

新奇有用微生物の分離とプロバイオティクスへの応用検討(第1報)

— *Bacillus*属細菌の分離方法の確立 —

山下 聡子*1 水城 英一*1 齋藤 浩之*1

Isolation of Novel Beneficial Bacteria and Application to Probiotics (I)

- Screening Methods for the isolation of useful *Bacillus* species -

Satoko Yamashita, Eiichi Mizuki and Hiroyuki Saitoh

*Bacillus*属細菌は、熱や乾燥に安定な芽胞を形成することから、流通や取扱いが容易であるという利点がある。このうち*B. coagulans*は、炭素源からL-乳酸を産生する特徴を有しており、プロバイオティクスとしての利用事例があるが、分離の報告は多くない。本研究では、*B. coagulans*の収集及びプロバイオティクスとしての利用の可能性を検討すること目的に、様々な分離源から効率的に分離する方法の確立を試みた。その結果、351株の菌株を分離することができた。また、この分離手法を応用し、*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*の分離も可能となった。

1 はじめに

有用微生物を利用したプロバイオティクス素材は整腸作用が期待されており、ヒトや家畜用の製品展開ニーズが高まっている。代表的なプロバイオティクスとして、腸内常在細菌であるビフィズス菌や乳酸菌の利用が知られているが、腸内常在細菌ではない*Bacillus*属細菌についてもいくつか利用例がある。

*Bacillus*属細菌は、休眠状況下では芽胞を形成することが知られており、この芽胞は熱や乾燥に安定であることから、保存や流通に優れているという利点がある。このうち、*B. coagulans*はL-乳酸を産生することから「有孢子性乳酸菌」とも呼ばれているが、効率的な分離方法が確立されておらず、国内での利用株はわずかである。

本研究では、有用微生物*B. coagulans*を効率的に分離する方法の確立を試みたので報告する。また、この過程で*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*も効率的に分離することができたので併せて報告する。

2 研究, 実験方法

2-1 供試菌株

本研究で分離した各*Bacillus*属細菌(候補菌)、当研究所が保有する*B. coagulans* NBRC12583^T株、*B. subtilis* natto(高橋菌)、*B. amyloliquefaciens* B1144株(分離菌株)を用いた。

2-2 *Bacillus*属細菌の分離源(試料)

当研究所敷地内及び周辺地域の土壌、植物、地域農産物、及び福岡県農林業総合試験場より提供を受けた家畜糞を分離源(試料)とした。

2-3 *Bacillus*属細菌の分離方法

2-3-1 *B. coagulans*候補菌の分離

試料に10倍量の滅菌水を加え、よく懸濁した後、水層を98℃で5分、又は65℃で30分熱処理し、中條らの報告¹⁾を参考としたpH 4.6の分離用寒天培地に接種、55℃で約3日間培養して生育する菌を取得した。

上記の方法で分離が困難であった試料は、pH 4.6又はpH 7.0に調製した分離用液体培地を適量加え、37℃又は55℃で約7日間予備培養を行った後、培養液を65℃で30分熱処理し、pH 4.6の分離用寒天培地に接種、55℃の条件下で生育する菌を分離した。

分離した菌は、滅菌した爪楊枝を用い0.5%の炭酸カルシウムを添加したpH 7.0の分離用寒天培地に穿刺し、55℃で培養して、菌周辺の炭酸カルシウムの溶解(ハロー)を確認した。

最終的に、顕微鏡観察で*B. coagulans*の特徴的形態並びに芽胞の形成が確認されたもの、及び炭酸カルシウムの溶解能が認められたものを*B. coagulans*候補菌とした。

2-3-2 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*候補菌の分離

37℃で予備培養を行った試料について、pH 4.6の分離用寒天培地に接種、37℃の条件下で生育する菌のうち、粘性物質の生産が認められ、かつ、顕微鏡観察で*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*両菌種の特

*1 生物食品研究所

微的形態並びに芽胞の形成が確認されたものを候補菌とした。

2-4 特定遺伝子の検出による種の判定

*Bacillus*属細菌の各種に特異的な遺伝子を基に primer を設計し、リアルタイムPCRで遺伝子の有無を検出、種を判定した。各種遺伝子の検索等は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のwebサイトが提供する検索ツールを利用した。*B. coagulans*については、遠田らが報告したITS領域²⁾及びL-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*L-ldh*) を標的とした。*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*についてはリン酸レギュロンの*phoR*遺伝子に primer を設定した。更に、*B. subtilis*と判定された菌株についてはビオチン生合成酵素にかかわるオペロン (*bio* operon) の*bioF*遺伝子の欠損の有無を確認し、*bioF*遺伝子が欠損した株を納豆菌と判定した。検出に用いた primer と増幅サイズは表1に示す (配列は非公開)。

2-5 *B. coagulans*分離菌株の16S rRNA遺伝子配列決定

*B. coagulans*と判定した菌株の一部について、定法³⁾に準じて16S rRNA遺伝子の配列を調べた。遺伝子の増幅には10F, 1500R primer⁴⁾、シーケンスには10F, 及びr1L, r2L primer³⁾を用いた。菌種の同定にはEZ Bio Cloudのwebサイトを使用した。

3 結果と考察

3-1 *B. coagulans*の効率的分離方法の確立

3-1-1 *B. coagulans*候補菌の分離

*B. coagulans*候補菌の分離は、土壌や家畜糞等*B. coagulans*の分離報告があり、一定量含まれることが期待される試料については、滅菌水に懸濁した溶液を

65 °Cで30分熱処理し、芽胞を形成する*Bacillus*属細菌以外の大半の微生物を排除すること、次にpH 4.6, 55 °Cの酸性かつ高温条件下で培養することで¹⁾、この条件下では生育できない多くの*Bacillus*属細菌を排除することにより、効率よく分離することができた。

一方、植物等の試料では、滅菌水に懸濁したのみの溶液からは*B. coagulans*候補菌は分離できなかった。植物等からの*B. coagulans*の分離報告は多くはないことから、試料中の存在量は極めて少ないのではないかと考えられたため、分離用培地を用いた予備培養の工程を加えることとした。予備培養は、酸性 (pH 4.6), 中性 (pH 7.0), 並びに高温 (55 °C), 中温 (37 °C) の条件を組み合わせで行った。予備培養後の試料溶液をpH 4.6の分離用寒天培地に接種、55 °Cの条件下で生育する菌を分離した結果、*B. coagulans*候補菌が分離された。

3-1-2 *B. coagulans*候補菌の顕微鏡観察及び性状確認

*B. coagulans*候補菌について、顕微鏡観察を行い、芽胞形成の有無を確認した。また、Bergey's manual⁵⁾に記載の、*B. coagulans*に特徴的な形態を確認した (図1)。菌体の長さや大きさは、菌株によって差が認められた (データ未掲載)。

分離した菌株の増殖能については、いずれも55 °Cでは良好であったが、37 °Cで培養した場合は増殖の速度に差が認められた。芽胞形成能は菌株によって大きな差があり、一部、形成率が極めて低い菌株も存在した。*B. coagulans*については、基準株: NBRC12583^T株に代表されるように芽胞形成率が低い菌株があることが知られており、試験結果はその知見を裏付けるものであった。

表1 *Bacillus*属細菌の種特異的遺伝子検出用 primer

菌種	標的遺伝子 (サイズ (bp))	Primer の名称	配列
<i>B. coagulans</i>	ITS 16S-23S rDNA (164, 166)	F: 101-22F R: 264-21R	文献 2)
	<i>L-ldh</i> (124)	F: P4-102B ldh F R: P4-102B ldh R	非公開
<i>B. subtilis</i> , <i>B. subtilis</i> natto	<i>phoR</i> (134)	F: B. sub- phoR F R: B. sub- phoR R	非公開
	<i>bioF</i> (F-R1/ WT:171, del:117) (F-R2/ WT:81, del:-)	F: B. sub- bioF F R1: B. sub- bioF R R2: B. sub- bioF R (del)	非公開
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>phoR</i> (115)	F: B. amy- phoR F R: B. amy- phoR R	非公開

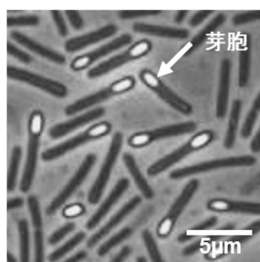


図1 オオシマザクラから分離した
B. coagulans 候補菌

*B. coagulans*の特徴の一つとして、炭素源からのL-乳酸の産生が挙げられる。そこで、*B. coagulans*候補菌を炭酸カルシウム、グルコースを添加したpH 7.0の分離用寒天培地に接種し、55 °Cで培養して、菌周辺の炭酸カルシウムの溶解（ハロー）をもって酸生成能を確認した（図2）。

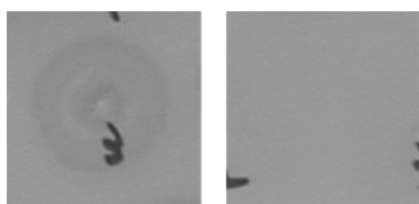


図2 *B. coagulans* 候補菌の酸生成確認
寒天培地中の炭酸カルシウムの溶解
左：候補菌接種，右：対照

3-1-3 *B. coagulans*の特異的遺伝子の検出

Bergey's manual⁵⁾を参照すると、*Bacillus*属細菌には*B. coagulans*以外にも高温、酸性で生育可能な種、及び*B. coagulans*と類似の形態を示す種が存在する。このため、3-1-1、並びに3-1-2の方法で分離した*B. coagulans*候補菌に別の種が存在する可能性は否定できない。そこで、取得した*B. coagulans*候補菌全てについて、*B. coagulans*に特異的な遺伝子を検出することとした。標的遺伝子は、既報¹⁾のITSのほか、*Ldh*遺伝子にPCR用primerを設計し、NBRCのBLAST検索にて*B. coagulans*に特異的であることを確認した。また、基準株：NBRC12583¹株に対しリアルタイムPCRを行い、この2つの遺伝子の存在を確認した。以上の検討を基に、*B. coagulans*候補菌の分離過程の最後にリアルタイムPCRを実施し、両遺伝子とも陽性であった菌株を*B. coagulans*と判定した。最終的に、351株の*B.*

*coagulans*を取得することができた（表2）。

3-1-4 *B. coagulans*分離菌株の16S rRNA遺伝子配列決定

分離した候補菌のうち任意の18株について、16S rRNA遺伝子の前半約500 bpの配列を決定しsimilarityを調べたところ、*B. coagulans*基準株とのsimilarityが98.4-99.8%，次に挙げた*B. acidiproducens*基準株とのsimilarityが93.3-93.9%であったことから、分離した候補菌は*B. coagulans*であると示唆された（データ未掲載）。このことから、本研究で確立した分離方法で*B. coagulans*を効率よく分離できるものと考えられた。

3-2 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*の効率的分離方法の確立

3-2-1 *B. subtilis*又はその類縁種の候補菌の分離、顕微鏡観察及び性状確認

3-1-1に記載した、*B. coagulans*候補菌の分離目的で行った予備培養において、中温（37 °C）で予備培養した試料をpH 4.6の分離用寒天培地に接種し、同じく37 °Cで培養したところ、生育した菌のなかに粘性物質を産生するものが認められた。この特徴を有する菌は*B. subtilis*又はその類縁種であると推測された。*B. subtilis*や類縁種の*B. amyloliquefaciens*はプロバイオティクスとしての利用事例があることから、これらについても分離を行うこととした。

*B. subtilis*又はその類縁候補菌について顕微鏡観察を行い、芽胞形成の有無を確認するとともに、これらの菌種に特徴的な形態を確認した（データ未掲載）。*B. subtilis*又はその類縁候補菌の37 °Cでの増殖能、芽胞形成能はいずれも良好であった。

3-2-2 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*の特異的遺伝子の検出

収集した*B. subtilis*又はその類縁候補菌について、*B. subtilis*及び*B. amyloliquefaciens*の判定を試みた。Guoらの論文⁶⁾のAbstractに、リン酸レギュロン⁶⁾の*phoR*遺伝子が*B. subtilis*とその類縁種の分類学的マーカーになり得るとの記載があり、この情報を基に*B. subtilis*と*B. amyloliquefaciens*の各*phoR*遺伝子を標的にPCR用primerを設計し、BLAST検索で各種に特異的であることを確認した。次に*B. subtilis* natto（高橋菌）、*B. amyloliquefaciens* B1144株に対しリアルタイムPCRを行い、設計したprimer対が両種を区

別可能であることを確認した。

実際の分類にあたっては、まず、候補菌に対し*B. subtilis*の*phoR*遺伝子が陽性であった菌株を*B. subtilis*と判定した。次に、*B. subtilis*の*phoR*遺伝子が陰性であった菌株で*B. amyloliquefaciens*の*phoR*遺伝子が陽性であった菌株を*B. amyloliquefaciens*と判定した。

更に、*B. subtilis*と判定された菌株のうち、いわゆる納豆菌 (*B. subtilis* natto) と推定される菌株を確認するため、納豆菌の特徴の一つであるビオチン要求性に関係すると言われる*bio* operonの*bioF*遺伝子の欠損を標的とし^{7,8)}、欠損があれば増幅サイズが小さくなるprimer対 (*B. sub- bioF* F / *B. sub- bioF* R)、又は増幅されない (*B. sub- bioF* F / *B. sub- bioF* R (del)) primer対を設定 (表1)、*B. subtilis* natto (高橋菌) を比較対象とし、PCR産物の電気泳動、又はリアルタイムPCRで確認した。これらのprimer対を用いることで、*B. subtilis*候補菌の中から、納豆菌の遺伝的特徴を有した菌株を選別することが可能となった (データ未掲載)。

最終的に、*B. subtilis*と判定された菌株：99株 (うち、納豆菌に見られる*bioF*遺伝子欠損の特徴を持った菌株：9株)、*B. amyloliquefaciens*と判定された菌株：160株を取得することができた (表2)。

4 まとめ

*B. coagulans*の分離・収集を目的として、培地、培養温度、基本性状確認等を組み合わせ、候補菌を効率よく分離する方法を確立した。また、予備培養を行うことで、含有量が少ないと考えられる分離源からの分離も可能となった。更に、特異的遺伝子の検出により、16S rRNA遺伝子の配列決定を行わずに、*B. coagulans*を判定することが可能となった。この分離方法を応用

し、*B. subtilis*及び*B. amyloliquefaciens*の分離、判定法も確立することができた。なお、*B. amyloliquefaciens*については近年*B. velezensis*に再分類される菌株があることから⁹⁾、分離菌株の菌種判定には今後精査が必要である。

5 謝辞

分離に用いた家畜糞については、福岡県農林業総合試験場より提供を受けました。

6 参考文献

- 1) 中條均紀, 森山裕子: 日本食品工業学会誌, 41巻, 第4号, pp. 281-286 (1994)
- 2) 遠田昌人, 田口憲人: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書, 27巻, pp. 77-83 (2009)
- 3) 鈴木健一郎, 平石明, 横田明 編: 微生物の分類・同定実験法, pp. 48-64, シュプリンガー・ジャパン (2001)
- 4) 第十六改正日本薬局方 (平成23年3月24日厚生労働省告示第65号), pp. 2029-2031
- 5) Rogan NA, De Vos P.: Bergey's manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Bacillus, Online. John Wiley & Sons, Inc. (2015)
- 6) Guo Q, et al.: Can. J. Microbiol., Vol. 58, No. 11, p. 1295-1305 (2012)
- 7) Kubo Y, et al.: Appl. Environ. Microbiol., Vol. 77, No. 18, p. 6463-6469 (2011)
- 8) Sasaki M, et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol. 68, No. 3, p. 739-742 (2004)
- 9) Dunlap CA, et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 66, No. 3, p. 1212-1217 (2016)

表2 様々な環境からの有用微生物 (*Bacillus* 属細菌) の分離

分離源	分離菌株数		
	<i>B. coagulans</i>	<i>B. subtilis</i> (うち、納豆菌の特徴を有する菌株)	<i>B. amyloliquefaciens</i>
土 壤	21	- a)	- a)
植 物	285	93 (9)	79
農産物	0	6 (0)	19
家畜糞	45	0 b)	62 b)
計	351	99 (9)	160

a) 候補菌の分離を行っていない。b) 一部の分離源について分離を実施。