

長崎県産乳酸菌の簡易同定法および機能性に関する研究

研究年度 平成 30 年度

研究期間 平成 30 年度～平成 30 年度

研究代表者名 松澤哲宏

共同研究者名

I. はじめに

乳酸菌は自然界に広く生息し、植物の表面、動物の体内、食品中などに分布している。昔からいろいろな種類の食品において重要な役割を演じており、代表的な有用微生物の一つと言える。乳酸菌は、糖質を発酵してエネルギーを獲得、多量の乳酸を生成する一群の細菌の総称であり、通常、消費した糖質から 50% 以上の割合で乳酸を産生する細菌と定義される。

近年は、乳酸菌および乳酸発酵食品がヒトの健康に及ぼす効果が注目を集めている。また、乳酸菌は 2002 年に FAO/WHO のワーキンググループによって「適量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生きた微生物」と定義されたプロバイオティクスとしての役割がある。プロバイオティクスは生菌であるため、摂食後腸管に生きて到達し、長く留まることでその生理機能を最大に発揮することができる。そのための特性として、いくつかの条件があるが、特に胃酸耐性や胆汁酸耐性などが必要とされる。元々ヒト腸管に常在するタイプの乳酸菌にはそれらの性質を保持しているものが多く、*Lactobacillus* 属の菌種がプロバイオティクスとして主に活用されている。報告されている乳酸菌の生理機能としては整腸作用、免疫抑制、脂質代謝改善作用、血圧降下作用などが挙げられる。*Lactobacillus plantarum* に関する研究報告は多く、脂質代謝改善作用¹⁾²⁾、血圧上昇抑制作用³⁾、抗ガン作用⁴⁾⁵⁾などが報告されている。そのため、様々な植物性食品から単離・同定され、機能性を有する菌株の探索が積極的に行われている。一般的に乳酸菌などの細菌の同定は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析することにより行われるが、*L. plantarum* やその近縁菌である *L. pentosus*、*L. paraplantarum* および *L. plantarum* subsp. *argentoratensis*（この 3 種 1 亜種は *L. plantarum* グループと呼ばれている）は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列が非常に類似しており菌株によっては区別することが非常に困難である。そのため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析に加えて、何種類もの糖の資化性を調べることにより種の決定が行われていたが、2001 年にイタリアの Torriani らによって *recA* 遺伝子の塩基配列を用いた PCR 法による簡易同定法が報告された⁶⁾。それ以降は以前よりも *L. plantarum* グループの同定が迅速かつ簡単に行えるようになった。しかし、Torriani らのプライマーでは *L. plantarum* グル

ープに属している *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* が、検出対象に含まれておらず、さらに *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* の機能性の有無は明らかにされていない。

そこで本研究では、*L. plantarum* subsp. *argenteratensis* を新たな検出対象として加えた *L. plantarum* グループの迅速識別法の改良を行った。さらにプロバイオティクスの特性として特に重要な消化液耐性を試みることで *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* の機能性についての検討も行った。

II. 研究内容

Torriani らと同様に *recA* 遺伝子を用いて改良プライマーの作成を行った。*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* および *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* の塩基配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースから取得し、MUSCLE を用いてアライメントを行った。各種に特異的な塩基配列を目視にて確認し、各種特異的な PCR プライマーの設計を行った。これらのプライマーを用いて PCR 反応を行うことで、*L. paraplantarum* は 218 bp、*L. pentosus* は 445 bp、*L. plantarum* は 569 bp および *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* は 651 bp の位置に増幅が認められるようになり、アガロースゲル電気泳動によって特異性の確認を確認を行った。

L. plantarum subsp. *argenteratensis* の機能性のため、人口消化液耐性試験を行った。乳酸菌培養液を人工胃液 (pH 2.5) で 37°C、3 時間処理を行った後、人工腸液 (pH 8.0) で 37°C、3 時間処理を行った。人工消化液処理前と処理後の生菌数を比較することで対象とする乳酸菌が生きて腸まで届く可能性を検証した。

III. 研究成果

設計した改良プライマーセットを用いてマルチプレックス PCR を行い、電気泳動によって、*L. paraplantarum* NBRC 107151^T は 218 bp に、*L. pentosus* NBRC 106467^T および MU-1 は 445 bp に、*L. plantarum* NBRC 15891^T、DH-16、SI-1 および SK-40 は 569 bp に、*L. plantarum* subsp. *argenteratensis* DSM 16365^T、BCC 3717、BCC 38039 および BCC 42482 は 651 bp の位置にバンドが検出された。本研究の結果、*L. paraplantarum* グループ 3 種 1 亜種の乳酸菌を迅速かつ明瞭に同定することが可能となった。

L. plantarum subsp. *argenteratensis* はこれまで機能性の検証がされてこなかったため、プロバイオティクスの条件の 1 つである『胃液、胆汁などに耐えて生きて腸に到達できる』ことについて、人工消化液耐性試験を行って検証した。その結果、*L. plantarum* subsp. *argenteratensis* 4 株 (DSM 16365^T, BCC 3717, BCC 38039 および BCC 42482) において、人工消化液処理後も処理前と同等の生菌数が確認され、

生きてそのまま腸に到達できる可能性が示唆された。

IV. おわりに

本研究の結果から *L. paraplantarum* グループ 3 種 1 亜種の乳酸菌を迅速かつ明瞭に同定することが可能となった。*L. paraplantarum* グループではこれまで *L. plantarum*, *L. pentosus* および *L. praplantarum* の 3 種においては機能性が報告されているが、*L. plantarum* subsp. *argenteratensis* においては機能性を有するかの検証が行われていなかった。本研究により、*L. plantarum* subsp. *argenteratensis* は人工消化液耐性があり生きて腸まで届く可能性が示唆された。そのため今後、抗酸化活性や抗腫瘍活性などを有するか検証を行い、機能性の有無を確認する必要があると考えられる。

V. 参考文献

- 1) Sakai T, Taki T, Nakamoto A, Shuto E, Tsutsumi R, Toshimitsu T, Makino S, Ikegami S (2013) *Lactobacillus plantarum* OLL2712 Regulates Glucose Metabolism in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 59: 144~147.
- 2) Salaj R, Stofilova J, Soltsova A, Hertelyova Z, Hijova E, Bertkova I, Strojny L, Kruzliak P, Bomba A (2013) The Effects of Two *Lactobacillus plantarum* Strains on Rat Lipid Metabolism Receiving a High Fat Diet. *The Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2013/135142.
- 3) Liu TH, Chiou J, Tsai TY (2016) Effects of *Lactobacillus plantarum* TWK10-Fermented Soymilk on Deoxycorticosterone Acetate-Salt-Induced Hypertension and Associated Dementia in Rats. *Nutrients*. doi: 10.3390/nu8050260.
- 4) Haghshenas B, Nami Y, Haghshenas M, Abdullah N, Rosli R, Radiah D, Khosroushahi AY (2015) Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *MicrobiologyOpen* 4 (5): 803~813.
- 5) Kwak SH, Cho YM, Noh GM, Om AS (2014) Cancer Preventive Potential of Kimchi Lactic Acid Bacteria (*Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*). *Journal of Cancer Prevention* 19 (4): 253~258.
- 6) Torriani S, Felis GE, Dellaglio F (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (8): 3450~3454.