

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05346

研究課題名(和文) ゲノムで読み解く広範分布性乳酸菌ラクトバチルス・サケイの「歩んだ道」と将来的利用

研究課題名(英文) Genomic insights into an evolution of widely-distributed lactic acid bacterium *Latilactobacillus sakei* and its future use

研究代表者

小柳 喬 (KOYANAGI, Takashi)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：20535041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：*Latilactobacillus sakei*は発酵肉、発酵野菜漬物、日本酒の生もと系酒母およびいすし系なれすしなど、様々な食品および関連原料から分離される広範分布性の乳酸桿菌である。その分離源の豊かさから本菌種の種内多様性が窺われるが、詳細な菌株間の類縁関係についての知見はこれまで充分ではなかった。本課題では、*L. sakei* 32株の全ゲノムデータより一塩基多型(SNP)結合塩基配列を構築し、動物性栄養源を含むか否かといった分離栄養源別に種内系統が分かれることを見いだした。本手法によりゲノム情報をもとに効率よく最適発酵スターターを選抜できるなどの将来的産業利用につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、SNP結合塩基配列に基づく種内系統解析を特定の乳酸菌種に適用することにより、これまでの既存手法では見いだされなかった詳細な菌株の類縁関係に関する系統分類に成功した。本手法は*L. sakei*のみならずその他の乳酸菌種にも適用可能であり、過去に明らかでなかった種内での系統整理に役立つ可能性がある。さらに、各菌株の表現形質などと関連付けた解析を今後進めることにより、ゲノム情報をもとにした最適発酵スターター株の選抜に利用できるなどの可能性が十分ある。本課題における成果は、乳酸菌の種内系統分類に新手法を導入した学術的意義のみならず、上記のような将来的産業利用につながる社会的意義も有している。

研究成果の概要(英文)：*Latilactobacillus sakei* is a widely distributed lactic acid bacteria isolated from a variety of foods and related ingredients, such as fermented meat, fermented pickles, Japanese rice wine starter (shubo), and fermented fish with rice koji (Izushi-type narezushi). The richness of such isolation sources suggests the intraspecific diversity in *L. sakei* species, but detailed information on the relationships among strains has not been fully elucidated until now. In this study, we constructed single nucleotide polymorphism (SNP)-concatenated sequences from the whole-genome nucleotide sequence data of 32 *L. sakei* strains and found that the strains were separated according to the nutrient types in the source of isolation, such as whether they contained animal nutrition. The SNP-based method on *L. sakei* established in this study may lead to efficient selection of optimal fermentation starters, and may be used for industrial applications in the future.

研究分野：食品微生物学、応用微生物学

キーワード：乳酸菌 ゲノム解析 *Latilactobacillus sakei* 次世代シーケンサー 種内系統解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* (旧種名: *Lactobacillus sakei*) は発酵ソーセージや発酵肉、発酵野菜漬物(ザワークラウト等)、日本酒の生もと系酒母およびいすし系なれずしなど、世界中の様々な食品および関連原料から分離される広範分布性の乳酸菌である。本菌種は分離原料の多様性から種内多様性の高さが窺われ、菌株レベルで今後多様な食品開発に生かせる可能性をもつと考えられた。しかし、本種内における各菌株間の類縁関係や不良形質の有無などは不明確であり、種菌として新規な食品製造に利用した場合などの食味や品質への影響などを推し量るには、事前に目的食品への発酵適合性や代謝物を調査するしかないのが研究開始当初の現状であった。本菌種の産業利用をさらに促進し菌株レベルでの食品利用への適合性を効率的に判断するためには、種内系統を正確に分別し判断する手法と技術の確立が不可欠であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題は、上記1.の背景のもと、*L. sakei* 種内におけるゲノムレベルでの菌株系統の解析を行うことによって、菌株間の類縁関係および菌株の分離栄養源依存的な遺伝的特徴を解明し、任意の発酵食品で使用する最適スター菌株のゲノム選抜基盤を確立することを最終目的とした。様々な発酵食品などの生育環境から分離される *L. sakei* の菌株間の種内系統関係および各系統の生育環境への適応性を決定している遺伝的要因をゲノム情報をもとに解明できれば、各々の発酵環境に最適なスター菌株を選定するための手法確立に資すると考えられた。本課題で確立する手法は、*L. sakei* だけでなく他の乳酸菌に対しても適用可能であると考えられ、種内ゲノム比較による産業利用可能な乳酸菌ライブラリー構築のモデルケースとなると考え、研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) *L. sakei* の種内系統を解析するため、全ゲノム中に散在する一塩基多型 (SNP) 箇所を用いた集団遺伝学的解析を実施した。分譲機関より入手可能な *L. sakei* 株および遺伝子データベースから入手可能なゲノムデータ、計 32 株分について、SNP 箇所を結合した塩基配列約 113 kbp を構築した。本結合塩基配列をもとに最尤法に基づく系統樹を作成し、種内系統のクラスタリングおよび類縁関係の整理を行った。また、菌株分離源が得られた地理的位置および分離栄養源の別などに基づいてクラスタリングされた菌株群に共通した何らかの性質がみられるかについて検討を行った。さらに、既存の表現形質(炭水化物発酵能: API テスト)に基づく分類および MLST といった系統分類に汎用される遺伝系統解析手法と比較し、SNP 結合配列に基づく本課題で用いた手法が有効であるかを検討した。

(2) 上記(1)で求めた種内系統ごとに、分離栄養源(動物性原料を含む発酵肉および「いすし」、植物性原料のみ含む日本酒酒母および発酵野菜など)によって菌株のもつ食品発酵適性が異なるかを検討した。米をベースとした植物原料のみを含む発酵媒体(植物モデル培地)、米に加えて動物栄養源(魚体)を含む発酵媒体(動物モデル培地)に各 *L. sakei* 菌株を接種し、pH および生菌数推移を評価した。乳酸菌数は MRS 平板寒天上のコロニー数にて評価した。また、発酵終了後に発酵代謝組成物として有機酸およびアミノ酸濃度の分析を HPLC にて行った。

4. 研究成果

(1) 様々な分離源に由来する *L. sakei* 菌株群の種内系統解析

各菌株間の詳しい類縁関係について、SNP 結合塩基配列を全ゲノムから構築することにより簡単に判別するための足掛かりを得るための解析を実施した。様々な地理的位置(ヨーロッパ、日本、南米)および由来物(いすし、山廃酒母、野菜漬物、発酵肉、サイレーズ等)より単離されている *L. sakei* のゲノムについて、研究室分離株および機関分譲株、さらにデータベース上よりゲノムデータを使用できる株を含めて、計 32 菌株分について SNP 結合配列を生成し、種内系統を予測した。その結果、これらの菌株群が大きく 3 つのクラスターに分類され、特に食品中に含まれる動物性成分の有無によって、クラスターが明確に分かれることが明らかになった(図 1)。この分類は MLST (Multi Locus Sequencing Typing) といった既存の汎用解析法では明確な系統に分かれなかったことから、SNP 結合配列を乳酸菌の種内系統解析に利用する手法としての有効性が強く示唆された。また、3 つのクラスターのうち 1 つ(4 菌株が属する)については、他の 2 つのクラスターと比して明らかに離れた系統群を形成しており、*L. sakei* が同種内においてもバラエティに富むゲノム構造を有する示唆を得た。

(2) (1) で明確になった 3 つのクラスターに遺伝的に分かれる *L. sakei* 種内系統について、代謝的特性についても同様にクラスター毎に分類されるかを精査した。API 50 CH キットを用いて炭水化物の発酵能を株間で比較したところ、全ゲノム SNP 結合塩基配列による系統解析におけるクラスタリングとの一致はみられなかった。また、*L. sakei* に一般的にみられる代謝系

であり低 pH 耐性に関わると考えられるオルニチン生成能（アルギニンデヒミナーゼ経路により生成）についてもクラスター毎に一致する傾向は見られず、分離食品の酸性環境の違いへの適応を示唆するような系統別の傾向はみられなかった。

そこで、このようなゲノム塩基配列上のバラエティが及ぼす表現形質への影響について、種内系統ごとに分離栄養源（動物性原料を含む発酵肉および「いずし」、植物性原料のみ含む日本酒酒母および発酵野菜など）によって食品発酵への適性が異なるかを検討した。その結果、各 *L. sakei* 菌株を用いた米をベースとした発酵食品の製造時に、特定の有機酸の蓄積量についてクラスターにより明確な差があることを示唆するデータを得た。また、その際の最終到達 pH にもクラスターの別により有意な差異があることを確認した。具体的には、米をベースとした植物原料のみを含む発酵媒体に各菌株を接種した場合、植物栄養源由来菌株群のみからなるクラスターに属する菌株群の方が動物栄養源由来菌株群を含むクラスターに属する菌株群よりも、発酵終了時の最終到達 pH が有意に低くなることを確認した。すなわち、分離由来源が動物性栄養を含むか否かによって、種内系統ごとに食品発酵適性が振り分けられる可能性が示唆された。現在は、本データについて再現性確認および精密化のための実験を進めており、ゲノム解析に基づいて分類された種内系統が表現型に差異をもたらす実際の食品発酵に影響を及ぼす具体例として、今後データを完成させる予定である。

以上の知見は、将来的にゲノム情報に基づいて *L. sakei* を最適な形で食品製造の種菌として利用するための重要な手掛かりとなると考えられた。また、菌株間での多様な性質の違いを生かすことにより、様々な新規発酵食品の開発につながる事が期待される。これらの結果の一部について、特にゲノム解析部分の成果について原著論文 1 報にまとめ投稿し、受理されている。

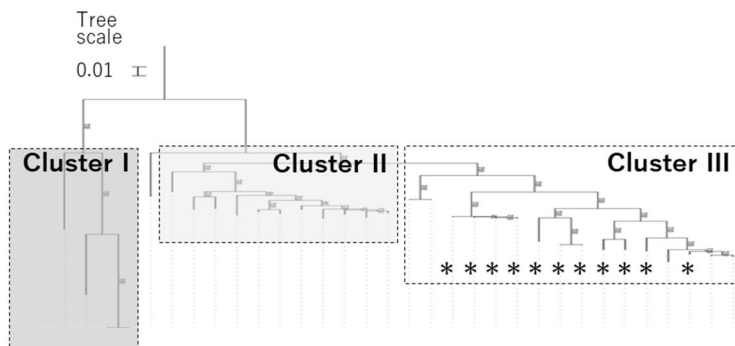


図 1 SNP 結合塩基配列に基づく全ゲノム解析により 3 つのクラスターに分かれた *Lactobacillus sakei* の種内系統

* を付した菌株群は動物性栄養源を含む原料（発酵肉およびいずし）から分離された菌株群、無印の菌株群は植物性栄養源のみからなる原料（日本酒酒母、発酵野菜など）から分離された菌株群

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Chisato Nishiyama, Suguru Sekiguchi, Yu Sugihara, Minami Nishikawa, Natsu Makita, Tenta Segawa, Momoka Terasaki, Hiroki Takagi, Takashi Koyanagi	4. 巻 42
2. 論文標題 Phylogenomic analysis in <i>Latilactobacillus sakei</i> by using polymorphisms detected by next-generation sequencing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 138-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12938/bmfh.2022-017	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山 知里, 関口 英, 杉原 優, 寺崎 桃香, 瀬川 天太, 西川 みなみ, 牧田 奈津, 小柳 喬, 高木 宏樹
2. 発表標題 多様な栄養源由来 <i>Latilactobacillus sakei</i> における種内系統分類
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会（オンライン・2022年 3月2～4日開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口 英, 西山 知里, 寺崎 桃香, 鶴貝 采映, 辻 篤史, 高木 宏樹, 小柳 喬
2. 発表標題 山麩酒母における乳酸桿菌 <i>Latilactobacillus sakei</i> の代謝・生育特性評価および優勢化要因の探索
3. 学会等名 第16回日本ゲノム微生物学会年会（オンライン・2022年 3月2～4日開催）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

HP記事「新たな解析手法で、乳酸菌の系統を明らかにしました」(石川県立大学・研究トピックス欄)
<https://www.ishikawa-pu.ac.jp/staff/achievement/2114/>

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
研究分担者	高木 宏樹 (TAKAGI Hiroki) (80616467)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授 (23303)	

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
---------	---------