

γ-アミノ酪酸 (GABA) を高生産する乳酸菌の探索

バイオ系チーム 和田 潤、田中 秀典、清野 珠美、泊 直宏、高阪 千尋
知恵産業融合センター 廣岡 青央

要 約

発酵微生物として有名な乳酸菌は多くの発酵食品に用いられる一方で、近年は消費者の健康への意識の高まりもあって、プロバイオティクス（ヒトの健康に好影響を与える生細菌）としても注目を集めている。また、我々が食事とともに摂取できる様々な機能性成分が注目されており、なかでもストレスの緩和や高めの血圧を下げる機能があるとされているγ-アミノ酪酸 (GABA) はよく知られている。GABAは広く生物界に存在し、微生物の中にもGABA生産能を有するものが存在することから、当研究所保有の乳酸菌ライブラリーを用いてGABA生産能に優れた乳酸菌の探索を行った。LC-MSを用いて乳酸菌培養液中のGABAの定量を行ったところ、スグキから分離された *Levilactobacillus brevis* F2103株と *Levilactobacillus brevis* F2938株が多量にGABAを生産することが分かった。

1. はじめに

乳酸菌は古くからヨーグルトや漬物など多くの発酵食品に用いられ、我々にとって非常に安心で馴染みのある微生物である¹⁾。近年は、乳酸菌はプロバイオティクス（ヒトの健康に好影響を与える生細菌）として注目を集めており²⁾、その効能も多岐にわたる³⁾⁻⁶⁾。日本健康・栄養食品協会の調べによると、特定保健用食品の2020年度の市場規模はおよそ5600億円であるが、そのうちの半分以上となるおよそ3000億円を乳酸菌関連が占めており、効能を有した乳酸菌を用いた機能性食品製造も盛んに行われている。

優れた機能性を有した乳酸菌を用いて、特徴ある発酵食品製造や商品化のコンセプトに合致しつつ、安定した製品製造を可能にするためには、適した性能を有した乳酸菌が必要となる。優れた最適な乳酸菌を選抜するためには多様で充実した乳酸菌のコレクションを保有する必要がある。そこで、当研究所では将来的に食品製造に利用され、人の口に入る可能性があることを鑑みて、既に食経験があり、安全が担保された発酵食品等から乳酸菌を単離及び採取し、これまでに500株以上の乳酸菌から構成される乳酸菌ライブラリーを構築した⁷⁾⁻⁸⁾。

昨今の消費者の健康への意識が高まる中、乳酸菌と同様にヒトの健康への寄与が明らかにされ、食品中などに含まれている機能性成分にも注目が集まっている。なかでも野菜や果物にも含まれており、ストレスの緩和や高めの血圧を下げる機能があるとされている成分にγ-アミノ酪酸 (GABA) がある (図1)。GABAは生物界に広く存在する非タンパク質構成アミノ酸で、乳酸菌のなかにもGABAを生産する菌株が報告されている⁹⁾。そこで、当研究所の乳酸菌ライブラリーを用いてGABAを生産する乳酸菌を本研究の対象として探索を行った。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) より購入した *Levilactobacillus brevis* (NBRC 12005)、*Levilactobacillus brevis* (NBRC 107147) と研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から代表的な菌株を用いた (表1)。

2.2 乳酸菌の培養方法

乳酸菌の培養はMRS培地 (DIFCO) を用いて30℃、3日、静置で行った。GABAの生産量を調べる試験では必要に応じてグルタミン酸 (グルタミン酸ナトリウム) を添加したMRS培地を用いた。

2.3 γ-アミノ酪酸 (GABA) の測定方法

乳酸菌培養液中のGABAの測定は簡易的には薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行った。TLCは、

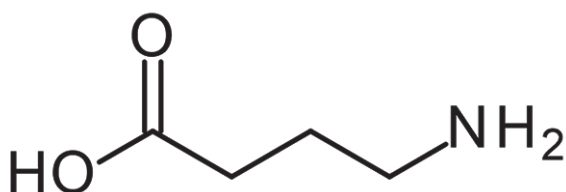


図1 γ-アミノ酪酸 (GABA)

表1 使用菌株

菌株番号	分離源	菌株番号	分離源	菌株番号	分離源	菌株番号	分離源	菌株番号	分離源
F101	漬物(スグキ)	F708	漬物(ミズナス)	F1404	清酒(酒母)	F2103	漬物(スグキ)	F2304	糠漬け(糠)
F104	漬物(スグキ)	F802	漬物(ミズナス)	F1411	清酒(酒母)	F2104	漬物(スグキ)	F2305	糠漬け(糠)
F105	漬物(スグキ)	F901	漬物(キュウリ)	F1412	清酒(酒母)	F2105	漬物(スグキ)	F2801	漬物(ナス)
F106	漬物(スグキ)	F1101	清酒醪	F1413	清酒(酒母)	F2206	漬物(スグキ)	F2802	漬物(ナス)
F110	漬物(スグキ)	F1102	清酒醪	F1416	清酒(酒母)	F2208	漬物(スグキ)	F2803	漬物(ナス)
F303	漬物(キャベツ)	F1103	清酒醪	F1708	キムチ(ダイコン)	F2213	漬物(スグキ)	F2811	漬物(ナス)
F307	漬物(キャベツ)	F1104	清酒醪	F1709	キムチ(ダイコン)	F2214	漬物(スグキ)	F2812	漬物(ナス)
F701	漬物(ミズナス)	F1401	清酒(酒母)	F1810	漬物(キュウリ)	F2301	糠漬け(糠)	F2823	漬物(ナス)
F703	漬物(ミズナス)	F1402	清酒(酒母)	F2101	漬物(スグキ)	F2302	糠漬け(糠)	F2824	漬物(ナス)
F706	漬物(ミズナス)	F1403	清酒(酒母)	F2102	漬物(スグキ)	F2303	糠漬け(糠)	F2835	漬物(ナス)
								F2836	漬物(ナス)
								F2901	漬物(スグキ)
								F2902	漬物(スグキ)
								F2937	漬物(スグキ)
								F2938	漬物(スグキ)
								F3002	漬物(スグキ)
								F3004	漬物(スグキ)
								F3005	漬物(スグキ)
								J1	漬物(ハクサイ)
								J31	漬物(ハクサイ)

MERCK社製シリカゲルプレート (TLC-アルミシート シリカゲル60 F₂₅₄) 及び展開溶媒 (酢酸エチル：酢酸：エタノール：水=12：3：3：2 v/v/v/v) を用いて展開し、ニンヒドリンを発色試薬として用いた。GABAの定量は既報¹⁰⁾と同様にカラムにDiscovery HS F5 (2.1 mm I.D.×150 mm) (Supelco)、移動相に0.1%ギ酸及び0.1%ギ酸-80%アセトニトリルを用いて、B液の濃度を0%から10分後に50%となるようにリニア-グラジエントとし、10分後から25分後までは100%、25分後から40分後までは0%とした。カラム温度40℃、流速0.25 ml/minの条件で検出はAcquity TQD LC/MS/MSシステム (Waters) を用いてESI、PositiveのMRMモード (MRMトランジション 104.1>86.9) で行った。GABAの標準物質をあらかじめ測定して検量線を作成し、本検量線を基にサンプル中のGABAの濃度を算出した。

2.4 乳酸菌の資化試験及び簡易同定

乳酸菌の資化試験にはAPI50CHL (ピオメリュー) を用いて行い、得られた資化プロファイルを基に菌名検索用アプリケーションのアピウェブ (<https://apiweb.biomerieux.com>) から乳酸菌の属種の推定を行った。また、属種の同定には指紋領域である16S rRNA 遺伝子の高度可変領域の一部の配列を決定し、データベー

スと照合することによっても推定した。目的とする指紋領域の増幅はPCR法を用いた。ポリメラーゼはKOD FX Neo (TOYOBO)、プライマーは7Fプライマー (5'-agagtttgat(c/t)(a/c)tggtcag-3') と1510Rプライマー (5'-acgg(c/t)tacctgttacgactt-3') を用いてPCR条件は付属の説明書に従った。PCR産物のシークエンス解析は株式会社FASMACに委託した。シークエンスには10Fプライマー (5'-gtttgatcctggctca-3') を用いた。得られた配列をNCBIのBLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) を用いて照合し、相同性の高い菌株を調べた。

3. 結果と考察

3.1 乳酸菌培養液中のGABA含有量

研究所が保有する乳酸菌ライブラリーの中から代表的な菌株60株 (表1) を用いて30℃で3日間培養した培養液を孔径が0.2 μmのフィルターでろ過したものを測定試料とした。LC-MSで定量分析を行ったところ、スグキから分離した乳酸菌のF2103株とF2938株の2菌株が他の乳酸菌と比べて多量のGABAを生産し、本2株のみが培養液中に500 ppm以上のGABAを生産することが分かった (図2)。

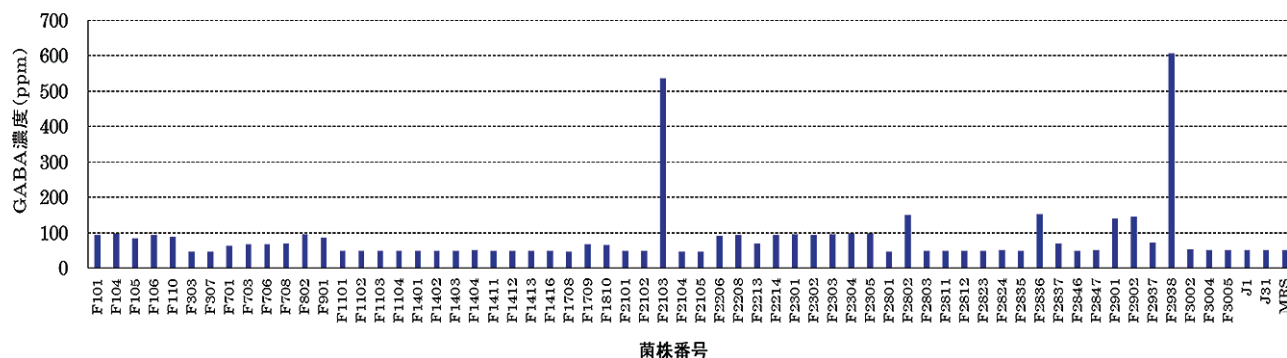


図2 乳酸菌培養液中のGABA含有量

乳酸菌をMRS培地を用いて30℃で静置培養した後、培養液中のGABAをLC-MSで測定した。試料番号には表1の菌株番号を用いた。

表2 糖質資化試験

糖質	菌株番号		糖質	菌株番号	
	F2103	F2938		F2103	F2938
コントロール	-	-	エスクリン	+	+
グリセロール	-	-	サリシン	-	-
エリスリトール	-	-	D-セロビオース	-	-
D-アラビノース	-	-	D-マルトース	+	+
L-アラビノース	+	+	D-ラクトース	-	-
D-リボース	+	+	D-メリビオース	±	+
D-キシロース	+	+	D-スクロース	-	-
L-キシロース	-	-	D-トレハロース	-	-
D-アドニトール	-	-	イヌリン	-	-
メチル-β-D-キシロピラノシド	+	±	D-メレジトース	-	-
D-ガラクトース	±	±	D-ラフィノース	-	-
D-グルコース	+	+	デンプン	-	-
D-フルクトース	+	+	グリコゲン	-	-
D-マンノース	-	-	キシリトール	-	-
L-ソルボース	-	-	ゲンチオビオース	-	-
L-ラムノース	-	-	D-ツラノース	-	-
ダルシトール	-	-	D-リキソース	-	-
イノシトール	-	-	D-タガトース	-	-
D-マンニトール	-	-	D-フコース	-	-
D-ソルビトール	-	-	L-フコース	-	-
メチル-α-D-マンノピラノシド	-	-	D-アラビトール	-	-
メチル-α-D-グルコピラノシド	-	-	L-アラビトール	-	-
N-アセチルグルコサミン	±	±	グルコン酸(塩)	±	±
アミグダリン	-	-	2-ケト-グルコン酸(塩)	-	-
アルブチン	-	-	5-ケト-グルコン酸(塩)	-	-

陽性を+、陰性を-、変色は確認されたが陽性までは至らない場合は±として表記した。

3.2 乳酸菌の資化試験及び簡易同定

GABAを多量に生産したF2103株とF2938株の2菌株についてAPI50CHLを用いて資化試験を行った(表2)。判定は、炭素源が資化されることにより酸が生成されてpHが低下することに伴い、培地中に含まれるpH指示薬の色調が紫色から緑色を経て黄色に変わるため、黄色に変化したものを陽性とした。エスクリン試験は黒色に変化したものを陽性とした。陽性の場合には+、陰性の場合には-、緑色の場合には±として判別したところ、どちらの菌株もお互によく似た資化パターンを示した。得られた結果を基にアピウェブにて検索を行ったところ、どちらの菌株も*Levilactobacillus brevis*に属することが示唆された。また、16S rRNA遺伝子の高度可変領域を対象にして本遺伝子をPCR法にて増幅して、前半部分の配列500塩基を決定した。BLASTを用いて相同性検索を行ったところ、F2103株とF2938株はどちらも既に登録されている*Levilactobacillus brevis*に属する乳酸菌らの16S rRNA遺伝子の塩基配列と高い相同性を示し、資化試験と同様に本2株はどちらも*Levilactobacillus brevis*に属することが示唆された。

3.3 GABA生産に対するグルタミン酸添加の影響

GABAは乳酸菌の一部が保有する脱炭酸酵素によってグルタミン酸から合成されるため、グルタミン酸ナ

トリウムを添加した培地で乳酸菌を培養し、GABAの生産量を測定した。初めに、F2103株とF2938株についてTLCを用いてグルタミン酸添加の影響を調べたところ、どちらの菌株もグルタミン酸添加により、無添加に比べ、濃く大きなスポットが検出された(図3)。F2103株とF2938株どちらの菌株もグルタミン酸を添加することによってGABAの生産量が増加することが分かった。そこでGABAの生産性を検討するためにMRS培地のみ、グルタミン酸の濃度に換算してグルタミン酸ナトリウム

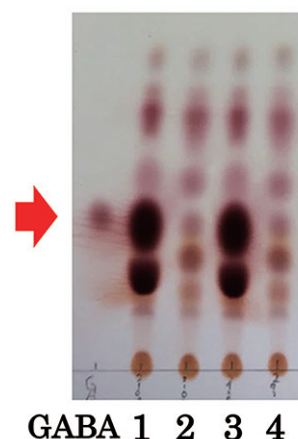


図3 グルタミン酸添加のGABA生産量への影響

- 1: F2103株をグルタミン酸を添加して培養時
- 2: F2103株をMRS培地のみで培養時
- 3: F2938株をグルタミン酸を添加して培養時
- 4: F2938株をMRS培地のみで培養時

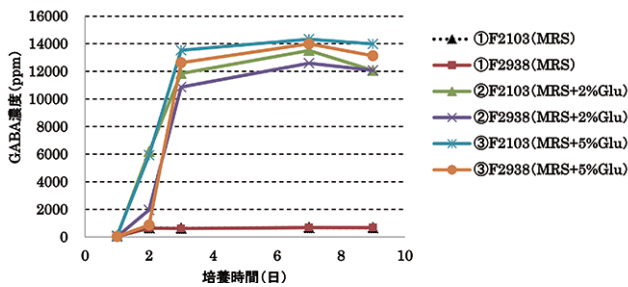


図4 グルタミン酸添加の有無によるGABAの経時的生産量の変化

- ① F2103 (MRS) : F2103株をMRS培地のみで培養時
- ① F2938 (MRS) : F2938株をMRS培地のみで培養時
- ② F2103 (MRS + 2%Glu) : F2103株を2%グルタミン酸を添加して培養時
- ② F2938 (MRS + 2%Glu) : F2938株を2%グルタミン酸を添加して培養時
- ③ F2103 (MRS + 5%Glu) : F2103株を5%グルタミン酸を添加して培養時
- ③ F2938 (MRS + 5%Glu) : F2938株を5%グルタミン酸を添加して培養時

を2%及び5%相当を添加したMRS培地を用いた。菌株にはF2103株及びF2938株と属種が同じ*Levilactobacillus brevis*に属し、GABAを生産することが知られているNBRC 12005株と基準株のNBRC 107147株を用いて培養を行い、培養液中のGABAの生産量を調べた。F2103株及びF2938株について経時的にGABAの生産量を調べたところ、TLCを用いた解析と同様にグルタミン酸添加のサンプルの方がより多量のGABAを生産し、添加濃度が高いほど生産量も高かった。また、グルタミン酸を添加することによって多量にGABAを生産ようになったサンプルも培養3日目まではGABAの生産量を増大させたが、3日目以降は横ばいとなった(図4)。そこで、培養3日目のGABA生産量をF2103株、F2938株、NBRC 12005株及びNBRC 107147株と比較したところ、基準株を除く3菌株はグルタミン酸を添加することによって10,000 ppm以上のGABAを生産した。今回、F2103株、F2938株、NBRC12005株及びNBRC107147株は同属種の*Levilactobacillus brevis*に属しながら、GABA生産能には違いがあることが分かった。また、当研究所の2菌株はNBRC 12005株よりも多量のGABAを生産した(図5)。GABAの摂取目安量は、一日当たり数10 mgと言われている。グルタミン酸添加時に10,000 ppm以上のGABAを生産する能力を有するF2103株とF2938株は生産能力としては十分と考えられるが、今後、発酵食品中においても同様の生産能力を発揮できるのか更なる検討が必要である。

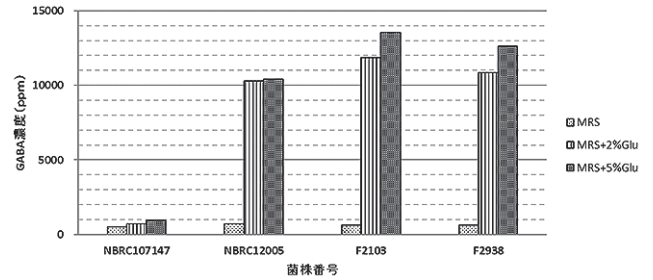


図5 GABAの生産量の菌株ごとの比較

- MRS : それぞれの菌株をMRS培地のみで培養時
- MRS + 2%Glu : それぞれの菌株を2%グルタミン酸を添加して培養時
- MRS + 5%Glu : それぞれの菌株を5%グルタミン酸を添加して培養時

4. まとめ

当研究所の乳酸菌ライブラリーの中からストレスの緩和や高めの血圧を下げる機能があるとされ、昨今、注目を集めている機能性成分のGABAを高生産することができる*Levilactobacillus brevis* F2103株と*Levilactobacillus brevis* F2938株を見出すことができた。これらの乳酸菌2株は、どちらもグルタミン酸添加時に10,000 ppm以上のGABAを生産することがわかった。独自性を有した特徴的なものづくりを目指すうえで機能性成分を含んだ発酵食品製造への応用が期待できる。

参考文献

- 1) 乳酸菌研究集談会 編, “乳酸菌の科学と技術”, p. 229, 学会出版センター(1996).
- 2) G. Reid 他: Clinical Microbiology Reviews, 16, 658 (2003).
- 3) Y. Kikuchi 他: PLoS ONE, 9, e86416 (2014).
- 4) K. Shida 他: Int. Arch. Allergy Immunol., 115, 278 (1998).
- 5) J. E. Kim 他: J. Microbiol. Biotechnol., 17, 1227 (2007).
- 6) N. Yamamoto 他: Biosci. Biotech. Biochem., 58, 776 (1994).
- 7) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.5, p.87 (2015).
- 8) 和田潤 他: 酒研会報, No.55, p.9 (2016).
- 9) 上野義栄 他: 生物工学会誌, 85(3), p.109 (2007).
- 10) 田中秀典 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.11, p.48 (2021).