＝短 報＝

gyrB 内部塩基配列に基づく *Alicyclobacillus* 細菌種の鑑別法

西堀綾子^{*1}・浅原未佳^{*1}・後藤慶一^{*1}
笠井宏朗^{*2}・横田 明^{*3}

(^{*1} 三井農林株式会社, ^{*2} 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所, ^{*3} 東京大学)

(受付: 平成 18 年 9 月 14 日)

(受理: 平成 19 年 1 月 17 日)

Development of a Detection Method for *Alicyclobacillus* Species, Based on *gyrB* Sequence

Ayako NISHIBORI^{*1,†}, Mika ASAHARA^{*1}, Keiichi GOTO^{*1},
Hiroaki KASAI^{*2} and Akira YOKOTA^{*3}

(^{*1} Microbiological & Analytical Group, Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co., Ltd.,
223-1 Miyabara, Fujieda, Shizuoka 426-0133; [†] Corresponding author)

(^{*2} Marine Biotechnology Institute Co., Ltd., 3-75-1 Heita, Kamaishi, Iwate 026-0001)

(^{*3} Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo,
1-1 Yayoi 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032)

Some *Alicyclobacillus* species cause the spoilage of acidic beverages resulting in an odor of phenolic compounds such as guaiacol. We have already developed a discrimination method based on the *gyrB* sequence for *A. acidoterrestris*, which is the most frequently isolated species from spoiled products. Furthermore, in order to discriminate the other *Alicyclobacillus* species, we determined *gyrB* sequences of additional *Alicyclobacillus* species and comparative analysis of *gyrB* sequences was performed among all *Alicyclobacillus* species. The results showed species-specific regions in each *Alicyclobacillus* species. Using these regions as primers, each *Alicyclobacillus* species could be clearly detected with the PCR technique. Moreover these primer sequences could be applied to the LAMP method, and each *Alicyclobacillus* species could be rapidly and easily detected without amplification of non-target species. It is suggested that these species-specific regions are useful for discrimination of *Alicyclobacillus* at species level in quality control laboratories.

Key words: *Alicyclobacillus*, *gyrB*, LAMP

緒 言

近年、果汁飲料やアイソトニック飲料などの酸性飲料の腐敗（主として異臭）を引き起こす微生物として、*Alicyclobacillus* 属細菌が問題視されている。^{1), 2)} *Alicyclobacillus* 属細菌は好熱性（至適温度: 40～60℃）、好酸性（至適 pH: 3.5～5）の好気性芽胞形成細菌であり³⁾、一部の菌種は異臭成分（グアイアコール）を伴った腐敗を引き起こす⁴⁾。なかでも *A. acidoterrestris* は他のグアイアコール産生菌に比べて腐敗品からの分離頻度が高いため、清涼飲料製造における管理対象菌種とされている。

これまでわれわれは、*A. acidoterrestris* を迅速・簡便に鑑別するため、DNA ジャイレースの B サブユニットをコードする *gyrB* に着目し、PCR 法および LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法による特異性の高い鑑別方法を開発した⁵⁾。しかし、食品やその原料からは *A. acidoterrestris* 以外の菌種 (*A. acido-*

[†] 連絡先

^{*1} ☎426-0133 静岡県藤枝市宮原 223-1

^{*2} ☎026-0001 岩手県釜石市平田 3-75-1

^{*3} ☎113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

caldarius や *Alicyclobacillus* genomic species 1 など)の方が一般的に高頻度に検出される⁶⁾。また, *A. acidoterrestris* 以外にも製品中で増殖したり (“*A. contaminans*” など³⁾), 異臭を産生する菌種が存在する (*A. acidiphilus* など⁷⁾)。したがって, より高度な品質管理の実現, ならびに汚染源の究明を行うためには *A. acidoterrestris* の鑑別だけでは不十分であり, その他の *Alicyclobacillus* 属細菌の正確な鑑別法の開発が望まれてきた。

以上の背景を踏まえ, すでに構築した *gyrB* に基づく *A. acidoterrestris* の鑑別法⁵⁾をもとに, その他の主要な *Alicyclobacillus* 属細菌を鑑別する手法を開発することを目的として, 以下の検討を行った。

材料および方法

1. 使用した菌株および鋳型 DNA

A. herbarius 5A239-20-her, *A. acidocaldarius* HP2, DSM 448, DSM 451, MIH 321, 3B および SO6, *A. hesperidum* DSM 12766, *A. cycloheptanicus* DSM 4005 および DSM 4007, *Alicyclobacillus* genomic species 1 DSM 11983, DSM 454, KHA 31, MIH 2, P2, UZ 1 および DSM 6481 について, すでに報告した手法に従って⁵⁾ *gyrB* の塩基配列を決定した。

LAMP 反応の検証には, *A. acidoterrestris* ATCC 49025^T, *A. herbarius* CP 1^T, *A. acidocaldarius* ATCC 27009^T, HP 2, DSM 448, DSM 451, MIH 321, 3B および SO 6, *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* DSM 11297^T, *A. hesperidum* DSM 12489^T および DSM 11985, *A. acidiphilus* TA-67^T, *A. pomorum* 3A^T, *A. cycloheptanicus* DSM 4006^T, *Alicyclobacillus* genomic species 1 DSM 11984, TA-3, DSM 454, KHC 3, MIH 2, DSM 11983, P2, UZ 1 および DSM 6481, *A. sendaiensis* JCM 11817^T, *Alicyclobacillus* genomic species 2 MIH 332, *A. disulfidooxidans* DSM 12064^T の菌株より抽出・精製した染色体 DNA を使用した。

また, *A. acidoterrestris* ATCC 49025^T, *A. acidocaldarius* ATCC 27009^T, *A. acidiphilus* TA-67^T, *A. hesperidum* DSM 12489^T, *A. cycloheptanicus* DSM 4006^T, *A. herbarius* CP 1^T, *A. pomorum* 3A^T および *Alicyclobacillus* genomic species 1 DSM 11984 の DNA 溶液をそれぞれ終濃度 1 ng/ μ l になるように調整し, 各々を等量ずつ混合したものを混合 DNA 溶液とした。

2. 部分 *gyrB* の塩基配列の解析

部分 *gyrB* 上の菌種特異的な領域の探索は, CLUSTAL W ver. 1.8⁸⁾ により作成したデータセットをもとに, GeneWorks (ver. 2.0, IntelliGenetics, Inc.) を用いて行った。

3. PCR 反応条件

設計したプライマーの特異性を検証するため, 対象とした 8 菌種の基準株由来の DNA 溶液 (1 ng/ μ l) または 8 菌種の混合 DNA 溶液を鋳型として PCR 反応を行った。反応液組成は, (total 50 μ l): 鋳型 DNA 溶液 10 μ l, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ l, dNTPs (各 2.5 mM) 4 μ l, プライマー溶液 (各 20 pmol/ μ l) 各 2.5 μ l, Pyrobest DNA Polymerase (TAKARA) 0.25 μ l とした。PCR 反応は, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用い 98 $^{\circ}$ C (10 秒) $\rightarrow$ 68 $^{\circ}$ C (1 分) を 30 サイクル繰り返した。増幅産物の検出は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて行った。

4. LAMP プライマーセットの構築

LAMP 法プライマー設計支援ソフト Primer Explorer V2 (栄研化学・富士通・富士通ソリューションズ) を使用し, PCR 反応に用いたおのおの *Alicyclobacillus* 属細菌に特異的なプライマー領域を, LAMP ターゲット領域 F1, F2, F3, B1c, B2c および B3c のいずれかに指定し, LAMP プライマーセットを構築した。

5. LAMP 反応条件

遺伝子増幅には, 市販の Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用い, 操作はキット添付のプロトコルに従った。反応温度は 63 $^{\circ}$ C, 反応時間は 60 分で行った。増幅産物の検出は, 反応チューブに 10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液 0.5 μ l を添加し, UV 254 nm 照射下で行った。

結 果

1. *gyrB* 塩基配列の決定および多重配列比較解析

Alicyclobacillus 属細菌 17 株について, *gyrB* の部分塩基配列 (1,167 bp) を決定した。これらの配列と, DDBJ より入手した *Alicyclobacillus* 属細菌の *gyrB* 配列情報をもとに多重配列比較解析を行い, 同一菌種内で保存され, かつその他の菌種とは高度に異なる領域を検索した。その結果, これらの条件を満たす特異性の高い領域を各菌種につき複数見いだした。さらに, これらの領域をもとに, 菌種ごとに増幅断片長が異なるようなプライマーを設計することができた (Fig. 1)。ただし *A. sendaiensis*, *Alicyclobacillus* genomic species 2 および *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* は, *A. acidocaldarius* や *Alicyclobacillus* genomic species 1 と塩基配列が高度に類似しており, 個々の菌種に対応したプライマーを設計することができなかった。しかし, 系統的に類縁であるこれら 5 菌種 (*A. acidocaldarius* group) に共通した領域を検索することで, 他の菌種と *A. acidocaldarius* group を区別するためのプライマーを設計することができた。

Fig. 1. Species-specific primer regions for each *Alicyclobacillus* species in *gyrB* sequence. Indicated sequence is based on *A. acidocaldarius* ATCC 27009^T.

PF3 & PR1: *A. acidoterrestris* primers, GHER-F/R: *A. herbarius* primers, GC-F/R: *A. acidocaldarius* primers, GHES-F/R: *A. hesperidum* primers, GACI-F/R: *A. acidiphilus* primers, GPO-F/R: *A. pomorum* primers, GCYL-F/R: *A. cycloheptanicus* primers, GG1-F/R: *Alicyclobacillus* genomic species 1 primers, Gcg-F/R: *A. acidocaldarius* group primers, F: Forward primer, R: Reverse primer

Fig. 2. Differentiation of each *Alicyclobacillus* using species-specific primers.

Mixed DNA solution was used as a template.

M: Marker, Lane 1: *A. pomorum* (GPO-F & GPO-R, 775 bp), 2: *A. acidiphilus* (GACI-F & GACI-R, 701 bp), 3: *A. acidocaldarius* (GC-F & GC-R, 563 bp), 4: *Alicyclobacillus* genomic species 1 (GG1-F & GG1-R, 520 bp), 5: *A. acidoterrestris* (PF3 & PR1, 446 bp), 6: *A. herbarius* (GHER-F & GHER-R, 370 bp), 7: *A. cycloheptanicus* (GCYL-F & GCYL-R, 320 bp), 8: *A. hesperidum* (GHES-F & GHES-R, 212 bp), 9: *A. acidocaldarius* group (Gcg-F & Gcg-R, 153 bp)

2. PCR 法による *Alicyclobacillus* 属細菌種の鑑別

設計した9種のプライマーの特異性を検証するために、まず検出対象の菌種およびそれ以外の菌種のDNAを鋳型とし、それぞれのプライマーを用いてPCRを行った。その結果、いずれのプライマーも対象菌種にのみ増幅が認められた (data not shown)。さらに、8菌種のDNAを混合した溶液を鋳型としてPCR反応を行ったところ、予想される断片長の単一バンドが各々の菌種およびグループについて認められた (Fig. 2)。以上の結果から、構築したプライマーは各菌種に非常に特異性が高く、他菌種との鑑別に有効であることが示された。

3. 種特異的な領域の LAMP 法への応用

PCR 反応で特異性が示されたプライマー領域を LAMP 法に応用するため、各菌種について LAMP プライマーセットを構築した。これらのプライマーセットと各菌株由来 DNA を用いて LAMP 反応を行い、エチジウムブロマイドによる染色を行った。Fig. 3 に *A. acidocaldarius* での実施例を示した。用いた LAMP プライマーセットは Table 1 に示した。*A. acidocaldarius* に対する LAMP プライマーセットを用いて LAMP 反応

Table 1. LAMP primer sequences for *A. acidocaldarius*

	Length (bp)	Sequence (5'→3')
F3	19	GCG AAC AAC ATC AAC ACG G
B3	19	ATG CCG CGS ACC TCG CTG T
F2	20	CAC GAG GCS GGC TTC AAG AG
F1c	24	CGA CTT CAR GAA GCC GTA TCG CCG
B2	17	TCT GSC CYT CRA ACT GC
B1c	22	AGC ATG ACS GGM GAC GAY GTC C

S; C or G, R; A or G, Y; C or T, M; A or C (IUB code)

Fig. 3. Fluorescent staining patterns of LAMP products using the LAMP primer set for *A. acidocaldarius*.

1: *Alicyclobacillus* genomic species 1 DSM 454, 2: TA-3, 3: DSM 11984, 4: KHC 3, 5: MIH 2, 6: DSM 11983, 7: P2, 8: UZ 1, 9: DSM 6481, 10: *A. acidocaldarius* ATCC 27009^T, 11: *A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii* DSM 11297^T, 12: *A. acidocaldarius* HP2, 13: DSM 448, 14: DSM 451, 15: MIH 321, 16: 3B, 17: SO 6, 18: *A. sendaiensis* JCM 11817^T, 19: *Alicyclobacillus* genomic species 2 MIH 332, 20: *A. acidiphilus* TA-67^T, 21: *A. hesperidum* DSM 11985, 22: DSM 12489^T, 23: *A. acidoterrestris* DSM 49025^T, 24: *A. cycloheptanicus* DSM 4006^T, 25: *A. pomorum* 3A^T, 26: *A. herbarius* CP 1^T, 27: *A. disulfidooxidans* DSM 12064^T, P: positive control, N: negative control

を行った場合、Fig. 3 に示したように、*A. acidocaldarius* の各菌株でのみ顕著な増幅が認められた。他の菌種に対するプライマーセットを用いた LAMP 反応結果についてのデータは割愛するが、いずれのプライマーセットでもターゲットとなる菌種でのみ増幅が起こり、その他の菌種との交差反応は認められなかった。

考 察

われわれはこれまでに *A. acidoterrestris* を対象として、*gyrB* 塩基配列に基づく PCR 法と LAMP 法による迅速・簡便な鑑別法を開発した。しかし果汁飲料においては、管理対象菌種である *A. acidoterrestris* よりもむしろ、その他の *Alicyclobacillus* 属細菌のほうが頻繁に検出されるため、それらの鑑別法の需要は高まってきている。

飲料業界で広く用いられている(社)日本果汁協会による統一検査法⁹⁾では、ペルオキシダーゼ法¹⁰⁾やグアイアコール検出法¹¹⁾、あるいは生育温度差を利用して¹²⁾ *A. acidoterrestris* を鑑別しているが、これらの手法ではそ

の他の *Alicyclobacillus* 属細菌種を特定することはできない。現在, *Alicyclobacillus* 属細菌の種の同定法としては 16S rDNA シークエンス法¹³⁾が主流であるが, 培養・DNA 抽出・PCR 反応・シークエンス反応といった煩雑な手順を踏む必要がある。

本研究では, 微生物の同定に従来用いられている 16S rDNA よりも進化速度が速い *gyrB* の塩基配列に着目することにより, 16S rDNA では相同性が高いために鑑別できなかった細菌種を同定することができると考え, 検討を行った。その結果, *gyrB* の配列情報を比較することにより, *Alicyclobacillus* 属細菌の主要な 8 菌種を鑑別するための特異性の高い領域を見いだすことができた。さらにこれらの領域をプライマー配列として PCR 反応を行うことで, ターゲット以外の菌種の DNA が混在していても, ターゲット菌種を特異的に検出することができた。よってこれら領域は非常に選択性が高いことが示された。

さらに, より簡便性を追求するため同領域を LAMP 法へと応用したところ, いずれの菌種でも交差反応が生じることなく, ターゲット菌種のみで増幅が起こる高い特異性をもったプライマーセットを構築することができた。LAMP 法は等温で短時間の増幅が可能であり, 増幅の有無も目視で確認することができることから, 従来に比べて簡便で迅速な *Alicyclobacillus* 属細菌の鑑別法として実用化され, 飲料製造現場の検査室等で利用されることが期待される。ひいては *Alicyclobacillus* 属細菌による腐敗事故の収束へ向けての役を担うものと考えられる。

文 献

- 1) 丹羽源廣, 廣田裕子, 白須由治: 輸入原料果汁より検出された新規耐熱性好酸性菌. 果汁協会報, **9**, 31-42 (1991).
- 2) Splittstoesser, D. F. and Churey, J. J.: Unique spoilage organisms of musts and wines. Toland, T. and Fugelsang, K. C. (ed.), p. 36-41. Wine spoilage microbiology Conference. California State University, Fresno (1996).
- 3) Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S.-Y., Kasai, K. and Yokota, A.: Proposal of *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawaensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangidus* sp. nov., *Alicyclobacillus saccharis* sp. nov., and *Alicyclobacillus shizuokaensis* sp. nov., novel moderately-thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press).
- 4) Jensen, N. and Whitfield, F. B.: Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. Lett. Appl. Microbiol., **36**, 9-14 (2003).
- 5) 後藤慶一, 浅原未佳, 笠井宏朗, 横田 明: *gyrB* 遺伝子内部塩基配列に基づく飲料変敗細菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の鑑別法. 日食微誌, **23**, 149-155 (2006).
- 6) Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M., Kasai, H. and Yokota, K.: *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **53**, 1537-1544 (2003).
- 7) Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M. and Yamasato, K.: *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a new thermo-acidophilic ω -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **52**, 1681-1685 (2002).
- 8) Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., **76**, 4350-4435 (1994).
- 9) (社)日本果汁協会: 「耐熱性好酸性菌統一検査法」について. 果汁協会報, **3**, 4-12 (2003).
- 10) Niwa, M.: *A. acidoterrestris* rapid detection kit. Fruit Processing, **13**, 328-331 (2003).
- 11) Gocmen, D., Elston, A., Williams, T., Smoot, J., Parish, M. and Rouseff, R.: Identification of antiseptic off-flavours formed from thermophilic spore-forming bacteria using GC-O and GC-MS. State-of-the-art in flavour chemistry and biology. Hofman, T., Rothe, M. and Schieberle, P. (ed.), p. 240-247. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, Germany (2005).
- 12) 後藤慶一: 耐熱性好酸性菌の検査法～分析法統一と発展の動向～〈耐熱性好酸性菌統一検査法の検査精度及び Q & A〉. 果汁協会報, **10**, 1-16 (2003).
- 13) Goto, K., Mochida, K., Asahara, M., Suzuki, M. and Yokota, A.: Application of the hypervariable region of the 16S rDNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*. J. Gen. Appl. Microbiol., **48**, 243-250 (2002).