

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：57103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05419

研究課題名(和文) 乳酸菌ラクトバシラスの新たなニッチAPEN獲得能の解明

研究課題名(英文) Characterization of a new ability of Lactobacillus to exploit adjacent-possible ecological niche

研究代表者

水野 康平 (Mizuno, Kouhei)

北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・教授

研究者番号：80342583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ある種のラクトバシラスが、貧栄養条件下で隣接する大腸菌細胞とマイクロ共凝集体を形成して効率的に増殖する現象を発見した。この乳酸菌と大腸菌の新しい相互作用のメカニズムを生態学的ニッチの新しい概念「隣接可能型生態学的ニッチAdjacent-Possible Ecological Niche (APEN)」として定義して、そのメカニズムを解明することを目的とした。まず、リステリア用プラスミド pJEBan6 の導入に成功した。また、大腸菌とカゼイは、共培養条件下で的確に培地交換することで生菌数を維持した。これは、両菌が安定的に相互作用しながら共存できることを示しており、生態学的に重要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌の1種ラクトバシラスは、腸管において常に少数者(0.1～数%)だが、乳酸や抗菌性物質を生産して菌叢全体を安定化させて、有害菌の侵入を防ぐ。本研究は、多くの栄養素を外部からの供給に依存する乳酸菌が、どのようにして、貧栄養環境で生存するかについて、新しい知見をもたらした。隣接する他種細菌に強力に依存して生育できるこの新しく発見された能力は、腸内環境における乳酸菌の定着や生存戦略についての定説に重要な示唆を与えるものであり、今後、腸内細菌のバランスによる疾患やその予防法などにも重要な視点を与える。今後、本現象を分子メカニズムまで解明できれば、新しい腸内細菌叢の制御にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We discovered that a certain species of Lactobacillus in a condition could grow with co-existing E. coli. We have proposed the new inter-species interaction as Adjacent-Possible Ecological Niche(APEN) as a new concept of ecological view of point. Firstly, the plasmid derived from Listeria was found to be transformed into the Lactobacillus, which is expected to be useful for further genetic analysis. In addition, giving a fresh medium regularly, the co-culture could be kept over 1 month, which suggests that this inter-species symbiotic relation is stable. These results would give us a new insight into ecological microbiological system.

研究分野：応用微生物学

キーワード：乳酸菌 ラクトバチルス 大腸菌 共生 Lactobacillus 相互作用 プロバイオティクス カゼイ

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌の1種ラクトバシラスは、腸管において常にサブ・ポピュレーション(0.1~数%)であり、優勢化することはないが、乳酸や抗菌性物質を生産して菌叢全体を安定化させて、有害菌の侵入を防ぐ例が知られている。実施者らは、ある種のラクトバシラスが、貧栄養条件下で隣接する大腸菌細胞とマイクロ凝集体を形成して効率的に増殖する現象を発見した。この乳酸菌と大腸菌の新しい相互作用のメカニズムを生態学的ニッチの新しい概念「隣接可能型生態学的ニッチ Adjacent-Possible Ecological Niche (APEN)」として定義して、そのメカニズムを解明することを目的として研究は実施された。

また、複合系では、通常の顕微鏡で見分けがつかないため、当該乳酸菌に対して、遺伝導入が可能となるように、プラスミドの導入を試みた。さらに、大型遺伝子どう導入する手法として、ラクトバチルス属が有する自然形質転換の手法の構築も試みた。

## 2. 研究の目的

乳酸菌は広く生態系(多くの動物の腸管、植物、食品など)に分布することが知られている一方で、その栄養要求性は非常に高いことが知られている。そこで、この乳酸菌の他の菌との相互作用による生存戦略は、乳酸菌の環境における生存、つまり、乳酸菌の生態学的な意義において重要と考えた。これを APEN (Adjacent-Possible Ecological Niche)として定義して、そのメカニズムの解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

いくつかの方法を同時並行で行った。一つは、遺伝子工学的なアプローチで、当該現象を発現する乳酸菌株に導入できるプラスミド遺伝子を探索して、リステリア菌のプラスミドを採用した。また、近年、ラクトバチルス属の中にも自然形質転換能に関与する遺伝子(ComK)がゲノム上に見出されており、その潜在的な能力が指摘されている。そこで、乳酸菌カゼイの関連遺伝子を同定するために自然形質転換を応用した新しい実験系を構築した。ゲノムレベルで遺伝子組み換えが共存細菌との間で起こっている可能性を考慮して、ナチュラルコンピーテンス能を調べることにした。また、共培養を連続的に培養し

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

てその安定性を調べるための培養系を構築する培養工学的アプローチをとることとした。

#### 4. 研究成果

乳酸菌の一属である *Lactobacillus* 属のうち、*casei* と総称されると *plantarum* と総称されるものが、M9 培地 (化学合成培地、炭素源グルコース、アミノ酸なし) 中で、大腸菌と共培養したときに、良好に増殖しただけでなく、大腸菌より優勢化して大腸菌を淘汰することを見出した。また、この培地を菌体を保持したまま、培地のみ新鮮培地に交換することで、約 1 か月、生存を維持できたことから、相互作用は、持続可能な関係であることが分かった。遺伝子解析を目的として、プラスミドの導入発現を試みた。リステリア属で用いられるプラスミドの 1 種 pJEBan6 を導入することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okawara Toru, Matsufuji Yurina, Mizuno Kouhei, Takehara Kenji, Nagamura Toshihiko, Iwasa Seiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Vinylpyrroles: solid-state structures and aggregation-induced emission properties	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 22817 ~ 22822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9RA04088A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wai XianLau, Octavio Carvajal-Zarrabal, Cirilo Nolasco-Hip&oacute;lito, Mizuno Kouhei, Zayn Al-Abideen Gregory, Mohammad Omar Abdullah, Seng ChiewToh, Samuel Lihan	4. 巻 14
2. 論文標題 Production of pigments by Rhodotorula mucilaginosa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaysian Journal of microbiology	6. 最初と最後の頁 344-350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21161/mjm.144188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 有田光騎、園田達彦、水野康平
2. 発表標題 乳酸菌と大腸菌の共培養に関する研究
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会(2019年7月13日北九州市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀暁洋、水野康平
2. 発表標題 新種細菌HS-3の形成するコロニーの形態学的基础研究
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会(2019年7月13日北九州市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嘉村禎一、小畑賢次、水野康平、松嶋茂憲
2. 発表標題 可視光応答型光触媒による大腸菌の光殺菌効果の検討
3. 学会等名 日本セラミックス協会九州支部秋季研究発表会 (2019年11月12日福岡県春日市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiko Koga, Mari Takahara, Tatsuhiko Sonoda, Toshihiko Nagamura, Kouhei Mizuno
2. 発表標題 New bacterium controls cells just like nematic liquid crystals for two-dimensional life
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会 (2019年11月27日横浜市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Ito, Tatsuhiko Sonoda, Kouhei Mizuno
2. 発表標題 Morphological changes of Lactobacillus casei in a long-term co-culture with Escherichia coli
3. 学会等名 第12回日韓合同バイオセンシングテクノロジーシンポジウム (北九州市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiko Koga, Satoko Nakanomori, Mari Takahara, Tatsuhiko Sonoda, Toshihiko Nagamura, Kouhei Mizuno
2. 発表標題 New cave bacterium forms liquid crystal-like colony
3. 学会等名 第12回日韓合同バイオセンシングテクノロジーシンポジウム (北九州市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場佳也、水野康平
2. 発表標題 広域宿主プラスミドpJRD215のLactobacillus属への形質転換法の確立
3. 学会等名 第55回化学関連合同支部会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 伊藤瞭、水野康平
2. 発表標題 蛍光タンパク質遺伝子の乳酸菌への形質転換法の確立
3. 学会等名 第55回化学関連合同支部会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Daisuke Fukuda, Kouhei Mizuno
2. 発表標題 Phylogenomic analysis of catalase genes of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales
3. 学会等名 微生物生態学会年次大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Ryo Ito, Kouhei Mizuno
2. 発表標題 Transformation of a red fluorescent protein DsRed into Lactobacillus casei
3. 学会等名 第11回日韓合同バイオマイクロセンシングテクノロジーシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 水野康平
2. 発表標題 乳酸菌の細胞コンタクトを介した新しい環境適応能力
3. 学会等名 第115回有機デバイス研究会「有用菌の科学と産業応用」(招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 水野康平
2. 発表標題 Two bacterial survival strategies: Adjacent-Possible ecological niche (APEN) of lactic acid bacteria, and polyhydroxyalkanoates (PHA) as a carbon and energy storage compound.
3. 学会等名 筑波大学医学セミナー(招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Two bacterial survival strategies: Adjacent-Possible ecological niche (APEN) of lactic acid bacteria, and polyhydroxyalkanoates (PHA) as a carbon and energy storage compound  <a href="http://www.md.tsukuba.ac.jp/gradmed/seminar/pdf/190123.pdf">http://www.md.tsukuba.ac.jp/gradmed/seminar/pdf/190123.pdf</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	森川 一也  (Morikawa Kazuya)  (90361328)	筑波大学医学医療系感染生物学部門・医学医療系感染生物学部門・教授    (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	柘植 丈治  (Tsuge Takeharu)  (70332260)	東京工業大学・物質理工学院材料系・准教授   (12608)	
連携研究者	園田 達彦  (Sonoda Tatsuhiko)  (30403992)	北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・准教授   (57103)	
連携研究者	高原 茉莉  (Takahara Mari)  (40804563)	北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・助教   (57103)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関