

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05923

研究課題名(和文) 運動性乳酸菌の選択分離に向けた基盤構築とその応用：植物防除への新展開

研究課題名(英文) Development of a basis for the selective isolation of motile lactic acid bacteria and its application: a new approach to plant pest control

研究代表者

乙黒 美彩 (OTOGURO, Misa)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：20635099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌のうち運動性を有する(以下、運動性乳酸菌)のはごく一部の菌群に限られる。分離が困難なこと、分布密度が低いことなどにより、運動性乳酸菌の産業利用は進んでいない。本研究ではこれらの菌群の選択分離法を構築し、環境中での分布を解析するとともに、運動性乳酸菌の新たな活用法として植物病害菌に対する抗菌活性を調査した。選択分離法として化学走性を利用した毛細管捕集法とマルチウェルプレート法を考案し、これらの方法を用いて、我が国においてはブドウ果汁中からの報告例のない*L. nagelii*を分離した。運動性乳酸菌の抗菌活性試験ではジャガイモ疫病菌に対して抗菌活性を有する菌株があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で分離報告例のない新規乳酸菌を取得することができ、細菌分類学に寄与することができた。運動性乳酸菌の一部に植物病原菌に対する抗菌活性が見出され、新規利用技術を確立するための一助となった。本研究で採用した毛細管捕集法やマルチウェルプレート法は乳酸菌の分離に応用した例はなく、誘引剤との組み合わせにより、多様な乳酸菌が取得できる可能性が残されている。以上のことから本研究課題により運動性という大きな特徴をもつ乳酸菌を効率よく分離し、新規性および革新性の非常に高い微生物農薬の開発に至る一貫した研究の基盤を形成できたと考える。

研究成果の概要(英文)：A small group of lactic acid bacteria have motility (hereinafter referred to as motile lactic acid bacteria). The industrial use of motile lactic acid bacteria has not been advanced due to the difficulty of isolation and low distribution density. In this study, we developed a selective isolation method for these groups of bacteria, analyzed their distribution in the environment, and investigated their antimicrobial activity against plant diseases as a new application of motile lactic acid bacteria. Capillary collection method using chemotaxis and multi-well plate method were devised as selective isolation methods, and using these methods, *L. nagelii*, which has never been reported from grape juice in Japan, was isolated. Antimicrobial activity tests of motile lactic acid bacteria revealed that some strains had antimicrobial activity against potato plague fungi *Phytophthora infestans*.

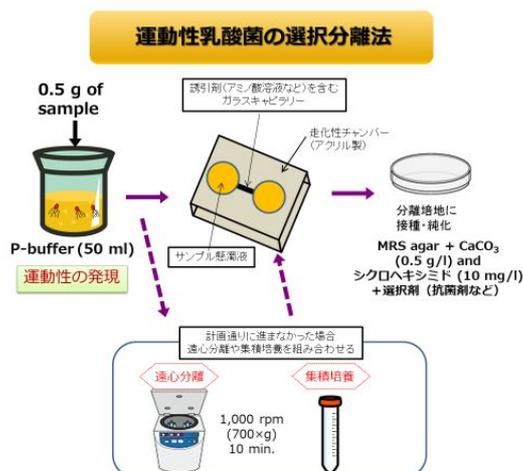
研究分野：応用微生物学

キーワード：運動性乳酸菌 分離 抗菌活性 *fliG*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌のうち運動性を有する(以下、運動性乳酸菌)のはごく一部の菌群に限られる。また分離が困難なこと、分布密度が低いことなどにより、運動性乳酸菌の産業利用は進んでいない。そこで、本研究ではこれらの菌群の選択分離法を構築し運動性乳酸菌の新たな活用法として低炭素社会の実現へ向けた環境浄化や環境保全型農業への応用を検討することを目的とする。具体的には(1)自然界や発酵食品から運動性乳酸菌を効率的に分離する方法を構築すること、(2)自然界における運動性乳酸菌の分布と多様性を解明すること、(3)運動性乳酸菌が生成するバクテリオシン生産性などの有用形質を明らかにすることに焦点を絞り、運動性乳酸菌の新規利用技術として農業分野への応用に向けた基盤を形成する。



2. 研究の目的

本研究では低炭素社会の実現へ向けた環境浄化や環境保全型農業に運動性乳酸菌を活用するために、最重要課題として運動性乳酸菌の選択分離法を構築することを目的とする。開発した方法を様々な分離源試料に適用し自然界から運動性乳酸菌を分離する。取得した分離株の多様性を解明し、系統関係と分離源の植生さらには運動性との関連性を明らかにする。また、運動性乳酸菌が生成するバクテリオシンや植物病原菌に対する拮抗作用などの有用形質を明らかにすることで、運動性乳酸菌の新規利用技術として農業分野への応用に向けた基盤を形成する。

3. 研究の方法

(1) 運動性乳酸菌の選択分離法の開発

運動性既知の基準株である *L. nagelii* JCM 12492^T および *L. ghanensis* JCM 15611^T を用いて、アミノ酸 11 種類、香気成分を含む有機化合物 29 種類、酵母エキス、リン酸緩衝液など 42 種類の試験化合物に対する走化性を試験した。有効性が認められた化合物に対して毛細管を用いた分離方法(毛細管捕集法)およびマルチウェルプレート法を利用して、ワイン醗、ブドウ果汁、湖水から運動性乳酸菌の分離を試みた。

(2) PCR を用いたサンプル評価方法

山梨県内の湖や池 6 か所から水を採取し、100 mL ずつ 4 枚のメンブレンフィルター(ADVANTEC, φ0.20)を用いて吸引ろ過を行った。各フィルターを 4 等分にし、シカジーニース DNA 抽出試薬 ST (関東化学株式会社)を用いてサンプル中の DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。運動性乳酸菌の *flgG* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、サンプル中の運動性乳酸菌の存在を解析した。

(3) 乳酸菌の有用性評価試験

運動性乳酸菌の既知株および分離株についてジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* に対する抗菌活性を重曹法にて調査した

(4) 新規選択分離法を利用した運動性乳酸菌の特徴づけ

毛細管捕集法で分離された運動性乳酸菌 14 株について、細胞壁アミノ酸組成を薄層クロマトグラフィーにより分析した。また、PCR により運動性関連遺伝子の確認、軟寒天培地培養法による運動性の確認を行った。

4. 研究成果

1) 運動性乳酸菌の基準種 *L. nagelii* JCM 12492^T および *L. ghanensis* JCM 15611^T について様々な試験化合物に対する走化性を調査した。その結果 *L. nagelii* JCM 12492^T においてはフェネチルアルコール、*L. ghanensis* JCM 15611^T においてはメチオノール及びイソブチルアルコールに走化性を示すことを明らかにした。これらを誘引剤としてワイン醗、ブドウ果汁を分離源として、毛細管捕集法を用いて分離を試みたところ、運動性乳酸菌分離株 14 株を得た。これらは 16S rRNA 塩基配列解析の結果からすべて *L. nagelii* と同定された。

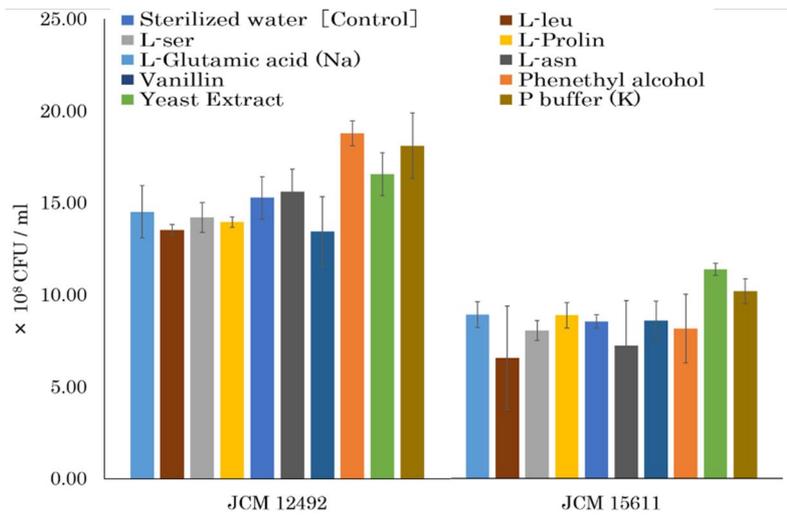


図 1 *L. nagelii* JCM 12492^T および *L. ghanensis* JCM 15611^T の各試験化合物に対する化学走性

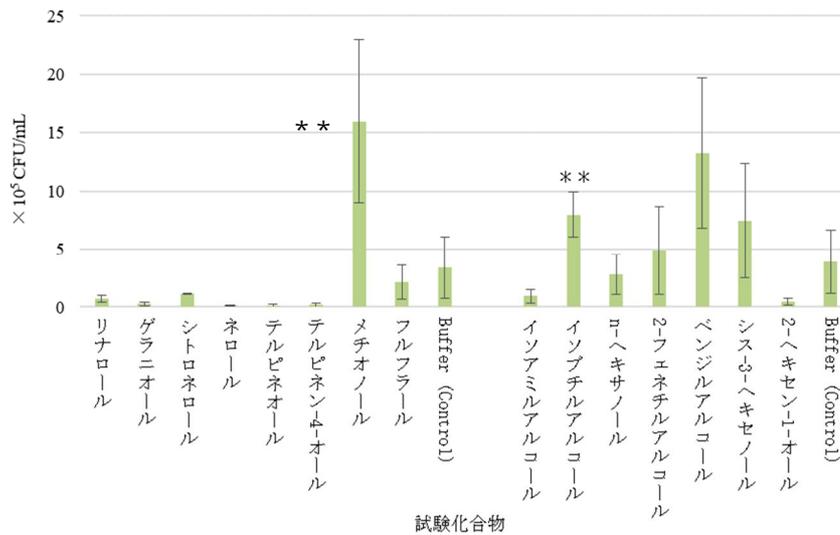


図 2 *L. ghanensis* JCM 15611^T の各試験化合物に対する化学走性 試験区 2:テルペノール類・メチオノール・フルフラール、および試験区 3:アルコール類 (n = 3) (** P < 0.01、t-test)

表 1 運動性乳酸菌分離株の同定結果

Serial culture No.	Sample No.	Species	Sequence identity (%)
18MFCH2f-4	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.66
18MFCH2f-5	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.87
18MFCH2w-5	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.93
18MFCH2w-8	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.8
18MFCH2w-9	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.66
18MFCH2w-10	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.93
18MFCH2y-1	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.93
18MFCH2y-2	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.93
18MFCH2y-3	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.93
18MFCH2y-4	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.66
18MFCH2y-5	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.86

18MFCH2y-6	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.86
18MFCH2y-10	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.87
18MFCH2y-11	18MFCH2	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	99.93

2) 分離頻度を向上させるため、サンプル中の運動性乳酸菌を検出する方法として *fliG* 遺伝子を利用した方法を検討した。運動性乳酸菌の既知種 6 株(うち 1 株は弱運動性)と非運動性乳酸菌既知種 1 株の計 7 株を使用し、PCR 条件の検討を行った。さらに、同じ 7 株に対し軟寒天培養試験を行い、遺伝子の有無と運動性の発現を比較した。PCR 試験の結果 7 株中 5 株で遺伝子の増幅が確認された。5 株はすべて運動性既知種であり、5 株のうち 4 株は目的の遺伝子が増幅した。目的遺伝子の増幅が確認された 4 株のうち 3 株は軟寒天培地培養試験において運動性の発現が確認できた。このことから PCR 試験を行うことでサンプル中の運動性乳酸菌の有無が確認できる可能性が示唆された。また、目的遺伝子の増幅が確認されたが運動性を発現しなかった株があり、一部の運動性の発現に条件を要する種・株がいることが示唆された。

運動性乳酸菌 *fliG* 遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR 試験を 2020 年にサンプリングした山梨県内の湖・池の水 6 サンプルに対して行った。6 サンプル中 4 サンプルで運動性乳酸菌が存在している可能性が示された。300 bp 付近の PCR 産物についてクローニングを行い、塩基配列解析を行った結果、*L. vini*, *L. ghanensis* の運動性オペロンと高い相同性を示した。これら 4 サンプルを 2 回集積培養にかけ、培養物の PCR 試験を行い目的遺伝子の増幅が確認できた培養物 5 サンプルを用いてマルチウェルプレート法で分離を行った。しかし、いずれのサンプルからも乳酸菌を分離することはできなかった。今後サンプルから運動性乳酸菌を分離するために、他の運動性既知種を用いた誘引剤の選抜試験の実施、集積培養物の PCR 試験の実施日の検討などを行う必要があると考えた。

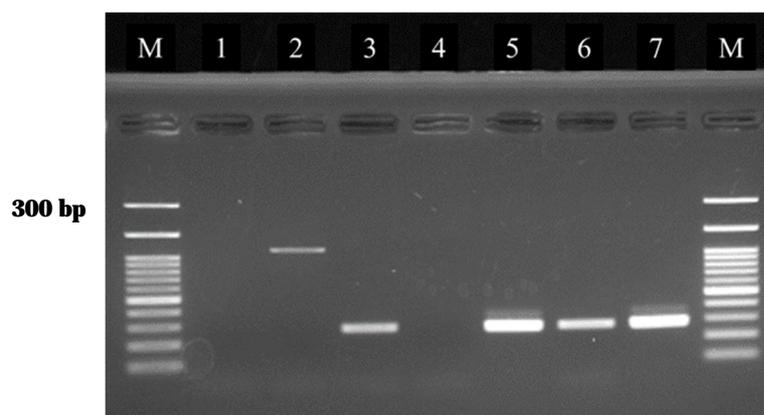


図 2 *fliG* 遺伝子の PCR による増幅産物

M : 100 bp DNA マーカー、1 : *L. plantarum* NBRC 15891^T, 2 : *L. nagelii* JCM 12492^T, 3 : *L. curvatus* NBRC 15884^T, 4 : *L. mali* NBRC 102159^T, 5 : *L. satsumensis* JCM 12392^T, 6 : *L. ghanensis* JCM 15611^T, 7 : *L. vini* JCM 14280^T

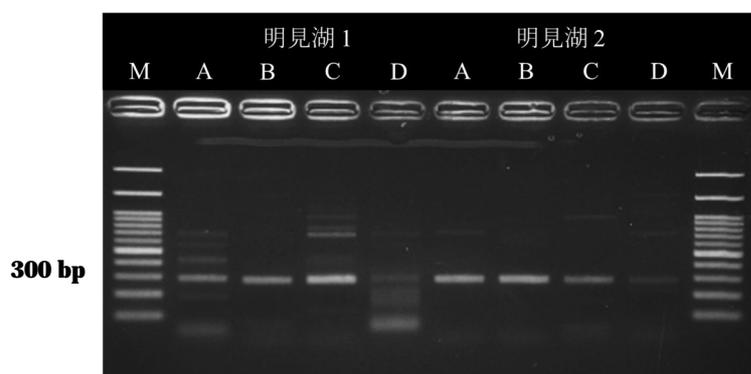


図 3 サンプル中における *fliG* 遺伝子の PCR による増幅産物

M : 100 bp DNA マーカー、明見湖 1 と明見湖 2 の結果。各サンプル吸引る過に使用したフィルターを 4 等分してそれぞれ A,B,C,D とした。

3) 毛细管捕集法で分離された運動性乳酸菌に対して細胞壁アミノ酸分析、PCR 試験による *fliG* 遺伝子の確認、軟寒天培地培養試験による運動性発現の確認を行った。細胞壁アミノ酸分析の結果運動性乳酸菌分離株すべてが *meso*-型のジアミノピメリン酸を含んでいるとわかった。

既知の運動性乳酸菌株の多くが *meso*-型をもつとされていることから同様の特徴であることが分かった。**PCR** 試験の結果、目的の遺伝子と長さの異なる増幅産物が確認された。今後さらなる条件検討が必要であると考えた。軟寒天培地培養試験の結果より、すべての株で運動性の発現が確認された。

4) 毛細管捕集法で得られた運動性乳酸菌分離株および既知株を用いて、ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* に対する抗菌活性を調査したところ、*L. nagelii* JCM 12492^T が強い抗菌活性を示した。以上のことから運動性乳酸菌の新規利用技術として農業分野への応用の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 真崎志桜里、田中悠二、柳田藤寿、乙黒美彩
2. 発表標題 運動性乳酸菌の選択分離法の構築と環境中からの分離
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中悠二、柳田藤寿、乙黒美彩
2. 発表標題 運動性乳酸菌の選択分離法の構築
3. 学会等名 日本生物工学会2018年大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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