

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450180

研究課題名(和文)食品製造用乳酸菌のストレス耐性生存機構の解明

研究課題名(英文) Studies on lactic acid bacteria containing hydroxyl fatty acid having tolerance against stress conditions

研究代表者

金内 誠 (Kanauhi, Makoto)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：70404845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「ヒドロキシ脂肪酸類」生成による乳酸菌の抗ストレス効果を明らかにすることを目的とした。まず、ヒドロキシ化能の高いL. sakei Y20と、L. sakei標準株とのヒドロキシ化活性について検討した。Y20株は、標準株と比較し、4倍以上強い酵素活性を示し、アルコール、pH、銅イオン、鉄イオンによるストレス条件下でも生存率が高かった。また、ヒドロキシ化に関わる酵素の遺伝子破壊を行い、その存在意義について検討した。ストレス耐性は減少し、膜輸送タンパク質の発現や脂肪酸代謝遺伝子の発現も低下した。これによりヒドロキシ化酵素は、耐ストレス耐性に関わる細胞膜代謝に関わると推察された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to clarify that lactic acid bacteria which contain hydroxyl fatty acid have tolerance against stress conditions. Lactobacillus sakei Y-20 strain with ability to hydroxylate fatty acid and a standard strain of L. sakei were used for this study. First, their fatty acid hydroxylase was assayed. The Y-20 strain activity was found to be four times higher than that of standard L. sakei bacteria. Furthermore, the ratio of survival of Y-20 strain under stress caused by alcohol, pH, and metal ions was found to be higher. After the strain-related fatty acid hydroxylase gene was prepared, its effects were investigated. Results show that the hydroxylase decreased tolerance against stress, and that the respective expressions of cell membrane transporter proteins and metabolisms of fatty acid were decreased also. We infer from the results that the fatty acid hydroxyl supports stress tolerance.

研究分野：発酵・醸造学

キーワード：乳酸菌 ヒドロキシ脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* は、脂肪酸構造の一部が水酸化基 (-OH) に変換した構造を持つヒドロキシ脂肪酸を経て、共役脂肪酸へと変換される¹⁾。ところが、腐造菌汚染していないウイスキーもろみの中では、ある種の乳酸菌が脂肪酸をヒドロキシ脂肪酸へ変換し、共役脂肪酸を経ず、最終的に酵母により香気性ラクトンへと変換されると報告している²⁾。

これまで申請者らは、ヒドロキシ脂肪酸高生産乳酸菌を自然界から分離・スクリーニング(2012年度発酵研究所研究助成金)した。低温や低 pH、高アルコール条件の泡盛もろみや清酒酒母などから、ヒドロキシ脂肪酸を高生産・蓄積できる乳酸菌類を多く分離した。さらに、これらの乳酸菌と酵母と組み合わせた桃やトロピカルフルーツ香(ノナラクトン)高生産法を確立した。分離株 Y-20 は、オレイン酸(18:1)を含む培地中で、ヒドロキシ脂肪酸変換効率が約 90%以上と高く、香気性ラクトン変換率も既知の3倍以上であった(日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨)。このように、ラクトンへの変換や共役脂肪酸への変換に関する検討は進んできているが、ストレス条件下培養でのヒドロキシ脂肪酸蓄積や乳酸菌への抗ストレス性についての研究はない。さらにヒドロキシ脂肪酸が微生物にもたらす影響もわかっていない。

2. 研究の目的

一般的に乳酸菌は、低 pH 条件下などのストレス条件下で培養することにより、細胞膜構成脂肪酸中の不飽和脂肪酸濃度を変化させることで耐性を得ると報告した³⁾。また、乳酸菌のアルコール耐性獲得機構において、*Oenococcus oeni* は、細胞膜の流動性を減少させることで細胞膜の浸透性を調整することを報告した⁴⁾。さらに、*Lactobacillus homohiochi* は、アルコールストレス条件下では、C₁₄、C₁₆、C₁₈の直鎖脂肪酸、モノ不飽和酸および C₁₇、C₁₉のシクロプロパン酸や

C₂₀ から C₃₀ に至る高度直鎖飽和酸を蓄積し、膜の厚さ、および膜の疎水性領域を増大させることで耐性を示すことが知られている。しかし、これらヒドロキシ脂肪酸の菌体への抗ストレス性に関する報告はない。

本研究では、食品の製造に利用される乳酸菌のヒドロキシ脂肪酸におけるストレス耐性作用を明らかにする。つまり酒類もろみやピクルス製造のように、低温や低 pH、高アルコールのストレス環境下でどのように乳酸菌がストレス耐性を獲得し、生存するかを明らかにする。このようなことから乳酸菌を含む微生物は抗ストレス因子を生産し、極限条件下の生育が可能となると考えられる。また、これら技術を応用することで、腸内でも生き続けることができる乳酸菌の開発に利用し、プロバイオティクス応用の一助になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

Lactobacillus sakei Y-20 および *L. sakei* NRIC1071 を用いた。

(2) 遺伝子カセットを用いた脂肪酸ヒドロキシ化酵素の欠損

FAHase 遺伝子を含んだ pUC-fah の調製は定法に従った。まず、*L. sakei* Y-20 株から抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、KOD-Plus-Neo を使用した PCR 法によって増幅した。Primer は、Hin FAH F2

(5'-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3')及び Hin FAH R2 (5'-AAAGGAGGTGATCCAG CC-3')を用いた。PCR 産物は、制限酵素 Hind

処理後、0.4%アガロースゲルで、電気泳動し、ゲル上のバンドを切り出し、抽出・精製後にインサート DNA とした。さらに、pUC19 プラスミドを含む *E. coli* DH5 α を培養し、プラスミドを回収した。このプラスミドを Hind 処理後、脱リン酸化、電気泳動を経て、ベクター DNA とした。調製したインサート DNA およびベクター DNA を DNA Ligation

Kit を用い、ライゲーションした。このベクターをヒートショック法により *E.coli* DH5 α へ形質転換させ、アンピシリン耐性を持ち、

ガラクトシダーゼを持たない株からプラスミド pUC-fah を得た。

(3) ネオマイシン耐性遺伝子を含んだ遺伝子カセットの調製

pUC-fah を含む *E. coli* DH5 α を培養し、pUC-fah を抽出、精製した。これを制限酵素 Nhe および Xho 処理を行い、ベクター DNA とした。また、ネオマイシン耐性遺伝子 (Neomycin Selection Cassette) をテンプレート DNA とし、Primer ; Nhe-BstP f(5'-CATTGCTAGCAGCAGC ACGT-3') および Xho-neoR (5'-ATTTCTCGAGGAGCGC GCCG -3') を用いて、PCR 法によって増幅した。増幅した DNA は、Nhe および Xho

処理後、脱リン酸化、電気泳動、抽出、精製を経て、インサート DNA とした。これらベクター DNA とインサート DNA をライゲーションさせた。このベクターをヒートショック法により *E.coli* DH5 α へ形質転換させ。

(4) ネオマイシン耐性遺伝子を含んだ遺伝子カセットによる Y-20 株への形質転換

L.sakei Y-20 株の形質転換は、Russell ら⁵⁾ および Mason ら⁶⁾ の方法に従った。ネオマイシン耐性遺伝子を含んだベクター(pUC-fah::Neo)を electroporation buffer で洗浄した Y-20 株菌体へ、エレクトロポレーション (600 V, 25 μ F, 600)法により導入した。その後、10 ml の 10 mM CaCl₂ を含む MRS 培地に加え、回復培養後、MRS 寒天培地(1.5 % agar, 100 μ g/ml neomycin 含有)に適量塗抹し、30 で 24 時間培養した。得られたコロニーを FAHase 欠損株とした。

(5) 培養方法

各脂肪酸は 1.0 % BSA に溶解後、シリンジフィルター (0.45 μ m)にて処理後に 121 、15 分間滅菌した YP 基本培地 (0.5 % Yeast extract, 0.5 % Peptone solution)に最終濃度 0.1 % となるように加え、YP-脂肪酸培地

とした。各菌株は MRS 培地で培養後に生理食塩水で洗浄した。これを 10⁷ cell/mL となるように YP-脂肪酸培地へ接種した。

(6) 各ストレス条件下での培養

pH 2.0 ストレス条件

0.5M HCl を用いて pH 2.0 に調製した YP-脂肪酸培地を用いて、各株を上記同様に培養した。対照として、脂肪酸無添加とした。

エタノール

10 ~ 15 %エタノールとなるように YP-脂肪酸培地に添加し、上記同様に培養した。対照は、脂肪酸無添加とした。

金属イオン

1 mM CuSO₄ · 5H₂O および FeCl₃ · 6H₂O を YP-脂肪酸培地に添加し、上記同様に培養した。対照は、脂肪酸無添加とした。

(7) 乳酸菌成分の分画方法

乳酸菌成分の分画方法は、口分田⁷⁾に従った。すなわち、菌体を回収し、リゾチーム処理後、遠心分離し、得られた上清を細胞壁画分とした。沈殿物は、リン酸緩衝液 (pH 7.0) でバーストさせ、さらに遠心分離し、上清を細胞質、沈殿部を細胞膜画分とした。

(8) 粗酵素液抽出方法

湿菌にリン酸緩衝液 (pH 7.0)および湿重量と等量のガラスビーズを添加し、Bug Crasher GM-01(タイテック社)を用いて菌体を破碎した。破碎後、遠心上清を粗酵素液とした。

(9) ヒドロキシ化酵素活性測定方法

20 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0)中に 0.8 μ M NADH、25 %ジメチルスルホキシド (DMSO)、160 μ M オレイン酸を含む溶液 80 μ l に酵素液 20 μ l を添加し、30 で反応させ、A₃₄₀ を測定した。酵素 1 ユニットの、1 分間に 1 mM NADH の減少量させる量とした。

(10) 脂肪酸抽出方法

Bligh-Dyer 法で脂肪酸の抽出を行い、Trimethylsilyimidazole にてトリメチルシリル化させた後、ヘキサンに脂肪酸を溶解させ、

GC/MS に供した。

(11) GC/MS 分析

GC/MS 分析は、定法に従った。GC/MS -QP2010 (島津製作所) を使用し、カラムは HP-5 を使用した。

(12) 乳酸菌生存率の測定

各培地条件で静置培養し、菌体に 1 mM CTC (5-Cyano-2, 3-ditoly-2H-tetrazolium chloride) 溶液を加え、励起波長 450 nm および蛍光波長 600 nm における蛍光強度を測定した。

(13) rt-PCR 解析

トータル RNA 抽出キットを用い、菌体からトータル RNA 抽出させた。cDNA 合成は、PrimeScript RT reagent Kit を用いた。ハウスキーピング遺伝子は 16rRNA とした。

4. 研究成果

L.sakei Y-20 を相対活性 100 % とした。

L.sakei NRIC1071 は、相対活性が 22.5 % と Y-20 株は 4 倍以上高い活性を示した。一方、Y-20 の FAHase の欠損株においては、ほとんどヒドロキシ化酵素の活性は確認されなかった (データ未提示)。また、*L. plantarum* でも活性は確認されなかった (データ未提示)。

これらの FAHase は *L.sakei* の特有の活性であり、特に Y-20 株は活性が高いことが確認された。

つぎに、定法に従い *fah* にネオマイシン耐性遺伝子を導入したベクター (pUC-*fah*::Neo) を構築した。これを Y-20 株に遺伝子導入し、相同組み換えによる FAHase 遺伝子の欠損を行った。FAHase 欠損株 (Δ *fah*) の活性が低く、欠損していることが確認できた。

つぎに、各株の各細胞画分に蓄積するヒドロキシ脂肪酸である 10-ヒドロキシステアリン酸の量を、脂肪酸構成比で示した (Fig.1)。

各株では細胞膜に多くのヒドロキシ脂肪酸が蓄積していた。Y-20 株をオレイン酸で培養させたときの細胞膜に多くのヒドロキシ

脂肪酸が蓄積し、構成脂肪酸の 68 % を占めた。

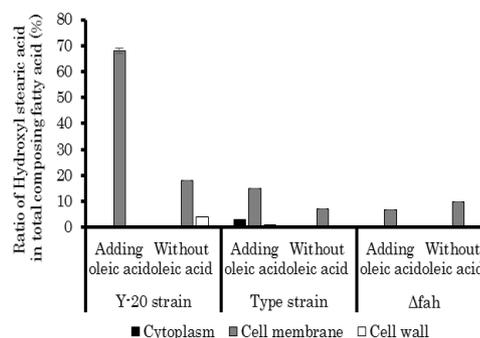


Fig.1 各菌株の部位によるヒドロキシ脂肪酸蓄積

また、オレイン酸を含まない条件下で培養した Y-20 株は 18 % であった。標準株をオレイン酸で培養させたところ、構成脂肪酸の 15 % を占めた。一方、オレイン酸を含まない条件下で培養したところ、標準株は 7 % であった。

FAHase を欠損させた株では、オレイン酸を含む条件下で培養したもの、含まない条件下で培養したものともに細胞膜には約 7~10 % 前後のヒドロキシ脂肪酸が検出された。上記の FAHase 活性は検出できなかったことから、乳酸菌の株に何らかのヒドロキシ脂肪酸の合成経路があるのかと考えられた。

次に各ストレス条件下における乳酸菌の生存率を Fig.2 に示した。

生存率のコントロールは、脂肪酸無添加培

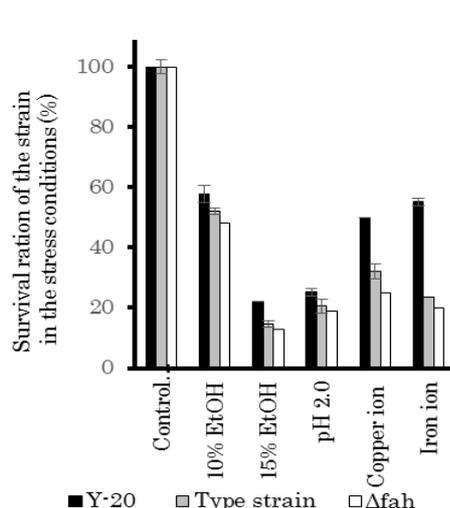


Fig.2 各ストレス条件下での各菌株の生存率

地にて 15、48 時間培養して得られた懸濁液の蛍光強度とした。10 %アルコール条件下における Y-20 株の生存率は 57.9 %であった。また、15 %アルコール条件下における Y-20 株の生存率は 22.1 %、pH2 条件では 25.2 %、pH10 条件では 52.5 %、Cu²⁺条件では 50.0 %、Fe²⁺条件では 55.1%であった。

L.sakei 標準株の生存率は、10 %アルコール条件下では 48.6 %、15 %アルコール条件下では 14.6 %、pH 2 条件では 10.0 %、pH 10 条件では 31.1 %、Cu²⁺条件では 32.7 %、Fe²⁺条件では 23.6 %の生存率であった。FAHase 欠損株の各ストレス条件下での生存率は、低いものであった。

FAHase が低い標準株や FAHase 欠損株 (*fah*)は、Y-20 より生存率が低く、この結果より抗ストレスから *L.sakei* を守るために、細胞膜中にヒドロキシ脂肪酸を蓄積させたのではないかと考えられた。

Y-20 株の 16sRNA の発現量をハウスキーピング遺伝子とし、30 における FAHase 遺伝子の発現比を 1.0 としたときの、各条件下の Y-20 株の FAHase 遺伝子発現比を Fig.3 に示した。

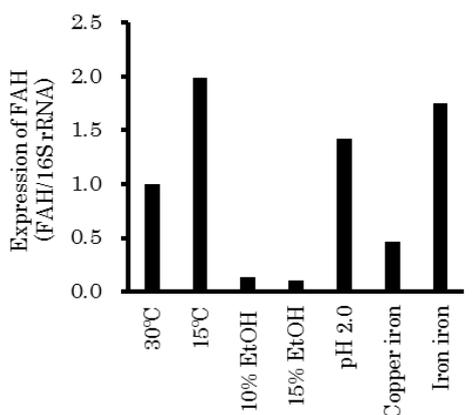


Fig.3 各ストレス条件下での *fah* 発現量

その結果、15 で培養したところ、FAHase 遺伝子発現比は 30 の 2 倍であった。一方、エタノール、銅イオンストレスによっては発現量が低かった。pH 2.0 条件下では 1.5 倍、鉄イオン存在下では 1.8 倍と高か

った。

これまで、オレイン酸からヒドロキシ脂肪酸への変換について、15 条件下で培養した菌株は、30 条件下で培養した場合よりも、変換率が高いと報告されている。また、本結果でも、膜蓄積量も高く、発現量が高い結果と一致した。一般に *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* は低温条件下でコールドショックプロテインの発現が低温により誘導される。

ストレス耐性を得るためにオレイン酸を 10-ヒドロキシ脂肪酸などのヒドロキシ脂肪酸へ変化させたのではないかと推察された。

pH 2.0 条件下で培養させたときの、関連タンパクの発現量を検討した。pH 2.0 に調製した培地で培養時、FAHase のハウスキーピング遺伝子である 16sRNA の発現量に対する発現比を 1.0 とし、各タンパク質遺伝子発現量を Fig.4 に示した。

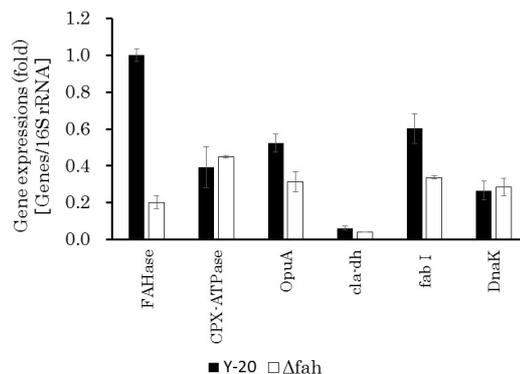


Fig.4 FAHase の有無による各代謝遺伝子発現量

重金属輸送に関わる CPX-ATPase、膜輸送タンパク質である OpuA、水酸化脂肪酸デヒドロゲナーゼ (cla-dh)、脂肪酸代謝遺伝子である fab、膜酵素である温度ショック発現タンパク質である DnaK の発現量について検討した。Y-20 の CPX-ATPase は 0.39 倍、OpuA は 0.52 倍、cla-dh は 0.06 倍、fab は 0.60 倍、DnaK は 0.27 倍の遺伝子発現比を示した。一方、ヒドロキシ化酵素欠損株においては、それぞれ FAHase は 0.20 倍、CPX-ATPase は 0.45 倍、OpuA は 0.31 倍、

cla-dh は 0.04 倍、fab は 0.34 倍、DnaK は 0.29 倍の遺伝子発現量を示した。一方、cla-dh は、低く共役脂肪酸生成能が低い株であるという結果と一致した。

以上のことより、ヒドロキシ化酵素の発現は、ストレス環境が影響し、ストレス耐性に関与していると考察された。

参考文献

- 1) Ogawa et al. *Appl. Environ Microbiol* 67, 1246-1252 (2001) and *J. Biosci. Bioeng*, 100 (4), 355-364, 2005
- 2) 鰐川：醸協、98、241-250、2003
- 3) Rani P. S and Agrawal R. *Food Biotechnol.*, 22 (1-2), 47-63, 2008
- 4) Da Silveira MG et al. *Appl Environ Microbiol* 69: 5826-32, 2003
- 5) Russell WM and Klaenhammer TR. *Appl Environ Microbiol.*, 67, 4361-4364, 2001
- 6) Masona CK et al. *J Microbiol Methods*, 60 353- 363, 2005
- 7) 口分田晃：岡山医学会雑誌, 96, 7-8, 1984

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suzuki Y., Matsuda M., Hatanaka S., Kanauchi M., Kasahara S., Shimoyamada M. Cloning and Sequence Analysis of Fatty Acid Hydroxylase Gene in *Lactobacillus sakei* Y-20 Strain and Characteristics of the Fatty Acid Hydroxylase. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 74 (1) 77-84, 2015. 共著, 査読付

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 長田彩加 金内誠 石田光晴; 乳酸菌の脂肪酸取り込みによる抗ストレス作用について, 日本農芸化学会 2015 年大会(岡山大学: 岡山県岡山市), 平成 27 年 3 月 28 日

近藤彩夏 長田彩加 金内誠 石田光晴;
Lactobacillus sakei Y-20 株中の脂肪酸ヒドロキシラーゼの役割に関する研究, 日本農芸化学会 2016 年大会(札幌コンベンションセンター: 北海道札幌市), 平成 28 年 3 月 30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金内 誠 (KANAUCHI, Makoto)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号: 70404845