

平成21年5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580095

研究課題名（和文）乳酸菌と酵母菌からなる複合バイオフィームに関する研究

研究課題名（英文） Studies on mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and yeasts

研究代表者

山崎 真狩 (YAMASAKI MAKARI)

日本大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号 6011889

研究成果の概要：我々は初めて、保存菌株の乳酸菌と酵母菌からなる複合バイオフィームの形成を見出した。また乳酸菌の培養濾液中で酵母菌を培養すると酵母菌が単独でバイオフィーム形成をおこなうことを見出した。この培養濾液中のバイオフィーム形成因子を部分精製し、その性質を明らかにした。一方、鹿児島県福山町で伝統的に製造されている福山壺酢の醸造諸味から分離した乳酸菌と酵母菌の組合せでは、さらに旺盛な複合バイオフィームの形成が認められた。この場合は上記のようなバイオフィーム形成因子を要せず両者の接触が必要であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能、複合バイオフィーム、バイオフィーム形成因子、乳酸菌、酵母菌、微生物間コミュニケーション、福山壺酢

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームの研究は従来、殆ど単独の微生物で形成されるものに限られていた。しかし自然界に見られるバイオフィームは複合系であるため、我々は複合バイオフィーム形成に興味をもって、各種細菌や酵母菌の2種混合系でのバイオフィーム形成を調べてきた。その過程で乳酸菌と酵母菌の間ではっきりした複合バイオフィーム形成がおこなわれることを見出した。従来、発酵・醸造の過程では乳酸菌と酵母菌が菌数密度高く共存していることが知られながら、両者間の相

互作用或いは共生現象は見出されていなかった。乳酸菌と酵母菌の複合バイオフィーム形成は、両者の相互作用を顕著に示すもので、これを指標に発酵・醸造における乳酸菌と酵母菌の共存関係の意味を探ろうとした。

2. 研究の目的

われわれは既に保存菌株において、特定の乳酸菌と酵母菌の組合せで複合バイオフィームが形成されることを世界で初めて報告した(T. Kawarai et al., Appl. Environ. Microbiol., 73, 4673-4676 (2007)). 更に乳酸

菌の培養濾液中で酵母菌を培養すると酵母菌は単独でバイオフィームを形成出来る様になることを見出した。即ち乳酸菌培養濾液中には酵母菌のバイオフィーム形成因子が含まれている。ここで述べた複合、或いは単独バイオフィーム中の酵母菌は細胞表面には多数の小さい丘のような突起を生じていた。

- (1) 本研究の第1の目的は、上記バイオフィーム形成因子の化学的本体を明らかにすることである。
- (2) 第2の目的は実際の発酵・醸造の諸味から採取した乳酸菌と酵母菌の組合せでもバイオフィームが顕著に形成されるかどうかを調べることである。もしそのような例があれば、発酵・醸造においてどのような寄与があるのか、例えば生態学的な優先化に関与しているのか否かを明らかにすることである。
- (3) 第3の目的は、複合、または単独のバイオフィーム形成酵母菌の遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法で調べ、細胞表面の丘状突起生成の生理学的意味を探ることである。

3. 研究の方法

- (1) バイオフィームの形成は一般に行われているタイタープレート法に拠った。
- (2) バイオフィーム形成因子の精製には逆層シリカゲルを用いた高速液体クロマトグラフィーに拠った。
- (3) 伝統的な発酵・醸造食品としては鹿児島県福山町の福山壺酢を選び、醸造会社の好意で経時的に採取してもらった発酵中の諸味から乳酸菌と酵母菌を分離した。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成因子の精製

保存菌株の乳酸菌 *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* IF03831 を YPD 培地で大量培養した。その培養濾液を分画し、協会 10 号酵母菌が単独でバイオフィームを形成出来る度合いをタイタープレート法での生物検定を行った。まず分子篩膜で分画したところ、分子量 3,000~5,000 Da にバイオフィーム形成活性が存在した。更にその活性は酸性 (pH 3.0) で酢酸エチルに転溶された。この酢酸エチル画分を数回、逆層シリカゲルカラムによる高速液体クロマトグラフィーにかけ、活性画分を単 1 ピーク (矢印で表示) にまで精製した (図 1)。

しかし微量にしか得られなかったため、組成分析は無理であった。バイオフィーム形成因子は熱感受性であった。多くの乳酸菌で抗生物質様の殺菌効果を持つペプチド系のバクテリオシンの生成が報告されていて、分子量も上記の数値の範囲である。ただこれらは皆熱耐性があり、バイオフィーム形成因子とは異なる。また我々の精製標品には紫外部吸

収が認められなかった

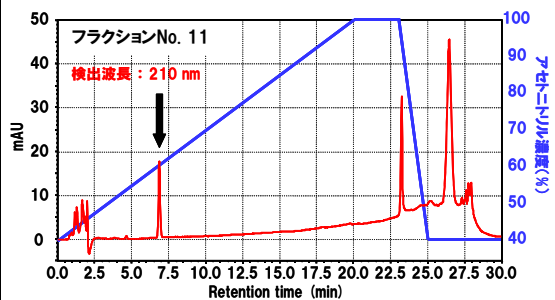


図 1 逆層シリカゲルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによるバイオフィーム形成因子の精製

このような結果からバイオフィーム形成因子はペプチド性のものではないと推定出来る。事実、バイオフィーム形成因子はプロテイナーゼ K の分解にも耐性であった。

次の(2)に述べる複合バイオフィーム形成例では、このバイオフィーム形成因子を必要としないので、バイオフィーム形成因子を必要とする例を「因子型」と呼ぶことにした。

(2) 福山壺酢発酵諸味由来乳酸菌と酵母菌による複合バイオフィームの形成

① 旺盛なバイオフィーム形成の組合せ

鹿児島県福山町で伝統的に醸造されている福山壺酢は、図 2 に示すような大きな壺に蒸米、米麴、水を仕込み、簡単な蓋をして野外に静置し、自然発酵に任せて造る米酢である。原始的な醸造であるが故に発酵学的には未解明なところが多く興味深い。春秋 2 回仕込みが行われる。



図 2 福山壺酢の醸造風景

2006 年秋仕込み 5 日目及び 11 日の発酵諸味から乳酸菌、酵母菌を多数分離した。これら分離菌の 2 種混合の組合せでバイオフィーム形成能を調べた。仕込み 5 日目から分離した乳酸菌と酵母菌の間でも幾つかの組合せで顕著なバイオフィーム形成が認められた。しかし仕込み 11 日目試料から分離した乳酸菌と酵母菌の組合せでは更に顕著なバイオフィーム形成を示すものが幾つか現れた。ちなみにこの仕込み 11 日目は高密度に

乳酸菌と酵母菌が共存している状態にある。仕込み 11 日目から採取した乳酸菌 (ML11-11) と酵母菌 (Y11-43) の組合せでは特に旺盛な複合バイオフィーム形成が認められた (図 3)。

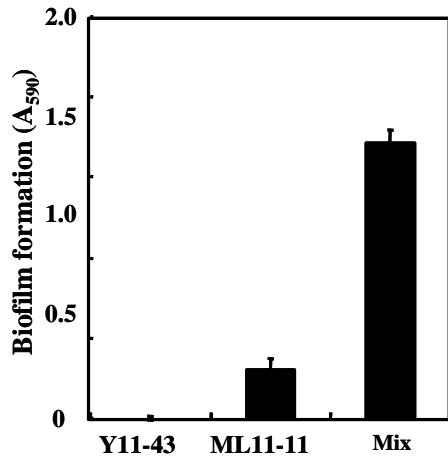


図 3 乳酸菌 (ML11-11) と酵母菌 (Y11-43) による複合バイオフィームの形成

この組合せの場合、乳酸菌或いは酵母菌の培養濾液は相方の菌に単独バイオフィーム形成をさせることが出来なかった。従って乳酸菌 ML11-11 と酵母菌 Y11-43 からなる複合バイオフィームの形成はバイオフィーム形成因子には依存せず、両者の接触が必要と考えられ、これを「接触型」と呼ぶことにした。

②組合せ相手の互換性

接触型の場合には乳酸菌、酵母菌はそれぞれ相手菌の細胞表層のどのような構造或いは表層分子を認識しているのであろうか。それを明らかにするには遺伝学的な解析が出来ることが望ましい。その為には、複合バイオフィーム形成の相手が、既にゲノム情報が得られている菌と互換出来ると好都合である。そこで乳酸菌の方は ML11-11 に固定しておいて、酵母菌の方を種々の実験室株に置き換えてみた。その結果、乳酸菌 ML11-11 は酵母菌の代表的実験室株である *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A とも顕著な複合バイオフィーム形成を行えることが判明した。同菌はハプロイド株であり多くの多くの変異株があるので、これらの変異株と乳酸菌 ML11-11 の組合せで、複合バイオフィーム形成不能な変異株を探し出せる道筋が得られたことになる。一方、酵母菌の方を Y11-43 に固定しておいて、種々の乳酸菌の保存菌株と組合わせてみたが、複合バイオフィームは形成されなかった。

③乳酸菌、酵母菌の種の同定

乳酸菌 ML11-11 と酵母菌 Y11-43 の種を同定するため、small rRNA 遺伝子の塩基配列の決定を行った。その結果、乳酸菌 ML11-11 は *Lactobacillus plantarum*、酵母菌 Y11-43

は *Saccharomyces cerevisiae* と相同性が最も高いことが判明した。両種とも発酵・醸造の現場からは頻度高く見出される種類である。

④走査型電子顕微鏡による観察

乳酸菌 ML11-11 と酵母菌 Y11-43 よりなる複合バイオフィームを走査型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果乳酸菌がアンカーの役割を果たし、その上に酵母菌が乳酸菌を介して凝集することにより、担体表面上に高次の構造体を構築していることが分った。その画像を図 4 に示す。

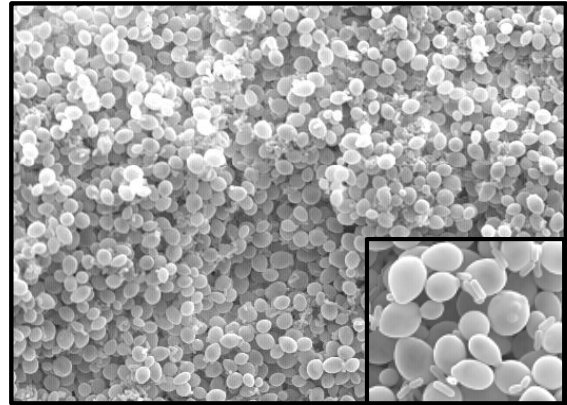


図 4 乳酸菌 ML11-11 と酵母菌 Y11-43 より成る複合バイオフィームの走査型電子顕微鏡像

⑤因子型と接触型の比較

本研究を通して乳酸菌と酵母菌の複合バイオフィーム形成には因子型と接触型の 2 タイプのあることが分った。因子型に於いては乳酸菌の作るバイオフィーム形成因子が酵母菌の細胞表層のリセプターに受容されて酵母菌体内にその情報が流れ、細胞表層に丘状の突起が幾つも現れ、これが担体に付着する役目を果たして、酵母菌単独でもバイオフィーム形成が可能であると考えられる (図 5)。

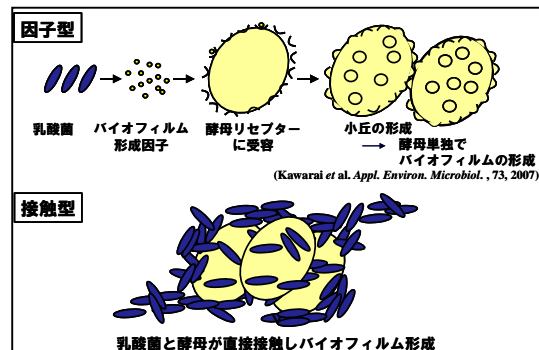


図 5 乳酸菌と酵母菌の複合バイオフィーム形成における因子型と接触型の差異

一方接触型では乳酸菌表層分子が、酵母菌の表層構造を認識して凝集し複合バイオフィーム形成に至ると考えられる。図4の拡大図をみると酵母菌の表面には丘状の突起は見られない。走査型電子顕微鏡での観察結果からはまず乳酸菌が担体表面に付着すると考えられる(図5)。

この接触型での乳酸菌と酵母菌による旺盛な複合バイオフィーム形成は微生物生態学的に考えると両者が微生物集団の中で優先化することを予測させる。その実証は今後の課題となる。

本研究遂行に於いて福山壺酢諸味試料を採取して頂いた、伊達醸造の伊達英史社長、また実験に従事してくれた河原井武人博士、吉田可奈子さん、能島菜積さん、それから研究遂行上、色々の御配慮を賜った日本大学生物資源科学部の森永康教授、走査型電子顕微鏡の操作を指導して下さった白鳥初美さんに深甚の謝意を表したい。更にバイオフィーム形成因子の精製に関し御指導頂き、種々御助力を賜った日本大学大学院総合科学研究科の別府輝彦教授、日本大学生物資源科学部の上田賢志准教授、高野英晃助教、天野昭一研究員に心からの感謝の意を表したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び研究連携者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 古川壮一、伊達英史、伊達孝美、荻原博和、森永康、山崎真狩、福山酢の来た道、人間科学研究(日本大学生物資源科学部・人文社会系研究紀要)、No. 5、p298-315 (2008)、査読有
- ② T. Kawarai, S. Furukawa, H. Ogihara, M. Yamasaki, Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts, Appl. Environ. Microbiol., 73, 4673-4676 (2007)、査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 古川壮一、吉田可奈子、能島菜積、荻原博和、山崎真狩、森永康、酵母と乳酸菌の複合バイオフィーム形成、日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡)、2009.3.28 発表、講演要旨集、pシ 20.
- ② 吉田可奈子、能島菜積、古川壮一、荻原博和、山崎真狩、森永康、福山壺酢由来酵母と乳酸菌によるバイオフィーム形成、日本農芸化学会 2008 年度大会 (名古屋)、2008. 3. 27 発表、講演要旨集、p107
- ③ T. Kawarai, S. Furukawa, N. Nojima, H. Ogihara, Y. Morinaga, M. Yamasaki,

Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts, ASM conference on "Cell-Cell communication in bacteria" (Austin, Texas), 2007. 9. 26 発表、Abstracts, p51

- ④ 吉田可奈子、本田亜希子、河原井武人、古川壮一、荻原博和、山崎真狩、森永康、福山壺酢より分離した酵母と乳酸菌の相互作用、日本生物工学会 2007 年度大会 (広島)、2007. 9. 26 発表、講演要旨集、P160
- ⑤ 河原井武人、古川壮一、荻原博和、山崎真狩、酵母と乳酸菌の複合バイオフィーム：酵母バイオフィーム形成促進因子の同定、日本農芸化学 2007 年度大会 (東京)、2007. 3. 26 発表、講演要旨集、p169

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 真狩 (YAMASAKI MAKARI)
日本大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号：60011889

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

古川 壮一 (FURUKAWA SOICHI)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号：40339289