

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2報)

— *Bacillus coagulans*の性状分析—

山下 聡子*1 日下 芳友*1 水城 英一*1 齋藤 浩之*1

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

- Characterization of Isolated *Bacillus coagulans* Strains -

Satoko Yamashita, Yoshitomo Kusaka, Eiichi Mizuki and Hiroyuki Saitoh

当研究所では、プロバイオティクスとしての利用事例がある*Bacillus coagulans*の効率的な分離方法を確立し、様々な分離源から351株の菌株を取得、保有している。本研究では、これらの分離菌株の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、各種性状及び遺伝子の特徴を分析した。その結果、分離菌株は多様性に富んでいることが明らかとなった。

1 はじめに

*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。本属は腸内常在細菌ではないが、アサヒカルピスウェルネス(株)の*B. subtilis*(製品名:枯草菌C-3102株)や三菱ケミカルフーズ(株)の*B. coagulans*(製品名:ラクリス™)など、ヒトや家畜用のプロバイオティクスとして利用されている菌株も存在する。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、国内で分離、利用されている株は、先に紹介したラクリス™を含め、数株しかない。

我々は、前報「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)」で報告したとおり、*B. coagulans*を様々な分離源(試料)から351株分離し、保有している。分離菌株はそれぞれ形態的特徴(大きさや長さ、芽胞の形)、増殖能、芽胞形成能、及びリアルタイムPCR産物の融解温度(T_m 値)に差があることが認められている。本研究では、分離菌株の性状分析並びに遺伝子の解析を行ったので報告する。

2 研究, 実験方法

2-1 供試菌株

当研究所で分離した各*Bacillus*属細菌(候補菌)、並びに保有する*B. coagulans* NBRC12583¹株を供試した。

2-2 有機酸分析

嫌気細菌用培地であるGAM液体培地(GAMブイヨン「ニッスイ」(日水製薬(株))より使用法に従い調製)に分離菌株を接種、三菱ガス化学(株)のアネロパックシステムを用い、37℃、嫌気条件下で4日間培養したのち、培養上清の有機酸濃度を測定した(n=1)。

2-3 炭素源の資化性

2-3-1 ラクトース(乳糖)の資化性

中條らの報告¹⁾にある分離用寒天培地を参考とし、炭素源をラクトースに換え、0.0025%のBromocresol purple (BCP)をpH指示薬として添加したpH 7.0の液体培地を96 wellプレートに100 μ L / well分注し、分離菌株を滅菌した爪楊枝で接種、41℃で培養し、資化による酸生成能をBCPの黄変で確認した(n=1)。

また、標準寒天培地に β -ガラクトシダーゼ(β -gal)の合成基質である5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal)と発現誘導物質であるIsopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を添加し分離菌株を接種、37℃で培養し、X-Galの分解をコロニーの青変で確認した(n=1)。

2-3-2 でんぷんの資化性

2-3-1の液体培地の炭素源を可溶性でんぷんに換え、分離菌株を接種、41℃で培養し、資化による酸生成能をBCPの黄変で確認した(n=1)。

2-4 遺伝子解析

*B. coagulans*の β -gal遺伝子、及び*acn* gene-like cluster²⁾を標的としたprimerを設計し、それぞれリアルタイムPCRで遺伝子の有無を検出した。各種遺伝子の検索等は、National Center for Biotechnology

*1 生物食品研究所

Information (NCBI) のwebサイトが提供する検索ツール並びに Carbohydrate-Active enZymes Database (CAZy) のwebサイトを利用した。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)。

3 結果と考察

3-1 嫌気条件下での増殖能及び有機酸生成能

Bergey's manual³⁾ によれば, *B. coagulans* は通性嫌気性菌と言われている。そこで, 分離菌株を嫌気

細菌用培地である GAM 液体培地に接種し, 嫌気条件下で培養したところ, 菌株により差はあるものの, 時間が進むに従い培養液の白濁が認められた。嫌気培養4日後の培養培地中の各種有機酸 (リン酸, クエン酸, ピルビン酸, リンゴ酸, コハク酸, 乳酸, 蟻酸, 酢酸, ピログルタミン酸) の量を測定し, GAM 培地中の含有量と比較したところ, 菌株によって含有量に差が認められた (図1)。全ての物質において値が低く生育不良と推測されるものは351株中3株 (0.9 %) であった。

表1 *B. coagulans* 用 PCR primer

菌種	標的遺伝子 (サイズ (bp))	Primer の名称	配列
<i>B. coagulans</i>	<i>β-gal</i> (147)	F: <i>B. coa</i> - <i>beta-gal</i> F R: <i>B. coa</i> - <i>beta-gal</i> R	非公開
	<i>acn</i> gene-like cluster <i>acnA</i> (102)	F: <i>acnA</i> -like F1 R: <i>acnA</i> -like R1	非公開
	<i>acnA-acnC</i> (no-insertion:227, insertion:- (388, 21k))	F: <i>acnA</i> -like F2 (C-ter) R: <i>acnC</i> -like R (N-ter)	非公開

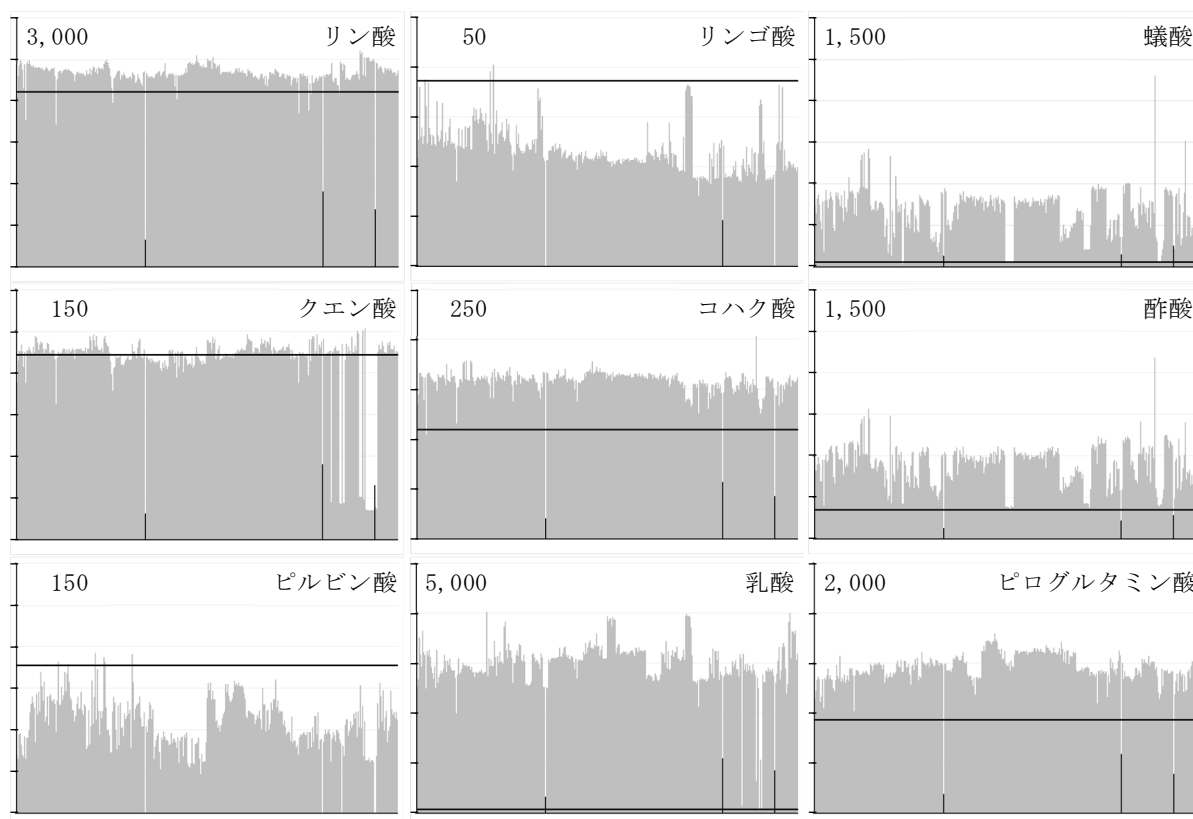


図1 *B. coagulans* 分離菌株嫌気培養上清の有機酸量

縦軸: 有機酸量 (mg/L)。左上の数値は各有機酸グラフの目盛りの最大値を,

太線は GAM 培地中の各有機酸の含有量を示す (blank 値)。

横軸: 分離菌株 (分離順に配列)。黒線は生育不良が想定される菌株。

このことから、分離菌株のほとんどは嫌気条件下でも増殖可能であることが判明し、プロバイオティクス用途を検討するにあたって、腸内環境での増殖が期待される結果となった。

コハク酸、乳酸、蟻酸、酢酸、ピログルタミン酸はGAM培地中の含有量と比較し多くの菌株で増加する傾向にあった。特に、乳酸、蟻酸、酢酸は菌株によって生成に著しい差が認められた。また、蟻酸、酢酸の増減は連動しているものと示唆された(図1)。一般に*B. coagulans*はL-乳酸を産生すると言われており、分離菌株の多くはGAM培地での培養においても多量の乳酸を産生したが、産生量が少ない、又はほとんど認められない菌株も存在することが明らかとなった。

一方、ピルビン酸、リンゴ酸は多くの菌株でGAM培地中の含有量より減少する傾向にあった。クエン酸については、ほとんどの菌株においてGAM培地中の含有量と大きな変化はなかったが、一部の菌株では著しい減少が認められ、これらの菌株においてはクエン酸が消費されているものと推測された(図1)。

3-2 炭素源の資化性

3-2-1 ラクトース分解活性と遺伝子の解析

3-2-1-1 ラクトースの資化性

ラクトースを炭素源とした培地に分離菌株を接種し好気条件下で培養を行ったところ、菌株により増殖能に差が認められた(データ未掲載)。ラクトースの資化による酸生成をBCPの黄変で確認したところ351株中327株に認められ(93.2%)うち、酸生成が明確なものが280株(79.8%)であった。24株ははっきりとした黄変が確認できなかった。ラクトースの資化速度は分離菌株によって差が認められ(データ未掲載)、これは増殖能の差に関連するものと考えられた。

3-2-1-2 X-Galの分解活性

ラクトースの資化による酸生成をBCPで確認する場合、黄変の程度に差があり、鮮やかに黄変する菌株がある一方、十分な黄変を待たず再度紫色に変色する菌株も認められた。このため、酵素活性をより明確に確認する目的で、 β -gal (EC 3.2.1.23)の合成基質であり分解により青色の不溶性物質を生じるX-Galを含有した標準寒天培地に菌株を接種し、コロニーの青変を確認した。その結果、334株(95.2%)で青変が確認された。陰性であった17株には、分離源を同じくするものが含まれていた(表2)。

3-2-1-3 *B. coagulans*の β -gal遺伝子

報告されている*B. coagulans*の β -gal遺伝子をCAZyで調べたところ、その転写産物はglycoside hydrolase (GH) familyのGH-42に属するものであった。*B. coagulans*の β -gal遺伝子を基にprimerを設計し、基準株：NBRC12583^T株並びにX-Gal分解能で陽性であった菌株に対しリアルタイムPCRを行い、遺伝子の存在を確認したうえで、X-Gal分解能で陰性であった菌株についてもリアルタイムPCRを行った結果、17菌株中9株には遺伝子が存在し、8株には遺伝子が確認できなかった。前者は β -gal遺伝子は存在するが、変異あるいは発現の問題等により、酵素活性が認められないのではないかと推察された。

3-2-2 でんぷんの資化性

可溶性でんぷんを炭素源とした培地での分離菌株の増殖能は、菌株によって差が認められた(データ未掲載)。資化性は251株に認められ(71.5%)、うち酸生成が明確なものが137株(39.0%)であった。可溶性でんぷんの資化速度も分離菌株によって差が認められた(データ未掲載)。

3-3 *acn* gene-like clusterの解析

B. amyloliquefaciens subsp. *plantarum* FZB42株(現在は*B. velezensis*とされている⁴⁾)の有する環状ペプチドamylocyclicin遺伝子(*acnA*)及びそのcluster(4.5 kbp)と類似の遺伝子が*B. coagulans* 36D1株に認められるとの報告²⁾があったため、他の*B. coagulans*菌株で該当する遺伝子を調査したところ、36D1株と同様に*acn* gene-like cluster(4.8 kbp)を有する菌株が存在する一方、基準株：NBRC12583^T株を含め*acnA*を持たない菌株も存在した。また、*acnA*とその後ろに位置する*acnC*の間に挿入が認められる菌株も存在することが判明し(LBSC株：161 bp, S-Lac株：21 kbp)、*B. coagulans*の*acn* gene-like clusterを解析すれば少なくとも3群に分けられると予想された。

そこで、まず、*acnA*を増幅するprimer対でリアルタイムPCRを行い、遺伝子の有無を確認した。基準株：NBRC12583^T株は*acnA*陰性であった。次に、*acnA*陽性であった菌株に*acnA*のC末端と*acnC*のN末端に設計したprimer対を用いてリアルタイムPCRを行い、増幅が認められた菌株は*acn* gene-like clusterが正常に保有されているもの、陰性であった菌株は標的領域に塩基

配列の挿入があるためリアルタイムPCRでは増幅が確認できなかったものと推察した。その結果、351株中、*acn* gene-like clusterを保有する菌株は178株 (50.7 %), clusterに変異があると推測される菌株が11株 (3.1 %), clusterを持たない菌株が162株 (46.2 %)であった。

4 まとめ

プロバイオティクスとしての利用事例のある*B. coagulans*について、嫌気条件下での有機酸生成量、好気条件下でのラクトース資化性と β -gal遺伝子、でんぷんの資化性、及び*acn* gene-like clusterの解析を行った。その結果、例えば分離源（試料）が同じであっても、分離条件の違い等により炭素源の資化性や保有遺伝子に差がある菌株が得られた（表2、試料名及び分離条件については非公開）。性状分析においては、ラクトースの資化性とX-galの分解結果が一致しない菌株も認められるが（試料：W）、試験回数が少ないこともあり、今後精査が必要である。一方、GAM培地培養中の有機酸生成量に特徴が認められる菌株は、分離源を同じくするものも含まれていた（データ未掲

載）。

本研究において、分離した*B. coagulans*には性状及び遺伝子に多様性が認められることが明らかとなった。

5 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) Scholz R, et al.: J. Bacteriol., Vol. 196, No. 10, p. 1842-1852 (2014)
- 3) Rogan NA, De Vos P.: Bergey's manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Bacillus, Online. John Wiley & Sons, Inc. (2015)
- 4) Dunlap CA, et al.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 66, No. 3, p. 1212-1217 (2016)

表2 *B. coagulans* 分離菌株の多様性

試料 ^{a)}	分離条件 ^{a)}	ラクトース資化性		X-gal 分解		β -gal gene		でんぷん資化性		<i>acn</i> gene-like cluster		
		陽性	陰性	陽性	陰性	保有	欠失	陽性	陰性	保有	変異	欠失
D	-1	6		6		6			6			6
	-2	3		3		3			3			3
	-3	14		14		14		14		14		
	-4	1		1		1		1				1
		6		6		6		6	6			6
		8		8		8		8		8		
E	-1	7		7		7		7		7		
		3		3		3			3	3		
	-2	10		10		10		10				10
		5		5		5			5			5
	-3	4		4		4		4			4	
		1		1		1			1		1	
	7		7		7		7		7		7	
	2		2		2		2		2		2	
	6		6		6		6		6		6	
V	-1	1		1		1		1		1		
		1		1		1		1	1			1
		1		1		1		1		1		
W	-1	1		1		1		1		1		
		1		1		1			1	1		
	-2	1			1		1	1		1		
		1			1		1		1	1		
		4		4		4		4		4		

a) 非公開。