

独自分離乳酸菌株からの胆汁酸耐性変異株取得の試み

八十川大輔

Examination of Bile Salt-Resistant Mutants from Previously Isolated Lactic Acid Bacteria for Practical Application

Daisuke Yasokawa

Chemical mutagenesis was applied to two bile salt-sensitive strains of lactic acid bacteria to obtain resistant mutants. From treatment with a low concentration (0.4%) of formaldehyde, three resistant mutants were isolated from two parental *Lactobacillus paracasei* strains. All six mutant strains were able to grow on agar plates containing 0.5% (w/v) bile salt, and the resistant phenotype was stable in 30 serial subcultures.

KEY-WORDS : bile salt resistance, mutation, *Lactobacillus paracasei*

キーワード : 胆汁酸耐性, 突然変異, *Lactobacillus paracasei*

乳酸菌は、消費した糖類から大量の乳酸を産生する細菌の総称であり、人類は古くからこの性質を利用して、ヨーグルト、チーズ、漬物など様々な発酵食品を作り出してきた。現在、北海道内にはチーズを中心に発酵乳製品を製造している企業が100を超え、それぞれが品質の向上、独自性の獲得を目指して努力をしているが、発酵乳製品製造用の市販乳酸菌スターターは外国製に占められている現状にある。

当センターでは、これら乳製品製造業者の要望もあり、発酵乳製品用の乳酸菌を中心に独自乳酸菌の分離・保存を行っており、産業上有用な乳酸菌が分離された場合に備えてそれを配布・提供する体制についても検討を行っている。しかし、自然界から分離した微生物が必ずしも実用に十分な性能を有しているとは限らず、今後、当センターにおける有用微生物活用の研究成果を実用化していくためには、自然界から分離した微生物について性能を改善する技術獲得が必要である¹⁾。従来の抗生剤開発においても、自然界からのスクリーニング後に高生産変異株の育種が行われており、既に工業的に利用され、様々に育種

改変されている酵母についても、現在でもなお変異処理を行ってより目的に合致した性能を有する菌株を育種する研究がなされている^{2, 3)}。

一方、乳酸菌の様々な健康機能性（整腸作用、免疫賦活化作用、抗ガン作用、変異源性低減化作用、抗インフルエンザ作用など）が近年注目され^{4, 5)}、多くの発酵乳製品やタブレットが発売されている。乳酸菌の有する機能性の一部については、生きたまま腸に届くことは必須な条件ではないことを示唆する報告⁶⁻⁹⁾もあるが、本研究では現在国内で市販されているいくつかの機能性乳酸菌の性質のうち、生きたまま腸に届くために重要視される胆汁酸耐性¹⁰⁾に着目して、当センターで分離した乳酸菌から比較的温和な変異処理であるホルムアルデヒド処理により変異株を獲得し、若干の知見を得たので報告する。

1. 実験方法

(1) 実験材料

GYP培地 (1.0% (w/v) グルコース, 1.0% (w/v) 酵母

事業名：経常研究

課題名：有用性向上のための独自分離乳酸菌株の育成・改変

エキス, 0.5% (w/v) ペプトン, 0.2% (w/v) 肉エキス, 0.2% (w/v) 酢酸ナトリウム三水和物, 0.02% (w/v) 硫酸マグネシウム七水和物, 0.001% (w/v) 硫酸マンガ四水和物, 0.001% (w/v) 硫酸鉄七水和物, 0.001% (w/v) 塩化ナトリウムおよび0.05% (w/v) Tween80, pH6.8に調整)を用いた。寒天培地の場合は寒天を1.5% (w/v)となるように加えた。121°Cで15分間オートクレーブして使用した。

変異処理の対象菌株として当センターで分離した *Lactobacillus paracasei* #50株, #250株を用いた。

胆汁酸耐性変異株の選抜には, グルコースを除いたGYP培地 (YP培地) に胆汁酸塩 (SIGMA-ALDRICH) を親株である#50株, #250株がコロニー形成を示さない濃度である0.4% (w/v) の割合で加えた寒天培地 (YP胆汁酸培地) を用いた。

(2) 変異処理

Loshon¹¹⁾らの方法を参考に条件を設定した。35°Cで対数増殖期まで培養, 遠心分離 (3000rpm, 10分間) にて集菌した。培養液と等量のリン酸生理食塩水 (PBS) (150mM NaCl, 25mM KPO₄; pH7.4) で洗浄後, 再度遠心して上清を捨て, 30°Cに保温した等量のホルムアルデヒド添加PBSに懸濁して直ちに30°Cで変異処理を行った。定期的に一定量をサンプリングして9倍体積の400mM (pH7.0) グリシン溶液に混和して20分間室温で静置, ホルムアルデヒドを解毒後0.1mLずつシャーレに塗抹した。YP胆汁酸培地に塗抹後35°Cで1週間嫌気培養し, 出現したコロニーを分離した。YP液体培地で培養し, YP胆汁酸培地に1白金耳塗抹し, コロニー形成を示した株を胆汁酸耐性変異株とした。

(3) 変異形質の安定性

L. paracasei #50株および#250株から分離した変異株はそれぞれ3株を, 胆汁酸塩を含まないGYP液体培地に1白金耳接種し, 30°C一晚培養の植え継ぎを行い1回の植え継ぎを1代と数えた。植え継いだ変異株について生理食塩水で希釈し, GYP寒天培地およびYP胆汁酸培地に塗抹して培養, 近似したコロニー数を示すかどうかによって胆汁酸耐性形質を確認した。

(4) 乳糖資化性試験

GYP液体培地で一晚培養した胆汁酸耐性変異株およびその親株を110°C, 10分間高圧滅菌した10% (w/v) 還元脱脂乳に1% (v/v) 接種して35°Cで静置培養した。経時的にサンプリングして生菌数および培地のpH変化を測定した。

2. 実験結果および考察

突然変異株取得には, 親株の生菌数が1/1000以下となるような条件が必要とされている¹²⁾。そこで先ずホルムアルデヒド処理における条件検討を行った。予備実験の結果からホルムアルデヒド濃度を0.4% (w/v) とし, 処理液から10分間隔でグリシン溶液に回収して生残菌数の変化をGYP寒天培地で検討したところ, 20分間処理により生残菌数が処理前の約1/1000~1/10000となったことから, 変異条件を20分間とした (図1)。

400mMグリシン溶液に回収した変異処理菌体をYP胆汁酸培地に塗抹し培養した結果, シャーレあたり0~数個のコロニーが出現した。これらの中から *L. paracasei* #50株および #250株からそれぞれ3株ずつの胆汁酸耐性変異株を分離した。いずれの菌株も0.5% YP胆汁酸培地においてもコロニー形成可能であった。

胆汁酸耐性形質の安定性を確認する目的で *L. paracasei* 変異株それぞれ3株ずつを30代, 胆汁酸塩を含まないGYP液体培地で植え継いで培養したところ, 本耐性変異は安定的に保存されていた (表1)。

様々な化学物質に対する耐性の獲得機構は, 1) 化学物質の細胞表面への吸着性低下, 2) 化学物質の細胞内部への透過性低下, 3) 化学物質の解毒 (分解, 修飾) 機構の獲得, 4) 化学物質の排出機構の増強, 5) 作用点の変異などが考えられる。胆汁酸の一次的標的は細胞膜であるとされており, 乳酸菌の耐性機構としてはトランスポーターによる胆汁酸の排出, 細胞膜脂質の組成変化, 菌体外多糖物質の生産が報告されている¹³⁾。今回分離された変異株それぞれが獲得した耐性メカニズムについては不明であるが, 10代~30代植え継いでもその形質を維持していることから胆汁酸耐性機構を維持することが菌体にとって

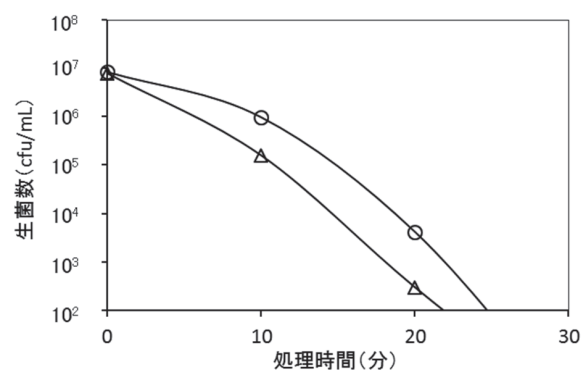
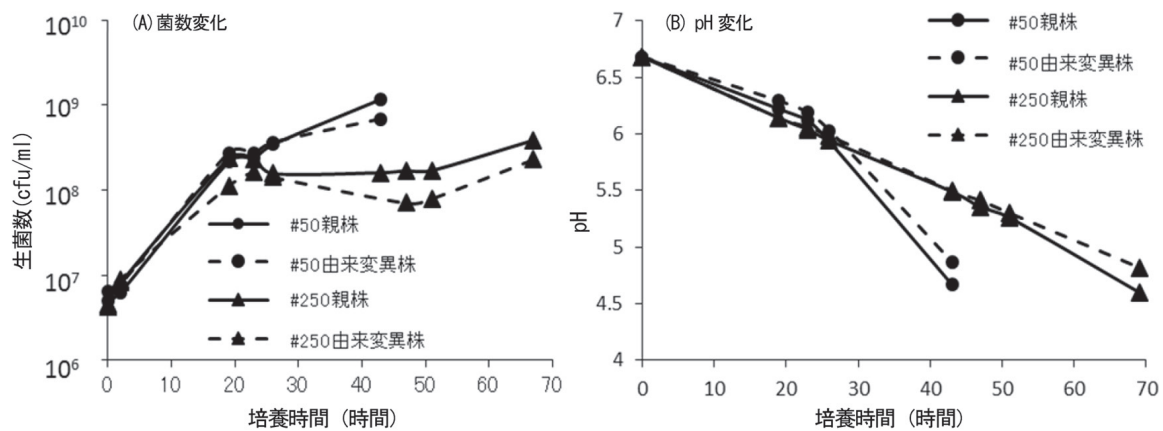


図1 ホルムアルデヒド変異処理条件による生菌数変化
シンボルはそれぞれ *L. paracasei* #50株 (○) および *L. paracasei* #250株 (△) の生菌数を示す。

表1 胆汁酸耐性変異株の遺伝的安定性

胆汁酸耐性 変異株	5代目		15代目		20代目		30代目	
	0.4%	0.5%	0.4%	0.5%	0.4%	0.5%	0.4%	0.5%
#50-3	++	++	++	++	++	++	++	++
#50-23	++	++	++	++	++	++	++	++
#50-26	++	++	++	++	++	++	++	++
#250-1	++	++	++	++	++	+	++	+
#250-3	++	++	++	++	++	++	++	++
#250-4	++	++	++	++	++	++	++	++

胆汁酸を含まないGYP液体培地で表記の回数植え継ぎ後、0.4%および0.5%胆汁酸塩を含むYP胆汁酸寒天培地に塗抹しコロニー形成を確認した。+：コロニー形成，++：明瞭なコロニー形成。

図2 *L. paracasei* 胆汁酸耐性変異株の10%還元脱脂乳発酵性試験

多大なストレスになるような変異ではないことが推定された。

分離した変異株を乳製品に使用することを想定した場合、今回の変異処理により乳糖代謝系遺伝子にも欠損変異が導入されたり、胆汁酸耐性変異自体が細胞表層の構造に変化をもたらし、イオンポンプ等の活性を阻害する場合など、乳糖資化性や有機酸生成に悪影響を及ぼす可能性もある。そこで、10% (w/v) 還元脱脂乳に胆汁酸変異株を接種してその増殖及びpH低下について親株と比較した。

その結果、*L. paracasei* 変異株は親株とほぼ同様の増殖及びpHの低下を示した(図2)。

この結果から、胆汁酸耐性変異自体は乳糖資化性に直接影響は及ぼさないと考えられた。

3. 要約

比較的温和な化学薬品であるホルムアルデヒドを用いて、当センターで独自に分離した胆汁酸感受性の*L. paracasei* から3株ずつ0.5%胆汁酸塩に耐性を有する変異株を分離した。これら変異株は比較的遺伝的に安定であり、還元

脱脂乳中での増殖能、酸生成能も親株とほぼ同等であった。

文 献

- 1) 佐々木隆, 森下隆, 門多真理子 (1996). 乳酸菌の遺伝と育種 3 遺伝子の導入と変異の誘起. 「乳酸菌の科学と技術」, (乳酸菌研究集談会編), 学会出版センター, 東京, pp.152-159.
- 2) 伊藤彰敏, 白井瑠美, 川崎明子, 山本晃司, 續順子 (2017). 本みりんを発酵原料に用いた貴醸酒タイプ酒類の開発. あいち産業科学技術研究センター研究報告, 62-65.
- 3) 根来宏明, 小高敦史, 松村憲吾, 秦洋二 (2017). 清酒酵母のリンゴ酸高生産に寄与する変異遺伝子の同定と育種への応用. 化学と生物, 55(6), 434-437.
- 4) 安武信義, 尾崎洋 (1997). 月刊フードケミカル, 1, 80-84.
- 5) 辨野義己 (2011). プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. モダンメディア, 57(10), 277-287.

- 6) Coconnier, M.-H., Bernet, M.-F., Chauvière, G. and Servin, A. L. (1993). Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **11**(4), 235-242.
- 7) Sashihara, T., Sueki, N. and Ikegami, S. (2006). An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases. *J. Dairy Sci.*, **89**(8), 2846-2855.
- 8) Lin, W-H., Yu, B., Lin, C-K., Hwang, W-Z. and Tsen, H-Y. (2007). Immune effect of heat-killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella typhimurium* invasion to mice. *J. Appl. Microbiol.*, **102**(1), 22-31.
- 9) Maeda, N., Nakamura, R., Hirose, Y., Murosaki, S., Yamamoto, Y., Kase, T. and Yoshikai, Y. (2009). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int. Immunopharm.*, **9**(9), 1122-1125.
- 10) Begley, M, Gahan, C. G. M. and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 625-651.
- 11) Loshon, C. A., Genest, P. C., Setlow, B. and Setlow, P. (1999). Formaldehyde kills spores of *Bacillus subtilis* by DNA damage and small, acid -soluble spore proteins of the α / β -type protect spores against this DNA damage. *J. appl. Microbiol.*, **87**, 8-14.
- 12) 齋藤日向 (1964). 微生物突然変異株のとり方. 化学と生物, **2**(4), 212-218.
- 13) Yokota, A. (2010). 乳酸菌・ビフィズス菌における胆汁酸ストレス応答. 日本乳酸菌学会誌, **21**(2), 87-94.