

高付加価値食品製造に向けた有用乳酸菌の探索

製品化・人材育成支援グループ 和田 潤、田中 秀典、清野 珠美
加工・製造技術グループ 泊 直宏、高阪 千尋
プロジェクト推進室 廣岡 青央
住友化学株式会社 河合 祐人、近藤 宏哉、末岡 英明、福田 貴子、味方 和樹

要旨

本研究では、研究所が保有する乳酸菌ライブラリーを用いて自然免疫を賦活する有用乳酸菌の探索を行った。本ライブラリーの中から効率的に自然免疫賦活能を有する乳酸菌を選抜するため、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子として働くタンパク質複合体であるNF- κ B結合配列の下流に分泌型アルカリフォスファターゼを連結したベクターを導入したマウスマクロファージ様細胞を用いたアッセイを利用し、分泌型アルカリフォスファターゼの活性を測定したところ、スグキより単離したF3004株が最も高い活性を有した。糖質資化試験と16S rDNA 遺伝子配列解析の結果から、F3004株は*Lactiplantibacillus pentosus*に属することが示唆された。

キーワード：乳酸菌、乳酸菌ライブラリー、発酵食品、発酵微生物、免疫賦活

1. はじめに

乳酸菌は、古来よりヨーグルトや漬物など多くの発酵食品に用いられ¹⁾、酵母や麹菌とならんで我々にとって非常に馴染みがある発酵微生物である。発酵食品の品質は発酵過程を担う微生物によって大きく左右される。また、近年、乳酸菌はヒトの健康に好影響を与えるプロバイオティクス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⁾。優れた機能を有する乳酸菌は、高付加価値食品製造に利用でき、更に機能性の原因因子を特定し、メカニズムを明らかにすることができれば、医薬品やサプリメントだけでなく、農薬や環境浄化など多様な分野で活用される可能性を有している。そのため、食品製造、健康や医療分野だけでなく様々な分野で必要に応じた機能性を有した乳酸菌が必要とされている。

研究所では独自性を有する高付加価値発酵食品製造に用いる乳酸菌の獲得を目指し、研究所オリジナルの多様で特徴あるライブラリーを構築し、保有している^{7, 8)}。本研究では、本ライブラリーから自然免疫を賦活する有用乳酸菌の探索を行った。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

発酵食品から単離、構築した研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から代表的な102種の菌株を用いた(表1)。

2.2 乳酸菌の培養及び調製

乳酸菌の培養はMRS培地(DIFCO)を用いて30°C、3日間、静置で行った。培養後集菌し、滅菌した生理食塩水で3回洗浄、続けて滅菌水で2回洗浄後、70°C、10分間加熱し、冷却した。上清を除いて-80°Cで凍結後、凍結乾燥を行い、以降の試料とした。

2.3 マウスマクロファージ様細胞Raw264.7の培養

細胞の培養は継代用培地(DMEM 90 mL, FBS 10 mL, 50 mg/mL Nomocin 0.2 mL, 100 mg/mL Zeocin 0.2 mL, 10000 U/ml Penicillin-Streptomycin 1 mL)、もしくはアッセイ用培地(DMEM 90 mL, FBS 10 mL, 10000 U/mL Penicillin-Streptomycin 1 mL)を用いて、37°C、5% CO₂存在下で行った。

2.4 マウスマクロファージ様細胞Raw264.7を用いた免疫賦活測定

マウスマクロファージ様細胞Raw264.7にレポーター遺伝子が導入されたRAW-Blue細胞(Invivogen)を100 mm細胞培養皿の継代用培地に 14×10^5 cells播種し、37°C、5% CO₂存在下で72時間培養した。培地を除去し、PBS 10 mLで2回洗浄後、5 mLのアッセイ用培地を添加した。セルスクレーパーで細胞を回収しカウントした後、アッセイ用培地で 5×10^5 cells/mLに希釈した。180 μ Lの細胞懸濁液に10 μ g/ml 乳酸菌懸濁液 20 μ Lをそれぞれ添加し、よく混和後に37°C、5% CO₂存在下で18時間培養した。

表1 使用菌株

菌株番号	単離源	菌株番号	単離源	菌株番号	単離源
F101	すぐき(塩漬け)	F906	きゅうり(ぬか漬け)	F1709	ダイコン(キムチ)
F105	すぐき(塩漬け)	F907	きゅうり(ぬか漬け)	F1711	ダイコン(キムチ)
F206	ケフィア	F908	きゅうり(ぬか漬け)	F1712	ダイコン(キムチ)
F207	ケフィア	F909	きゅうり(ぬか漬け)	F1713	ダイコン(キムチ)
F208	ケフィア	F910	きゅうり(ぬか漬け)	F1714	ダイコン(キムチ)
F209	ケフィア	F1001	すぐき(塩漬け)	F1715	ダイコン(キムチ)
F210	ケフィア	F1002	すぐき(塩漬け)	F1811	きゅうり(ぬか漬け)
F301	キャベツ(塩漬け)	F1003	すぐき(塩漬け)	F1812	きゅうり(ぬか漬け)
F302	キャベツ(塩漬け)	F1004	すぐき(塩漬け)	F1813	きゅうり(ぬか漬け)
F303	キャベツ(塩漬け)	F1005	すぐき(塩漬け)	F1814	きゅうり(ぬか漬け)
F307	キャベツ(塩漬け)	F1106	清酒醪	F1815	きゅうり(ぬか漬け)
F311	キャベツ(塩漬け)	F1107	清酒醪	F2301	ぬか(ぬか漬け)
F312	キャベツ(塩漬け)	F1108	清酒醪	F2302	ぬか(ぬか漬け)
F401	白菜(キムチ)	F1206	すぐき(塩漬け)	F2303	ぬか(ぬか漬け)
F402	白菜(キムチ)	F1207	すぐき(塩漬け)	F2304	ぬか(ぬか漬け)
F403	白菜(キムチ)	F1208	すぐき(塩漬け)	F2305	ぬか(ぬか漬け)
F404	白菜(キムチ)	F1209	すぐき(塩漬け)	F2802	なす(しば漬け)
F405	白菜(キムチ)	F1210	すぐき(塩漬け)	F2811	なす(しば漬け)
F511	水ナス(ぬか漬け)	F1311	きゅうり(キムチ)	F2812	なす(しば漬け)
F512	水ナス(ぬか漬け)	F1312	きゅうり(キムチ)	F2823	なす(しば漬け)
F513	水ナス(ぬか漬け)	F1313	きゅうり(キムチ)	F2824	なす(しば漬け)
F514	水ナス(ぬか漬け)	F1314	きゅうり(キムチ)	F2835	なす(しば漬け)
F515	水ナス(ぬか漬け)	F1315	きゅうり(キムチ)	F2838	なす(しば漬け)
F606	チーズ	F1401	清酒酒母	F2847	なす(しば漬け)
F607	チーズ	F1402	清酒酒母	F2901	すぐき(塩漬け)
F608	チーズ	F1403	清酒酒母	F2902	すぐき(塩漬け)
F609	チーズ	F1404	清酒酒母	F2937	すぐき(塩漬け)
F610	チーズ	F1411	清酒酒母	F3002	すぐき(塩漬け)
F706	水ナス(ぬか漬け)	F1601	ダイコン(ぬか漬け)	F3004	すぐき(塩漬け)
F713	水ナス(ぬか漬け)	F1602	ダイコン(ぬか漬け)	F3005	すぐき(塩漬け)
F716	水ナス(ぬか漬け)	F1603	ダイコン(ぬか漬け)	F3006	すぐき(塩漬け)
F808	水ナス(ぬか漬け)	F1604	ダイコン(ぬか漬け)	F3007	すぐき(塩漬け)
F809	水ナス(ぬか漬け)	F1605	ダイコン(ぬか漬け)	F3008	すぐき(塩漬け)
F812	水ナス(ぬか漬け)	F1708	ダイコン(キムチ)	F3009	すぐき(塩漬け)

20 μ Lの培養上清に180 μ LのQUANTI-Blue (Invivogen)を加え、37°C、5% CO₂ 存在下で3時間培養した後、プレートリーダーで620 nmの吸光度を測定した。ポジティブコントロールには10 μ g/mL Zymosan (出芽酵母由来の細胞壁由来の多糖類)を用いた。

2.5 乳酸菌の糖質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)を用いた。糖質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。また、その中の炭素源の1つであるエスクリンに対する試験だけ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-、緑色の場合は±として判別した。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。乳酸菌のゲノムの抽出にはQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いた。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PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ)、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産物のシーケンス解析は株式会社FASMACに委託した。シーケンスには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 マウスマクロファージ様細胞Raw264.7を用いた自然免疫賦活活性を有した有用乳酸菌の探索

自然免疫を賦活するような有用乳酸菌の探索は、マウスマクロファージ様細胞Raw264.7を用いた。乳酸菌ライブラリーの中から宿主に種々のサイトカインの発現を促し、自然免疫賦活能を有するような有用株の絞り込みが効率的に行えるように、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子として働くタンパク質複合体であるNF-κB結合配列の下流に分泌型アルカリフォスファターゼを連結したベクターをマウスマクロファージ様細胞に導入し、分泌型アルカリフォスファターゼの活性を指標にしたレポーターアッセイによってマクロファージ刺激能の高い乳酸菌を探索した(図1)。2.2により調製した乳

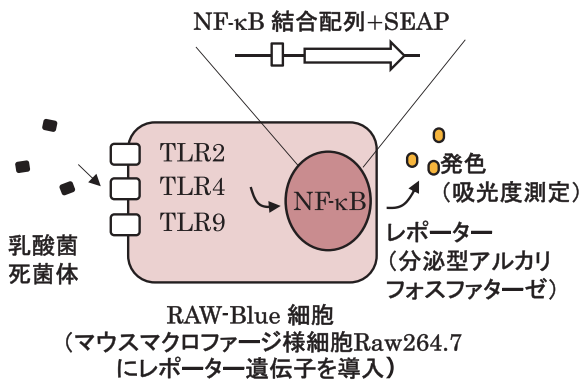


図1 レポーターアッセイを用いた評価方法

酸菌について上記のアッセイを利用し、アルカリフォスファターゼの活性を測定したところ、複数の株で活性が確認された。中でもスグキより単離したF3004株が最も高い活性を有し、本菌株はマクロファージのNF-κBを活性化できることが示唆された。(図2)。

3.2 乳酸菌の糖質資化試験及び簡易同定

強いマクロファージ刺激能が示唆されたF3004株についてAPI50CHLを用いて資化試験を行った(表2)。得

表2 糖質資化試験 (F3004株)

糖質	評価	糖質	評価
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	+	グリコーゲン	-
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)	-
エスクリン	+		

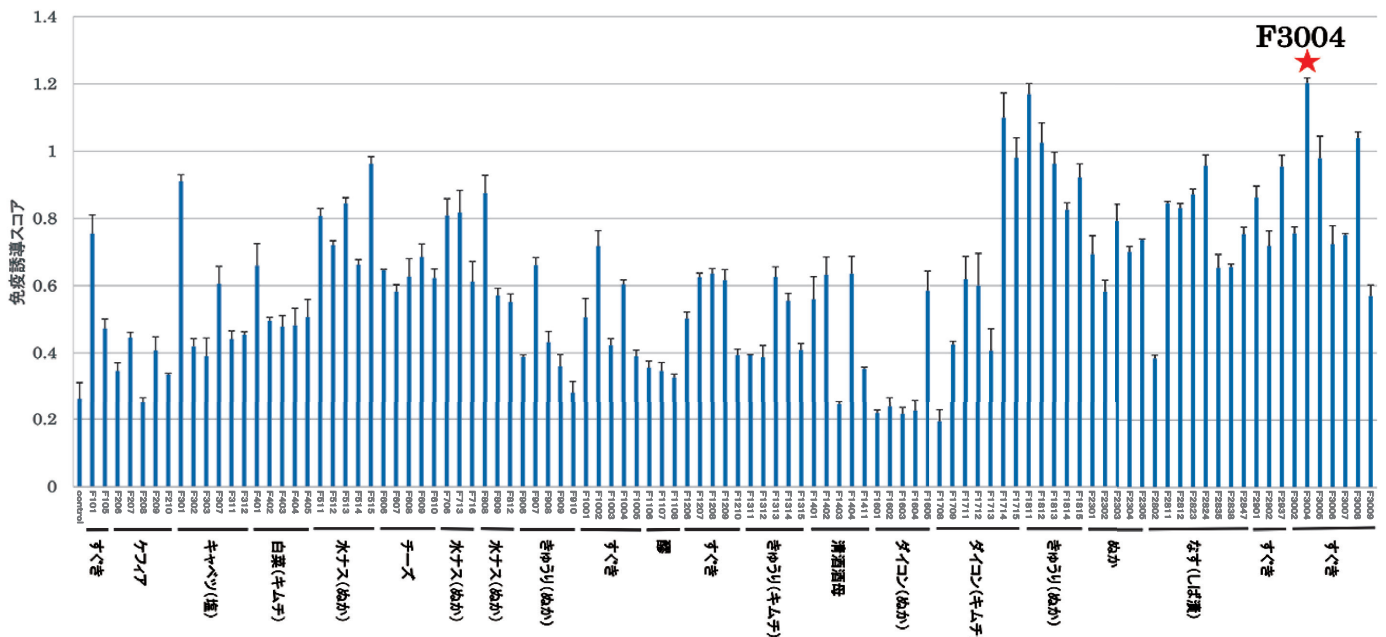


図2 レポーターアッセイを用いたマクロファージ刺激能の高い乳酸菌の探索結果

免疫誘導スコアはポジティブコントロールである10 mg/ml Zymosan (出芽酵母由来の細胞壁由来の多糖類)の吸光度を1とした時の各菌株の吸光度を示し、単離源ごとに区切って表記した。凍結乾燥した乳酸菌は培地に懸濁し、終濃度10 mg/mlで反応させた。

られた結果を基にアピウェブにて検索を行ったところ、*Lactiplantibacillus pentosus*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、F3004株は既に登録されている*Lactiplantibacillus pentosus*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菌株は*Lactiplantibacillus pentosus*に属することが示唆された。

4. まとめ

研究所の乳酸菌ライブラリーの中からNF- κ B結合配列の下流に分泌型アルカリフォスファターゼを連結したベクターを導入したマウスのマクロファージ様細胞を用いて自然免疫賦活能を有する乳酸菌を探索した。複数の乳酸菌株がアルカリフォスファターゼ活性を有したが、中でもスグキより単離したF3004株が最も高い活性を有し、糖質資化試験と16S rDNA 遺伝子配列解析により属種同定を行ったところ、*Lactiplantibacillus pentosus*に属することが示唆された。

今後、独自性を有した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).