

機能性関与成分 *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ)
総菌数測定方法(定量分析)¹⁾

1. 試薬の調製

(1) リン酸緩衝生理食塩水の調製

ダルベッコ PBS(-) (日水製薬、東京、日本) 9.6 g にミリ Q 水 1 L を加えて溶解し、121°C で 15 分間滅菌した。

(2) SET buffer の調製

Sodium Chloride 4.38 g、EDTA2Na 9.30 g、Tris 2.42 g にミリ Q 水 900 mL を加えて溶解した。1 N の NaOH で pH7.5 に調整した後、1 L にメスアップし、121°C で 15 分間滅菌した。

(3) TE buffer の調製

以下手順で調製した 1 M Tris-HCl(pH8.0) 10 mL、0.5 M EDTA(pH8.0) 2 mL を混合した後、1 L にメスアップし、121°C で 15 分間滅菌した。

・ 1 M Tris-HCl(pH8.0)

Tris 121.2 g にミリ Q 水 900 mL を加えて溶解した。1 N の HCl で pH8.0 に調整した後、1 L にメスアップし、121°C で 15 分間滅菌した。

・ 0.5 M EDTA(pH8.0)

EDTA2Na 46.5 g にミリ Q 水 200 mL を加え、NaOH を添加しながら溶解した。さらに 5 N の NaOH で pH8.0 に調整した後、250 mL にメスアップし、121°C で 15 分間滅菌した。

(4) MRS 液体培地の調製

Lactobacilli MRS Broth (BD, Franklin Lakes, USA) 55 g に水 1 L を加えて溶解し、121°C で 15 分間滅菌した。

2. 発酵乳中の菌体のゲノム DNA 抽出

発酵乳 100 μ l を 8,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離した後、得られた沈殿にリン酸緩衝生理食塩水 100 μ l を加えて懸濁した。遠心分離と懸濁をさらに 2 回繰り返した後、8,000 $\times g$ で 1 分間遠心分離した。得られた沈殿に SET buffer 100 μ l を加えて懸濁した後、1 mg/ml RNase (Sigma Aldrich, St. Louis, USA ; 酵素粉末を滅菌した Milli-Q 水に溶解)溶液 0.5 μ l、10 mg/ml Lysozyme (富士フィルム和光純薬、東京、日本; 酵素粉末を滅菌した SET buffer に溶解)溶液 10 μ l、1000 U/ml N-Acetylmuramidase (Sigma Aldrich, St. Louis, USA ; 酵素粉末を滅菌した Milli-Q 水に溶解)溶液 2 μ l を添加し、37°C で 1 時間静置した。さらに 10%(w/w)ドデシル硫酸ナトリウム 11 μ l、5 mg/ml Proteinase K (富士フィルム和光純薬、東京、日本; 酵素粉末を滅菌した Milli-Q 水に溶解)溶液 1.1 μ l を添加し、適宜攪拌しながら 55°C で 1 時間反応した。反応物に TE buffer 200 μ l、TE saturated Phenol 500 μ l を添

加し、Deltamixer Se-08 (TAITEC、越谷、日本) を用いて 1 分間懸濁した。25℃、17,800×*g* で 5 分間遠心分離した後、上層 300 μl を別のチューブへ回収し、Phenol–Chloroform–isoamyl alcohol mixture (25 : 24 : 1) 500 μl を添加し、1 分間懸濁した。再度 25℃、17,800×*g* で 5 分間遠心分離した後、上層 200 μl を別のチューブへ移し、3 M Sodium acetate 2 μl と 2-propanol 200 μl を添加し、転倒混和した。氷上で 10 分以上静置した後、4℃、17,800×*g* で 5 分間遠心分離した。上清を除き、70%エタノールを 500 μl 添加した後、4℃、17,800×*g* で 5 分間遠心分離を行い、リンスした。エタノールを除き、アスピレーターで乾燥させた後、50 μl の TE buffer に溶解し、使用まで-20℃で保存した。

3. *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) MRS 培養物中の菌体のゲノム DNA 抽出

L. helveticus SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) を MRS 液体培地で、37℃で 16 時間培養した。培養物中の総菌数をバクテリアカウンター(サンリード硝子、東京、日本)で測定し、1E+07cells/mL 相当容量を 2. と同様にしてゲノム DNA を抽出した。

4. *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) を特異的に検出するプライマー、LNA プローブの設計

製品中には、機能性関与成分である *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) と発酵乳製造に必要な *Streptococcus thermophilus* (サーモフィルス菌) が含まれているのみである。そこで、機能性関与成分である乳酸菌ヘルベ (phenylalanyl-tRNA synthase alpha-subunit 遺伝子 (*pheS*)²⁾ を標的とし、菌種特異的な部位をもとにプライマー hel_pheS F1 (5'-GAAGGCTTGGTAGTAGATAAGAACGTC-3')、hel_pheS R4 (5'-AAGGCAAAACCACCGTAAACAG-3') と LNA プローブ h-P1(5'-6-FAM_C+TACTCGT+CT+TCGTCCAAGT_BHQ1-3')を設計した。なお、当該プライマーを用いて得られる *pheS* 増幅断片が *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) に由来する (サーモフィルス菌由来ではない) ことは、塩基配列解析によって確認済みである。また、*pheS* は *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) のゲノム上に 1 コピーで存在することが報告されていることから³⁾、当該遺伝子を標的に定量する事で、総菌数を測定することができる。

(* 6-FAM:6-carboxyfluorescein, BHQ-1:Black hole quencher, +C,+T:Locked Nucleic Acid)

5. 定量的 PCR

設計したプライマーと LNA プローブを用いて、発酵乳から抽出した DNA 溶液を定量的 PCR に供した。検量線は上記 2 で調製したゲノム DNA 溶液を 1E+01~05 cells 相当量に適宜希釈した溶液を用いて作成した。発酵乳から抽出した DNA 溶液の Ct 値を測定し、検量線から発酵乳中の総菌数を算出した。

2 種のプライマーは終濃度 0.3 μl、LNA プローブは 0.2 μl となるようにサンプルと混

合した。定量的 PCR は、ViiA™ 7 Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)を用い、PCR 反応には、THUNDERBIRD Probe qPCR mix (TOYOBO、大阪、日本)を用いた。PCR 反応は、95℃, 20 秒加熱後に、95℃, 1 秒、60℃, 60 秒のサイクルを 40 サイクル行った。また、定量的 PCR は Duplicate で実施し、ネガティブコントロールとして DNA を添加していない試験水準を準備した。なお、当該 qPCR mix では、使用する PCR 装置によって最適な反応条件が異なるため、詳細は商品添付のマニュアル⁴⁾に従った。

6. 参考文献

- 1) Yamashita M, Kobatake E, Obuchi S, Iwai M, Ichikawa K, Kabuki T, Enomoto T. Intake safety of *Lactobacillus helveticus* SBT2171 and its effects on nasal and ocular symptoms associated with mites and house dust: An open-label study and a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel group study. *Funct. food health dis.* 2019; 9(1): 52-77.
- 2) Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J. Identification of *lactobacilli* by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007 ;57(Pt 12):2777-2789.
- 3) Moser A, Berthoud H, Eugster E, Meile L, Irmeler S. Detection and enumeration of *Lactobacillus helveticus* in dairy products. *Int Dairy J.* 2017 ;68:52-59
- 4) THUNDERBIRD Probe qPCR mix 取扱説明書(TOYOBO)

以上

機能性関与成分 *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ)
定性試験方法

1. 試薬の調製

(1) 改変 A 希釈液¹⁾の調製

リン酸二水素カリウム 4.5 g、リン酸水素二ナトリウム 6.0 g、L-システイン塩酸塩 0.5 g、Tween 80 0.5 g、寒天 0.5 g に精製水 1000ml を加え、121℃で 15 分間滅菌した。

(2) 強化クロストリジア寒天培地 pH5.0²⁾の調製

強化クロストリジア寒天培地(OXOID, Basingstoke, UK) 52.5 g に水 950 mL 程度を加えて溶解した。1~3 mol/l の塩酸で pH 5.0 に調整後、1000 ml にメスアップし、121℃で 15 分間滅菌した。50~60℃程度に冷却後、シャーレに 15~20 ml ずつ分注して平板とした。

(3) MRS 液体培地の調製

Lactobacilli MRS Broth (BD, Franklin Lakes, USA) 55 g に水 1 L を加えて溶解し、121℃で 15 分間滅菌した。

(4) リン酸緩衝生理食塩水の調製

ダルベッコ PBS(-) (日水製薬、東京、日本) 9.6 g にミリ Q 水 1 L を加えて溶解し、121℃で 15 分間滅菌した。

(5) SET buffer の調製

Sodium Chloride 4.38 g、EDTA2Na 9.30 g、Tris 2.42 g にミリ Q 水 900 mL を加えて溶解した。1 N の NaOH で pH7.5 に調整した後、1 L にメスアップし、121℃で 15 分間滅菌した。

(6) TE buffer の調製

以下手順で調製した 1 M Tris-HCl(pH8.0) 10 mL、0.5 M EDTA(pH8.0) 2 mL を混合した後、1 L にメスアップし、121℃で 15 分間滅菌した。

・ 1 M Tris-HCl(pH8.0)

Tris 121.2 g にミリ Q 水 900 mL を加えて溶解した。1 N の HCl で pH8.0 に調整した後、1 L にメスアップし、121℃で 15 分間滅菌した。

・ 0.5 M EDTA(pH8.0)

EDTA2Na 46.5 g にミリ Q 水 200 mL を加え、NaOH を添加しながら溶解した。さらに 5 N の NaOH で pH8.0 に調整した後、250 mL にメスアップし、121℃で 15 分間滅菌した。

2. 発酵乳中からの *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) の単離

発酵乳試料 1g を改変 A 希釈液 9ml に十分に混合して試料原液を調製した。さらに試料原液 1 mL を改変 A 希釈液 9 mL で混合し、同様の操作を繰り返して 10 倍段階の希釈液

を調製した。調製した同一希釈段階の希釈液を各 2 枚の強化クロストリジア寒天培地 pH5.0 に 0.1 ml ずつ無菌的に分注し、均一に塗末した。塗抹後の平板を倒置し、アネロパックケンキ（三菱ガス化学）で嫌気状態とし、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 72 ± 3 時間培養した。寒天培地上に形成されたコロニー（*L. helveticus* SBT2171（乳酸菌ヘルベ））を 1 つ釣菌し、8 ml の MRS 液体培地(Difco, Detroit, USA)で 37°C 、16 時間培養した。

3. MRS 液体培養物からの DNA 抽出

1 で調製した MRS 液体培養物を 4°C 、 $1,800\times g$ で 5 分間遠心分離した後、得られた菌体をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した。菌体を SET buffer 900 μl に懸濁し、 -20°C で完全に凍結させた後、室温で融解させた。RNase(Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 1 μl 、10mg/ml Lysozyme（富士フィルム和光純薬、東京、日本）100 μl 、1000 U/ml の N-Acetylmuramidase（Sigma Aldrich, St. Louis, USA）溶液 20 μl を添加し、 37°C で 1 時間静置した。10% (w/w) ドデシル硫酸ナトリウム溶液 110 μl 、5 mg/ml Proteinase K（富士フィルム和光純薬、東京、日本）11 μl を添加し、適宜攪拌しながら 55°C で 1 時間反応した。600 μl を新しい 1.5 ml チューブに移し、5 M NaCl 200 μl を添加し、緩やかに攪拌した。クロロホルム 600 μl を添加し、適宜攪拌しながら室温で 30 分間静置した。 25°C 、 $20,000\times g$ で 5 分間遠心分離した後、上層を新しい 1.5 ml チューブに移し、 -20°C で保存していたイソプロパノールを等量添加し、緩やかに転倒混和した。 4°C 、 $20,000\times g$ で 5 分間遠心分離して上清を除去した後、 -20°C で保存していた 70% エタノールを 1 ml 添加した。再度 4°C 、 $20,000\times g$ で 5 分間遠心分離して、エタノールを除去した。アスピレーターを用いて 15 分間真空乾燥し、TE buffer 200 μl を添加した。一晚 4°C 保管することで DNA を自然溶解させ、使用まで -20°C で保存した。

4. PCR による菌種の同定

ヘルベティカス菌（*L. helveticus*）種の識別は、渡辺らの方法³⁾に従い、16S rRNA をターゲットとしたプライマー A（5'-GCAGATTTACTTCGGTAATGACGC-3'）及びプライマー B（5'-AAGATTCCCTACTGCTGCC-3'）を用いた PCR 法により行った。PCR 反応は、EmeraldAmp MAX PCR Master Mix（タカラバイオ、草津、日本）10 μl 、プライマー A（10 μM ）0.4 μl 、プライマー B（10 μM ）0.4 μl 、PCR-Grade H₂O 8.2 μl に抽出 DNA（100 ng/ μl ）1 μl を加えて全量 20 μl で行った。反応には Veriti 96-well Thermal Cycler（Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA）を使用し、 94°C 、3 分加熱を行った後、 94°C 、20 秒、 55°C 、20 秒、 72°C 、30 秒を 30 サイクル行った。PCR 反応後、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、ヘルベティカス菌種特異的な DNA 断片（312 bp）の増幅を確認した（図 1 参照）。なお、使用した DNA マーカー（100 bp DNA Ladder, タカラバイオ、草津、日本）は下から順に 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500 bp である（以下の RAPD 法も同様のマーカーを使用）。

5. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) -PCR 法による菌株の同定

L. helveticus SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) の同定は、シングルプライマー {プライマー C⁴⁾ (5'-AGCAGCGTGG-3') またはプライマー D⁵⁾ (5'-CGGCCCCTGT-3')} を用いた RAPD-PCR 法により行った。RAPD-PCR 反応には、Titanium *Taq* PCR Kit (タカラバイオ、草津、日本) を使用し、反応は 10×Titanium *Taq* PCR buffer 2 μl、50×dNTP mix 0.4 μl、50×Titanium *Taq* DNA Polymerase 0.4 μl、プライマー-C (10 μM) あるいはプライマー-D (10 μM) 0.4 μl、PCR-Grade H₂O 16.4 μl に抽出 DNA (100 ng/μl) 0.4 μl を加えて全量 20 μl で行った。反応には Veriti 96well Thermal Cycler を使用し、94°C, 5 分、36°C, 5 分、72°C, 5 分を 4 サイクル行った後、94°C, 1 分、36°C, 1 分、72°C, 1 分を 30 サイクル行い、最後に 72°C, 10 分を 1 サイクル行った。PCR 反応後、2% アガロースゲルで電気泳動を行い、検出される各 DNA 断片のサイズを確認した (図 2, プライマー-C; 図 3, プライマー-D)。

図 2、図 3 とともに「レーン 2」が *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) に相当しており、*L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) は試験した他の 7 種のヘルベティカス菌とは明らかに異なるバンドパターンを示している。図 2 (プライマー-C 使用) においては、*L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) のバンドパターンの特徴として、1500 bp 以上にメジャーな DNA バンドが確認されていないことが挙げられる。他の 7 種類のヘルベティカス菌では 1500bp 以上に、特に濃い DNA バンド (1600~1700 bp あたりと推定) が確認できているが、*L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) にはこれが無い。さらに、図 3 (プライマー-D 使用) においては、*L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) のバンドパターンの特徴として、900 bp 付近に最も濃い DNA バンドが確認できる点が挙げられる。他の 7 種類のヘルベティカス菌では 900 bp 付近にも薄く DNA バンドが確認できるが、主要な増幅産物ではないことは明らかである。

上述のように、プライマー-C および D において、*L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) に特徴的なバンドパターンが得られており、これらを併用することで、定性分析における *L. helveticus* SBT2171 の判定制度を高めることができる。特に、プライマー-D を用いた場合に (図 3)、900 bp 付近に *L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) に特徴的なメジャーバンドが確認できるようになる。これを判定の一つの基準にすることで、*L. helveticus* SBT2171 (乳酸菌ヘルベ) を他の菌と誤判定する可能性は極めて低くなる。

<図 1~3>

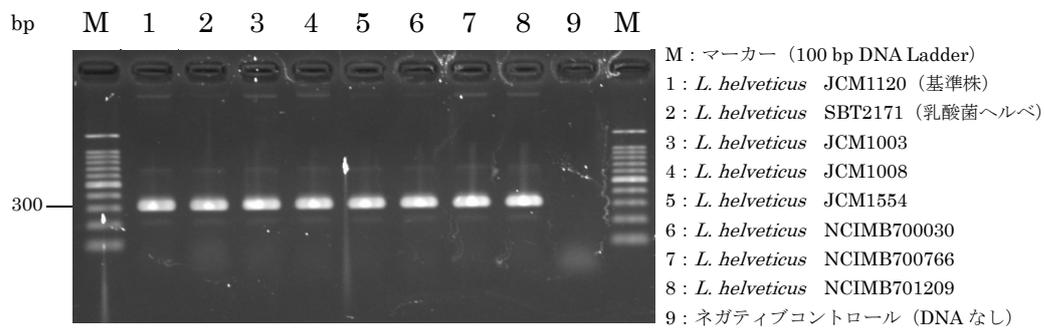


図 1 プライマーA、Bを用いたヘルベティカス菌種特異的 PCR における各菌株の DNA バンドパターン

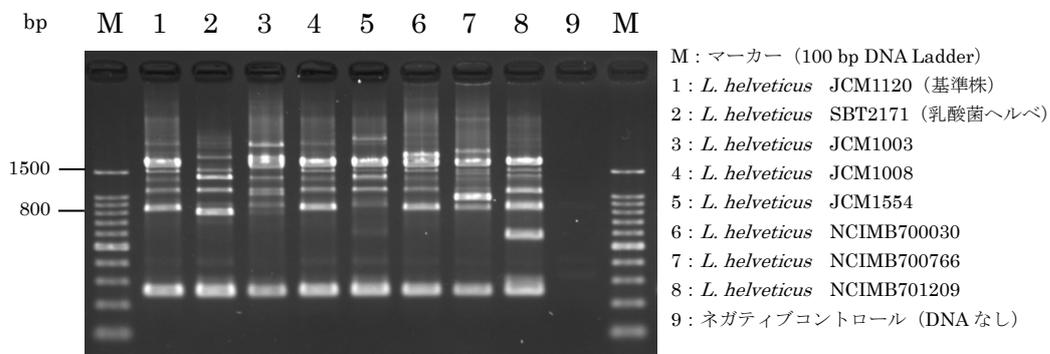


図 2 プライマーCを用いた RAPD-PCR における各菌株の DNA バンドパターン

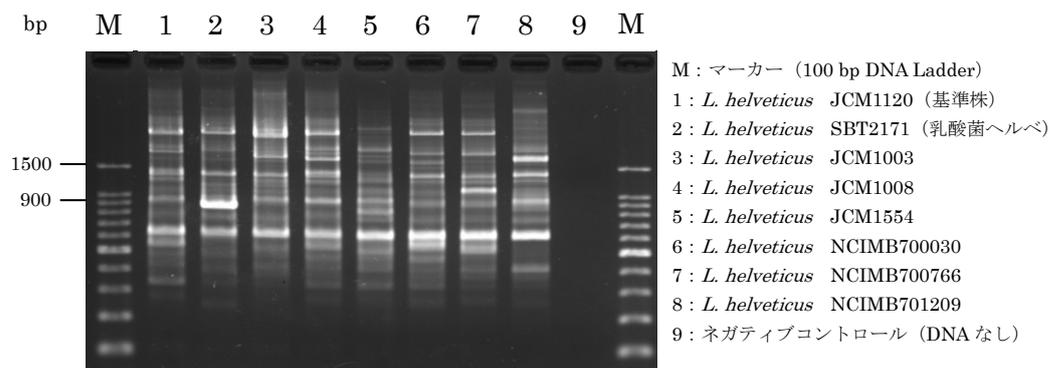


図 3 プライマーDを用いた RAPD-PCR における各菌株の DNA バンドパターン

6. 引用文献

- 1) 光岡知足（編著）ビフィズス菌の研究.日本ビフィズス菌センター. 1994; 308.
- 2) Ashraf R, Shah NP. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. *Int J Food Microbiol.* 2011;149(3):194-208.3
- 3) 渡辺幸一、三宅妙子、松木隆広、小柳津広志. 16S rRNA の塩基配列を利用した発酵乳製品中の *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* の菌種同定 光岡知足（編）腸内フローラの分子生態学. 学会出版センター. 1998; 129-154.
- 4) Cocconcelli PS, Porro D, Galandini S, Senini L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett Appl Microbiol.* 1995 ;21(6):376-379.
- 5) Johansson ML, Quednau M, Molin G, Ahrné S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett Appl Microbiol.* 1995 ;21(3):155-159.

以上