に塩基配列の類似度によるハイブリダイゼーションに基づいた検出系を構築する場合、そのプライマーやプローブの設計には、構造を精査してより多くのアレルで保持されている部分を選定することが必要と考えられる。また、PCR系では増幅対象領域内に欠失をもつアレルが存在すると、複数のバンドを生じて判定が難しくなるため、プライマー設計においては単一のバンドが生じるようアレル間の多型を考慮しなければならない。最善の配置はプライマーをアレル間で共通の領域に配置することであるが、通常PCRでは100塩基以上を必要とするため、ITS内の部分配列では不十分な場合が多い。本研究で示したプライマーペアを用いたPCRではおよそ160 bpの増幅産物の有無で、調査した*B. coagulans*の13菌株全ての菌株を陽性として検出した。一方で*B. coagulans*以外の菌種では陽性を示さず、本プライマーペアで*B. coagulans*を特異的に検出することができた。

要 約

*Bacillus coagulans*の13菌株について16S-23S rDNA ITS領域の塩基配列を詳細に調査した。いずれの菌株もITS-PCRで複数の鎖長の異なる増幅産物を生じ、主要な産物は5種類であった。産物のうち供試全菌株で共通に見られたのは403bpの増幅産物のみであった。

アライメントの結果、増幅産物は7つの部分配列から成り、いずれかの欠失によりバリエーションを生じていた。共通産物である403 bp産物の塩基配列に基づき、*B. coagulans*を特異的に検出あるいは同定可能なPCRプライマーを構築した。

文 献

- 1) Lee Z. M.-P., Bussema III, C. and Schmidt, T. M.: *Nucleic Acids Research*, **36**, 1-5 (2008).
- 2) Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. and Polz, M. F.: *J. Bacteriol.*, **186**, 2629-2635 (2004).
- 3) Daffonchio, D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5128-

5137 (2003).

- 4) Mora, D. *et al.*: *Microbiology*, **149**, 807-813 (2003).
- 5) Osorio, C.R., Collins, M. D., Ronalde, J. R. and Eoranzo A. E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 636-644 (2005).
- 6) Xu, D. and Côté, J.-C.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 695-704 (2003).