

博士論文

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 の特性と
その多成分バクテリオシンに関する研究

**Characterization of *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6
and the multiple bacteriocins**

熊本県立大学大学院 環境共生学研究科 環境共生学専攻

食品バイオ工学研究室

河原 あい

2021 年度 (2022 年 3 月)

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 の特性と その多成分バクテリオシンに関する研究

目次

	頁
第一章 序論	1
1-1 はじめに	2
1-2 乳酸菌について	3
1-3 プロバイオティクスについて	5
1-4 バイオプリザベーション	6
1-5 乳酸菌が生産するバクテリオシン	7
1-6 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> とその菌種が生産するバクテリオシン	11
1-7 研究目的	16
第二章 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6 の特性	18
2-1 緒言	19
2-2 実験操作	20
2-2-1 使用菌株および使用培地	20
2-2-2 耐塩性試験	21
2-2-3 乳酸生産量	21
2-2-4 胃酸耐性試験	22
2-2-5 胆汁酸耐性とコレステロール吸収・吸着作用試験	23
2-3 結果および考察	26
2-3-1 <i>L. plantarum</i> PUK6 の耐塩性	26
2-3-2 <i>L. plantarum</i> PUK6 の乳酸生産	26
2-3-3 胃酸耐性の評価	27
2-3-4 胆汁酸耐性とコレステロール吸収・吸着作用	31
2-4 小括	32
第三章 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6 が生産するバクテリオシンの精製	33
3-1 緒言	34
3-2 実験操作	35
3-2-1 使用菌株および使用培地	35
3-2-2 バイオアッセイ	36
3-2-3 培養条件の検討	36
3-2-4 バクテリオシンの生産	36
3-2-5 硫安沈殿（塩析）	37
3-2-6 透析（脱塩）	37
3-2-7 Sep-Pak Plus tC18 によるバクテリオシンの粗精製	38
3-2-8 逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）	38

3-2-9	Tricine-SDS-PAGE およびゲルのバイオアッセイ	39
3-2-10	タンパク質の定量	39
3-2-11	構造解析	40
3-3	結果および考察	41
3-4	小括	52
第四章	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6 が生産するバクテリオシンの生合成 関連遺伝子群 (<i>pln</i> locus) の同定および機能解析	54
4-1	緒言	55
4-2	実験操作	56
4-2-1	使用菌株およびプラスミド	56
4-2-2	菌株の保存	56
4-2-3	Plantaricin A、EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子のクロー ニング	56
4-2-4	Plantaricin A、EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子座の決定	58
4-2-5	PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (<i>pln</i> locus) のクロー ニング	59
4-2-6	プライマーウォーキング	62
4-2-7	<i>pln</i> locus 上遺伝子の機能解析	65
4-3	結果および考察	66
4-3-1	Plantaricin A、EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子の塩基配 列の決定	66
4-3-2	Plantaricin A、EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子座の決定	66
4-3-3	PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (<i>pln</i> locus) の決定	69
4-3-4	<i>pln</i> locus 上遺伝子の機能解析	72
4-4	小括	75
第五章	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6 の <i>pln</i> locus 上に存在する機能不明遺 伝子 (<i>orf1</i> および <i>orf2</i>) の機能解析	77
5-1	緒言	78
5-2	実験操作	79
5-2-1	使用菌株	79
5-2-2	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6 の total RNA の抽出	80
5-2-3	RT-PCR	83
5-2-4	Orf1 および Orf2 の化学合成ペプチドの調製	85
5-2-5	抗菌活性試験	85
5-2-6	作用機序	85
5-3	結果および考察	88
5-3-1	<i>orf1</i> および <i>orf2</i> の発現解析	88
5-3-2	抗菌活性試験	91

5-3-3	作用機序	91
5-4	小括	95
第六章	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの 抗菌スペクトル	96
6-1	緒言	97
6-2	実験操作	98
6-2-1	使用菌株	98
6-2-2	化学合成ペプチドの調製	98
6-2-3	抗菌活性試験	99
6-3	結果および考察	100
6-4	小括	103
第七章	総括	104
	引用文献	111
	Appendix	124
	Appendix-1 使用培地	125
	Appendix-2 Protocols	128
	謝辞	146

第一章

序論

1-1 はじめに

食品は、私たちが生命活動を維持する上で欠かすことのできない栄養源であり、「安全・安心に食べることができる」ことが必須条件で挙げられる。また、内閣府食品安全委員会が毎年行なっている、「食品の安全性に関する意識等について」の令和2年度（2020年度）の調査結果において、モニター357名のうち83.2%の方が「有害微生物（細菌等）、ウイルス等による食中毒」に対して、「とても不安を感じる」または「ある程度不安を感じる」と回答している¹⁾。このことから、食品の安全性を担保する上で微生物制御技術が最優先事項である。その方法として代表的なものに、加熱殺菌・放射線照射・塩蔵・糖蔵などが挙げられる²⁾。主に用いられる方法は加熱殺菌であるが、熱により食品の味や風味に影響を与えること、また生鮮食品に応用できないことから、加熱の代替技術として食品添加物が作り出され、令和3年1月時点では、指定添加物（472品目）、既存添加物（357品目）、天然香料および一般飲食物添加物が登録されている³⁾。

一方で、消費者の健康志向の高まりから、食品添加物は避けられ、自然由来な原材料のみを用いた商品が要望される傾向にある。しかしながら、現代社会における忙しさや食品価格（特に野菜や果物）の高騰により、調理済み食品・レトルト食品などの需要も拡大し、味・風味の均一化や保存性を高めるために食品添加物が使用されるといふ一見背反した状況が、現在の食を取り巻く環境で起こっている。ゆえに、食生活における利便性の向上と、栄養や品質などの食品価値やその安全性との両側面において食品保存（保蔵）が非常に重要となってくる⁴⁾。

このような傾向から、近年、天然由来の食品保存技術としてバイオプリザベーションが注目されてきた⁵⁾。バイオプリザベーションとは、「植物、動物および微生物起源の抗菌性物質で、何らの害作用なしに食品として長期間食べられてきたもの（バイオプリザバティブ）を用いて食品を保存する技術」と定義される。日本において、古くからこの手法を用いた食品保存は行われており、各地域で伝統的に受け継がれてきた発酵食品などがその代表例である。私たちは発酵食品を古くから摂取しており、その食経験の豊富さから、バイオプリザバティブの安全性を確立してきた。乳酸菌は発酵食品中に見られる安全な微生物の一つである。乳酸菌の生産するバイオプリザバティブの一つである、抗菌物質のバクテリオシンは、安全性の高い天然の食品保存料としての利用が期待されている。また、近年の感染症拡大によってライフスタイルが大きく変化し、免疫力や健康意識といった点から腸内環境が注目されている。そのため、生きて腸管まで到達し、宿主であるヒトに有益な効果をもたらす微生物（プロバイオティクス）を環境中から探索することも重要であり、食品への応用が期待されている。

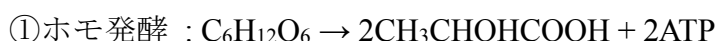
1-2 乳酸菌について

乳酸菌は炭水化物（糖類、多糖類、配糖体および糖アルコール）を含む有機培養基によく繁殖し、発酵生産物として、主として乳酸（50%以上）を生産する細菌を指す⁶⁾。この他、グラム陽性で、運動性がなく、胞子を形成せず、ブドウ糖に対しホモ発酵あるいはヘテロ発酵に従うことを条件に挙げている。さらに詳しい乳酸菌の定義を Table 1-1 に示す。

Table 1-1 乳酸菌の定義⁶⁾

-
1. グラム陽性
 2. 桿菌または球菌
 3. カタラーゼ陰性
 4. 内生胞子を形成しない
 5. 運動性を持たない（稀に若い細胞で示すものがある）
 6. 消費したブドウ糖に対し、50%以上の乳酸を産生する
 7. ビタミン B 群のうちナイアシン（niacin）を必須要求する
-

乳酸菌の代謝について詳しく述べる。乳酸菌は生育時に酸素を必要とせず、好気代謝に関わる TCA サイクルを持たない。1 mol のグルコースを代謝したとき、好気性菌の好気代謝（呼吸）では 38ATP のエネルギーが確保できるが、乳酸菌は 2ATP（ホモ発酵）か 1ATP（ヘテロ発酵）しか確保できない⁷⁾。



①ホモ発酵：*Leuconostoc* 属と一部の乳酸菌を除く全ての乳酸菌は解糖系でグルコースを分解することで 2 mol の ATP を生産する。

②ヘテロ発酵：ヘキソースリン酸経路によりグルコースを分解し、エタノール、CO₂、そして 1 mol の ATP を生産する。

加えて、乳酸菌はグルコースから乳酸を生成する過程で生命維持に必要な ATP を連続的に生成する。

上記のことより、乳酸菌が生育に必要な十分量の ATP を得るには、好気性微生物よりも多くのグルコースを消費しなければならない。また、タンパク質は菌体成分として、乳酸菌にとって重要な成分である。細胞を増やすために自己のタンパク質を合成する必要があり、従ってタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸全てが必要である。しかし、乳酸菌は TCA サイクルを持たないため、20 種類のアミノ酸のうち半数以上

は自前で合成できず、細胞外にあるアミノ酸を取り込まなければならない。ビタミン類についても同様で、多種類のビタミン B 群を取り込まなければならない。さらに一部の乳酸菌は脂肪酸の一つであるオレイン酸（培地中では Tween 80 が代用）を必須に要求する。

また、乳酸菌が生育する場所には、糖質、アミノ酸、ビタミン類、ミネラル、さらに脂肪酸がそろっていなければならない⁸⁾。これら乳酸菌が必要とする栄養成分はヒトでいう五大栄養素、すなわち炭水化物、タンパク質、ビタミン、ミネラル、脂質に該当し、人間の食料に乳酸菌が多く棲み着く点からも理解できる。

乳酸菌の分類体系は 1900 年初頭から 1980 年頃までは細胞形態、細胞配列、乳酸発酵様式の違いにより区別され、*Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* の 4 つの属で乳酸菌の世界が構築されていた^{9,10)}。その後、生理・生化学的性質に加え化学分類学的性質や 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析が分類学へ適応され、乳酸菌にも属の再編や新規分類群の提案が行われた (Table 1-2)。また、2020 年には、260 を超える種が存在していた *Lactobacillus* 属について、より詳細なゲノム解析によりさらに 25 属に再編成された (Table 1-2)^{11,12)}。

Table 1-2 *Lactobacillales* 目に分類される科および属^{6,11,12)}

科	属
<i>Lactobacillaceae</i> 科	<i>Acetilactobacillus</i> , <i>Agrilactobacillus</i> , <i>Amylolactobacillus</i> , <i>Apilactobacillus</i> , <i>Bombilactobacillus</i> , <i>Companilactobacillus</i> , <i>Dellaglioia</i> , <i>Fructilactobacillus</i> , <i>Furfurilactobacillus</i> , <i>Holzapfelia</i> , <i>Lacticaseibacillus</i> , <i>Lactiplantibacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lapidilactobacillus</i> , <i>Latilactobacillus</i> , <i>Lentilactobacillus</i> , <i>Levilactobacillus</i> , <i>Ligilactobacillus</i> , <i>Limosilactobacillus</i> , <i>Liquorilactobacillus</i> , <i>Loigolactobacillus</i> , <i>Paralactobacillus</i> , <i>Paucilactobacillus</i> , <i>Schleiferilactobacillus</i> , <i>Secundilactobacillus</i>
<i>Enterococcaceae</i> 科	<i>Enterococcus</i> , <i>Catelicoccus</i> , <i>Melissococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Pilibacter</i>
<i>Aerococcaceae</i> 科	<i>Aerococcus</i> , <i>Abiotrophia</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Delosicoccus</i> , <i>Eremococcus</i> , <i>Globicatella</i> , <i>Ignavibratum</i>
<i>Carnobacteriaceae</i> 科	<i>Carnobacterium</i> , <i>Alkalibacterium</i> , <i>Allofustis</i> , <i>Alloiococcus</i> , <i>Atopobacterium</i> , <i>Atopococcus</i> , <i>Atopostipes</i> , <i>Desemzia</i> , <i>Dolosigranulum</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Isobaculum</i> , <i>Marinilactibacillus</i> , <i>Trichococcus</i>
<i>Streptococcaceae</i> 科	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactovum</i>

乳酸菌は、農産物や食品からヒトや動物の体まで自然界に広く存在し、それらは菌種によってはっきりした“すみわけ”があるとされている。乳酸桿菌（旧分類での *Lactobacillus* 属）は乳酸菌の代表的なものであり、発酵食品から、口腔、腸管、膣の常在菌として存在し¹³⁾、それらのさまざまな機能が近年注目されている。例えば、ヒトや動物においては抗菌作用、抗変異原性、抗腫瘍活性、免疫賦活作用などの効果を有し、食品においては保存性の付与、風味形成、熟成促進などの役割を果たしている¹⁴⁾。

1-3 プロバイオティクスについて

1989年に Fuller により“腸内常在菌のバランスを変えることにより宿主に保健効果を示す生きた微生物”と定義された「プロバイオティクス」は、同年、Salminen らによって“宿主に保健効果を示す生きた微生物およびそれを含む食品”として定義された^{15, 16)}。Salminen らの定義により、プロバイオティクスおよび関連食品については、各菌株レベルでの安全性と機能評価の科学的な証明が要求されるようになった。腸内常在菌の構成を改善し、宿主に有益な作用をもたらすプロバイオティクスに用いられる有用微生物の条件を以下に示す。

-
- i) 胃酸や胆汁酸などの消化管上部のバリアー内でも生存できること
 - ii) 増殖部位として消化管下部で増殖可能なこと
 - iii) 便性改善、腸管内菌叢のバランス改善および腸管内腐敗物質の低下などの有効効果を発現すること
 - iv) 抗菌性物質の産生や病原細菌の抑制作用を有していること
 - v) 安全性が高いこと
-

現在、世界各国で用いられているプロバイオティクスの微生物は、乳酸桿菌（旧分類の *Lactobacillus* 属）、*Bifidobacterium*、*Enterococcus* など、その菌株は 21 種類以上におよぶ¹⁶⁾。これらプロバイオティクスの研究および発信は、欧米より盛んに行われているが、発酵食品の多いアジア地域では知らず知らずのうちに乳酸菌をうまく利用してきた。特に、日本は温和な気候で微生物の発酵に適した環境であり、世界有数の発酵大国でもあるため、プロバイオティクス候補となる未知の乳酸菌が存在する可能性は非常に高い。プロバイオティクスに求められる条件として、以下の 6 つが挙げられる¹⁷⁾。

-
- ① 胃酸耐性
 - ② 胆汁酸耐性
 - ③ 粘液、腸管細胞またはその両者に対する付着性
 - ④ 病原菌に対する付着阻害性
 - ⑤ 胆汁酸変換活性をもたないこと
 - ⑥ 殺精子剤に対する耐性
-

つまりは、⑥を除いて、生きて腸に到達して長くとどまり、悪玉菌を排除する作用に加えて生体機能に対する影響力と有用性が明確化されていることが、プロバイオティクスに求められる条件である¹⁷⁾。

これまでに多くの乳酸菌のプロバイオティクス作用が報告されている。例えば、発酵乳から分離した *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 は血清コレステロール低下作用、ケフィアから分離した *Lactobacillus* spp. は腸管への高い付着性および抗酸化作用、また *Lactiplantibacillus plantarum* や *Lactobacillus acidophilus* の一部が生産するバクテリオシン（抗菌物質）は、消化器系条件下で、*Helicobacter*、*Clostridium difficile*、ロタウイルス、多剤耐性の *Shigella* 属や *E. coli*、さらに多くの泌尿器系病原体に対しても抗菌活性を示し、腸内細菌叢の組成を調整する、などが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。このように、乳酸菌の有するプロバイオティクス効果を調べ、食品保存機能とプロバイオティクス機能を併せて応用化することが重要である。

1-4 バイオプリザベーション

最近の食生活の質的向上に伴い、素材の特徴を活かした新鮮感覚でナチュラルな食品を求める消費者の志向が強まってきた。そこで、過度の加熱や化学合成保存料の代わりとして関心が高まっている保存方法が、バイオプリザバティブを利用したバイオプリザベーションである⁵⁾。バイオプリザベーションとバイオプリザバティブの定義について Table 1-3 に示した。

Table 1-3 バイオプリザバティブとバイオプリザベーション⁵⁾

バイオプリザバティブ	植物、動物及び微生物起源の抗菌作用を持つ化合物で、何らの害作用もなしに食品としてあるいは食品とともに長期間ヒトに食べられてきたもの。
バイオプリザベーション	上記のバイオプリザバティブを使って食品を保存すること。特に発酵によって生産されたものによって食品の保存性を高める方法はその代表的なもの。

バイオプリザベーションは、生きている乳酸菌によって乳酸発酵が起こらずとも、乳酸菌の生産した抗菌作用を持つ物質を利用するのであるから、乳酸菌と有害微生物のアンタゴニズム（拮抗作用）による抑制、乳酸菌の生産した有機酸の利用、乳酸菌などによって生産されたバクテリオシンや過酸化水素の利用、熱などによって不活性化された乳酸菌そのものの利用などが含まれることになる⁵⁾。乳酸菌を起源とするバイオプリザバティブを Table 1-4 に示す。

Table 1-4 乳酸菌を起源とした食品バイオプリザバティブ⁵⁾

有機酸	乳酸、酢酸、ギ酸、プロピオン酸
アルコール	エタノール
ケトン	ジアセチル
アルデヒド	アセトアルデヒド
抗菌性タンパク質	バクテリオシン
その他の物質	ロイテリン
乳酸菌菌体細胞	酵素系による過酸化水素生産など

伝統的に食されてきた発酵食品の保存性に、上記のバイオプリザバティブを生産する乳酸菌が寄与していることは明らかである。そこで、乳酸菌由来バイオプリザバティブを科学的に検討・管理し、利用しようとする動きが高まっている⁵⁾。

乳酸菌が生産するバイオプリザバティブのうち、有機酸（乳酸、酢酸、ギ酸、プロピオン酸など）は、非解離型の場合は脂溶性となり細胞膜を通過し、細胞内で解離型となって細胞機能を破壊して死に至らしめる²¹⁾。したがって、有機酸の抗菌活性は酸性領域で発揮され、解離度が低く非解離度が高いほど抗菌活性が強くなる。しかしながら、乳酸は酸味を帯びており、食品中に抗菌物質として利用するには好ましくない。その他、過酸化水素、ジアセチル、ロイテリンについては、その強力な酸化力や刺激臭ゆえに法的規制がなされているものもあり、食品加工には不適切である。そこで、有機酸などに並ぶ重要な抗菌物質としてバクテリオシンが近年注目されている。

1-5 乳酸菌が生産するバクテリオシン

前項で述べたように、バイオプリザバティブのひとつとして、乳酸菌が生産するバクテリオシンが近年注目されている。Klaenhammer は、バクテリオシンとは「抗菌作用を示すタンパク質性の成分であり、通常はその類縁菌に対して作用する物質」と定義している²²⁾。バクテリオシンは多くのグラム陽性菌および陰性菌が生産することが知られている。乳酸菌が生産するバクテリオシンの特徴を Table 1-5 に示す。

Table 1-5 乳酸菌バクテリオシンの特徴²⁾

1. 安全性が高い
2. 食品加工上都合の良い性質を持つ
3. 通常の方法では阻止しがたい微生物に効果がある
4. 抗菌スペクトルが限定されるため、製造に必要な微生物スターターや腸内菌叢に対する影響が小さい

乳酸菌バクテリオシンの多くは生理的条件下で不安定であり、また純粋なペプチドであるため、トリプシンやキモトリプシンなどの消化酵素によって容易に分解・失活する。また乳酸菌自体が、最も安全な微生物として伝統的に食品加工に積極的に利用されており、安全性が高いと考えられている。さらに、大部分の乳酸菌バクテリオシンには異味・異臭がなく、酸性側で安定であり、耐熱性が高いなどの食品加工上都合のよい性質を持つ⁴⁾。また、特定の乳酸菌バクテリオシンは低温増殖能をもつ *Listeria monocytogenes* に対して有効である。*L. monocytogenes* は食品を広く汚染し、5℃以下で活発に増殖すること、致命率が高いことなどから、十分な加熱殺菌のできない食品（生ハム、デザート類、チルド食品）や調理済み食品（ready to eat）など、低温管理によって腐敗が防止される食品において潜在的脅威となっている。欧米においては、*L. monocytogenes* は乳酸菌バクテリオシンの主要なターゲットとなっている⁴⁾。

現在、商業的に実用化されている乳酸菌バクテリオシンとして、nisin A、pediocin PA-1、そして Micocin[®]が挙げられる²³⁾。Nisin A は、世界保健機関（WHO）およびアメリカ食品医薬品局（FDA）で構成される食品添加物専門家会議（JECFA）の第 12 回（1968 年）会議において評価・使用許可され、さらに FDA から GRAS 認証（Generally Recognized As Safe）を受けており、現在世界 50 ヶ国以上で使用されている²⁴⁾。さらに近年の研究により、nisin A は、多剤耐性 *Streptococcus pneumoniae* の 56 種、*Staphylococcus aureus* の 33 種、バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecium* および *Enterococcus faecalis* の 29 種に対し、抗菌効果を発揮することが報告されている²³⁾。また、pediocin PA-1 は、*Pediococcus acidilactici* が生産するバクテリオシンであり、食中毒細菌の *Listeria* 属に効果を示す。これまでに pediocin PA-1 を化学合成して使用することも検討されたが、抗菌活性を有するペプチド合成に至っておらず、収率も 1%未滿と非常に低いことがわかっている²⁵⁾。Micocin[®]は、バクテリオシンやその他の抗菌物質を生産する *Carnobacterium maltaromaticum* CB1 の培養液を乾燥させたものであり、カナダ、メキシコ、コスタリカ、コロンビア、米国での使用が承認されている²⁶⁾。このように、一部のバクテリオシンやバクテリオシン生産乳酸菌の食品保存への応用は認められてきているが、使用用途の制限や、食品保存料としての潜在性を持ちながら応用化まで至っていないものが多く存在する。

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、その構造や特性からクラス分類がされており、その分類は常に新しい特徴をもつバクテリオシンの発見により変化している。1993 年、

最初に分類の定義を提唱した **Klaenhammer** によると、バクテリオシンはその一次構造から **Class I-IV** の 4 つのクラスに分類された²²⁾。その後、新たな構造として環状構造をもつバクテリオシンが発見され、2003 年に **Kemperman** らにより 5 つのクラスに分ける分類体系が提唱された²⁷⁾。その後、2005 年に **Cotter** らにより、これまでと大きく異なり、**Class I** (ランチビオティック) および **Class II** (非ランチビオティック) に分類した²⁸⁾。さらに、2016 年 **Alvarez-Sieiro** らによって新たな分類体系が提唱された²⁹⁾。詳しい定義を **Table 1-6** に示す。

Table 1-6 Alvarez-Sieiro らによるバクテリオシンの分類²⁹⁾

Class (Subclass)	Property	Example
I	Heat stable, modified small peptide (<10 kDa)	
(Ia)	Lanthipeptides	Nisin A
(Ib)	Cyclized peptides	Enterocin AS-48
(Ic)	LAPs	Streptolysin S
(Id)	Sactibiotics	Subtiliosin A
(Ie)	Glycocins	Glycocin F
(If)	Lasso peptides	Micrococin J25
II	Heat stable, unmodified small peptide (<10 kDa)	
(IIa)	Pediocin like	Pediocin PA-1
(IIb)	Two-peptide	Lactococcin Q
(IIc)	Leaderless	Lacticin Q
(IId)	Non pediocin-like, single-peptide	Laterosporullin
III	Thermo-stable, larger than 10 kDa peptide	
(IIIa)	Bacteriolysin	Zoocin A
(IIIb)	Non-lytic	Helveticin J

Class I バクテリオシンはランチオニンや 3-メチルランチオニンなどの翻訳後修飾を受ける残基をもつ、分子量の小さいペプチドでありランチビオティック (lantibiotics; lanthionine-containing antibiotics) と呼ばれる。Alvarez-Sieiro らは、この **Class I** をそのペプチドの特徴から、さらに 6 つに分類した (**Table 1-6**)²⁹⁾。このクラスに属するバクテリオシンは酵素認識部位や輸送、ペプチド不活性化に関与するリーダーペプチドを含みコアペプチドと結合している。

Class II バクテリオシンはランチオニンや 3-メチルランチオニンなどといった異常アミノ酸を含まない低分子ペプチド (10 kDa) である。両親媒性のヘリックス構造を持つことで指標菌の細胞膜に入り込むことができる³⁰⁾。**Class IIa** バクテリオシンは別名 **pediocin-like** バクテリオシンとも呼ばれる。N 末端近傍に抗リステリア活性に必要な

な構造である、YGNG(V/L)モチーフ (pediocin-box) および α ヘリックス構造をもつ^{30, 31)}。Class IIb バクテリオシンは 2 分子ペプチドバクテリオシンであり、完全に作用するのは両方のペプチドが相互に働いた場合である。Class IIc バクテリオシンは、環状構造をもつバクテリオシンが属しており、N 末端と C 末端が繋がることで、そのバクテリオシンの構造が安定する、リーダーレス (リーダーペプチドを持たない) バクテリオシンである。一方で、Class IId バクテリオシンはさまざまな構造・特徴をもつバクテリオシンが属している。例えば、単分子であるがペディオシン様ではないものなどが属している³⁰⁾。

Class III バクテリオシンは、一般的に分子量 10 kDa 以上であり、熱に安定、複雑な構造・特性をもつバクテリオシンが属している³²⁾。作用機構は他のクラスのバクテリオシンとは異なり、標的細胞の細胞壁を溶解することにより抗菌作用を示すと言われている。N 末端はエンドペプチターゼと相同性を持ち、C 末端は標的細胞を認識するために必要な構造をとっている。これは zoocin A に特異的な構造であり、zoocin A は、標的細胞のペプチドグリカンを貫くことで抗菌活性を示す bacteriolysins として特徴づけられている²⁹⁾。

乳酸菌バクテリオシンの作用機序は、そのクラスや種類によって差異が見られる。Class I である nisin A は、細胞膜前駆体である lipid II に結合することで、細胞膜合成を阻害する³³⁾。これに伴い、細胞膜に孔を開けることで標的細胞を死滅させる。*Staphylococcus warneri* が生産する nukacin ISK-1 も、nisin A と同様に lipid II に結合することで細胞膜合成を阻害するが、孔形成については見られず、meticillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) のバイオフィーム形成を阻害することが報告されている³⁴⁾。*Microbispora* sp. ATCC-PTA-5024 が生産するランチビオティックである NAI-107 は、lipid II に結合し、vancomycin 耐性 *Enterococcus* 属 (VRE) や MRSA の生育を阻害する³³⁾。この他にも、DNA の複製阻害³⁵⁾、タンパク質合成阻害により抗菌活性を示すバクテリオシン³⁶⁾、細胞膜を破壊することにより抗菌活性を示すバクテリオシン³⁷⁾ も報告されている。

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、プレバイオティクス機能もち、その機能は大きく三つに大別される³⁸⁾。一つは、コロニー形成を促進する作用 (colonizing) である。バクテリオシンを生産する菌は、生物の消化管等のような環境下で、非バクテリオシン生産菌数を自身のバクテリオシンにより減少させ、コロニーを形成する。この例として、非バクテリオシン生産 *Escherichia coli* は streptomycin 処理したネズミの腸管内でその菌数が著しく減少した (10^6 CFU/g から 10^2 CFU/g) のに対し、colicin を生産する *E. coli* は、菌数を変化させずに生存できたという報告がある³⁹⁾。

二つ目に、抗菌作用 (killing) が挙げられる。例えば、広い抗菌スペクトルを持つ lacticin 3147 は、*in vitro* 試験においては *L. monocytogenes* に対し抗菌作用を示すが、*in vivo* 試験では活性を示さない⁴⁰⁾。複数のバクテリオシンを生産する *E. coli* H22 は、*in vivo* 試験においても抗菌作用を示し、さらにヒトにとって有用菌であると言われている

る *Bacteroidetes* 門には作用しないことが知られている⁴¹⁾。このように、腸管由来バクテリオシン生産菌は、実際に腸管内でも有害菌に対して抗菌作用を示すことにより、宿主の健康を維持すると考えられている。ただし、細菌の増殖やバクテリオシン生産に対して、食品粒子、香辛料、添加物、塩分、胆汁、消化酵素などが悪影響をおよぼす可能性がある⁴²⁾。さらに、消化管内でのバクテリオシンの食物粒子への付着性や拡散性、さまざまな pH 状況下での安定性、消化酵素やタンパク質分解酵素への耐性なども、バクテリオシンの抗菌活性に関わる。さらに、塩分や EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 濃度の増加は、一部のバクテリオシンにおいてグラム陰性菌の感受性を高めることもわかっている。そのため、消化管内でのバクテリオシンを可視化し、その機能を決定することは極めて困難である⁴³⁾。

最後に、シグナル作用 (signaling) が挙げられる。細菌は、菌体外のシグナル物質の拡散を感じ取ることによりコミュニケーションおよび物質生産を行っている (クオラムセンシング)⁴⁴⁾。このシグナル物質には 3 種類あり、アセチルホモセリンラクトン (AHL)、オートインドゥーシングペプチド (AIP)、そしてフラノシルボレートジエステルまたはテトラヒドロキシフラン (AI-2) が挙げられる⁴⁵⁾。ホモセリンラクトン (AHL) はグラム陰性菌、バクテリオシンなどのペプチド (AIP) はグラム陽性菌、そして AI-2 はグラム陰性菌・陽性菌におけるシグナル物質として機能する。この例として、nisin A は、抗菌作用を示すと同時に生産菌のシグナル物質として、自身の生合成を促進している (二成分制御系)⁴⁶⁾。

1-6 *Lactiplantibacillus plantarum* とその菌種が生産するバクテリオシン

L. plantarum はキムチ⁴⁷⁾ やチーズ⁴⁸⁾、ワイン⁴⁹⁾ などの発酵食品や乳製品のほか、サイレージ⁵⁰⁾ やヒトの唾液⁵¹⁾ に至るまで、あらゆる環境下に存在している乳酸菌種である。この *L. plantarum* に属する菌株の局在性および多様性は、それらの表現型や代謝能力が関係している。そのため、この多様性を今後のさまざまな技術へ応用するべく、多くの研究が進んでいる。例えば、一部の *L. plantarum* は、プロバイオティクスとしての機能をもち、機能性食品や口腔内のワクチンへの応用化が進んでいる⁵²⁾。あるいは、健康効果や食品の保存効果を促進する潜在的機能によって、乳製品や野菜等の漬物のスターター菌として利用されている⁵³⁾。また、胃腸などの酸および胆汁存在下においても耐性を示す *L. plantarum* の報告もある⁵⁴⁾。

L. plantarum が生産するバクテリオシンは plantaricin と呼ばれ、一種類のバクテリオシンを生産するものから複数種のバクテリオシンを同時に生産するものまで多岐にわたる。一種類のみを生産する例として、中国のヤクヨーグルトから分離した *L. plantarum* Q7 が生産する plantaricin Q7⁵⁵⁾、山羊の生乳チーズから分離した *L. plantarum* LpU4 が生産する plantaricin LpU4⁵⁶⁾、インドネシアの牛肉製品から分離した *L. plantarum* IIA-1A5 が生産する plantaricin IIA-1A5⁵⁷⁾、オレゴン州のワインから分離し

た *L. plantarum* LMG 2379 が生産する plantaricin W⁵⁸⁾などが挙げられる。一方、複数の plantaricin を生産するものとして、きゅうりから分離された *L. plantarum* C11 (plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin JK を生産)⁵⁹⁾、サイレージから分離した *L. plantarum* NC8 (plantaricin NC8 および plantaricin EF を生産)⁶⁰⁾、赤ワインから分離した *L. plantarum* J23 (plantaricin JK および plantaricin EF を生産)⁶¹⁾などが挙げられる。

複数の plantaricin を生産する株のほとんどは、plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin JK のいずれかを生産し、それらの株はさまざまな生態系から分離されている。そこで、それらの株が生産するバクテリオシンの特徴を述べる。

< Plantaricin A >

きゅうりの発酵食品から分離した *L. plantarum* C11 が生産するバクテリオシンであり、誘導ペプチドとしての機能も有する⁵⁹⁾。また、プロテアーゼによって分解され、熱に安定 (150 °C、30 分未満) で、非透析性 (>8,000 MW) であり、pH 4.0~6.5 で活性を有する。さらに、Sand らによると、plantaricin A は真核細胞にも浸透性を示すことや、膜タンパク質との間に静電的な引力が働くことが抗菌活性に関与すると報告されている⁶²⁾。Calasso らによると、plantaricin A を *L. plantarum* DC400 および *L. sanfranciscensis* DPPMA174 の培養時に添加すると、クオラムセンシングに関与する Histidine kinase、Response regulator、PlnC activator、AgrB-like proteins の合成量が増加することがわかっており、同種に限らず他の種のクオラムセンシングの誘導ペプチドとして機能することが示唆されている⁶³⁾。

< Plantaricin EF >

L. plantarum C11、*L. plantarum* 8P-A3、*L. plantarum* LZ95 などによって生産されると報告されている^{59,64)}。

Plantaricin EF は class IIb バクテリオシンであり、plantaricin E は 33 アミノ酸残基、plantaricin F は 34 アミノ酸残基からなる^{65,66)}。これら 2 つペプチドが揃ってバクテリオシンとしての機能を発揮する。また plantaricin E はダブルグリシン (Gly-Gly) を 2 つ有する (1 つは 22-23 残基、もうひとつは 27-28 残基)⁵⁹⁾。また、plantaricin E および F のアミノ酸配列上に複数存在する GxxxG モチーフによって、両ペプチドのヘリックス構造間の相互作用が起こり、抗菌活性を高めることが明らかになっている⁶⁶⁾。さらに、*L. plantarum* pl2 を用いた実験にて、plantaricin EF は指標菌のプロトン駆動力を低下させ、菌体内の ATP を減少させることによりその抗菌作用を発揮することも報告されている⁶⁵⁾。

< Plantaricin NC8 >

L. plantarum NC8 が生産する 2 分子ペプチドバクテリオシンであり、class IIb バクテリオシンに属する。Plantaricin NC8 α および NC8 β の 2 分子両方が存在して完全な抗菌

活性を示す⁶⁰⁾。Plantaricin NC8 α は 28 アミノ酸残基、plantaricin NC8 β は 34 アミノ酸残基からなり、質量分析によると、plantaricin NC8 α は 3,587 Da、plantaricin NC8 β は 4,000 Da である。また、plantaricin NC8 の生産が、*Lactococcus latis* MG1363、*Pediococcus pentosaceus* FBB63 および異なるタイプのグラム陽性菌の存在などにより誘導されることがわかっており、これは NC8 株が MG1363 株や FBB63 株にさらされた結果、PLNC8IF (制御) オペロンの発現を促進するためと考えられる⁶⁷⁾。なかでも、*Bacillus* 属、*Enterococcus* 属、*Lactobacillus* 属、*Levilactobacillus* 属、*Lacticaseibacillus* 属、*Latilactobacillus* 属、*Lactiplantibacillus* 属、*Lentilactobacillus* 属、*Limosilactobacillus* 属、*Ligilactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Listeria* 属、*Pediococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属に属する 82 株中の 41 株は plantaricin NC8 の生産を誘導する⁶⁸⁾。また、現在食品保存料として使用されている nisin A は、指標菌の lipid II を標的物質として抗菌作用を示す一方、plantaricin NC8 は lipid II の有無で抗菌活性の差が見られず、lipid II 以外の物質を標的としていることが示唆される⁶⁹⁾。加えて、plantaricin E および plantaricin F の構造に見られる GxxxG モチーフは plantaricin NC8 α のみ有しており、plantaricin NC8 β には見られない。

<Plantaricin JK>

L. plantarum C11⁵⁹⁾、*L. plantarum* NC8⁶⁰⁾、*L. plantarum* WCFS1⁷⁰⁾ が生産する 2 分子ペプチドバクテリオシンである。Plantaricin JK は、標的細胞の細胞膜の Δ pH を速やかに消失させることで指標菌を死滅させる⁷¹⁾。また、plantaricin J および plantaricin K の *L. plantarum* 965 に対する MIC (Minimum Inhibitory Concentration; 最小生育阻止濃度) は、plantaricin J が 20 nM、plantaricin K が 200 nM と単独でもある程度の抗菌活性を有し、両ペプチドを組み合わせることで単独使用と比べて約 10^3 倍の抗菌活性を示す⁷²⁾。一方、*L. plantarum* J23 では、*plnJ* 遺伝子 (plantaricin J の構造遺伝子) の下流に 42 bp の欠失がみられ、*plnK* 遺伝子 (plantaricin K の構造遺伝子) も見い出されない⁶¹⁾。また、*Weissella viridescens* NCFB 1655 の plantaricin JK 耐性変異株のゲノム解析により、アミノ酸-ポリアミン-オルガノカチオン (APC) ファミリーの輸送タンパク質が plantaricin JK 受容体と推定され、バクテリオシン耐性に関与することが示唆されている^{73, 74)}。

上記のバクテリオシンを生産する株の多くは、類似の plantaricin 生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) を有している (Fig. 1-1)⁷⁵⁾。

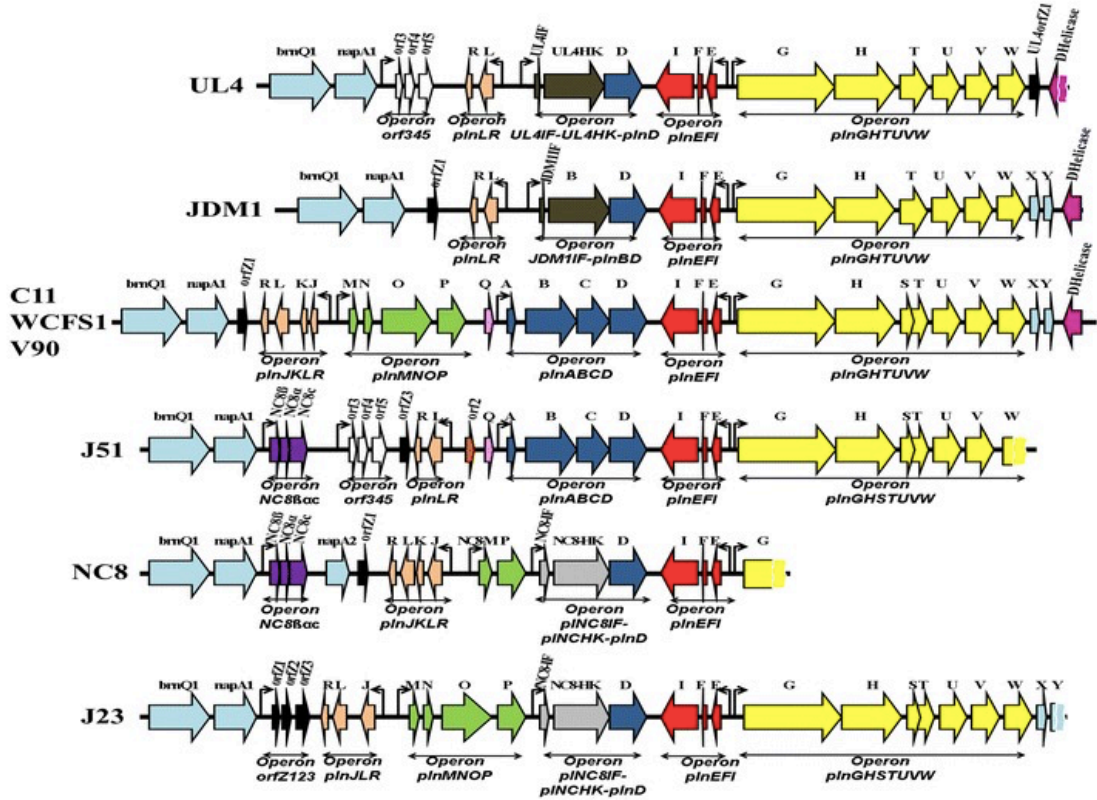


Fig. 1-1 *pln* loci of *L. plantarum* ⁷⁵⁾

最も詳細に *pln* locus が調べられているのは C11 株であり、バクテリオシン生産はクオラムセンシングによって制御されている ^{76,77)}。C11 株の *pln* locus は、5つのオペロンで構成されている (Fig. 1)。Plantaricin A はバクテリオシンとして、かつ他のバクテリオシン遺伝子の転写を誘発するフェロモンとしての、2つの役割を持つ。ある一定の菌密度条件下では、plantaricin A (PlnA) がヒスチジinkinナーゼ (PlnB) およびレスポンスレギュレーター (PlnCD) のリン酸化反応の引き金となり、転写量が増加する。次いで、リン酸化されたレスポンスレギュレーターは、5つのオペロン (*plnABCD*、*plnEFI*、*plnJKLR*、*plnMNOP*、*plnGHSTUV*) の転写を誘導する ⁷⁸⁾。*plnEFI* と *plnJKLR* は、plantaricin EF と plantaricin JK をコードするオペロンであり、*plnI*、*plnL*、*plnR* および *plnP* はそれらバクテリオシンの自己耐性機能に関わる遺伝子である。PlnG は ABC 輸送タンパク質、PlnH は PlnG のアクセサリタンパク質と高い相同性を示しており、*in vitro* において、PlnG は ABC 輸送体として plantaricin E の抗菌活性に寄与していることが明らかとなっている ^{59,79)}。一方、PlnH は PlnG のアクセサリタンパク質として、バクテリオシンの免疫活性および菌体外分泌能に関与していることが推測されているが、その機能の詳細は明らかになっていない。また、*plnO* および *plnN* (バクテリオシン様タンパク質遺伝子) の機能は未だ解明されていない ⁸⁰⁾。一方、PlnTUVW は type II CPBP ファミリーに特有な 4つのモチーフを有しており (EExxxR, FxxxH, sxxxs および HxxxB: E, Glutamic Acid; R, Arginine; F, Phenylalanine; H, Histidine; s, small residue; B, asparagine

or aspartate; x, any amino acid residue that usually has a hydrophobic residue)、バクテリオシンの自己免疫機能に関与することが示唆されているが、詳細は明らかにされていない⁸¹⁾。*L. plantarum* において類似の生合成関連遺伝子クラスターが見出されているが、多成分 plantaricin 生合成機構は完全には明らかとなっていない。

1-7 研究目的

近年、消費者の天然・自然志向によって、化学合成食品添加物に変わる天然の食品保存料の需要が高まっている。その代表的な手法が「発酵」であり、特に日本は高温多湿な気候条件から、全国各地でさまざまな発酵食品が製造され、食されてきた。代表的な発酵食品として、醤油、味噌、みりん、日本酒、漬物、チーズ、ヨーグルトなどが挙げられ、中でも大豆由来の発酵食品は多岐にわたる。また、日本人の平均寿命が世界でもトップレベルであることから、発酵食品を中心とした日本食が健康に良いこともうかがえる⁸²⁾。九州は特に温暖な環境下なため、多くの発酵食品が伝統的に製造されており、発酵による風味や栄養価の向上を享受してきた。さらに、発酵食品の保存性に、乳酸菌が大きく関与していると考えられ、特に、*Lactiplantibacillus plantarum* はさまざまな植物性の発酵食品から分離されている。例えば、これまでに発酵茶（石銚黒茶、阿波晩茶）、らっきょうの塩漬け、野沢菜漬けなどから分離した例が報告されている⁸³⁻⁸⁵⁾。このように、多くの発酵食品には乳酸菌が存在し、風味の付与や栄養価の向上だけでなく保存性にも寄与しており、発酵スターター菌としても用いられている⁸⁶⁾。

乳酸菌が生産する抗菌物質の一つにバクテリオシンが挙げられ、中でも食経験豊富な乳酸菌が生産するバクテリオシンは、無味無臭なため食品の風味に影響を与えず、腸管内の消化酵素で容易に分解できることから、安全性の高い天然の食品保存料として期待されている⁸⁷⁾。現在食品保存料として利用されているバクテリオシンとして代表的なものにナイシンが挙げられるが、酸性領域でのみ安定で中性～アルカリ性では活性が低下、失活してしまう。また、単独使用ではグラム陽性菌にしか抗菌活性を示さない。そのため、この欠点を補うために、現在さまざまなバクテリオシン生産乳酸菌の研究が行われている。

我々は、熊本県球磨地方で800年にわたり伝統的に製造され、食べられてきた「味噌漬け豆腐」からバクテリオシン生産乳酸菌を分離し、*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6（旧名 *Lactobacillus plantarum* PUK6）と同定・命名している⁸⁸⁾。*L. plantarum* は一般的に6.5% NaClに耐性であるが、PUK6株は塩分を含む味噌漬け豆腐から分離した菌株であることから、食塩を添加する発酵食品のスターター菌として好ましいと考えられる。そこで本研究では、*L. plantarum* PUK6の特性、およびPUK6株が生産するバクテリオシンの精製、同定、生合成関連遺伝子群の同定 (*pln* locus) および解析、さらに *pln* locus 上に存在する機能不明遺伝子の解析を行うことを目的とした。

第一章では、乳酸菌、プロバイオティクス、バイオペリザベーションであるバクテリオシン、そして *L. plantarum* が生産するバクテリオシンについて概説した。

第二章では、*L. plantarum* PUK6の耐塩性、乳酸生産およびプロバイオティクス評価を行った。本研究では、プロバイオティクスの条件である胃酸耐性および胆汁酸を含む培地でのコレステロール吸収・吸着率を調べた。

第三章では、PUK6 株の培養条件およびそのバクテリオシン精製方法の確立を目指した。さらに精製物のアミノ酸配列を分析し、PUK6 株が生産するバクテリオシンについて検討した。

第四章では、PUK6 株が生産するバクテリオシン生合成関連遺伝子群の同定および解析を目指した。第三章で PUK6 株が生産すると予想したバクテリオシンの生合成に関連する遺伝子を明らかにすることで、生合成メカニズムを推察することを目的とした。

第五章では、第四章で明らかになった PUK6 株が生産するバクテリオシン生合成関連遺伝子群上に存在する機能不明遺伝子の解析を試みた。

第六章では、*L. plantarum* PUK6 が生産する 4 種類のバクテリオシンについて、化学合成ペプチドを用いて、それぞれの抗菌スペクトルを比較した。

第七章では、本論文で得られた結果を総括した。

第二章

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 の特性

2-1 緒言

これまでの研究で、熊本県球磨地方で 800 年以上続く伝統的発酵食品である味噌漬け豆腐から、*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 を分離・同定・命名している。一般的に *L. plantarum* は 6.5%NaCl に耐性を示すとされている。そこで、発酵食品から分離された乳酸菌ということも踏まえ、*L. plantarum* PUK6 の特性評価として NaCl 耐性について調べた。

また、乳酸菌は糖を消費して多量の乳酸を生産する微生物の総称であり、D-乳酸および L-乳酸のどちらか一方、もしくは両方の乳酸を生産する。乳酸は一般的に食品における食品添加物や、医薬品、化学工業などの分野において幅広く利用されている^{1, 2)}。さらに、近年乳酸は環境中の微生物によって水や二酸化炭素に分解される、いわゆる生分解性プラスチックのポリ乳酸 (Poly(lactic acid), PLA) の原料として、医療用の縫合糸や接着剤、支持材料などに用いられている^{3, 4)}。化学的に合成される乳酸は DL-乳酸 (ラセミ体) であり、ポリ乳酸の原料としては適していない。一方、乳酸菌を用いた乳酸発酵では、乳酸菌の種類や発酵条件を選択することによって D-乳酸、L-乳酸、DL-乳酸のいずれも製造することが可能となる⁴⁾。一般的に、*L. plantarum* は D-乳酸および L-乳酸の両方を生産することが知られている。そこで、*L. plantarum* PUK6 の今後の応用可能性を広げるために乳酸生産量および D/L 乳酸比を調べた。

乳酸菌には乳酸生産だけでなく、そのほかのさまざまな生理機能が知られており、中でもプロバイオティクスとしての利用が注目されている⁵⁾。特に、*L. plantarum* のプロバイオティクス効果は数多く報告されており、例えば、キムチから分離した *L. plantarum* 200655 の免疫増強作用⁶⁾、糞便から分離した *L. plantarum* OLL2712 の抗炎症作用⁷⁾、ヤギ乳ヨーグルトから分離した *L. plantarum* HFY01 の抗酸化作用⁸⁾などが挙げられる。乳酸菌は古くから発酵食品の主要な微生物であることから食経験が豊富で安全性が高く、今後もプロバイオティクスとしての応用が期待される⁸⁾。そこで、本章では *L. plantarum* PUK6 の特性として NaCl 耐性、乳酸生産とその光学活性に加え、プロバイオティクスとしての利用可能性として、胃酸耐性および胆汁酸耐性を調べ、コレステロールの吸収・吸着作用について調べた。

2-2 実験操作

以下の項目について *L. plantarum* PUK6 の特性を調べた。

- ・耐塩性
- ・乳酸生産量と乳酸の光学活性
- ・胃酸耐性
- ・胆汁酸耐性
- ・コレステロール吸収・吸着作用

2-2-1 使用菌株および使用培地

本研究の対象菌である *L. plantarum* PUK6 に加え、当研究室でこれまでに自然環境や食品中から分離した 5 株の、合計 6 株を用いて研究を行った (Table 2-1)。

Table 2-1 Strains used in this study

Strain	Relevant characteristics	Source
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6	Bacteriocin producer	<i>Tofu</i> pickled in <i>miso</i>
<i>Lactococcus lactis</i> PUK11	GABA ^a production	<i>Venerupis philippinarum</i> (calm shell)
<i>L. plantarum</i> PUK20	GABA ^a production	Fermented bamboo powder
<i>L. plantarum</i> PUK25	GABA ^a production	Pickled mustard
<i>Lactocaseibacillus casei</i> PUK26	Bacteriocin producer	<i>Tofu</i> pickled in <i>moromi</i>
<i>Lactococcus lactis</i> PJR24	Bacteriocin producer	Pickled Japanese radish

^a γ -aminobutyric acid

【使用培地】

《耐塩性試験》

- ・NaCl 含有 MRS 培地

MRS 培地 (5 mL) に 0、3、4、6.5、7.5、10、12.5、15、18 および 20% となるように NaCl を添加した。

Appendix -1 (Table A-1) 参照。

《乳酸生産量の測定》

- ・MRS 培地

Appendix -1 (Table A-1) 参照。

《胃酸耐性の評価》

- ・MRS 寒天平板培地および液体培地

Appendix -1 参照。

- ・pH 2.5 および 3.0 に調整した人工胃液 (0.32 %ペプシン含有 MRS 培地)

Table A-1 (Appendix -1 参照) の 50 mL 分の MRS 培地試薬 2.6 g を蒸留水 30 mL に溶解し、6 N HCl で pH 2.5 および 3.0 に調整した。それを試験管に 3 mL ずつ分注

し、121 °C、15 min オートクレーブ殺菌を行った。ペプシン 0.16 g を 20 mL の 0.01 N HCl に溶解し、0.2 μm フィルターを用いてフィルター滅菌した(0.8%ペプシン)。培地の使用前に、3 mL の MRS 培地に 0.8%ペプシン溶液を 2 mL 添加した (0.32% ペプシン含有 MRS 培地)。

《胆汁酸耐性およびコレステロール吸着作用の評価》

・0.2%タウロコール酸ナトリウム含有 MRS-THIO (0.2%チオグリコール酸ナトリウム含有 MRS 培地)

Table A-1 の MRS 培地試薬および 0.2% (w/v) タウロコール酸ナトリウムと 0.2% (w/v) チオグリコール酸ナトリウムを添加して、蒸留水に溶解した。それを試験管に 5 mL ずつ分注し、121 °C、15 min オートクレーブ殺菌を行った。

2-2-2 耐塩性試験

L. plantarum PUK6 が生育可能な食塩の上限濃度を調べるため、耐塩性試験を行った。まず、PUK6 株を 5 mL の MRS 液体培地に接種し、30 °C で一晩培養した (前培養)。培地の NaCl 濃度を 0、3、4、6.5、7.5、10、12.5、15、18 および 20%に調製した MRS 培地 5 ml に前培養液をそれぞれ 10 μL 接種し、30 °C で培養した。培養 1、2、3、4、7 日目に、600 nm における吸光度 (濁度) を測定した。

2-2-3 乳酸生産量

D-および L-乳酸生産量の測定には、F-キット D-乳酸/L-乳酸 (J.K.インターナショナル) を用いた。

【キット内容】

- ・ビン 1 ; グリシルグリシンバッファー (pH 10.0、L-グルタミン酸 約 440 mg)
- ・ビン 2 ; NAD (凍結乾燥品)
- ・ビン 3 ; GPT (ALT) (約 1100 U)
- ・ビン 4 ; D-LDH (約 3800 U)
- ・ビン 5 ; L-LDH (約 3800 U)

ビン 1、3、4、5 はそのまま使用する (溶液 1、懸濁液 3、溶液 4、溶液 5)。

ビン 2 の内容物は、滅菌水 6 mL で溶解した後、使用する (溶液 2)。

【方法】

PUK6 株を MRS 培地 (5 mL) にて 30 °C、18 h、120 strokes/min で前培養した。前培養液を新しい MRS 培地 (5 mL) 3 本に 2% (v/v) 接種後、30 °C、18 h、120 strokes/min で培養し、6、9、12 h ごとにサンプリング、3 mL をマイクロチューブに移した。遠心分離後 (12,000 rpm、5 min、4 °C)、上清を新しいマイクロチューブに移し、1 N NaOH を用いて pH 7.0~8.0 に調整した。フィルター滅菌 (0.2 μm) 後、ヒートブロックで

80 °C、15 分間加熱処理し、これをサンプルとした。紫外線透過型ディスポセルにグリシルグリシンバッファを 1.00 mL、NAD を 0.20 mL、GPT (ALT) を 0.20 mL、サンプルを 0.10 mL、滅菌水を 0.90 mL 加え、パラフィルムで密閉後ゆっくり転倒混和した。また、紫外線透過型ディスポセルにグリシルグリシンバッファを 1.00 mL、NAD を 0.20 mL、GPT を (ALT) 0.20 mL、滅菌水を 1.00 mL 加え、パラフィルムで密閉後ゆっくり転倒混和したものをブランクとした。約 5 分後、それぞれ 340 nm の吸光度 (A_1) を測定した。試料溶液、ブランクともに D-LDH を 0.02 mL を加え、パラフィルムで密閉後ゆっくり転倒混和した。続いて、反応終了後 (室温、約 30 分後)、それぞれ 340 nm の吸光度 (A_2) を測定する。続いて、試料溶液、ブランクともに L-LDH を 0.02 mL 加え、パラフィルムで密閉後ゆっくり転倒混和した。反応終了後 (室温、約 30 分後)、それぞれ 340 nm の吸光度 (A_3) を測定した。ブランクおよび試料について吸光度差 ($A_2 - A_1$) を求め、試料の吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いた。

$$\Delta A_{D\text{-乳酸}} = (A_2 - A_1)_{\text{試料}} - (A_2 - A_1)_{\text{ブランク}}$$

ブランクおよび試料について吸光度差 ($A_3 - A_2$) を求め、試料の吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いた。

$$\Delta A_{L\text{-乳酸}} = (A_3 - A_2)_{\text{試料}} - (A_3 - A_2)_{\text{ブランク}}$$

求めた $\Delta A_{D\text{-乳酸}}$ および $\Delta A_{L\text{-乳酸}}$ をもとに、下記の計算式を用いて D-および L-乳酸生産量を算出した。試料が希釈されている場合は希釈率を乗じた (本実験では 20 倍希釈したため、最後に 20 を乗じた)。

【D-乳酸生産量】

$$c [\text{D-乳酸 g/L}] = \frac{2,240 \times 90.1}{6.3 \times 1.00 \times 0.100 \times 1,000} \times \Delta A_{D\text{-乳酸}} \cong 0.3203 \times \Delta A$$

【L-乳酸生産量】

$$c [\text{L-乳酸 g/L}] = \frac{2,260 \times 90.1}{6.3 \times 1.00 \times 0.100 \times 1,000} \times \Delta A_{L\text{-乳酸}} \cong 0.3203 \times \Delta A$$

2-2-4 胃酸耐性試験

Watanabe ら⁹⁾の方法を改変し、Table 2-1 の乳酸菌株の胃酸耐性能を調べた。

【方法】

《人工胃液での培養》

Table 2-1 で示した各乳酸菌を MRS 液体培地 (5 mL) に 1 白金耳接種し、30 °C、18 h、120 strokes/min で振とう培養を行った。pH 2.5 または 3.0 に調整した人工胃液 5 mL に前培養液を 1% (50 µL) 接種し、37 °C、4 h、50 strokes/min で振とう培養を行った (胃の中の環境をシミュレートするため、緩やかに振とう培養した)。培養 0 時間目 (接種時)、2 時間目、4 時間目 (培養終了時) に培養液を 500 µL ずつサンプリングした。

《生菌数の測定》

滅菌生理食塩水 (0.9% NaCl) を用いて 10^5 、 10^6 、および 10^7 倍に希釈した。MRS 寒天平板培地に菌体の希釈懸濁液 200 µL を 2 枚ずつプレーティングし、30 °C で培養した。コロニーの数を数え、3 種類の希釈系列を 2 枚ずつの計 6 枚の平均値を算出し、生菌数を求めた。接種時の生菌数と培養終了後の生菌数を比較し、生残率を算出した。生菌数の測定には、コロニー形成法を用いた。

生残率 (%)

$$= (\text{培養終了後の生菌数 (cfu/mL)}) / (\text{接種時の生菌数 (cfu/mL)}) \times 100$$

2-2-5 胆汁酸耐性とコレステロール吸収・吸着作用試験

Watanabe ら⁹⁾の方法を改変し、Table 2-1 に示す乳酸菌株を 0.2% タウロコール酸ナトリウム存在下で培養した菌体へのコレステロールの吸収・吸着作用を調べた。

【試薬】

- ・ 33% (w/w) KOH

16.5 g の KOH をメタノール 33.5 g (41.9 mL) に溶解した。

- ・ エタノール
- ・ ヘキサン
- ・ イソプロパノール
- ・ コレステロール定量 F-キット (J.K.インターナショナル)

食品および一般試料中のコレステロールの酵素法による可視吸収法測定キット。この測定法でのコレステロールの最適量は 0.400 mL の試料中に 8~160 µg (試料中のコレステロール濃度 (0.07~0.4 g/L) であるため、この測定範囲に入るように試料を濃縮・希釈する。

- ・ ビン 1

リン酸アンモニウム緩衝液、pH 約 7.0 ; メタノール 2.6 mol/L ; カタラーゼ約 220,000 U

- ・ ビン 2

アセトン 0.05 mol/L ; メタノール 0.3 mol/L

- ・ビン 3

コレステロールオキシターゼ約 12 U

- ・溶液 4

ビン 1 : ビン 2 = 3 : 2 で混合した。褐色瓶に入れて 2~8 °C で保存した (3 ヶ月安定)。使用前に 20~25 °C で 1 時間放置した。

【方法】

《前培養》

Table 2-1 に示した乳酸菌株を MRS 液体培地 (5 mL) に 1 白金耳接種し、30 °C、24 h、120 strokes/min で振とう培養した。前培養液をボルテックスし、マイクロチューブ 2 本に 1 mL ずつ分注した。6,000 rpm、3 min、4 °C で遠心分離後、上清を除去し、生理食塩水を 200 µL ずつ加え、懸濁、洗菌した。6,000 rpm、3 min、4 °C で遠心分離後、上清を除去し、2 つのマイクロチューブのうち片方に生理食塩水を 200 µL 加えて懸濁し、その後全量をもう片方のマイクロチューブに移し、懸濁して 2 本を 1 本にまとめた (合計 200 µL)。その後、マイクロチューブから 30 µL を試験管にとり、蒸留水を 3 mL 加えて 101 倍希釈し、その希釈液の 600 nm における濁度を測定した。

《本培養》

上記で調製した菌体懸濁液を OD₆₀₀=0.15 となるように生理食塩水で希釈し、0.2% タウロコール酸ナトリウム含有 MRS-THIO (0.2% チオグリコール酸ナトリウム含有 MRS 培地) (5 mL) に 1% (50 µL) 接種した。その後、滅菌コレステロール溶液 (エタノール中 10 mg/mL) を最終濃度が 70 µg/mL となるように添加した (5 mL の試験管につき、滅菌コレステロール溶液 (エタノール中 10 mg/mL) を 35 µL 添加)。37 °C、20 h、50 strokes/min で振とう培養を行った (腸内の環境をシミュレートするため、緩やかに振とう培養した)。その後、培養液をボルテックスした後、マイクロチューブ 2 本に 1.4 mL ずつ分注し、2,800 g、10 min、4 °C で遠心分離し、得られた培養液上清をコレステロール定量用のサンプルとした。

《コレステロールの定量》

栓付きフラスコ (300 mL 容) に、コレステロール定量用サンプルを 2 mL とり、33% KOH を 6 mL、エタノールを 30 mL 添加した。栓付きフラスコに重りを付け、37 °C の湯浴中で 30 分けん化させた。50 mL の冷ヘキサンと 30 mL の蒸留水を添加し、スターラーを入れて 1 分間攪拌させた。上層 (有機層) と下層 (水層) に分離したら、マイクロピペッターで上層のみをナスフラスコ (100 mL 容) に移した。エバポレーターで有機層を蒸発させて濃縮乾固させた後、イソプロパノール 0.4 mL を加え、溶解させた。溶液 4 を 5 mL 入れて混和した後、全量を試験管に移してボルテックス後、別の試験管に 2.5 mL 移し、それにビン 3 の 0.02 mL を加え、混和した (試料)。残りの溶液の約 2.5 mL を試料ブランクとした。パラフィルムで試験管を密封し、

37°C の湯浴中に 1 時間インキュベートした。20～25 °C になるまで放冷後、試料ブランク、試料の順に、405 nm における吸光度を測定した。このとき、空気を対照とした。試料の吸光度から試料ブランクの吸光度を引いた値を ΔA とし、コレステロール定量 F-キット (JK インターナショナル) に記載されている式に従って、培養液上清のコレステロール量を算出した。

$$\text{コレステロール (g/L)} = 0.711 \times \Delta A / 5 \quad (5 \text{ 倍に濃縮しているため})$$

また、コントロールと比較して、菌体のコレステロール吸着率を求めた。

$$\begin{aligned} & \text{コレステロール吸着率 (\%)} \\ & = 100 - [(\text{培養液上清コレステロール量 } (\mu\text{g/mL}) / \\ & \quad \text{コントロールのコレステロール量 } (\mu\text{g/mL})] \times 100 \end{aligned}$$

2-3 結果および考察

2-3-1 *L. plantarum* PUK6 の耐塩性

L. plantarum PUK6 の耐塩性を調べた。0、3、4、6.5、7.5、10、12.5、15、18、20% となるよう NaCl を添加した MRS 培地で *L. plantarum* PUK6 を培養した結果、培養 1 日目で NaCl 濃度 7.5% までは生育が確認されたが、10% 以上の NaCl 条件下では、生育が確認できなかった (Table 2-2)。2 日目以降も 10% NaCl 含有 MRS 培地での生育を観察したが、7 日間で生育の確認はできず、*L. plantarum* PUK6 は 7.5% NaCl 耐性であると判断した。一般的に、*L. plantarum* は 6.5% NaCl に耐性であるが、PUK6 株は塩濃度の比較的高い味噌漬け豆腐 (塩分濃度 10%) から分離した乳酸菌でもあることから、高い耐塩性を有することが明らかとなった。

Table 2-2 Growth of *L. plantarum* PUK6 under NaCl conditions

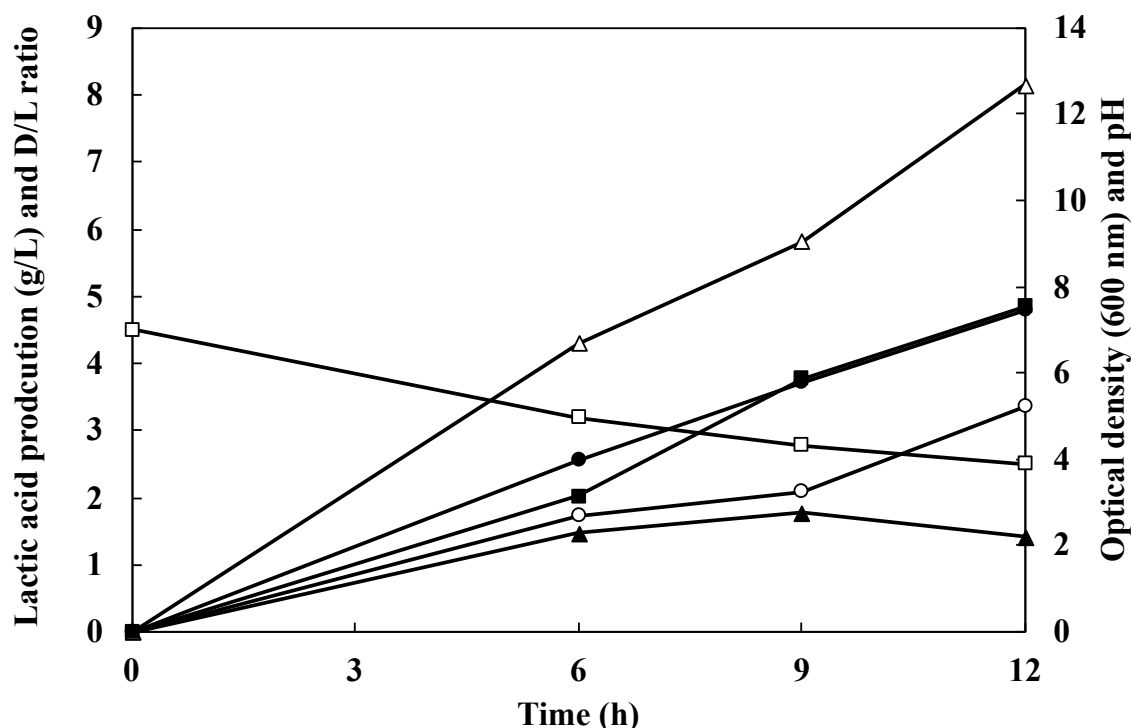
NaCl concentration (%)	OD ₆₀₀
0	10.12
3.0	9.03
4.0	7.43
6.5	4.49
7.5	3.13
10.0	—

2-3-2 *L. plantarum* PUK6 の乳酸生産

L. plantarum PUK6 が生産する D-および L-乳酸生産量、そして D/L 乳酸比を調べた。PUK6 株は増殖速度が速いため、接種時から 6、9、12 h の培養液をサンプリングし、培養液上清の D-および L-乳酸量を測定した。その結果、12 時間後の乳酸生産量は、D-乳酸が 4.8 g/L、L-乳酸が 3.4 g/L、総乳酸生産量が 8.2 g/L、D/L 乳酸比は 1.42 であり、PUK6 株は L-乳酸よりも D-乳酸を多く生産することがわかった (Table 2-3 および Fig. 2-1)。発酵で生産される乳酸の多くは L-乳酸であり、D-乳酸を優位に生産する菌株の探索は重要である¹⁰⁾。PUK6 株は増殖速度が速く、乳酸生産量も多いので、乳酸生産の有力な候補株となり得る。

Table 2-3 Lactic acid production by *L. plantarum* PUK6.

Cultivation time (h)	D-lactic acid (g/L)	L-lactic acid (g/L)	Total lactic acid (g/L)	D/L (ratio)	OD ₆₀₀	Final pH
6	2.6	1.7	4.3	1.47	3.1	5.0
9	3.7	2.1	5.8	1.78	5.9	4.3
12	4.8	3.4	8.2	1.42	7.5	3.9

**Fig. 2-1 Lactic acid production profile by *L. plantarum* PUK6.**

Profile of lactic acid fermentation by *L. plantarum* PUK6. The fermentations were conducted in 5 mL MRS broth and incubated at 30°C with shaking at 120 strokes/min. Closed circles, D-lactic acid production; open circles, L-lactic acid production; closed triangles, D-/L-lactic acid production ratio; open triangles, total lactic acid production; closed squares, cells (optical density at 600 nm); open squares, pH.

2-3-3 胃酸耐性の評価

Table 2-1 に示した乳酸菌 6 株を pH 2.5 または 3.0 の 5 mL の人工胃液 (0.32% ペプシン含有 MRS 液体培地) を用いて 37°C で 4 h 振とう培養 (50 strokes/min) し、生菌数と生残率を算出した (Tables 2-4, 2-5 and 2-6 および Fig. 2-2, 2-3, 2-4 and 2-5)。まず、pH 3.0 に調整した人工胃液における生菌数の変化 (Table 2-4 and Fig. 2-2) および接種時の生菌数と培養終了後の生菌数を比較し、生残率を算出したところ (Table 2-6 and Fig. 2-4)、PUK6 株および PUK25 株の培養 4 h 後の生残率は 100% であった。また、pH 2.5 に調整した人工胃液における生菌数の変化 (Table 2-5 and Fig. 2-3) および生残率を算出したところ (Table 2-6 and Fig. 2-5)、PUK6 株の生残率は 100% であった。このことから、PUK6 株はヒトの胃酸に強い耐性を示すと考えられた。

Table 2-4 Viable cell number (cfu/mL) in artificial gastric juice (pH 3.0)

Strain	0 h	2 h	4 h
PUK6	3.0×10^9	3.5×10^9	3.2×10^9
PUK11	1.7×10^9	6.3×10^8	2.1×10^8
PUK20	3.4×10^9	3.8×10^9	2.4×10^9
PUK25	2.5×10^9	2.8×10^9	2.7×10^9
PUK26	9.6×10^8	5.0×10^8	2.1×10^8
PJR24	1.9×10^9	1.8×10^8	7.9×10^8

Table 2-5 Viable cell number (cfu/mL) in artificial gastric juice (pH 2.5)

Strain	0 h	2 h	4 h
PUK6	3.1×10^9	3.3×10^9	3.2×10^9
PUK11	2.1×10^9	3.0×10^7	1.6×10^5
PUK20	3.1×10^9	2.2×10^9	2.2×10^9
PUK25	2.3×10^9	1.1×10^9	4.0×10^8
PUK26	9.1×10^8	2.2×10^7	2.8×10^5
PJR24	1.7×10^9	0	0

Table 2-6 Viable cell number rate (%) in artificial gastric juice (pH 3.0 or 2.5) after 4 h of cultivation

Strain	pH 3.0	pH 2.5
PUK6	106.6	103.2
PUK11	12.4	0.0076
PUK20	70.6	71.0
PUK25	108.0	17.4
PUK26	2.2	0.03
PJR24	4.1	0.00

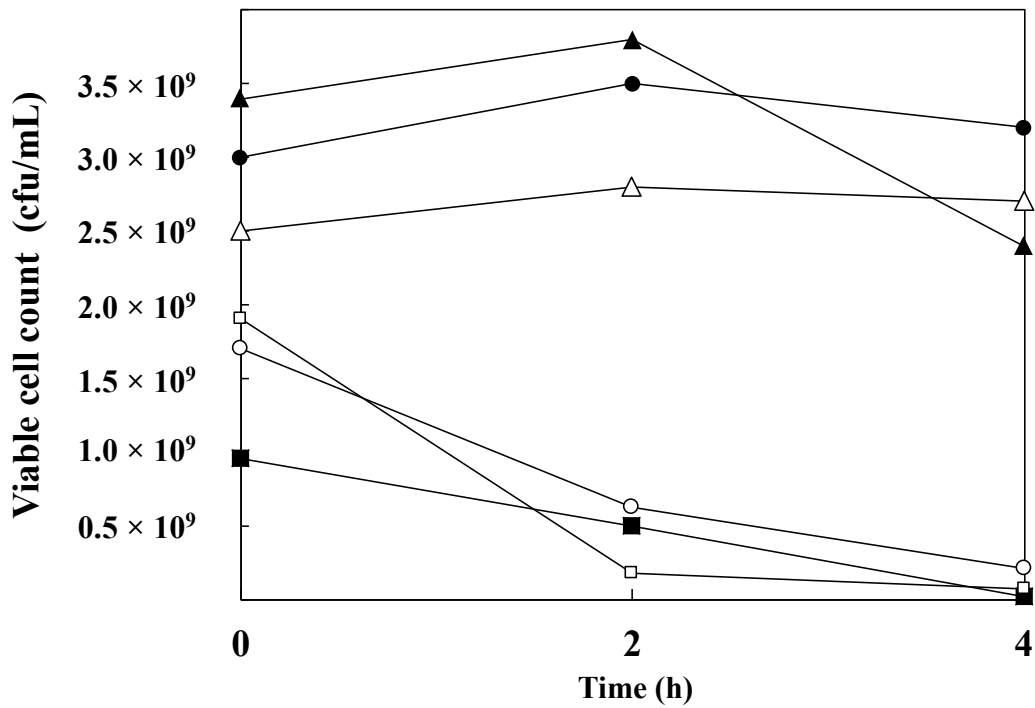


Fig. 2-2 Time course of viable cells count in artificial gastric juice at pH 3.0

Closed circles, open circles, closed triangles, open triangles, closed squares, and open squares indicate the results of PUK6, PUK11, PUK20, PUK25, PUK26 and PJR24 strains, respectively.

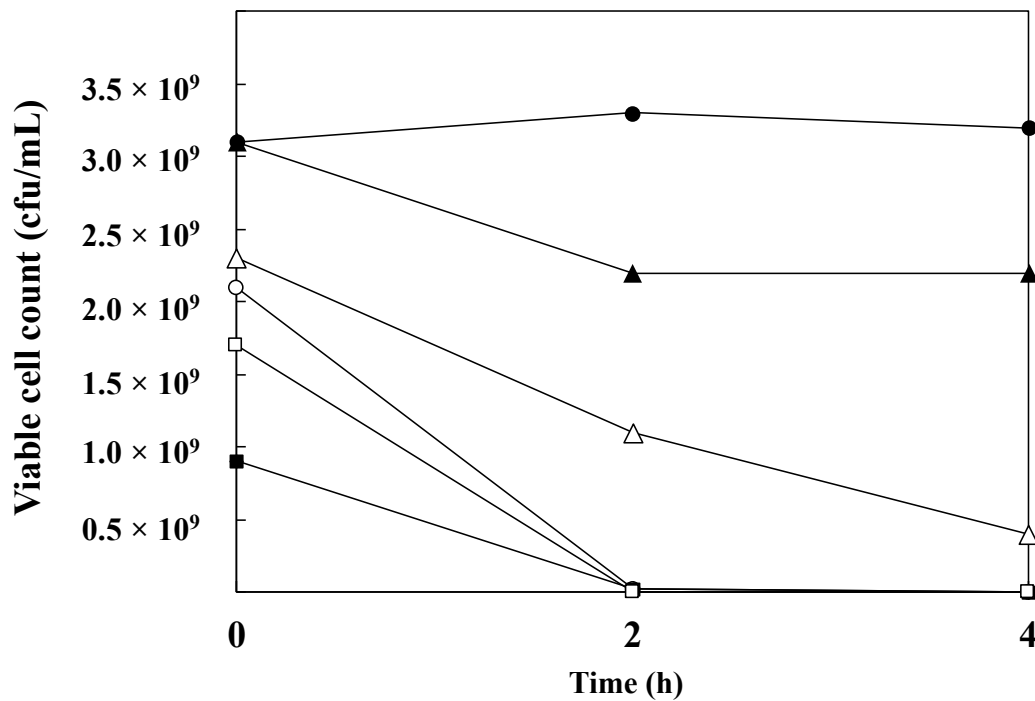


Fig. 2-3 Time course of viable cells count in artificial gastric juice at pH 2.5

Closed circles, open circles, closed triangles, open triangles, closed squares, and open squares indicate the results of PUK6, PUK11, PUK20, PUK25, PUK26 and PJR24 strains, respectively.

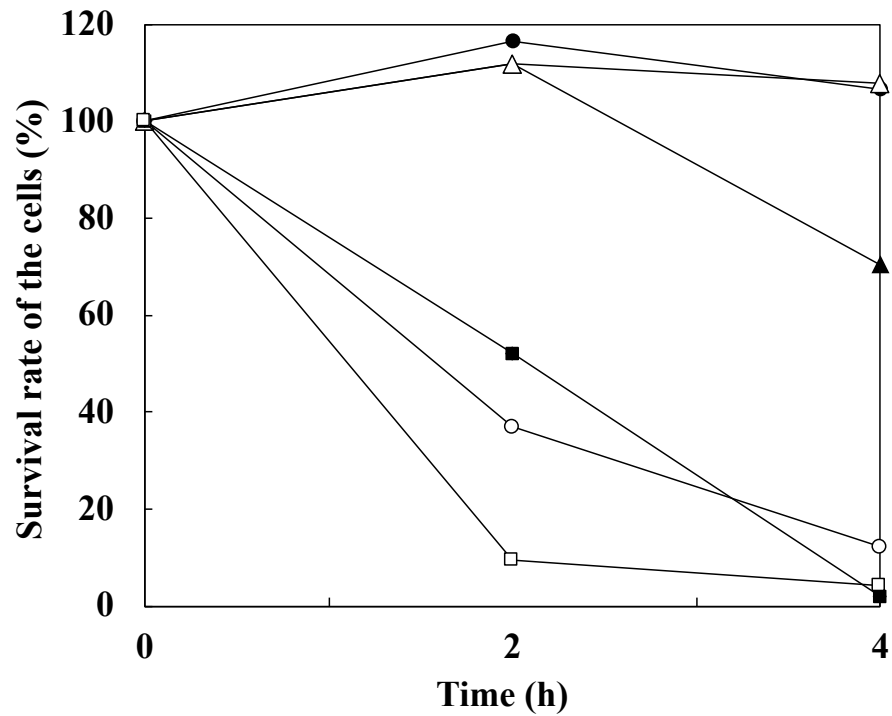


Fig. 2-4 Survival rate of the cells in artificial gastric juice at pH 3.0

Closed circles, open circles, closed triangles, open triangles, closed squares, and open squares indicate the results of PUK6, PUK11, PUK20, PUK25, PUK26 and PJR24 strains, respectively.

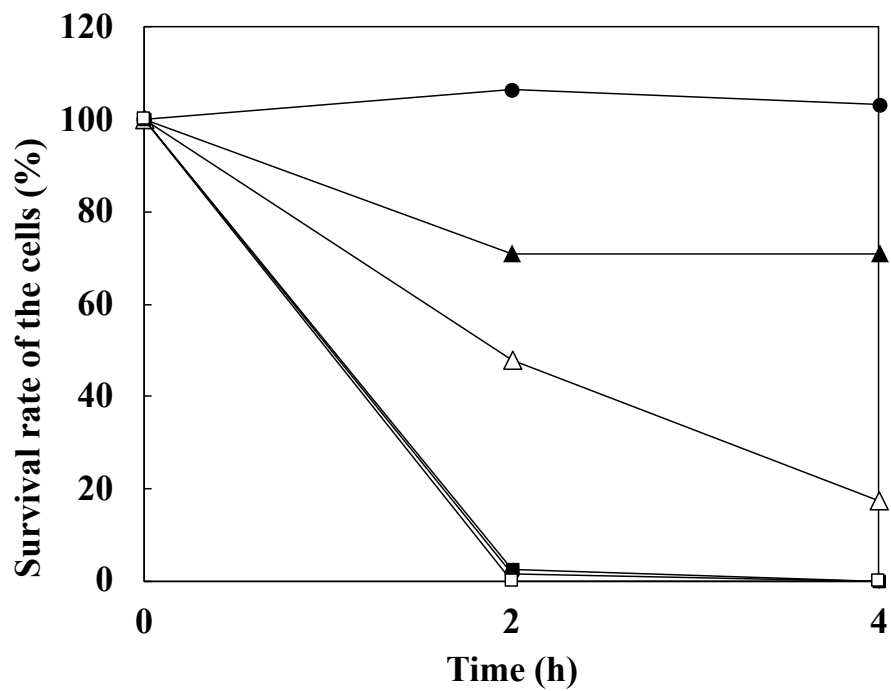


Fig. 2-5 Survival rate of the cells in artificial gastric juice at pH 2.5

Closed circles, open circles, closed triangles, open triangles, closed squares, and open squares indicate the results of PUK6, PUK11, PUK20, PUK25, PUK26 and PJR24 strains, respectively.

2-3-4 胆汁酸耐性とコレステロール吸収・吸着作用

Table 2-1 に示した乳酸菌を、コレステロール（最終濃度 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、0.2 % タウロコール酸ナトリウムおよび 0.2 % チオグリコール酸ナトリウムを含む MRS 液体培地（5 mL）を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 h 振とう培養した（50 strokes/min）。培養液上清をけん化・濃縮後、菌体に吸収・吸着されなかったコレステロール量を定量し、菌体へのコレステロールの吸収・吸着作用を評価した。また、腸内の状態をシミュレートするためタウロコール酸含有培地での増殖を観察することによる胆汁酸耐性の評価も同時に行った。その結果、*L. plantarum* PUK6 のコレステロールの吸収・吸着率は 28.7 % であり、当研究室で分離した他の乳酸菌株（PUK11 株、PUK20 株、PUK25 株、PUK26 株、および PJR24 株）と比べて最も大きいコレステロール吸収・吸着作用を示した（Fig. 2-6）。また、PUK6 株はタウロコール酸含有培地にて増殖が良好であり、胆汁酸に耐性を示すことがわかった。

PUK6 株のコレステロール吸収・吸着率 28.7% は、他の 5 株のコレステロール吸収・吸着率に比べ約 2~5 倍と高い値であり、PUK6 株はコレステロール吸収・吸着作用に優れる可能性がある。しかし、既に報告されているコレステロール低下作用が知られている乳酸菌と同条件下で試験を行ったわけではないため、比較することはできない。また、コレステロール低下作用には、今回調べた菌体へのコレステロールの吸収・吸着作用の他に菌体の胆汁酸脱抱合作用などがあり、PUK6 株をプロバイオティクスとして評価する場合はこのような作用についても調べていく必要がある。以上の結果より、PUK6 株はコレステロールを吸収・吸着する作用があるため、PUK6 株をヒトが摂取すると、菌体とともにコレステロールが便として排泄されると考えられ、ヒトへのコレステロール低下作用が期待される。

以上より、*L. plantarum* PUK6 は有力な D-乳酸生産株であり、7.5% NaCl 耐性、胃酸耐性・胆汁酸耐性を持ち、胃酸や胆汁酸に耐えて腸に届くことに加え、コレステロール低下作用が期待されることから、有力なプロバイオティクス候補となる可能性がある。

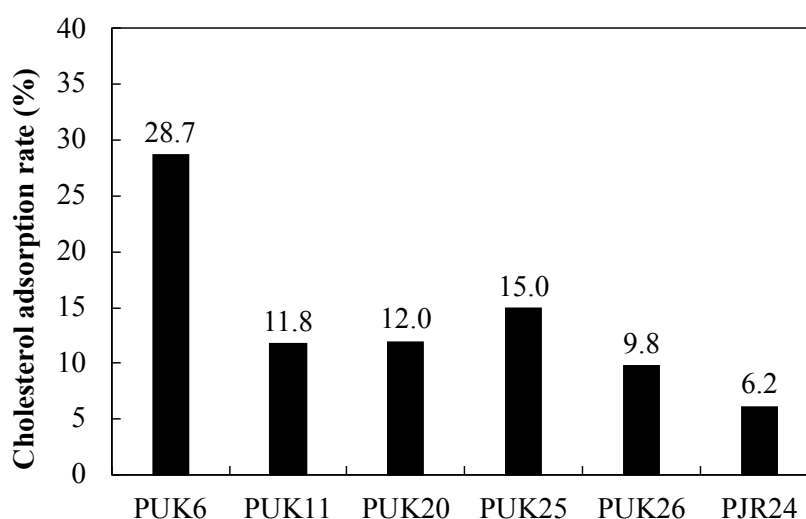


Fig. 2-6 Cholesterol absorption and adsorption effect.

The PUK11, PUK20, PUK25, PUK26, and PJR24 strains are lactic acid bacteria isolated in our laboratory.

2-4 小括

本章では、*L. plantarum* PUK6 の特性評価として、耐塩性、D-および L-乳酸生産能、胃酸耐性、胆汁酸耐性およびコレステロール吸収・吸着作用を調べた。また、本章で行った実験は全て MRS 培地を用いて、30 °C にて培養を行っているが、条件検討については第三章で述べる。

PUK6 株の耐塩性について調べた結果、7.5% NaCl 存在下での増殖が確認でき、10% NaCl 存在下では菌が増殖できなかったことから、PUK6 株は 7.5% NaCl に耐性であることがわかった。これは一般的な *L. plantarum* の耐塩性 (6.5% NaCl 耐性) よりも高く、PUK6 株が塩濃度の比較的高い味噌漬け豆腐 (塩分濃度 10%) から分離した乳酸菌であるためと考えられる。

また、PUK6 株の乳酸生産量について調べた結果、培養 12 時間後の乳酸生産量は、D-乳酸が 4.8 g/L、L-乳酸が 3.4 g/L、総乳酸生産量が 8.2 g/L、D/L 乳酸比は 1.42 であり、PUK6 株は L-乳酸よりも D-乳酸を多く生産することがわかった。このことから PUK6 株は増殖速度が速く、乳酸生産量も多いので、D-乳酸生産の有力な候補株となり得る。

当研究室でこれまでに環境中および食品から分離した、PUK6 株を含む乳酸菌 6 株について胃酸耐性を評価した。pH 2.5 または 3.0 の人工胃液 (0.32 % ペプシン含有 MRS 液体培地) における 4 h 後の生残率を算出したところ、PUK6 株および PUK25 株が pH 3.0 の人工胃液に対して強い耐性を示し、生残率は 100 %であった。また、PUK6 株は pH 2.5 の人工胃液に対しても強い耐性を示し、生残率は 100 %であった。このことから、PUK6 株はヒトの胃液に対しても強い耐性をもつと考えられた。

また、PUK6 株を含む乳酸菌 6 株について胆汁酸耐性能およびコレステロール吸収・吸着作用を評価した。その結果、本研究で試験した 6 株は、タウロコール酸含有培地にて増殖が良好であったため、この 6 株はいずれも胆汁酸に耐性をもつことがわかった。また、コレステロール (最終濃度 70 $\mu\text{g/mL}$)、0.2 % タウロコール酸ナトリウムおよび 0.2 % チオグリコール酸ナトリウムを含む MRS 液体培地で培養を行い、菌体へのコレステロールの吸収あるいは吸着率を算出したところ、試験した 6 株のうち *L. plantarum* PUK6 が 28.7 %と最も大きいコレステロール吸収・吸着作用を示した。このことから、PUK6 株は胃酸および胆汁酸耐性でありコレステロール吸収・吸着作用があることから、有力なプロバイオティクス候補株であることがわかった。今後、PUK6 株をプロバイオティクスとして利用していくためには、ラットやマウスを用いた動物実験などより詳細な試験が必要である。

以上より、*L. plantarum* PUK6 は有力な D-乳酸生産株であり、7.5% NaCl 耐性、胃酸耐性・胆汁酸耐性を示すことから、PUK6 株をヒトが摂取した場合、胃酸や胆汁酸に耐えて腸に届くことに加え、コレステロール低下作用が期待されることから、有力なプロバイオティクス候補となる可能性がある。

第三章

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 が 生産するバクテリオシンの精製

3-1 緒言

今日、日本では多くの食品が流通・販売されている。これらの食品の安全性については、多くの研究や技術の発達により以前より向上しているものの、微生物による食中毒の発生をはじめとした食品に関する苦情は多く、課題は山積みである。さらに、近年は一般消費者の天然・自然志向を求める声が大きくなり、食品の安全と安心を同時に叶える食品微生物制御技術が求められている。

このような背景から、環境中の植物や微生物による天然の抗菌物質（バイオプリザバティブ）を用いた食品保存技術である、バイオプリザベーションが注目されている²⁾。バイオプリザバティブの一つであるバクテリオシンは、細菌が生産する抗菌ペプチドであり、特に食経験豊富な乳酸菌が生産するバクテリオシンは、ヒトの腸管内の消化酵素で容易に分解できることや無味無臭であることから、安全性の高い天然の食品保存料として期待されている³⁾。実用化されているものの代表としてナイシンが挙げられ、乳製品や缶詰などの食品保存料に用いられている⁴⁾。しかしながら、ナイシンは酸性領域でのみ安定であることや、単独使用ではグラム陽性菌にしか抗菌活性を示さないという問題点がある⁵⁾。そこで、バクテリオシンの応用可能性を広げるために、さまざまな特徴を持つ汎用性の高いバクテリオシンの探索を行い、それぞれの用途にあった性質を持つバクテリオシンを適材適所に用いることで、より高度な食品微生物制御技術の実現につながる⁶⁾。

これまでの研究で、熊本県球磨地方で 800 年以上続く伝統的発酵食品の味噌漬け豆腐から、バクテリオシンを生産する *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 を分離している⁷⁾。*L. plantarum* PUK6 は、第二章で述べたように胃酸および胆汁酸に耐性があり、コレステロール低下作用が期待されるプロバイオティクス候補株である。すなわち、本株は発酵食品のスターター菌として用いた際の保存効果に加えてプロバイオティクス効果も期待できる。また、一部の *L. plantarum* は複数のバクテリオシンを生産する種として知られている⁸⁾。そのため、*L. plantarum* PUK6 も複数のバクテリオシンを生産するのであれば、昨今問題視されている多剤耐性菌出現の抑制も期待される。そこで、本研究では、*L. plantarum* PUK6 が生産するバクテリオシンの精製を行い、その構造解析を行うことを目的とした。

3-2 実験操作

3-2-1 使用菌株および使用培地

Table 3-1 の菌株を用いた。

Table 3-1 Strains used in this study

Strain	Medium
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6	MRS
<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS
<i>Weizmannia coagulans</i> JCM 2257 ^T	NB
<i>Niallia circulans</i> JCM 2504 ^T	NB
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JCM 1465 ^T	NB
<i>Kocuria rhizophila</i> NBRC 12708	LB
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS
<i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L	MRS
<i>Lacticaseibacillus casei</i> JCM 1134 ^T	M17G
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 ^T	MRS
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	M17G
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 7638	M17G
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	LB
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	MRS
<i>Escherichia coli</i> JM109	LB

ATCC, American Type Culture Collection

JCM, Japan Collection of Microorganisms

NBRC, National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center

TUA, Tokyo University of Agriculture

【使用培地】

• MRS 培地

Appendix -1 参照。

• MRS 培地 (0.5% CaCO₃)

Appendix-1 の MRS 培地試薬 52g を 1 L の蒸留水に溶解し、0.5% CaCO₃ を加え、121 °C、15 min オートクレーブ殺菌を行う。

• M17G 培地

Appendix -1 参照。

3-2-2 バイオアッセイ

抗菌活性の検出には一般的にはバイオアッセイが用いられている。これは、抗菌物質を実際に指標菌に添加し、指標菌の生育阻害を調べる方法である。バイオアッセイには、被検菌のコロニーを形成させた後、指標菌を重層する **direct method**（直接法）と **spot-on-lawn method**（間接法、寒天拡散法）とがある。本研究では、Ennahar らの方法を改良した **spot-on-lawn method**（間接法、寒天拡散法）を用いて抗菌活性値、活性回収率を算出した^{7,9)}。

【方法】

Appendix -2 参照。

L. sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌に用いた。

3-2-3 培養条件の検討

PUK6 株の生育およびバクテリオシン生産における培養条件（培地、温度、時間）を検討した。

【方法】

・培地および培養温度の検討

PUK6 株を 5 mL の MRS 試験管培地に接種し、30 °C で一晩培養した (120 strokes/min)（前培養）。5 mL の MRS 試験管培地 2 本または 5 mL の M17G 試験管培地 (0.5% グルコース) 2 本に、前培養液を 50 μL ずつ接種し、30 °C または 37 °C で 18 時間振とう培養した (100 strokes/min)。培養終了後、600 nm における吸光度（濁度）、pH、抗菌活性について調べた。

・培養時間の検討

PUK6 株を 5 mL の MRS 培地に接種し、30 °C で一晩培養した (120 strokes/min)（前培養）。300 mL 容三角フラスコに 150 mL の MRS 培地 (0.5% CaCO₃) を作製し、前培養液を 2% (v/v) となるように接種、6 h および 9 h にサンプリングし、600 nm における吸光度（濁度）、pH、抗菌活性について調べた。

3-2-4 バクテリオシンの生産

【方法】

MRS 寒天平板培地上の PUK6 株のコロニーを 5 mL の MRS 試験培地に接種し、30 °C で一晩培養した (120 strokes/min)（前培養）。1 L 容三角フラスコに 500 mL の MRS 培地 (0.5% CaCO₃) を 4 本作製し (計 2 L)、前培養液を培地の 2% (v/v) となるように接種、30 °C で 9 h 培養した (90 strokes/min)。

3-2-5 硫安沈殿（塩析）

【試薬】

- ・20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5) : 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ に 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を加えて pH 5.0 に調整する。

【方法】

本培養液を遠心チューブに入れ、15,000 g、10 min、4 °C で遠心分離した。培養液上清の一部を滅菌遠沈管に 2 mL とり、NaOH を用いて pH を 6~7 付近に調整し、クリーンベンチ内でフィルター滅菌 (0.2 μm) を行った。これを培養液上清の抗菌活性測定用サンプルとした。残りの上清をあらかじめ乾熱滅菌しておいた 1 L 容三角フラスコに集め、乳鉢で細かく粉砕した $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を、培養液上清 500 mL に対して 236 g (70%飽和) になるよう少しずつ入れ、氷中でかくはんした。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を全て入れた後、30 分以上攪拌し、4 °C で一晩放置した。懸濁液を遠心チューブに移し、15,000 g、10 min、4 °C で遠心分離し、活性沈殿物を得た。その沈殿物をできるだけ少量の 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) で懸濁し、滅菌遠沈管に集めた。

3-2-6 透析（脱塩）

【試薬および器具】

- ・20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) : 本章 3-2-4 参照。
- ・8 M 尿素-HCl buffer (pH 5.0) : 尿素 240 g を蒸留水に溶解後、濃 HCl で pH 5.0 に調整し、蒸留水で 500 mL にメスアップする。
- ・透析チューブ (スペクトラポア 7、MWCO 1,000、 $\phi 38\text{ mm} \times 24\text{ mm} \times 5\text{ m}$ 、SPECTRUM)

【方法】

硫安沈殿物を、透析チューブに入れ、1 L 容ビーカーを用いて外液を 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) とし、4 °C 下で攪拌した。外液の 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) を 2~3 h 毎に 2~3 回新しいものに替え、外液が透明になるまで攪拌した。外液を 8 M 尿素-HCl buffer (pH 5.0) に取り替え、500 mL 容ビーカーを用いて 2~3 h、4 °C 下で攪拌し、沈殿が完全に溶解したことを確認した後に透析チューブからサンプルを取り出し、遠沈管に回収した。その一部をクリーンベンチ内でフィルター滅菌 (0.2 μm) し、抗菌活性測定用サンプルとした。回収した残りのサンプルは滅菌遠沈管に入れ、4 °C で保存した。*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌として spot-on-lawn 法によるバイオアッセイを行い (Appendix-2 参照)、抗菌活性を測定して活性回収率を算出した。また、集めたサンプルの一部を用いて、粗精製ペプチンリオシンの抗菌スペクトルを調べた。使用した指標菌を Table 3-1 に示す。

3-2-7 Sep-Pak Plus tC18 によるバクテリオシンの粗精製

前処理カラム Sep-Pak Plus tC18 (Waters) を用いて、PUK6 株の培養液上清の硫酸沈殿および透析によって得られたサンプルの粗精製を行った。

【試薬】

- ・ A 液 : 0.05% (v/v) TFA (トリフルオロ酢酸)
- ・ B 液 : 0.05% (v/v) TFA 含有アセトニトリル (CH₃CN)

【方法】

あらかじめ、A 液と B 液を A/B=70/30、40/60、10/90 の 3 種類の比 (v/v) で混合した。10 mL 容シリンジに 2 つ連結した Sep-Pak Plus tC18 のカードリッジをはめ、A/B=10/90 を 10 mL 通し、カラムの洗浄を行った。以降、流速は全て 1.0 mL/min 以下で行った。A/B=70/30 を 10 mL 通し、カラムの平衡化を行った後、透析サンプルをアプライした (透析後サンプルの抗菌活性値、タンパク質濃度などを考慮し、サンプルアプライ量を決定した)。A/B=70/30、40/60 を順に 10 mL カラムに通し吸着画分を溶出させ、耐圧ビンに回収した。その後、A/B=10/90 を 10 mL 通しカラムを洗浄した。回収した画分を凍結乾燥させ、A/B=70/30、A/B=40/60 および A/B=10/90 溶出画分をそれぞれ少量の 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) で溶解した。このサンプルを、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌として、spot-on-lawn 法によるバイオアッセイを行い (Appendix -2 参照)、抗菌活性を測定した。

3-2-8 逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)

Sep-Pak Plus tC18 を用いた粗精製により得られた活性画分を凍結乾燥にて濃縮した後、HPLC による精製を行った。

【使用した機器】

- ・ HPLC 装置 : PU-2080 (日本分光)
- ・ 検出器 : UV-2070 (日本分光)
- ・ カラム : Resource RPC (3 mL) (GE Healthcare)
- ・ フラクションコレクター : CHF100AA FRACTION COLLECTER (ADVANTEC)

《検出》

【試薬】

- ・ 移動相 A : 0.05% TFA in Water

蒸留水 499.75 mL にトリフルオロ酢酸 (TFA) 0.25 mL をドラフト内で添加し、スターラーで混合する。0.45 μm セルロースアセテート膜を用いて吸引ろ過を行い、その後減圧下で 30~45 min 脱気する。

- ・ 移動相 B : 0.05% TFA in CH₃CN

アセトニトリル (CH₃CN) 499.75 mL に TFA を 0.25 mL をドラフト内で添加し、スターラーで混合する。0.5 μm PTFE を用いて吸引ろ過を行い、その後減圧下で 15~30 min 脱気する。

【条件】

- ・ 流速 : 1.0 mL/min
- ・ 吸光度 : 210 nm
- ・ グラジエント条件
 - 1st HPLC : 60 min で A/B = 70/30 から A/B = 40/60
 - 2nd HPLC : 60 min で A/B = 70/30 から A/B = 60/40

【サンプル】

- ・ Sep-Pak Plus tC18 クロマトグラフィーにおける A/B=40/60 溶出画分を凍結乾燥後、121°C、20 min でオートクレーブ殺菌した少量の 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) に溶解したもの

【方法】

流路内を移動相で満たすために、まず A 液、B 液ともに流速 10 mL/min で約 5~10 分パージした。A/B = 70/30 の割合でベースラインが安定するまで流速 1.0 mL/min で流し、カラムの平衡化を行った。その後、0.45 μm のフィルターに通したサンプル 20 μL をカラムにアプライし、60 min で B 液が 30% から 60% となるグラジエント条件で溶出させ、フラクションコレクターを用いて 60 sec または 40 sec で 1 フラクションとなるように分画した (1st HPLC)。採取したフラクションの抗菌活性を *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌とした spot-on-lawn 法によるバイオアッセイ (Appendix-2) により測定した。また、回収した活性フラクションの一部は、60 min で B 液が 30% から 40% となるようグラジエント条件を変更し、再び HPLC に供した (2nd HPLC)。

3-2-9 Tricine-SDS-PAGE およびゲルのバイオアッセイ

HPLC によって粗精製したサンプルを用いて、Tricine-SDS-PAGE およびゲルバイオアッセイを行った (Appendix-2 参照)。ゲルバイオアッセイ時の指標菌には、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を用いた。

3-2-10 タンパク質の定量

Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad) のマイクロアッセイ法によりタンパク質濃度を求めた。

【試薬】

- Quick Start BSA スタンダードセット
(0.125、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 mg/mL)
- Quick Start BSA プロテインアッセイ染色液

【方法】

定量を行うサンプルについて、20 mM リン酸 buffer (pH 5.0) を用いて 10, 100, 1,000 および 10,000 倍希釈サンプルを調製した (50 μ L)。ディスポセルにスタンダードあるいは、サンプルの希釈液を各 20 μ L、染色液を各 1 mL 加えて混和し、室温で 5 min 以上放置した後、595 nm における吸光度を測定した (ただし、1 時間以内に測定)。このとき、キット中の 1.5 および 2.0 mg/mL のスタンダードを 10 倍希釈して 0.15 および 0.2 mg/mL とし、これらもスタンダードとして使用した。スタンダードの吸光度の結果から検量線を作成し、それをもとに各サンプルのタンパク質濃度を BSA 濃度として換算した。

3-2-11 構造解析

PUK6 株バクテリオシンの精製物についてアミノ酸配列分析および質量分析を行った (共同研究者の九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門システム生物学講座微生物工学研究室の善藤威史准教授に分析を依頼した)。

【使用機器】

- アミノ酸配列分析 : PPSQ-31 gas phase automatic sequencer (島津製作所)
- 質量分析 : JMS-T100LC mass spectrometer (日本電子)

3-3 結果および考察

L. plantarum PUK6 が生産するバクテリオシンの精製を進めるため、まず PUK6 株の培養条件を検討した。その結果、PUK6 株は 150 mL の MRS 培地を含む 300 mL 容三角フラスコにて 30 °C、9 h 培養したときに、その培養液上清は 3,200 AU/mL と、最も高い抗菌活性を示した (data not shown)。そこで、この結果をもとに PUK6 株の培養を行った。500 mL の 0.5% CaCO₃ 含有 MRS 培地を含む 1 L 容三角フラスコ 4 本 (2 L 分) を用いて、30 °C、9 時間の振とう培養 (90 strokes/min) を行った。このときの培養液上清の抗菌活性は 100 AU/mL (総活性 200,000 AU) であった。培養条件検討時に比べて培養液上清の抗菌活性が低下した原因として、培養液量が増えたことで菌体の密度が低下し、クオラムセンシングによるバクテリオシン生産が減少したことや、液量が増えたことによるフラスコ培地の温度上昇が緩やかとなり、培養 9 時間では十分な生産量に達しなかったことなどが考えられた。

培養液上清に細かく粉砕した硫酸アンモニウムを 70%飽和 (500 mL あたり 236 g) となるように、攪拌しながら少しずつ添加して活性沈殿物を回収した。回収した沈殿物を 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) に対して透析を行い、その後、沈殿物の完全な溶解およびバクテリオシンの凝集を解離させて単量体の状態にするために 8 M 尿素-HCl バッファー (pH 5.0) で透析した。透析チューブ内の沈殿が完全に溶解した時点で透析を完了した。このとき、約 20 mL 透析サンプルを得た。また、この透析サンプルの抗菌活性は、6,400 AU/mL (総活性 128,000 AU) であった。

次に、この透析サンプルについて Sep-Pak Plus tC18 を用いて粗精製を行った。10 mL 容シリンジに 2 つ連結した Sep-Pak Plus tC18 のカードリッジを装置し、10 mL の A/B=10/90 でカラムの洗浄、10 mL の A/B=70/30 でカラムの平衡化を行った。透析サンプルを 500 µL アプライし、カラムに吸着させ、A/B=70/30、40/60 および 10/90 と次第にアセトニトリル濃度を高めて吸着画分をステップワイズで溶出した。これを繰り返して、透析サンプル全量の粗精製を行い、溶出したサンプルを濃縮するために凍結乾燥した。その後、A/B=70/30 溶出画分には夾雑タンパク質が多く含まれることから、20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) を少しずつ加え、最終的に 3.5 mL に溶解した。A/B=40/60 溶出画分は 0.8 mL の 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) で溶解した。これら粗精製後サンプルのバイオアッセイを行った結果、A/B=70/30 および 40/60 での溶出画分において抗菌活性がみられた (Figs. 3-1 and 3-2) (A/B=70/30 ; 抗菌活性 1,600 AU/mL、総活性 5,600 AU、A/B=40/60 ; 抗菌活性 204,800 AU/mL、総活性 163,840 AU)。

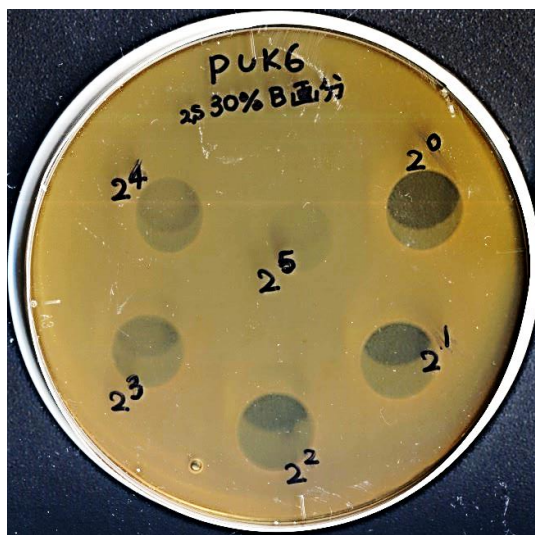


Fig. 3-1 Antimicrobial activity of the samples after Sep-Pak Plus tC18 eluted with 30% CH₃CN containing 0.05% TFA.

Cell suspension of *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T was overlaid on the gel.

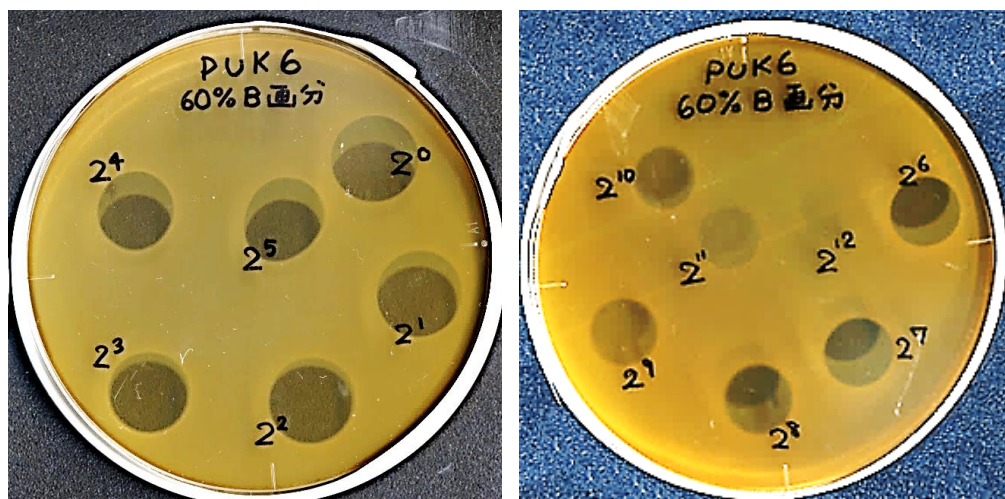


Fig. 3-2 Antimicrobial activity of the samples after Sep-Pak Plus tC18 eluted with 60% CH₃CN containing 0.05% TFA.

Cell suspension of *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T was overlaid on the gel.

今回 A/B=70/30 溶出画分を用いたバイオアッセイで抗菌活性が検出されたが、Sep-Pak Plus tC18 クロマトグラフィーのカラムは A/B=70/30 を用いて平衡化しており、本来は活性画分がカラムに吸着している画分である。これは硫安沈殿・透析後サンプルの Sep-Pak Plus tC18 クロマトグラフィーへ供する量(500 μL)が多すぎたことにより、平衡化の段階でカラムに吸着できずに溶出してしまっていることが原因と考えられる。そこで本実験では、A/B=40/60 溶出画分サンプルを活性画分とし、逆相 HPLC による精製を進めた。Sep-Pak Plus tC18 の A/B=40/60 溶出画分を凍結乾燥させ、少量(800 μL)の 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) で溶解した。そのサンプルを

20 μ L アプライし、60 min で A/B = 70/30 から A/B = 40/60 となるグラジエント条件にて逆相 HPLC を行った (1st HPLC)。その結果、複数のピークが検出された (Fig. 3-3)。次に、このグラジエント条件で 40 秒で 1 fraction となるように分取して Fraction 1~7 の 7 つの画分に分けた。それぞれ回収これらの 7 つの画分を凍結乾燥後、少量の buffer で溶解し、バイオアッセイを行った。HPLC を用いて精製する場合には、検出と各フラクションへの回収時間にタイムラグが生じるので、タイムラグを考慮し (52 秒)、Fraction 1~7 を回収した。Fraction 1~7 の溶出時間および溶出したアセトニトリル濃度を Table 3-2 に示した。

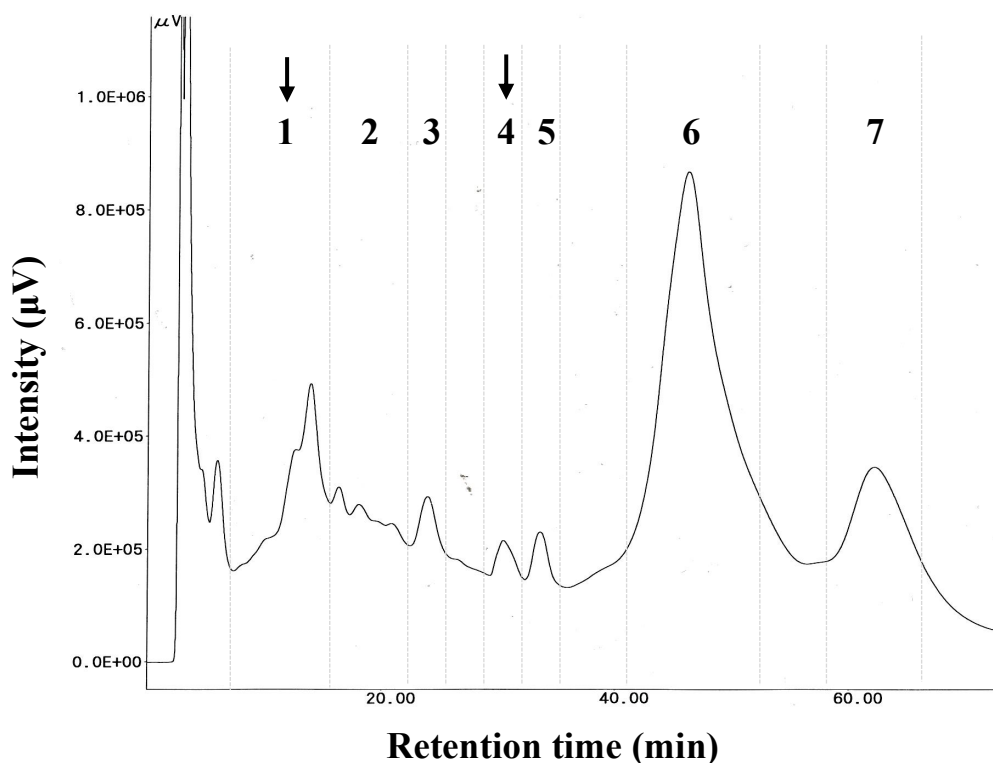


Fig. 3-3 Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) of the crude bacteriocin (1st).

The crude bacteriocin eluted with 60% acetonitrile by Sep-Pak Plus tC18 was injected into the resource RPC column and eluted with a linear gradient of 30%–60% solvent B in solvent A (solvent A, 0.05% TFA in distilled water; solvent B, 0.05% TFA in CH_3CN) for 60 min at a flow rate of 1 mL/min. Two active fractions with antimicrobial activities were obtained (Fractions 1 and 4) and a indicated by arrows.

Table 3-2 Elution time and acetonitrile concentration of each fraction when the crude bacteriocin obtained from Sep-Pak Plus tC18 chromatography was subjected to HPLC (1st HPLC).

Fraction	Eluted time (sec)	Concentration of solvent B (%)
1	462~912	33.9~37.6
2	912~1342	37.6~41.2
3	1342~1522	41.2~42.7
4	1732~1922	44.0~45.6
5	1922~2142	46.0~47.8
6	2272~3252	48.9~57.1
7	3492~4032	59.1~63.6

採取時のサンプルは、9回（20 μ L、40 μ L \times 2回、50 μ L、70 μ L \times 3回、75 μ L \times 2回）に分けてアプライし、その合計は510 μ Lだった。採取したサンプルを凍結乾燥させ、200 μ Lの20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) で溶解し、バイオアッセイを行った結果、Fraction 1 と Fraction 4 にのみ抗菌活性が検出された (Fig. 3-4)。また、各画分の Tricine SDS-PAGE およびゲルバイオアッセイを行った結果から Fraction 1 のバクテリオシンの分子量は6.1 kDa、Fraction 4 のバクテリオシンの分子量は4.1 kDa であることがわかった (Fig. 3-5)。さらに、抗菌活性が検出された2つのピークのバクテリオシンの相乗効果を調べるために、2つの活性 Fraction を等量混合したもの（混合サンプル）のバイオアッセイを行ったが、Class IIb バクテリオシンに見られるような抗菌活性の相乗効果を確認することはできなかった (data not shown)。これらのことから、PUK6 株は2分子ペプチドバクテリオシンではなく、少なくとも2種類の異なるバクテリオシンを生産していると推測された。

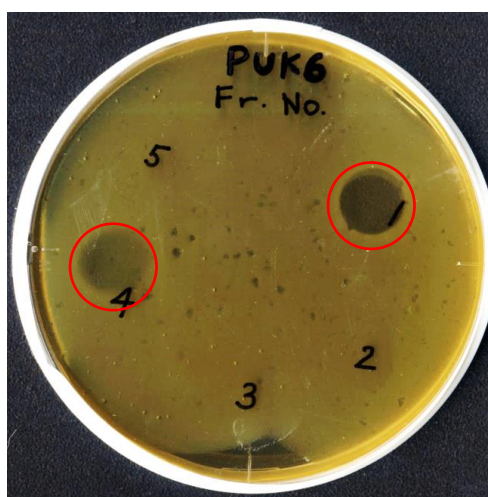


Fig. 3-4 Antimicrobial activity of Fraction 1 and 4 obtained by 1st HPLC.

Cell suspension of *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T was overlaid on the gel.

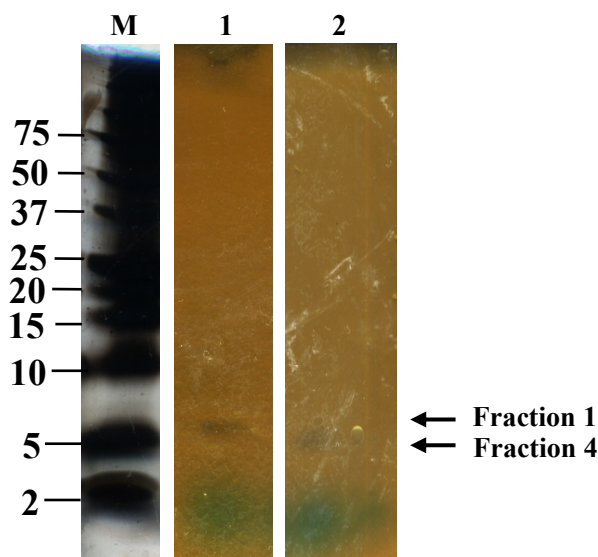


Fig. 3-5 Gel bioassay of of Fraction 1 and 4 obtained by 1st HPLC.

M, Precision Plus Protein Dual Xtra Prestained Protein Standards (Bio-Rad); 1 and 2, Fractions 1 and 4 obtained by RP-HPLC, respectively. The gel was overlaid with *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T as an indicator strain.

また、Fraction 4 のバクテリオシンについては、逆相 HPLC (1st) における活性ピークが単一であったため (Fig. 3-3)、アミノ酸配列分析および質量分析を行った。Fraction 4 のバクテリオシンのアミノ酸配列は、AELTLLAGLQFSLGIANRQDQ、であり、21 アミノ酸残基まで決定することができた。このアミノ酸配列の相同性検索を行うと、既知バクテリオシンと相同性を示すものはなかったが、*L. plantarum* LZ95 (ALV16217.1) が生産する機能不明タンパク質の一部と相同性を示した (data not shown)。さらに、Fraction 4 には塩基性アミノ酸を多く含んでいることから、Fraction 4 は、その機能不明タンパク質の分解物であり、その分解物が静菌作用を示したのではないかと考えられた。

一方、逆相 HPLC (1st) で抗菌活性を示した Fraction 1 については複数のピークが重なっていたので、グラジエントの勾配を穏やかにした逆相 HPLC (2nd) をさらに行うことにした。まず、Fraction 1 を全て回収後、凍結乾燥して 300 μ L の 20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) で溶解したものを、60 min で A/B = 70/30 から A/B = 60/40 となるようなグラジエント条件で溶出させた。サンプルを数回に分けて (25 μ L、50 μ L、100 μ L) 全量をアプライした。その結果、8 つのピークが検出され、どのピークがバクテリオシンであるのかを調べるために、ピークごとに区分けし、フラクションコレクターを用いて回収した (Fraction 1-A、-B、-C、-D、-E、-F、-G、-H) (Fig. 3-6)。それぞれ回収し、バイオアッセイを行ったところ、全ての Fraction で抗菌活性がみられた (Table 3-3)。その中でも、最も高い抗菌活性を示した Fraction 1-H (1,600 AU/mL)、次に高い抗菌活性を示した Fraction 1-D (800 AU/mL)、そして単一ピークで分画することができた Fraction 1-G (400 AU/mL) を凍結乾燥後、アミノ酸配列分析および質量

分析を行った。アミノ酸配列分析の結果、Fraction 1-D は VSIKSLQMGATAIKQVXKL FXKXG、Fraction 1-G は(V/D)(F/L/P)(T/H)AK(L/S)ARGVRNN(K/L)(K/G)SAVGPADXVI SAVRGFIHL、Fraction 1-H は GVPAMVLTGLIQILRQAKKHRKTIEWSPNW であった。次に、これらのアミノ酸配列の BLAST による相同性検索を行った結果、Fraction 1-D、Fraction 1-G、Fraction 1-H はそれぞれ plantaricin A¹⁰⁾ (60.0%)、plantaricin F¹¹⁾ (78%)、および plantaricin NC8 β ¹²⁾ (63.3%) と相同性を示した。さらに、各フラクションの質量分析の結果、Fraction 1-D は 1502.21 (2 価) および 1001.85 (3 価) を検出したことから約 3,000 Da のバクテリオシンと推定された (Fig. 3-7)。Fraction 1-G は不純物が多く複数のピークが検出されたものの、1795.24 や 1853.16 (2 価) を検出したことから、約 3,700 Da のバクテリオシンであると推定された (Fig. 3-8)。加えて、Fraction 1-H の質量分析の結果、1334.75 (3 価) および 1001.33 (4 価) を検出し、約 4,000 Da のバクテリオシンであると推定され (Fig. 3-9)、これらは plantaricin A、F および NC8 β の推定分子量 (2,985、3,702 および 4,000) とほぼ一致した。Fraction 1-D、1-G および 1-H と plantaricin A、F および NC8 β のアミノ酸配列と比較したものを Fig. 3-10 に示した。以上より、plantaricin A、plantaricin F および plantaricin NC8 β の推定分子量と質量分析の結果がほぼ一致することから、PUK6 株はこれら 3 つのバクテリオシン、あるいはその構造類似体を生産すると予想された。また、逆相 HPLC (2nd HPLC) で見られた 8 つのピークのうち残りの 5 つのピーク (A、B、C、E、F) のいずれかは、plantaricin E または plantaricin NC8 α である可能性が示唆された。しかしながら、一般的に 2 分子ペプチドバクテリオシンは 2 分子の中央付近で水素結合や塩橋を形成し、相互作用するという特徴があるため、精製過程でそれぞれのペプチドを分画することは難しい¹³⁾。そこで、今後は推定アミノ酸配列を基にバクテリオシン遺伝子のクローニングと分子解析を行うことが望ましい。

Plantaricin F および plantaricin NC8 β は、2 分子ペプチドからなるクラス II b バクテリオシン (plantaricin EF および plantaricin NC8) であることが知られている^{11,12)}。また、これまでに *L. plantarum* C11 が plantaricin A と plantaricin EF を生産し¹¹⁾、*L. plantarum* NC8 が plantaricin NC8 を生産する¹⁴⁾ことがわかっている。Plantaricin A は抗菌活性をもつバクテリオシンであるとともに、バクテリオシン生合成関連遺伝子の転写を促進する誘導物質であることも明らかとなっている¹⁵⁾。このことから本研究の *L. plantarum* PUK6 のバクテリオシンも同様の生合成機構を有する可能性がある。

PUK6 株バクテリオシンの精製をまとめたものを Table 3-4 に示す。培養液 2 L から Sep-Pak Plus tC₁₈ によるバクテリオシンの粗精製まで、活性回収率 25.6%、比活性 3.1 倍で粗精製することができた。しかしながら、PUK6 株は複数のバクテリオシンを生産することが明らかとなり、各バクテリオシン精製物の回収率および比活性は精製量が少なく求めることはできなかった。また、PUK6 株の培養液上清および硫酸沈殿・透析後の粗精製サンプルを用いて抗菌スペクトルを調べた結果、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T や *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* JCM 1164^T などの近縁種だけでなく、食品汚染菌の *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JCM 1465^T、*Weizmannia*

coagulans JCM 2257^T および *Niallia circulans* JCM 2504^T にも抗菌活性を示した (Table 3-5)。

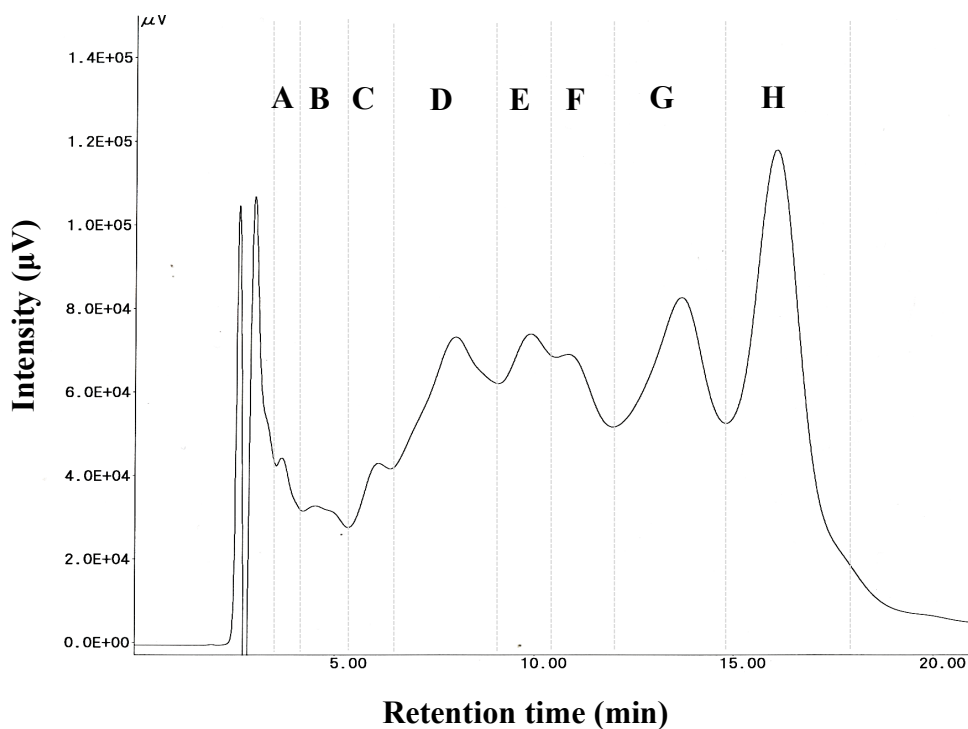


Fig. 3-6 Second RP-HPLC of Fraction 1 obtained from the first RP-HPLC.

The bacteriocins were eluted with a linear gradient of 30%–40% solvent B in solvent A (solvent A, 0.05% TFA in distilled water; solvent B, 0.05% TFA in CH₃CN) for 60 min at a flow rate of 1 mL/min. Three active peaks with high antimicrobial activities (peaks D, G, and H) were obtained.

Table 3-3 Antimicrobial activity of Fraction 1-A, B, C, D, E, F, G and H

Fraction 1	Antibacterial activity (AU/mL)
-A	200
-B	100
-C	100
-D	800
-E	400
-F	400
-G	400
-H	1600

測定データ名: Fr.1-D PUK6
 試料名(内部):
 イオン化モード: ESI+ オリフィス1電圧掃引: 80V
 質量校正データ名: TFANa_ESI+ 2000... 質量電荷比範囲: 50.0..3000.0
 処理履歴: ベース補正[5.0%];平均(MS[1] 0.10..0.21)

実験日時: 2015/03/11 16:26:50
 スペクトル記録間隔: 0.4[s]
 リングレンズ電圧: 15[V]
 スペクトルの代表測定経過時間: 0.130...
 分析者名: AccuTOF

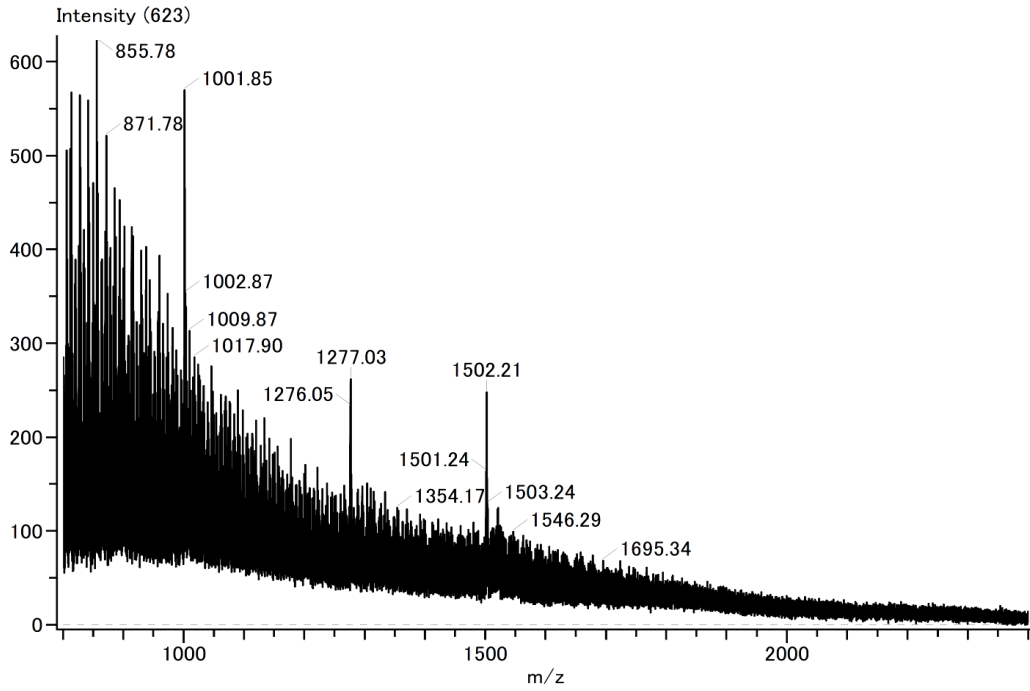


Fig. 3-7 ESI-TOF mass spectrum of Fraction 1-D

測定データ名: 1-6
 試料名(内部):
 イオン化モード: ESI+ オリフィス1電圧掃引: 80V
 質量校正データ名: TFANa_ESI+ 2000... 質量電荷比範囲: 50.0..3000.0
 処理履歴: ベース補正[5.0%];平均(MS[1] 0.10..0.14)

実験日時: 2015/05/28 14:56:47
 スペクトル記録間隔: 0.4[s]
 リングレンズ電圧: 15[V]
 スペクトルの代表測定経過時間: 0.130...
 分析者名: AccuTOF

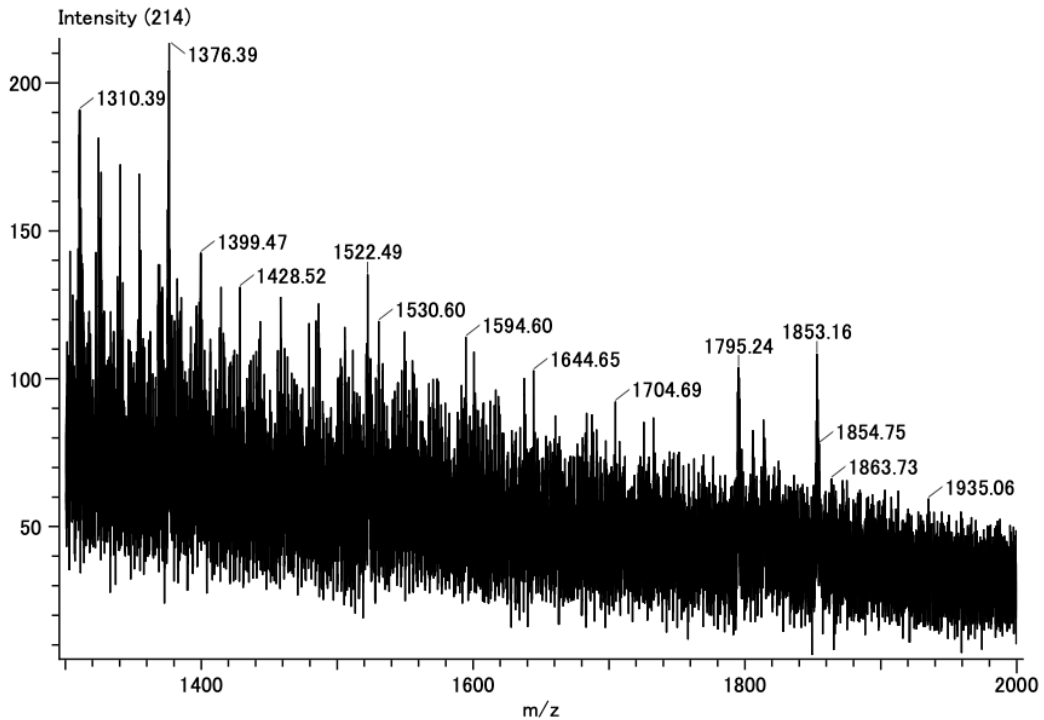


Fig. 3-8 ESI-TOF mass spectrum of Fraction 1-G

測定データ名: Fr.1-H PUK6
 試料名(内部):
 イオン化モード: ESI+ オリフィス1電圧掃引: 80V
 質量校正データ名: TFANa.ESI+.2000.... 質量電荷比範囲: 50.0..3000.0
 処理履歴: ベース補正[5.0%];平均(MS[1] 0.10..0.19)

実験日時: 2015/03/11 16:30:09
 スペクトル記録間隔: 0.4[s]
 リングレンズ電圧: 15[V]
 スペクトルの代表測定経過時間: 0.130...
 分析者名: AccuTOF

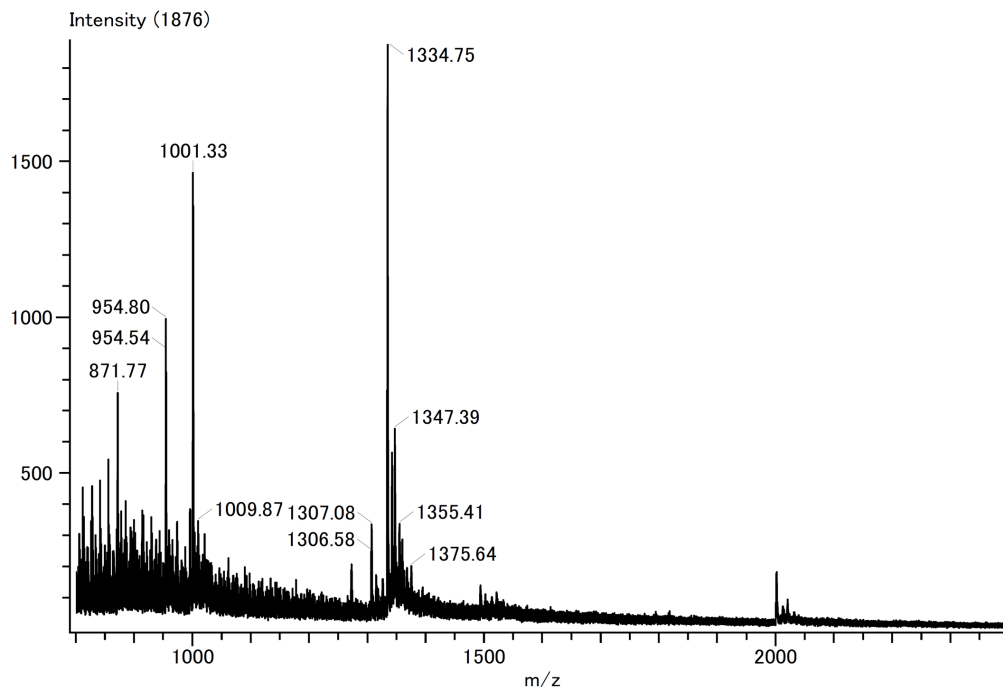


Fig. 3-9 ESI-TOF mass spectrum of Fraction 1-H

```

Fraction 1-D :  VSIAKSLQMGATAIKQVXKLFXKXG
                * ***** ** * *
plantaricin A :  AYSLQMGATAIKQVKKLFKKWGW

Fraction 1-G :  (V/D) (F/L/P) (T/H) AK(L/S) ARGVRNN (K/L) (K/G) SAVGPADXVISAVRGFIHL
                *   *      * *   * *****   *   ***** *****
plantaricin F :  V   F      H AY   S ARGVRNN Y   K   SAVGPADWVISAVRGFIHG

Fraction 1-H :  GVPAMVLTIGIQILRQAKKHRKTIEWSPNW
                ** * **** ** * ***** * *
plantaricin NC8β :  SVPTSVYTLGIKILWSAYKHRKTIEKSFNKGFYH
  
```

Fig. 3-10 Sequence comparison of Fractions 1-D, 1-G and 1-H obtained from 2nd HPLC with plantaricin A, plantaricin F, and plantaricin NC8β.

Table 3-4 Purification of the bacteriocins produced by *L. plantarum* PUK6.

Sample	Volume (mL)	Activity (AU/mL)	Total protein (mg)	Total activity (AU)	Specific activity (AU/mg)	Recovery (%)	Purification (-fold)
Culture supernatant	2,000	100	189.5	200,000	1,055	100.0	1.0
Ammonium sulfate precipitate (70 % saturation)	20	6,400	88.7	128,000	1,443	64.0	1.4
Sep-Pak Plus tC18	1	51,200	15.9	51,200	3,220	25.6	3.1

Table 3-5 The antimicrobial spectrum of the bacteriocins produced by *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6.

Indicator strain	Antimicrobial activity (AU/mL)	
	Culture supernatant of PUK6	Crude bacteriocin
<i>Weizmannia coagulans</i> JCM 2257 ^T	0	1600
<i>Niattia circulans</i> JCM 2504 ^T	0	200
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JCM 1465 ^T	100 - 200	1600 - 3200
<i>Kocuria rhizophila</i> NBRC 12708	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	0	100
<i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L	0	0
<i>Lacticaseibacillus casei</i> JCM 1134 ^T	0	100 - 200
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 ^T	100 - 200	200 - 400
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	0	0
<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	1600 - 3200	6400 - 12800
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	0	0
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 7638	0	200
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	0	0
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	0	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	0	100
<i>Escherichia coli</i> JM109	0	0

ATCC, American Type Culture Collection

JCM, Japan Collection of Microorganisms

NBRC, National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center

TUA, Tokyo University of Agriculture

3-4 小括

本章では、*L. plantarum* PUK6 が生産するバクテリオシンの精製と構造解析を行った。

まず、*L. plantarum* PUK6 を 500 mL の 0.5% CaCO₃ 含有 MRS 培地 4 本 (計 2 L) を 30 °C、9 h 培養した (100 strokes/min)。培養液上清を回収し、硫酸アンモニウムを 70% 飽和となるように添加し、氷上で緩やかに攪拌したのち、4 °C で一晩放置した。活性沈殿物を遠心分離で回収後、20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 5.0) に対して透析を行った。その後、沈殿物の完全な溶解およびバクテリオシンの凝集を解離させて単量体の状態にするために外液を 8 M 尿素-HCl (pH 5.0) に替えて透析を続けた。透析チューブ内の沈殿が完全に溶解した時点で透析を終了し、約 13 mL の透析サンプルを得た。また、この透析サンプルの抗菌活性は、6,400 AU/mL (総活性 83,200 AU) であった。その後、Sep-Pak Plus tC18 を用いて粗精製を行った結果、60%アセトニトリル溶出物の抗菌活性は 204,800 AU/mL、総活性 163,840 AU であった。次に、Sep-Pak Plus tC18 による活性画分を用いて逆相 HPLC を行った。一回目の逆相 HPLC (1st HPLC) では複数のピークが検出され、Fraction 1~7 の 7 画分に分けた (Fig. 3-3)。各画分を回収してバイオアッセイを行った結果、Fraction 1 および Fraction 4 に抗菌活性が検出された (Fig. 3-5)。Fraction 4 については単一ピークで精製できたため、アミノ酸配列分析を行った。その結果、Fraction 4 のアミノ酸配列は AELTLLAGLQFSLGIANRQDQ であった。このアミノ酸配列の相同性検索を行ったが、既知バクテリオシンと相同性を示すものではなく、*L. plantarum* LZ95 (ALV16217.1) が生産する機能不明タンパク質の一部と相同性を示した (data not shown)。Fraction 4 は塩基性アミノ酸を多く含んでいることから、機能不明タンパク質の分解物が静菌作用を示したと予想した。

一方で、Fraction 1 については逆相 HPLC (1st HPLC) において複数のピークが重なっていたため (Fig. 3-5)、その画分を全て回収し、グラジェントの勾配を穏やかにして再び逆相 HPLC に供した (2nd HPLC)。その結果、Fraction 1 はさらに A~H の 8 つのピークに分けることができ (Fig. 3-5)、それぞれ回収してバイオアッセイを行ったところ、全てのピークで抗菌活性が検出された。その中で、特に抗菌活性が高かった Fraction 1-D、1-G および 1-H のアミノ酸配列分析を行った。その結果、Fraction 1-D、1-G および 1-H は *L. plantarum* が生産する既知バクテリオシンの plantaricin A、plantaricin F および plantaricin NC8β とそれぞれ相同性を示した。このことと、質量分析の結果から、PUK6 株は、plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 あるいはそれらの構造類似体の少なくとも 3 種類のバクテリオシンを生産することが明らかとなった。また、PUK6 株の培養液上清および硫酸沈殿・透析後の粗精製サンプルを用いて抗菌スペクトルを調べた結果、PUK6 株が生産するバクテリオシンは、近縁種の他に食品汚染菌の *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JCM 1465^T、*Weizmannia coagulans* JCM 2257^T および *Niallia circulans* JCM 2504^T に対しても抗菌活性を示すことが明らかとなった。

多成分バクテリオシンを生産する *L. plantarum* は複数報告されており、PUK6 株のように発酵食品由来の株も多成分バクテリオシンを生産する¹⁶⁻¹⁸⁾。すなわち、発酵期間における高い保存性に、乳酸菌が生産するバクテリオシンが関与している可能性が高い。そのため、発酵食品から分離した乳酸菌が生産するバクテリオシンを明らかにすることで、今後の食品微生物制御技術に新たな知見をもたらすことが期待される。

第四章

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 が生産する
バクテリオシンの生合成関連遺伝子群
(*pln locus*) の同定および機能解析

4-1 緒言

ヒトにとって古くから身近な存在である乳酸菌が生産するバクテリオシンは、無味無臭であること、ヒトの腸管内の消化酵素で容易に分解できること、食経験豊富な乳酸菌が生産することから、安全性の高い天然の食品保存料として注目されている。バクテリオシンを食品保存料として安全かつ幅広く利用するためには、それらの抗菌作用機序や性質、構造、生産機構等を明らかにしていく必要がある。例えば、現在食品保存料として世界 50 カ国以上で使用されているナイシン (nisin A) は、*Lactococcus lactis* のある株が生産するバクテリオシンであり、諸性質や抗菌作用機序、生合成機構が明らかになっている¹⁾。さらに、ナイシンは医学分野においても応用が進んでおり、従来抗生物質との併用でグラム陰性菌をはじめとしたさまざまな細菌感染症予防も可能であることが報告されている^{2,3)}。他にも、*Pediococcus acidilactici* が生産する pediocin PA-1/ACH や、*Enterococcus* 属が生産する enterocin など、乳酸菌が生産するバクテリオシンの食品への応用に関する研究が行われている⁴⁾。このように、バクテリオシンやバクテリオシン生産乳酸菌を食品保存へ応用するためにも、分子レベルでの解析が求められる。

Lactiplantibacillus plantarum は、漬物やワインなどの植物性発酵食品から多く分離される乳酸菌であり、これらはプランタリシン (plantaricin) と呼ばれるバクテリオシンを生産する。代表的なものとして、発酵キュウリから分離した *L. plantarum* C11 が生産する plantaricin A、JK および EF⁵⁾、*L. plantarum* NC8 が生産する plantaricin NC8 などが挙げられる⁶⁾。これらをはじめとした多くの *L. plantarum* における plantaricin 生合成遺伝子群 (*pln* locus) の分子解析および生合成機構の解明は進められているが、未だ不明点も多い⁷⁾。

我々は、熊本県球磨地方に伝わる伝統的発酵食品の味噌漬け豆腐からバクテリオシンを生産する *L. plantarum* PUK6 を分離した⁸⁾。第三章にて、この PUK6 株が生産するバクテリオシンの精製と構造解析を行った結果、plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 あるいはそれらの構造類似体の、少なくとも 3 種類のバクテリオシンを生産することを明らかにした。これらのバクテリオシンを同定し、生合成関連遺伝子群を明らかにすることは、*L. plantarum* PUK6 の多成分バクテリオシンの生合成機構の解明につながる。

そこで本章では、PUK6 株ゲノム DNA を抽出し、遺伝子クローニング、プライマーウォーキングにより PUK6 株が生産する多成分バクテリオシンの構造遺伝子を含む生合成関連遺伝子群の塩基配列を決定すること、さらには各遺伝子の機能を解析することを目的とした。

4-2 実験操作

4-2-1 使用菌株およびプラスミド

以下の菌株およびプラスミドを用いて研究を行った (Table 4-1)。

Table 4-1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6	Wild strain	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Host for cloning and plasmid propagation, <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^-m_K^+$), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$, $\Phi80\Delta lacZ\Delta M15$, F ⁻	Clontech
Plasmids		
T-vector pMD20	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap ^r , <i>lacPOZ</i> , SP promoter	TaKaRa
pUC118 <i>HincII</i> /BAP	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap ^r , <i>lacPOZ</i> , <i>lac</i> promoter	TaKaRa

Ap^r, ampicillin resistance gene

4-2-2 菌株の保存

菌株の保存には、復元が容易な凍結保存法を用いた。*E. coli* では、菌体が生育している LB 寒天平板培地 (必要に応じて抗生物質含有) から、単コロニーを液体培地に植菌し、最適温度で 12~18 時間振とう培養 (120~150 strokes/min) を行った。その培養液に、保護分散媒として 60%グリセロール水溶液 (オートクレーブ殺菌済み) を 3:1 の割合で加え (終濃度 15%グリセロール水溶液)、セラムチューブ (滅菌済み) に 0.5 mL ずつ分注し、-80°C で保存した。*L. plantarum* PUK6 は MRS 液体培地で 30 °C、18 h 振とう培養を行った培養液に上記と同様の処理を行った。

実験期間中の短期の保存には、*E. coli* では、菌体が生育している寒天平板培地から単コロニーを寒天平板培地に植菌後、37 °C で 12~36 時間培養を行い、4 °C で保存し、3 週間毎に植え継ぎを行った。*L. plantarum* PUK6 では MRS 寒天平板培地で 30 °C、一晚培養後、4 °C で保存し 2 週間を目安に新しい培地に植え継いだ。詳細を Appendix-2 に示す。

4-2-3 Plantaricin A, EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子のクローニング

L. plantarum PUK6 のゲノム DNA を調製し (Appendix-2 参照)、PCR クローニングの鋳型に用いた。

第三章より、PUK6 株は、plantaricin A, EF および NC8 様バクテリオシンを生産することが明らかとなった。そこで、これらの遺伝子に特異的なプライマー (Table 4-2) を用い、*L. plantarum* PUK6 のゲノム DNA を鋳型にして、Ex Taq HS DNA Polymerase

(TaKaRa) による PCR を行った (Tables 4-3 and 4-4)。特異的な増幅産物が確認できたサンプルについては QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製後、T-vector pMD20 に挿入して Sambrook ら⁹⁾の方法により *E. coli* DH5 α に形質転換した (Appendix-2 参照)。EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa)を用いたコロニーPCRによりインサートのチェックを行い (Tables 4-5 and 4-6)、目的 DNA の挿入が期待されたコロニーからプラスミドを抽出した (Appendix-2 参照)。その後、GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (BECKMAN COULTER, SCIEX) を用いて DNA の塩基配列を決定した (Appendix-2 参照)。

Table 4-2 Primers used for cloning of bacteriocin structural genes

Gene	Primer name	Sequence (5'→3')	Reference
<i>plnA</i>	plnA-F	GTACAGTACTAATGGGAG	10
	plnA-R	CTTACGCCATCTATACG	
<i>plnEF</i>	plnEF-F	GGCATAGTAAAATTCCCCC	11
	plnEF-R	CAGGTTGCCGCAAAAAAAG	
<i>plnNC8β</i>	plnNC8-F	GGTCTGCGTAAGCATCGC	12
	plnNC8-R	AATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC	

Table 4-3 Components of reaction mixture

Components	Volume (μ L)	Final concentration
10 x Ex Taq buffer (Mg ²⁺ plus)	5	1 x
2.5 mM dNTPs	4	0.2 mM each (A,T,G,C)
Forward primer (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
Reverse primer (10 μ M)	2.5	0.5 μ M
Template DNA	x	<500 ng
Ex Taq HS DNA Polymerase	0.25	2.5 unit/100 μ L
Sterilized water	up to 50	

Table 4-4 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	55 °C	30 sec
Extend	72 °C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

Table 4-5 Components of reaction mixture for 10 colonies

Components	Volume (μL)
EmeraldAmp PCR Master Mix (2 x Premix) (TaKaRa)	50
Forward primer (10 μM)	2
Reverse primer (10 μM)	2
Sterilized water	46
Total	100

Table 4-6 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	5 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	55 °C	30 sec
Extend	72 °C	1 min (to step 2 x 35)
Cool	4 °C	∞

4-2-4 Plantaricin A、EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子座の決定

PUK6 株が生産する 3 種類のバクテリオシン (plantaricin A、EF および NC8 あるいはそれらの構造類似体) の遺伝子座を PCR を用いて決定することにした。*L. plantarum* PUK6 のゲノム DNA を鋳型とし、前項で用いたプライマーおよび Tks Gflex PCR polymerase (TaKaRa) を用いて PCR を行った (Tables 4-2, 4-7, 4-8 and 4-9)。アガロースゲル電気泳動により、特異的な増幅産物が確認できたサンプルについては QIAquick PCR Purification Kit を用いて増幅産物を精製した。そして、Mighty Cloning Reagent Set <Blunt End> (TaKaRa) を用いた Blunting Kination 反応後、pUC118 *HincII*/BAP に挿入し、*E. coli* DH5 α に形質転換した (Appendix-2 参照)。コロニー PCR により目的遺伝子の導入が期待できたコロニーから DNA シークエンシング用のプラスミド抽出を行い、塩基配列を決定した (Appendix-2 参照)。

Table 4-7 Components of reaction mixture

Components	Volume (μL)	Final concentration
2 x Gflex PCR buffer (Mg^{2+} , dNTP plus)	25	1 x
Forward primer (10 μM)	1.5	0.2 μM
Reverse primer (10 μM)	1.5	0.2 μM
Template DNA	X	100 ng
Tks Gflex DNA Polymerase	1	2.5 unit/100 μL
Sterilized water	Up to 50	

Table 4-8 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	55 °C	15 sec
Extend	68 °C	15 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

Table 4-9 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Extend	68 °C	15 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

4-2-5 PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) のクローニング

本章 4-2-4 の結果より、PUK6 株は *L. plantarum* の 8P-A3 株および J51 株と同様の遺伝子クラスターを有していることがわかった。そこで、これらの株やその他の *L. plantarum* に共通する遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマー (Table 4-10) および PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)、Ex Taq HS DNA Polymerase (TaKaRa) または Tks Gflex DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて、PUK6 株ゲノム DNA の PCR を行った (Tables 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17 and 4-18)。得られた増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて dA を付加、あるいは Mighty Cloning Reagent Set <Blunt End> (TaKaRa) を用いた Blunting Kination 反応後、T-vector pMD20 または pUC118 *HincII*/BAP に挿入し、*E. coli* DH5 α を形質転換した (Appendix-2 参照)。コロニー PCR により目的 DNA の挿入が期待されたコロニーからプラスミドを抽出し、塩基配列を決定した (Appendix-2 参照)。

Table 4-10 Primers used in this study

Gene	Primer name	Sequence (5'→3')	Reference
<i>plnA</i>	plnA-F	GTACAGTACTAATGGGAG	11
	plnA-R	CTTACGCCATCTATACG	11
<i>plnEF</i>	plnEF-F	GGCATAGTTAAAATCCCCCCC	13
	plnEF-R	CAGGTTGCCGCAAAAAAAG	13
<i>plnC8βa</i>	plnC8-F	GGTCTGCGTAAGCATCGC	14
	plnC8-R	AATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC	14
	C18	CCAAGTTATGGAGCTCTTGGGGATATTATC	This study
<i>brnQ1</i>	brnQ1-F	ATGCTCTTTGGGATGTTTTT	13
<i>napA1</i>	napA1-F	CGGTCAGGTGACTGCAACAC	15
<i>plnG</i>	plnG-F	TTACAAGGGGTCAGCTATCGTT	15
	plnG-R	TCAGTAATTGCATCCAGTCCAC	15
<i>plnW</i>	P22	GATGAAATGTTACAGAAGAATTTA	This study
	plnW-R	GTGTCATCGCTACCGGATTT	15
<i>helD</i>	C34	TTACTTCTTAGACACCTATGAACAAT	This study

Table 4-11 Components of reaction mixture

Components	Volume (μL)	Final concentration
5 x PrimeSTAR PCR buffer (Mg ²⁺ plus)	10	1 x
2.5 mM dNTPs	4	0.2 mM each (A,T,G,C)
Foward primer (10 μM)	1.5	0.2~0.3 μM
Reverse primer (10 μM)	1.5	0.2~0.3 μM
Template DNA	x	<100 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5	1.25 unit/50 μL
Sterilized water	up to 50	

Table 4-12 Components of reaction mixture

Components	Volume (μL)	Final concentration
10 x Ex Taq buffer (Mg ²⁺ plus)	5	1 x
2.5 mM dNTPs	4	0.2 mM each (A,T,G,C)
Foward primer (10 μM)	2.5	0.5 μM
Reverse primer (10 μM)	2.5	0.5 μM
Template DNA	x	<500 ng
Ex Taq HS DNA Polymerase	0.25	2.5 unit/100 μL
Sterilized water	up to 50	

Table 4-13 Components of reaction mixture

Components	Volume (μL)	Final concentration
2 x Gflex PCR buffer (Mg^{2+} , dNTP plus)	25	1 x
Foward primer (10 μM)	1.5	0.2~0.3 μM
Reverse primer (10 μM)	1.5	0.2~0.3 μM
Template DNA	x	<100 ng
Tks Gflex DNA Polymerase	1	2.5 unit/100 μL
Sterilized water	up to 50	

Table 4-14 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	55 °C	15 sec
Extend	72 °C	3 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

Table 4-15 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	50 °C	30 sec
Extend	72 °C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

Table 4-16 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	55 °C	15 sec
Extend	72 °C	6 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

Table 4-17 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	55 °C	15 sec
Extend	68 °C	4 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

Table 4-18 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	3 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	55 °C	15 sec
Extend	72 °C	4 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

4-2-6 プライマーウォーキング

PUK6 株の *pln* locus の全塩基配列を決定するために、前項で作製したクローンの塩基配列を決定した。その際、インサートの全長を一度の DNA シークエンシングで明らかにできなかったため、明らかにした塩基配列を基に新たにプライマーを作製し、この作業を繰り返すことで各クローンの目的とする部分の全塩基配列を決定するプライマーウォーキングを行った。使用したプライマーを以下に示す (Tables 4-19 and 4-20)。

Table 4-19 Primers used in this study (sense strand)

Primer	Sequence
PUK6pln-P1	5'-GTTTAAATTAGTGACGACAAGC-3'
PUK6pln-P2	5'-AGCTATCTTGGATGACACTACAT-3'
PUK6pln-P3	5'-ATGAGAATGGTAATACACTATCA-3'
PUK6pln-P4	5'-TTAGTCGTATTTAAAATTAGTGACAA-3'
PUK6pln-P5	5'-AATAAGCAATTAAATGATTATCTTAA-3'
PUK6pln-P6	5'-AAGGGTCAAAAAGCTATTAGTTTATA-3'
PUK6pln-P7	5'-AATTAATATTTAATTGATAAGCAACAA-3'
PUK6pln-P8	5'-AATAAGTGTTTCCAATTTATTTATTA-3'
PUK6pln-P9	5'-ATATTGATAGCTTAACGACACAAT-3'
PUK6pln-P10	5'-TTGCATATTTATTAGAAGAAAACAT-3'
PUK6pln-P11	5'-TTCCAGGTAATTTAAATAGTTTGA-3'

PUK6pIn-P12	5'-ATCACGAATGGTTTTGTAATCTA-3'
PUK6pIn-P13	5'-TTAACGTCAAATACCAATGTTAG-3'
PUK6pIn-P14.2	5'-GATTATTAAGGACATCAATGTAGTA-3'
PUK6pIn-P15	5'-GGATTTATTCCAAGCTTATTA-3'
PUK6pIn-P16	5'-ATTAAAACATAAGAATTAGTTTATCCA-3'
PUK6pIn-P17	5'-ATAGATTGCGAAAACACTACAATAA-3'
PUK6pIn-P18	5'-CTAAACTAATTATTCCAGCTGTAA-3'
PUK6pIn-P19	5'-AATTTGTTGATTATCTACGTAAGA-3'
PUK6pIn-P20	5'-ATCGATATTTTAACTCAAGTATAA-3'
PUK6pIn-P21	5'-AGACTAACTGTTTCATGTATTCATAA-3'
PUK6pIn-P22	5'-GATGAAATGTTACAGAAGAATTTA-3'
PUK6pIn-P23	5'-ATAATTGAAATTGTAGTGCTACAA-3'
PUK6pIn-P24	5'-ATAGTGGAAATTTTATGTTGATT-3'
PUK6pIn-P25	5'-TATTGGTAATTTATTGGATAATG-3'
PUK6pIn-P26	5'-TAATGTCTGTTAATTATACCAATC-3'
PUK6pIn-P27	5'-ACATTCATCAAATATTGATTGATA-3'
PUK6pIn-P28	5'-ATAATTAATAGATACCGATACTTAATAAT-3'
PUK6pIn-P29	5'-GTATTCTTCAGTTATCGCTACAAT-3'
PUK6pIn-P30	5'-TAGGTGTTATATTAAGAGCATAGAAA-3'
PUK6pIn-P31	5'-TATTTATTAGCTTACTCATTGATT-3'
PUK6pIn-P32	5'-CTAAATTTCTAAATCAGTTATC-3'
PUK6pIn-P33	5'-ATTTAACGACTTTAGTTCAAACG-3'
PUK6pIn-P34	5'-ACTACTTAACTGGGTCCATTTAA-3'
PUK6pIn-P35	5'-AACTATTATGGCGATTATTATTTGTTTAGC-3'
PUK6pIn-P36	5'-TTACGTCTTGTCAGACCAATAT-3'
PUK6pIn-P37	5'-CTATATATGAAATTTGCACAGATA-3'
PUK6pIn-P38	5'-CTAAATCTTTAGTTAGTACGGCAA-3'

Table 4-20 Primers used in this study (antisense strand)

Primer	Sequence
PUK6pIn-C1	5'-GCAAAAATAGCACTAAAAAATTC-3'
PUK6pIn-C2	5'-AATCGTCAAATTAACATCATCTAA-3'
PUK6pIn-C3	5'-ACCGTTATCCAGTTATACTTGAGT-3'
PUK6pIn-C4	5'-ATCTATTTCCAATAATAAATTGAAT-3'
PUK6pIn-C5	5'-TAATCCAAAAAAGTGTCATATTCT-3'
PUK6pIn-C6	5'-TTTGTGCACACTAATGTTAATAA-3'

PUK6pIn-C7	5'-CTTATTATCGCAAACACAACACTAA-3'
PUK6pIn-C8	5'-CACCAATTATTAAGTATCGGTATCTA-3'
PUK6pIn-C9	5'-GATAATTACGGTGATTATACTGATT-3'
PUK6pIn-C10	5'-AAATAATTACTATGACGATTGAACT-3'
PUK6pIn-C11	5'-TGCTCAGCCTTTTTAGTTTATAT-3'
PUK6pIn-C12	5'-TTTATAATAATCAAACCAAGTCACC-3'
PUK6pIn-C13	5'-TTTATACTTCTAAAGACGTCGATAGA-3'
PUK6pIn-C14	5'-ACTAAGTAGTAACAACGTTTTTGA-3'
PUK6pIn-C15	5'-CTTAGCGACATACTCATTAAAAA-3'
PUK6pIn-C16	5'-ATTGGTTGATAGATTTTTCTAGTT-3'
PUK6pIn-C17	5'-GAATAATTAGTAATGTTGAAAAATTT-3'
PUK6pIn-C18	5'-TAATTGCTTTCTATAGCTTTAATATAA-3'
PUK6pIn-C19	5'-GAACTCAGCAACCCTTATTAATA-3'
PUK6pIn-C20	5'-TTAATCCACTTGAGATTTGAT-3'
PUK6pIn-C21	5'-TATTATCGTACAATAATTTACCGATA-3'
PUK6pIn-C22	5'-ATCTCAAACAAGATACTACGATT-3'
PUK6pIn-C23	5'-TAAACTGCTCATATCAATATTCACT-3'
PUK6pIn-C24	5'-TTAGAATTCATAACATTATTCATTAA-3'
PUK6pIn-C25.2	5'-ATTTAATTGACTTTCATTATGAATT-3'
PUK6pIn-C26	5'-CAATATCTCATTCTTCAGATGCT-3'
PUK6pIn-C27	5'-AATAATTTCAATACCAATGAATAAAT-3'
PUK6pIn-C28	5'-ACCAAATAATATCCGAATAGTAA-3'
PUK6pIn-C29	5'-CAATCATGATACTCAACAGAAT-3'
PUK6pIn-C30	5'-AAAGTCTTACCATCTATCATACAC-3'
PUK6pIn-C31	5'-CATCTATCATACACCTTTAGTCCT-3'
PUK6pIn-C32	5'-ATAACTGATTTTAGGAAATTTAGC-3'
PUK6pIn-C33	5'-ATTACTGATAAATCAGTGAATTTG-3'
PUK6pIn-C34	5'-TTACTTCTTAGACACCTATGAACAAT-3'
PUK6pIn-C35	5'-ATTACGTTGAATAAGAGCTACC-3'
PUK6pIn-C36	5'-ATCTTATATACGATTGCGTCAC-3'
PUK6pIn-C37	5'-ACACGAATATCATGCTTAGATAATA-3'
PUK6pIn-C38	5'-AAGCTAACTAACAGTGTAACCAA-3'

4-2-7 *pln* locus 上遺伝子の機能解析

前項で決定した塩基配列を元に BLAST 検索を行い、相同性の高い他の *L. plantarum* の株のゲノム情報を入手した。さらに機能について明らかになっていない遺伝子については、データベースによるその塩基配列由来の推定アミノ酸配列に基づいた機能解析を行った。

【使用データベース】

- BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
(NCBI : National Center for Biotechnology information)
- InterPRO (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)
(EBI : European Bioinformatics Institute)
- Phobius (<http://phobius.cgb.ki.se/>)
(SBC : Stockholm Bioinformatics Center)

4-3 結果および考察

4-3-1 Plantaricin A、EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子の塩基配列の決定

第三章にて、*L. plantarum* PUK6 は plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 あるいはその構造類似体を生産していると考えられた。そこで、これらの構造遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行ったところ、それぞれ特異的増幅産物が得られた (Fig. 4-1)。次に、得られた PCR 増幅産物をベクターにクローニング後、DNA シークエンシングを行い、塩基配列を決定した。BLAST 検索したところ、塩基配列を明らかにした範囲において、各増幅産物の塩基配列は plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 とアミノ酸レベルで 100%一致した。このことから、*L. plantarum* PUK6 が生産するバクテリオシンは plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 と同一である可能性が高いと考えられた。

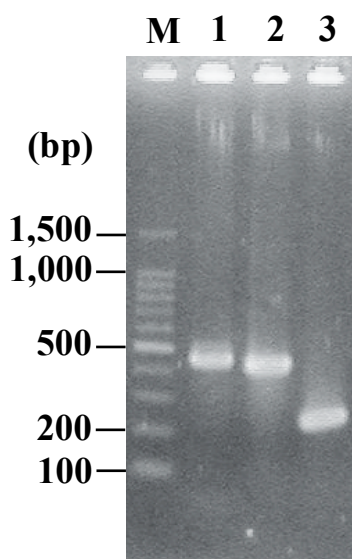


Fig. 4-1 Electrophoresis of PCR using the primers specific for the structural genes of plantaricins A, EF and NC8

Agarose gel electrophoresis of PCR products with the primers specific for plantaricins A (lane 1), EF (lane 2), and NC8 (lane3). The genomic DNA of *L. plantarum* PUK6 was used as a template. M, 100 bp DNA ladder marker.

4-3-2 Plantaricin A、EF および NC8 様バクテリオシン構造遺伝子座の決定

L. plantarum PUK6 は plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 を生産することが予想された。そこで、これら各バクテリオシンの構造遺伝子座を決定するために、PUK6 株ゲノム DNA を用いた PCR クローニングを行った。まず、以下に示す 8 つの仮説 (Fig. 4-2) を立て、各バクテリオシン構造遺伝子に特異的なプライマーの組合せを考えた (Table 4-21)。

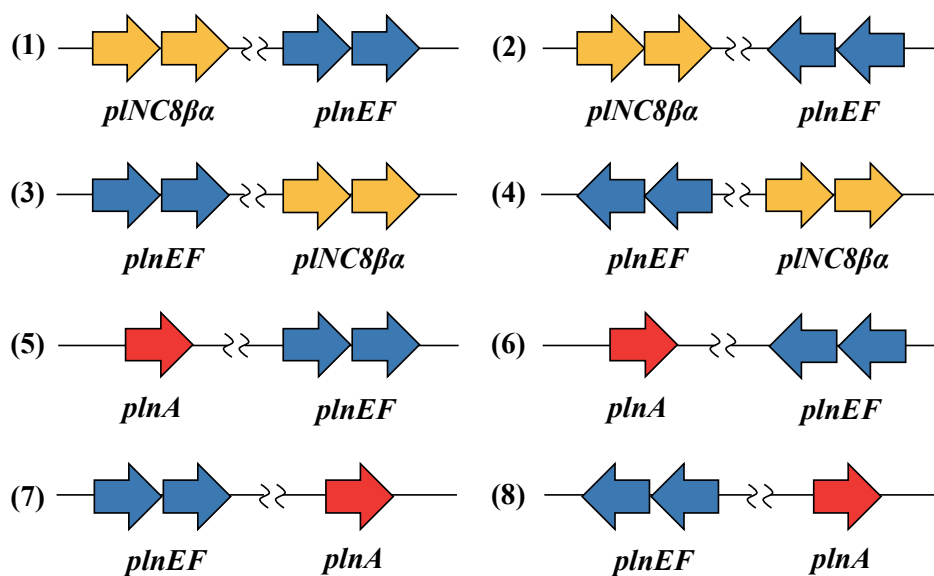


Fig. 4-2 Hypothesis of putative plantaricins structural genes locus in *L. plantarum* PUK6

Table 4-21 Combination of the primers

(1)	pINC8-F	plnEF-R
(2)	pINC8-F	plnEF-F
(3)	pINC8-R	plnFF-F
(4)	pINC8-R	plnEF-R
(5)	plnA-F	plnEF-R
(6)	plnA-F	plnEF-F
(7)	plnA-R	plnEF-F
(8)	plnA-R	plnEF-R

PUK6株のゲノムDNAを鋳型とし、Table 4-21に示したプライマーの組み合わせにてPCRを試みた結果、Fig. 4-2の仮説の(2)および(6)にて、それぞれ約10 kbおよび約4 kbの特異的増幅が見られた (Fig. 4-3)。

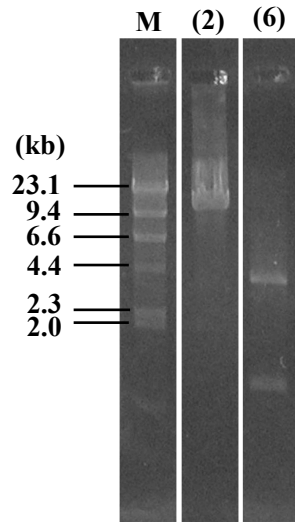
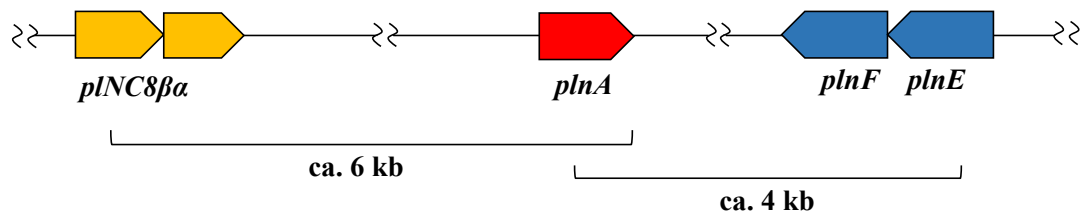


Fig. 4-3 Location and orientation of plantaricin structural genes on *pln* locus in *L. plantarum* PUK6 by PCR analysis

M, Loading Quick λ HindIII marker; (2), The product amplified by PCR with *plnNC8-F* and *plnEF-F*; (6), The product amplified by PCR with *plnA-F* and *plnEF-F*.

以上の結果より、PUK6 株の生産する 3 種類のバクテリオシンの構造遺伝子は、*plNC8 β a*、*plnA* および *plnF* および *plnE* の並びで Fig. 4-4 のように位置していると考えられた。また、各バクテリオシン構造遺伝子の位置や相同性から、PUK6 株のバクテリオシン遺伝子は、*L. plantarum* J51 および 8P-A3 と同様の遺伝子クラスターを有していると予想された^{15,16)} (Fig. 4-4)。

● *pln* locus in *L. plantarum* PUK6 (This study)



● *pln* locus in *L. plantarum* strains J51 and 8P-A3

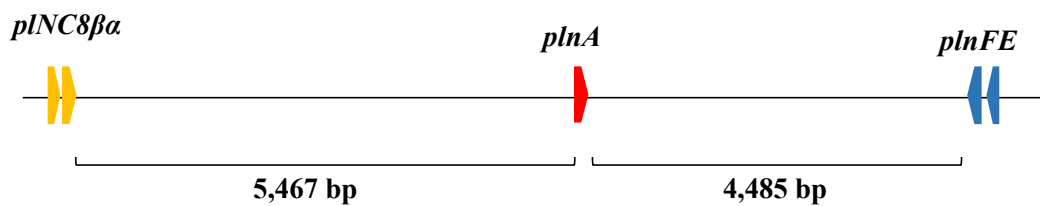


Fig. 4-4 Putative plantaricin structural gene locus in *L. plantarum* PUK6

4-3-3 PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の決定

前項において明らかにした遺伝子の塩基配列や構造遺伝子の位置関係から、PUK6 株の plantaricin 生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) は、*L. plantarum* の J51 株および 8P-A3 株と同様の遺伝子クラスターを有していると考えられた^{15,16)}。そこで、これらの *pln* locus と同様あるいは類似の *pln* locus を有する *L. plantarum* に共通する遺伝子である、*brnQ1*、*napA1*、*plnG*、*plnW* および D-helicase 遺伝子を選択し、その遺伝子に特異的なプライマーを設計した (Fig. 4-5)。

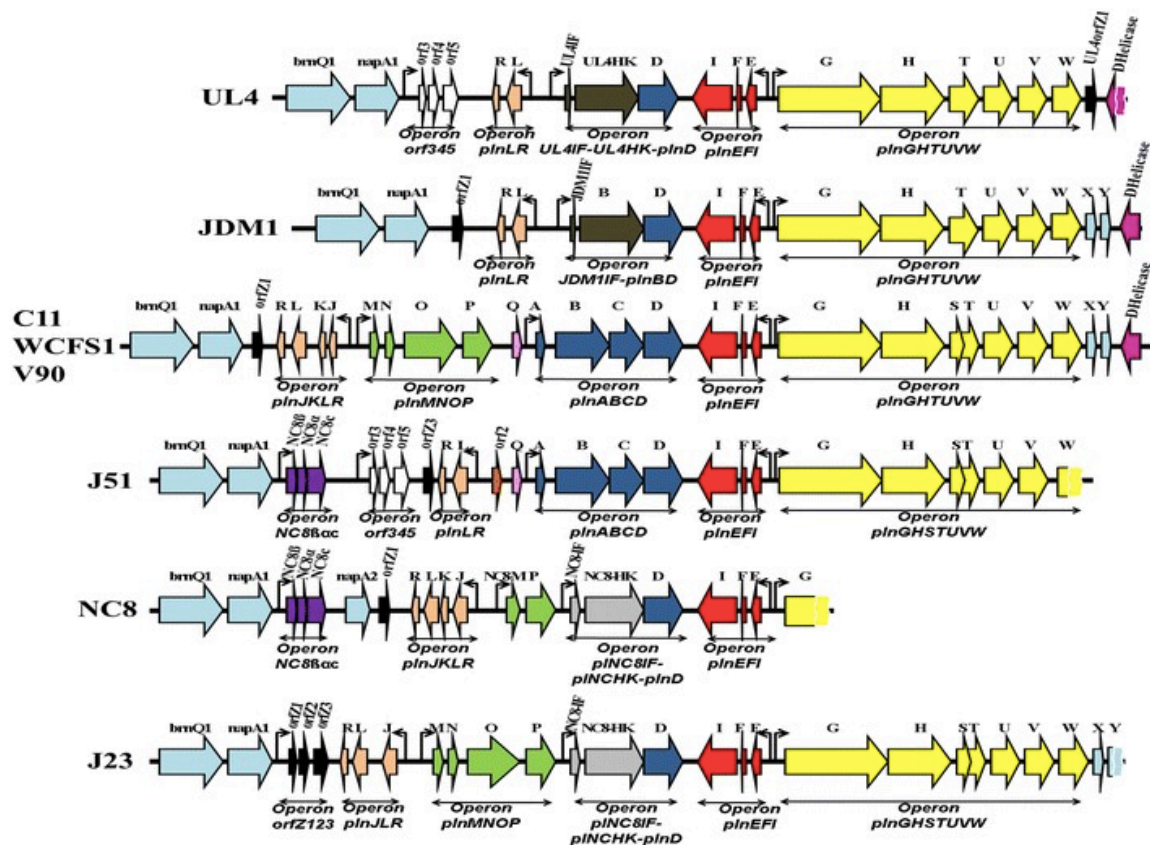
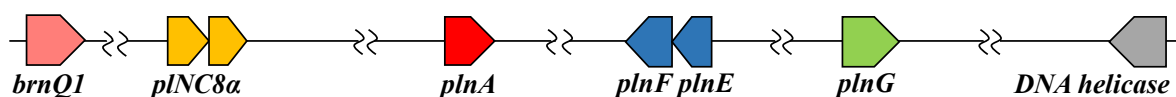


Fig. 4-5 *pln* loci in *L. plantarum*¹¹⁾

まず、これら遺伝子と、これまでに明らかにした構造遺伝子に特異的なプライマーを用いて、さらに PCR クローニングを行った (Figs. 4-6 and 4-7, and Table 4-22)。



►The fragments amplified by PCR

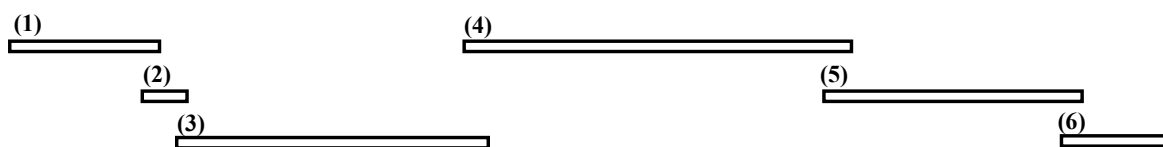


Fig. 4-6 Specific genes and PCR fragments on *pln* locus in *L. plantarum* PUK6

Table 4-22 PCR condition

Primer				
No.	Sense	Antisense	Components	Cycling condition
(1)	brnQ1-F	PUK6pln-C18	Table 4-11	Table 4-14
(2)	napA1-F	plnC8-R	Table 4-12	Table 4-15
(3)	plnNC8α-f2	plnA-R	Table 4-11	Table 4-16
(4)	plnA-F(I-UL4)	plnG-R	Table 4-13	Table 4-17
(5)	plnG-F	plnW-R	Table 4-13	Table 4-17
(6)	PUK6pln-P22	PUK6pln-C34	Table 4-11	Table 4-18

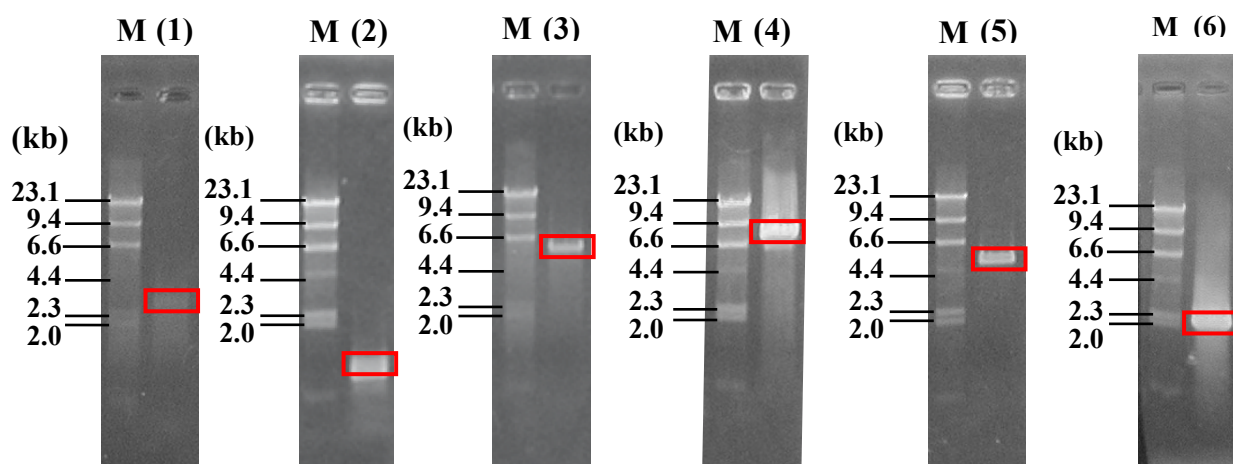


Fig. 4-7 PCR analyses of the *pln* locus

The products amplified by PCR with the primer sets. (1), The product amplified by PCR with brnQ1-F and PUK6pln-C18; (2), The product amplified by PCR with napA1-F and plnC8-R; (3), The product amplified by PCR with plnNC8α-f2 and plnA-R; (4), The product amplified by PCR with plnA-F(I-UL4) and plnG-R; (5), The product amplified by PCR with plnG-F and plnW-R; (6), The product amplified by PCR with PUK6pln-P22 and PUK6pln-C34; M, Loading Quick λ HindIII marker.

次に、得られた PCR 増幅産物を精製し、pUC118HincII/BAP または T vector-pMD20 にクローニングした。以降、作製したクローンを用いて DNA シークエンシングを行った。さらに、明らかにした塩基配列を基に新たにプライマーを作製し (Tables 4-19 and 4-20)、プライマーウォーキングを行った。その結果、21,847 bp の plantaricin 生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の塩基配列を決定した (Fig. 4-8) (accession no. LC666911 in EMBL, GenBank and DDBJ databases)。また、PUK6 株の *pln* locus の塩基配列は、*L. plantarum* の J51 株および 8P-A3 株の *pln* locus の塩基配列と 99% の相同性を有していた。

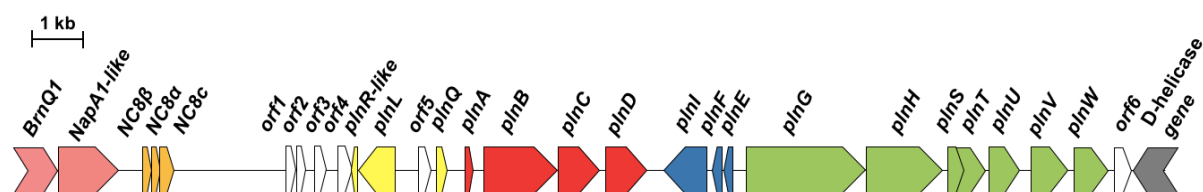


Fig. 4-8 *pln* locus in *L. plantarum* PUK6

4-3-4 *pln* locus 上遺伝子の機能解析

前項で明らかにした *pln* locus 上に存在する遺伝子について、BLAST 検索による機能解析を行った。その結果、PUK6 株は *L. plantarum* の J51 株および 8P-A3 株の *pln* locus と 99%の相同性を示した。そこで、これらの株のゲノム情報を基に、各遺伝子の機能を決定・推定した (Table 4-23)。

Table 4-23 Gene function on the *pln* locus in *L. plantarum* PUK6

Gene	Designation
<i>brnQ1</i>	branched-chain amino acid transport protein
<i>napA1-like</i>	putative cation:proton antiporter
<i>plNC8β</i>	plantaricin NC8 beta peptide precursor
<i>plNC8α</i>	plantaricin NC8 alpha peptide precursor
<i>plNC8c</i>	putative immunity protein (plantaricin NC8)
<i>orf1</i>	two-peptide bacteriocin precursor (plantaricin PUK6)
<i>orf2</i>	two-peptide bacteriocin precursor (plantaricin PUK6)
<i>orf3</i>	putative immunity protein
<i>orf4</i>	hypothetical protein
<i>plnR-like</i>	putative plantaricin biosynthesis protein PlnR
<i>plnL</i>	bacteriocin immunity protein
<i>orf5</i>	hypothetical protein
<i>plnQ</i>	plantaricin biosynthesis protein PlnQ
<i>plnA</i>	plantaricin A precursor
<i>plnB</i>	histidine protein kinase PlnB
<i>plnC</i>	response regulator PlnC
<i>plnD</i>	response regulator PlnD
<i>plnI</i>	immunity protein PlnI
<i>plnF</i>	two-peptide bacteriocin plantaricin EF subunit PlnF
<i>plnE</i>	two-peptide bacteriocin plantaricin EF subunit PlnE
<i>plnG</i>	peptide cleavage/export ABC transporter PlnG
<i>plnH</i>	bacteriocin secretion accessory protein PlnH
<i>plnS</i>	plantaricin biosynthesis protein PlnS
<i>plnT</i>	integral membrane protein PlnT (protease CAAX family)
<i>plnU</i>	integral membrane protein PlnU (protease CAAX family)
<i>plnV</i>	integral membrane protein PlnV (protease CAAX family)
<i>plnW</i>	integral membrane protein PlnW (protease CAAX family)
<i>orf6</i>	hypothetical protein
<i>helD</i>	DNA helicase gene (AAA family ATPase)

その結果、PUK6 株は既知バクテリオシンである plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 を生産することがわかり¹⁰⁻¹²⁾、さらに *pln* locus 上に 29 の遺伝子を見出した。このうち、*plNC8βac*、*plnLR-like*、*plnABCD*、*plnEFI*、*plnGHSTUVW* はバクテリオシン生合成に関連する 5 つの推定オペロンであった。*plNC8βac* と *plnEFI* は 2 分子ペプチドバクテリオシンと関連する免疫タンパク質をコードする。また、*plnABCD* は二成分調節系に関係し、*plnA* はバクテリオシンかつ他のバクテリオシン遺伝子の転写を誘導するフェロモンである plantaricin A、*plnB* はヒスチジinkinナーゼ、*plnCD* はレスポンスレギュレーターをコードする。リン酸化された PlnCD は、*pln* locus 上に存在する複数のオペロンの転写を促進または抑制する⁷⁾。なお、*plnB* および *plnD* については、開始コドンが TTG であり、*plnC* の開始コドンは GTG である。これは、原核生物の開始コドンの多様性によるものであり、まれに見られる配列である¹⁷⁾。*plnGHSTUVW* は、バクテリオシン輸送遺伝子および免疫タンパク質遺伝子と推定される¹¹⁾。菌体内で生成したバクテリオシン前駆体は、PlnG/H によってリーダー配列部分が切断され、活性型バクテリオシンとして菌体外に排出（分泌）されることが推測されているが、未だこの機能は完全には解明されていない¹⁸⁾。*plnJR-like* は、*L. plantarum* の C11、WCFS1、99 および V90 株の *pln* locus 上に存在する 2 分子ペプチドバクテリオシン遺伝子とその免疫タンパク質遺伝子のオペロンである *plnJKLR* の一部であり¹¹⁾、PUK6 株だけでなく J51 株と 8P- A3 株においても、*plnJK* の一部と *plnR* の一部が欠損している¹⁶⁾。また、J51 株の *napA1* と相同性 99%を示した遺伝子が PUK6 株の *pln* locus 上に存在するが、遺伝子の途中で終止コドンが存在していたことから、活性型として発現していない可能性が考えられる (*napA1-like*)。さらに、*pln* locus 上に機能不明の 6 つの *orf* を見出した。そこで、InterPRO を用いて、これら 6 つの遺伝子の推定翻訳産物の機能解析を行った。その結果、Orf1 は ComC protein family、Orf2 は Bacteriocin class IIb protein family に属していることが明らかになり、2 分子ペプチドバクテリオシンである可能性が示唆された。さらに、Orf3 については、膜貫通領域のドメインが検出された。そこで、Phobius (<https://phobius.sbc.su.se>) を用いて、詳細な膜貫通領域解析を行った (Fig. 4-9)。

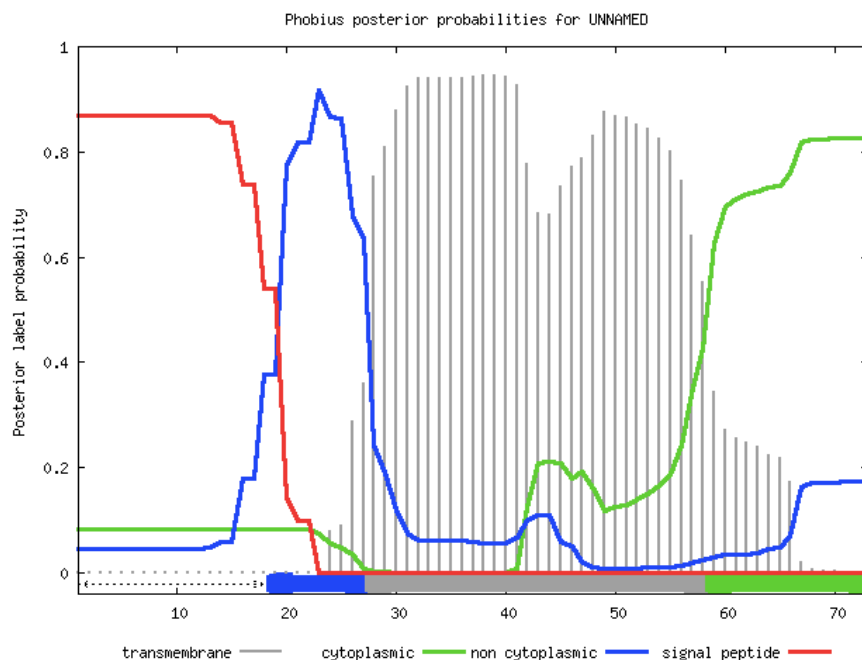


Fig. 4-9 Transmembrane region analysis of the putative translational product of from *orf3* using Phobius

その結果、1 番目のアミノ酸が N 領域（正電荷アミノ酸）、2-13 域が H 領域（疎水性アミノ酸）、14-18 域に C 領域（シグナル配列）が存在し、また、28-58 残基が膜貫通領域であった。このことから、Orf3 は細胞膜上に存在していることが示唆された。PINC8c (plantaricin NC8 の免疫タンパク質) や PlnI (plantaricin EF の免疫タンパク質) など、多くの免疫機能（自己耐性機能）を司るペプチドは細胞膜上に存在している。このことから、Orf3 は細胞膜上に存在し、免疫タンパク質として機能していると予想された。また、Navarro らにより、J51 株における *orf3*、*orf4* および *orf5* はバクテリオシンおよびその免疫タンパク質遺伝子としてオペロンを形成していることが推察されている¹⁶⁾ (Fig. 4-10)。

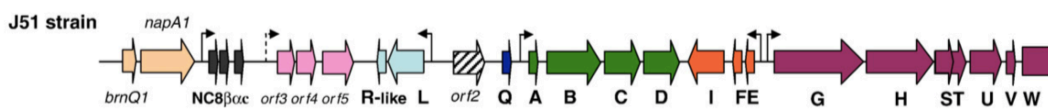


Fig. 4-10 *pln* locus in *L. plantarum* J51¹⁷⁾

J51 株の *orf3*、*orf4* および *orf5* と PUK6 株の *orf1*、*orf2* および *orf3* は 100% の相同性であり、同一の機能をもつ遺伝子と考えられる。すなわち、PUK6 株においてもこれらの遺伝子はオペロンを形成していると推測される。また、PUK6 株の *orf4*、*orf5* および *orf6* については、それらの機能は不明のままであった。

4-4 小括

本章では、PUK6 株が生産する多成分バクテリオシンおよびその生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) 上に存在する遺伝子を明らかにするために、PCR クローニングとそれらの遺伝子解析を行った。第三章において PUK6 株は plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 あるいはその構造類似体を生産することが示唆された。そこで、これらの構造遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR クローニングを行い、得られた増幅産物の塩基配列を決定した結果、塩基配列を明らかにした範囲において、plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 とアミノ酸レベルで 100%一致した。このことから、PUK6 株は plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 を生産すると予想した。そこで、次にこれら 3 種類の構造遺伝子に特異的なプライマーをさまざまな組み合わせで PCR を行い、各構造遺伝子の位置を明らかにした結果、PUK6 株のゲノム上には、上流から *plnNC8*、*plnA*、*plnEF* (逆向き) で存在することが明らかになった。また、これらのバクテリオシン遺伝子の位置や相同性から、PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) は、*L. plantarum* の J51 株および 8P-A3 株と同様の *pln* locus を有すると予想した。

次に、PUK6 株の *pln* locus の全塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。まず、PUK6 株と類似の *pln* locus を有していると考えられた他の *L. plantarum* に共通する遺伝子に特異的なプライマーを設計し、それらを用いて PUK6 株ゲノム DNA の PCR クローニングを行った。得られた 6 つのクローンを用いて、DNA シークエンシングおよびプライマーウォーキングを行い、PUK6 株の *pln* locus (21,847 bp) の全塩基配列を決定した (accession no. LC666911 in EMBL, GenBank and DDBJ databases)。得られた塩基配列の BLAST 検索を行い、29 遺伝子を見出し、それらの機能を解析した。その結果、PUK6 株の *pln* locus 上に既知バクテリオシンである plantaricin A、EF および NC8 をコードする遺伝子 (*plnA*、*plnEF*、*plnNC8 β a*) およびバクテリオシン免疫タンパク質遺伝子 (*plnNC8c*、*plnI*) を見出し、その他にも多成分バクテリオシンの生合成関連遺伝子を見出した。また、*pln* locus 上に機能不明の 6 つの *orf* (open reading frame: 機能不明遺伝子) を見出し、InterPRO を用いて機能解析を行った。その結果、Orf1 はシグナルペプチド、Orf2 は class IIb バクテリオシンのペプチドファミリーに属しており、2 分子ペプチドバクテリオシンの可能性が考えられた。Orf3 については InterPRO により膜貫通領域が検出されたため、Phobius により詳細に解析した結果、シグナル配列および膜貫通領域をもつことが明らかとなり、免疫タンパク質の可能性が示唆された。さらにこれら 3 つの *orfs* は、オペロンを形成していることが予想された。しかしながら、未だ機能が明らかになっていない遺伝子が複数存在しており、これらについても異種発現や遺伝子破壊株を作製することで推定バクテリオシンの抗菌活性との関連、あるいは今回までに明らかにされたバクテリオシンの生産性との関連を調べていく必要がある。これにより、PUK6 株の多成分バクテリオシン生合成メカニズムを詳細に明らかにしていくとともに、乳酸菌の有用物質生産メカニズムの知見の蓄積

に貢献できることが期待される。

第五章

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 の *pln* locus 上に存在する機能不明遺伝子 (*orf1* および *orf2*) の機能解析

5-1 緒言

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、ヒトの腸管内の消化酵素で容易に分解できること、無味無臭で食品の風味に影響しないことから、天然の食品保存料として期待されている。そのため、バクテリオシンの作用機序や生合成機構の解明のために、生合成関連遺伝子群の決定と解析、そして新たな特徴を有する新規バクテリオシンの探索が行われている¹⁾。

第四章では、味噌漬け豆腐から分離した *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの同定、およびその生合成関連遺伝子群の決定と遺伝子の機能解析を試みた。その結果、PUK6 株は少なくとも 3 種類のバクテリオシン (plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8) を生産することを明らかにし、その生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の全塩基配列を決定し (21,847 bp)、*pln* locus 上に 29 遺伝子を見出した。BLAST 検索や InterPRO 等による機能解析の結果から、各遺伝子の機能を推定し、*L. plantarum* PUK6 の生合成メカニズムを推察したが、複数の遺伝子についてはその機能は未だ不明のままである。その機能不明遺伝子の中で、InterPRO の結果より、*orf1* は ComC protein family、*orf2* は Bacteriocin class IIb protein family に属していることが予想され、2 分子ペプチドバクテリオシンである可能性が示唆された。また、Orf1 および Orf2 の推定アミノ酸配列中にはバクテリオシンに特徴的な double-glycine 配列が見出された。これらのことから、Orf1 および Orf2 はバクテリオシンの可能性が高いと予想される。また、*orf1* および *orf2* の下流に存在する *orf3* は、InterPro および Phobius によるドメイン解析の結果より、膜貫通領域を見出したことから、*orf3* はバクテリオシン免疫タンパク質遺伝子であると予想した。さらに、PUK6 株と同様の *pln* locus を有する *L. plantarum* J51 の *pln* locus 上にも、PUK6 株の *orf1*、*orf2* および *orf3* と相同性を有する *orf3*、*orf4* および *orf5* が存在し、これらについても 2 分子ペプチドバクテリオシンおよびその免疫タンパク質遺伝子であると推定されているが、未だその機能は証明されていない²⁾。

そこで本章では、PUK6 株 *pln* locus 上に存在する機能不明遺伝子の *orf1*、*orf2* および *orf3* について、遺伝子の発現を RT-PCR により確認し、*orf1* および *orf2* については化学合成ペプチドを用いて機能解析を行った。

5-2 実験操作

L. plantarum PUK6 の *pln* locus 上に存在する機能不明遺伝子 *orf1* および *orf2* の機能を調べるため、以下の項目を調べた。

- ・ 遺伝子発現
- ・ 抗菌活性
- ・ 作用機序

5-2-1 使用菌株

Table 5-1 の菌株を用いた。

Table 5-1 Strains used in this study

Strain	Medium
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6	MRS
<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM ^a 1157 ^T	MRS
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 ^T	MRS
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC ^b 14917 ^T	MRS
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	MRS
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JCM 1465 ^T	LB
<i>Weizmannia coagulans</i> JCM 2257 ^T	LB
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	M17G
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	M17G
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	LB
<i>Escherichia coli</i> JM109	LB

^a JCM, Japan Collection of Microorganisms (Wako, Japan).

^b ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

【使用培地】

《遺伝子発現解析》

- ・ MRS 寒天平板培地および液体培地
Appendix -1 (Table A-1) 参照。

《抗菌活性試験》

- ・ MRS 寒天平板培地およびねじ口試験管培地
Appendix-1 (Table A-1) 参照。

《作用機序》

- ・ MRS 液体培地
Appendix -1 (Table A-1) 参照。
- ・ 10 倍希釈 MRS 液体培地 (試験管 1.5 mL)
MRS 培地試薬それぞれ 1/10 量 (計 5.2 g) を 1 L の蒸留水に溶解し、試験管に 1.5 mL ずつ分注してシリコ栓をし、オートクレーブ殺菌 (121°C、15 min) を行った。

- M17G 培地
Appendix -1 (Table A-1) 参照。
- LB 寒天平板培地および液体培地
Appendix -1 (Table A-1) 参照。

5-2-2 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の total RNA の抽出

L. plantarum PUK6 の *pln* locus 上に存在する機能不明遺伝子 *orf1* および *orf2* が実際に発現しているかを調べるために、RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

I. 生菌数の測定

RNA 抽出を行う際には一定の生菌数から RNA を抽出する必要があるため、*L. plantarum* PUK6 の生菌数を調べた。なお、操作は全てコンタミネーションを防ぐためクリーンベンチ内で行った。

【方法】

L. plantarum PUK6 を 5 mL の MRS 試験管培地に 2 本接種し、30 °C、120 strokes/min で一晩培養した (前培養)。前培養液を新しい 5 mL MRS 試験管培地 4 本に 2% (v/v) 接種後、30 °C、120 strokes/min で 4~6 h 振とう培養した。培養液をマイクロチューブに移した後、6,000 rpm、3 min 遠心分離して上清を捨てた。ペレットを 500 μ L の生理食塩水 (0.85% NaCl) で懸濁した後、6,000 rpm、3 min で遠心分離して上清を捨てた。ペレットを生理食塩水 (0.85% NaCl) 1 mL に懸濁し、4 本のマイクロチューブを 1 本にまとめ、15 mL 容遠沈管に入れた (全量で 6 mL)。そのうち 300 μ L に 2.7 mL の蒸留水を加えて 10 倍に希釈し、分光光度計で 600 nm における濁度を測定した結果 $OD_{600} = 1.86$ であったことから、これを $OD_{600} = 1$ ($\cong 10^6$ 個のコロニー) になるように生理食塩水 (0.85% NaCl) で希釈した (原液サンプルとする)。原液サンプルを用いて、さらに 2, 3, 4, 5, 10, 20 倍希釈サンプルを 4 mL ずつ作製した。2~20 倍希釈サンプルは $10^5 \sim 10^7$ 倍希釈系列を、原液サンプルは $10^7 \sim 10^9$ 倍希釈系列を 450 μ L ずつ作製し、MRS 寒天平板培地に 200 μ L ずつプレーティングした (計 6 枚)。30 °C にて一晩培養し、形成されたコロニーの個数を数え、以下の式にしたがって「CFU/200 μ L」の単位から「CFU/mL」に換算し、検量線を作成した。

$$\text{CFU/mL} = \text{形成コロニー数} \times \text{希釈倍率} \times 5$$

II. *L. plantarum* PUK6 の total RNA の抽出

Qiagen の RNeasy Protect Bacteria Reagent および RNeasy RNA purification キットを用いた。プロトコールによると、このキットは、シリカゲルカラムメンブレン法を用いており、DNase I 処理なしで、DNA を効果的に除去することができると言われている。しかしながら、抽出後の RNA サンプルを用いて、PCR により DNA の混入を調べたところ、RT-PCR に支障を与える程度の DNA がコンタミしているようであった。また、Hoffmann と Rehm³⁾も、RNA 抽出後に DNase 処理を行っていることから、このキ

ットのみでは完全に DNA を除去できず、DNase 処理が必要であることが示唆されたため、本研究でも DNase I 処理を同時に行うこととした。

【試薬】

- RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) (RNA の分解を防ぐ)
- RNeasy Mini (Qiagen)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen)
- β -メルカプトエタノール (以後、 β -ME と省略する)
- リゾチーム
- 100%エタノール

II-A. Total RNA の抽出

<培養およびサンプル抽出量の決定>

L. plantarum PUK6 を 5 mL の MRS 試験管培地に植菌し、30 °C で 16 h 振とう培養した。培養液を分取し 100 倍希釈して、分光光度計にて 600 nm で濁度を測定し、初発菌体濃度が $OD_{600}=0.05$ となるように MRS 前培養液を 100 mL の MRS 培地 (300 ml 容の三角フラスコ) に 2% (v/v) 接種し、8 h および 20 h 振とう培養した。培養液を 10 倍希釈して OD_{600} を測定し、あらかじめ作成した検量線をもとに培養液中の生菌数を算出し、培養液サンプル中の生菌数を求め、採集するサンプル量を決定した。Qiagen のプロトコールによると、RNeasy Mini スピнкаラムの許容生菌数は、 7.5×10^8 であり、生菌数から取れる RNA 量が定かでないときは、最初 2×10^8 個の生菌数から RNA を抽出することを試すとよいと記されている。培養 8 時間後のサンプルが 2.7×10^9 CFU/mL、20 時間後のサンプルが 9.4×10^9 CFU/mL の菌体数となり、許容生菌数を超えていたが、 7.5×10^8 CFU/mL に合わせて使用する培養液量を減らした際、RNA が抽出できなかったため、500 μ L (8 h)、1 mL (20 h) の培養液を使用することにした。

<キットを用いた RNA の抽出>

次に、生菌を含む培養液 (500 μ L (8 h)、1 mL (20 h)) にサンプル量の 2 倍液量の RNAprotect Bacteria Reagent (2 mL) を入れてボルテックスし、室温で 5 min インキュベートした。2 mL マイクロチューブに分注し、5,000 g、10 min、4 °C 遠心分離後、上清を捨て、20 mg/mL の Proteinase K を 10 μ L および 1 mg/mL リゾチーム含有 TE buffer を必要量添加した (Table 5-2 を参照)。ボルテックスで 10 sec 混合し、室温で 10 min インキュベート、その間 2 min 毎に少なくとも 10 sec ボルテックスで穏やかに攪拌した。サンプルに 1% β -ME 含有 Buffer RLT を必要量添加し、激しく攪拌した (Table 5-2 を参照)。このとき、微粒子 (おそらく DNA およびその他菌体破砕物だと考えられる) が見える場合には、4 °C にて遠心分離 (2 mL 以下では、微量遠心機での最高速度 (13,000 rpm) で 2 min、2 mL 以上では 3,000~5,000 rpm で 5 min) によりペレットを除き、上清のみを次のステップに使用した。100%エタノールを必要量、ライセートに添加し、ボルテックスした (Table 5-2 を参照)。2 mL コレクションチューブにセットした RNeasy ミニカラムにサンプルをアプライし、10,000 rpm、15 sec 遠心分離後、フ

フロースルーを廃棄した。700 μL の Buffer RW1 を RNeasy カラムにアプライし、チューブのふたを閉めて 10,000 rpm、15 sec、4 °C で遠心分離し、フロースルーを廃棄した。RNeasy ミニカラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移した後、500 μL の Buffer RPE をカラムにアプライし、10,000 rpm、15 sec、4 °C で遠心分離後、フロースルーを廃棄した。500 μL の Buffer RPE をカラムにアプライし、10,000 rpm で 2 min 遠心分離後、フロースルーを廃棄した。RNeasy カラムを新しい 1.5 mL 容量のコレクションチューブに移し、30~50 μL の RNase Free water をメンブレンに加えて 10 min インキュベート後、10,000 rpm で 1 min 遠心分離して RNA を溶出させた。

Table 5-2 Volume of TE buffer, Buffer RLT and EtOH for purification of total RNA

Number of pelleted cells	TE buffer containing lysozyme	Buffer RLT containing β -ME	Ethanol
$< 5 \times 10^8$	100 μL	350 μL	250 μL
$5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$	200 μL	700 μL	500 μL

今回は、8 時間後のサンプルが 2.7×10^9 CFU/mL、20 時間後のサンプルが 9.4×10^9 CFU/mL のバクテリア数であったため、TE (リゾチーム含有) buffer を 200 μL 、Buffer RLT を 700 μL 、エタノールを 500 μL 添加した。

II-B. DNase I 処理

1500 Kunitz units の粉末状態の DNase I を、RNase free water に溶かし、2.7 Kunitz units/ μL になるように調製し、50 μL ずつ小分けして保存した (以後、これを DNase I ストック溶液と表記する)。基本的には -20°C で冷凍保存しておき、使用するもののみを冷蔵保存とした。

【方法】

RNA 抽出後サンプルの 87.5 μL に Buffer RDD を 10 μL 、DNase I を 2.5 μL を加え、穏やかに混合し、室温 (20–25 °C) で、5 h インキュベートした。その後、サンプルに 350 μL の Buffer RLT を添加して混合し、250 μL のエタノールを加え、ボルテックスにより懸濁した。全量 700 μL のサンプルを 2 mL コレクションチューブにセットした RNeasy ミニカラムに加え、10,000 rpm で 15 sec 遠心分離後、フロースルーを廃棄した。カラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、500 μL の Buffer RPE を加え、10,000 rpm で 15 sec 遠心分離後、フロースルーを除いてカラムを洗浄した。500 μL の Buffer RPE をカラムに添加し、10,000 rpm で 2 min 遠心分離後、フロースルーを廃棄した。カラムを新しい 2 mL コレクションチューブに移し、15,000 rpm、1 min 遠心分離後、フロースルーを廃棄してメンブレンを完全に乾燥させた。RNeasy カラムを新しい 1.5 mL 容量のコレクションチューブに移し、30~50 μL の RNase Free Water をメンブレンに添加し、10 min インキュベート後に 10,000 rpm で 1 min 遠心分離して RNA を溶出させた。10 μL の 5 M NaCl および 250 μL の 100%冷エタノールを加え、-

80 °C、10 min 以上放置した (エタノール沈殿)。エタノール沈殿後、真空遠心乾燥機で約 15 分間乾燥し、沈殿物を 40 μ L の RNase Free Water で溶解した。得られた RNA 溶液について、分光光度計 (NanoVue, GE Healthcare) を用いて RNA 濃度を測定した。

5-2-3 RT-PCR

L. plantarum PUK6 の total RNA を用いて、RT-PCR を行った。まず、Total RNA 溶液 1 μ L をマイクロチューブに分注し、DEPC 処理水を加えて、5 μ g/ μ L のサンプルを作製した。RT-PCR は、PrimeScript II High Fidelity RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いて行った。使用したプライマーを Table 5-3 に示す。プライマーは全て RNase Free Water に溶解した。

Table 5-3 Primers used in this study

Primer	Sequence	Tm (°C)
<i>orf1</i> -f1	5'- ATGAAAAATATTAATAATTTTCAGGCATT -3'	61.7
<i>orf2</i> -r1	5'- CTAGTAGCCATAACCTTTTTTCTTG -3'	60.1
<i>orf3</i> -r2	5'- AATTACAGCTACTATAATTCCTCCAAATTC -3'	61.6

Total RNA を鋳型として、逆転写酵素を加えて反応を行ったもの (cDNA) および逆転写酵素を加えずに反応を行ったもの (ネガティブコントロール)、また *L. plantarum* PUK6 のゲノム DNA を鋳型として、PCR 反応を行ったもの (ポジティブコントロール) の 3 種類を作製した。

A. 鋳型 RNA の変性とプライマーのアニーリング

ネガティブコントロール作製のために、反応液量を通常のプロトコール (10 μ L) の 2 倍量で調製した。また、プロトコールによると、template RNA は、8 μ L まで持ち込み可能であり、total RNA は 6 μ g まで使用可能である。推奨使用量は、10 μ L あたり 200 ng~2 μ g となっているが、今回は 4 μ g/10 μ L で反応を行った (Tables 5-3, 5-4 and 5-5)。サーマルサイクラーで (65 °C, 5 min; 4 °C, ∞) 反応させ、鋳型 RNA の変性と reverse プライマーの鋳型 RNA へのアニーリングを行った。その後、アニーリング済み反応液を、PCR チューブ 2 本に分注し、1 本をサンプル、1 本をネガティブコントロール用とした。

Table 5-4 Components of reaction mixture

Components	Volume (μ L)	Final concentration
dNTPs mixture (10 mM each)	1	10 mM
Reverse primer (2 μ M)	1	0.2 μ M
Template RNA	x	4 μ g
RNase free water	10 - x	-
	Up to 10	

Table 5-5 RNA concentration and amount used in this study

Sample	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Template RNA (μL)
RNA (8 h)	2.6	1.6
RNA (20 h)	1.3	3.1

B. 逆転写反応

Table 5-6 の組成で調製したサンプルを用いて、サーマルサイクラーにて (42°C , 30 min; 95°C , 5 min; 4°C , ∞) で逆転写反応させ、一本鎖 cDNA を作製した。

Table 5-6 Components of reaction mixture

Components	Sample (μL)	Negative control (μL)
Annealing finished solution	10	10
5 x PrimeScript II Buffer	4	4
Primescript II RT Enzyme mix	1	-
RNase free water	5	6
Up to	20	20

C. PCR

Table 5-7 に従ってサンプルを調製したあと、でサーマルサイクリングを行った (Table 5-8)。ただし、サイクルの途中で、サンプルを分注する場合は、必ず反応を再開する前に、 94°C , 2 min 熱変性を行ってから、サイクルを行った。その後、増幅された DNA 断片のサイズを確認するため、2 %アガロースゲル電気泳動を行った (Appendix-2 参照)。

Table 5-7 Components of reaction mixture

Components	cDNA (μL)	RNA (μL) (Negative control)	Genomic DNA (μL) (Positive control)
5 x PrimeSTAR GXL Buffer	10	10	10
dNTP mixture (10 mM each)	1	1	1
Forward primer (10 μM)	1	1	1
Reverse primer (10 μM)	1	1	1
cDNA or RNA or gDNA	5	5	1.5 μL (130 ng/ μL)
PrimeSTAR GXL for RT-PCR	2	2	2
RNase free water	30	30	33.5
Up to	50	50	50

Table 5-8 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	94 °C	2 min
Denature	98 °C	10 sec
Anneal	60 °C	15 sec
Extend	68 °C	1 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

5-2-4 Orf1 および Orf2 の化学合成ペプチドの調製

Orf1 および Orf2 の機能解析を行うため、推定成熟ペプチド (mOrf1 および mOrf2) を化学合成した (Greiner Bio-One, Tokyo, Japan) (Table 5-9)。まず、粉末状の mOrf1 および mOrf2 を 1 mM になるように 0.05% TFA および 0.1% Tween 80 含有滅菌水に溶解し、ガラス容器に入れ、-25 °C で冷凍保存した。なお、このサンプルについて 0.1% Tween 80 を用いて 10 μM となるように希釈した。

Table 5-9 Amino acid sequence and molecular weight of mOrf1 and mOrf2

Name	Amino acid sequence	Molecular weight (actual measurements)
mOrf1	SNNKFWTWAGYTYENWRISSRRAFNLRQRKNTMTHH	4559.470
mOrf2	IWQWIVGGLGFLAGDAWSHSDQISSGIKKRKKKGYGY	4138.520

5-2-5 抗菌活性試験

まずはじめに、mOrf1 および mOrf2 の抗菌活性の有無を調べるために、Table 5-1 に示す指標菌を用いたバイオアッセイを行った (Appendix-1)。このとき、mOrf1 (10 μM)、mOrf2 (10 μM) および mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物 (各 5 μM) を用いた。このとき、mOrf1 および mOrf2 が 2 分子ペプチドバクテリオシンである予想し、2 つのペプチドが相互作用して抗菌活性を示すと考え、mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物は使用前に氷上にて 30 分間保持した。

5-2-6 作用機序

mOrf1 および mOrf2 の指標菌に対する作用機序を調べた。このとき、mOrf1 および mOrf2 の抗菌作用への感受性が高かった *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌として用いた。また、mOrf1 および mOrf2 の抗菌作用が微弱であったことから、使用する MRS 培地は 10 倍希釈したものをを用いた。

《増殖阻害試験》

【方法】

指標菌を MRS 液体培地 (試験管 5 mL) に接種し、30°C、120 strokes/min で一晩振とう培養した (前培養)。10 倍希釈 MRS 液体培地 (試験管 1.5 mL) 4 本に前培養液を

それぞれ 15 μL (培地の 1%量) 接種し、30 $^{\circ}\text{C}$ 、120 strokes/min で振とう培養した (本培養)。指標菌培養の 0 時間目または 4 時間目 (対数増殖期) に、それぞれの試験管に mOrf1 (10 μM)、mOrf1 (10 μM) および mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物 (各 5 μM) を 150 μL ずつ添加した。また、コントロールとして 0.0005% TFA 含有 0.1% Tween 80 溶液を 150 μL 添加した。その後、培養液 100 μL を 1 時間毎にサンプリングした (培養 0~11 時間)。サンプリング溶液 (100 μL) に蒸留水 900 μL を加えて 10 倍希釈とし、600 nm における指標菌の濁度を測定した。

《蛍光顕微鏡観察》

増殖阻害試験における、mOrf1 および mOrf2 の指標菌への増殖阻害作用について、-Bacstein- Bacterial Viability Detection Kit- DAPI/PI (DOJINDO, Japan) を用いた蛍光顕微鏡観察を行い、指標菌の状態を観察した。

【使用機器】

- ・ HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス)

以下に、用いたフィルタとその波長特性を示した (Table 5-10)。本実験で用いた蛍光染色試薬と染色を観察したフィルタが対応している。

Table 5-10 Filters used in fluorescence microscopy

Filter	Excitation wavelengt (nm)	Reagent
OP-66834 BZ Filter DAPI-BP	320-400	DAPI Solution
OP-66838 BZ Filter TexasRed	520-600	PI Solution

【方法】

指標菌を MRS 液体培地 (試験管 5 mL) に接種し、30 $^{\circ}\text{C}$ 、120 strokes/min で一晩振とう培養した (前培養)。10 倍希釈 MRS 液体培地 (フラスコ 10 mL) 4 本に前培養液をそれぞれ 100 μL 接種し、30 $^{\circ}\text{C}$ 、100 strokes/min で振とう培養した (本培養)。指標菌培養の 4 時間目 (対数増殖期) にそれぞれの試験管に mOrf1 (10 μM)、mOrf2 (10 μM) および mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物 (各 5 μM) を 1 mL ずつ添加した。培養 4~8 時間目に培養液 1.4 mL を 1 時間毎にサンプリングした。サンプリングした指標菌の培養液 1.4 mL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し入れた。12,000 rpm、3 分間、常温で遠心分離した。上清を捨て、生理食塩水 (0.85% NaCl) 200 μL を加え懸濁し、手順を 2 回繰り返した。懸濁液 200 μL に対して DAPI Solution を 0.2 μL 加え、よく混合した。暗所、常温で 5 分間静置した。その後、PI Solution を 0.2 μL 加え、よく混合した。暗所、常温で 5 分間静置した。反応後の蛍光染色サンプルをスライドガラスに 10 μL 滴下して、空気が入らないようにカバーガラスをかぶせ、プレパラートの観察部分に半滴~1 滴ミネラルオイルを滴下し、ステージに固定した。プレパラートと対物レンズ ($\times 100$) を接触させ、倍率 1,000 倍で焦点を合わせ、蛍光観察用フィルターで観察した (Table 5-11)。

Table 5-11 Wavelength properties of fluorescent staining reagents

Reagent	Maximum Ex/Em	Filter	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
DAPI Solution	360/460	DAPI-BP	320-400	410-510
PI Solution	530/620	TexasRed	520-570	535-675

5-3 結果および考察

5-3-1 *orf1* および *orf2* の発現解析

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 の *pln* locus 上に存在する *orf1* および *orf2* は、その推定翻訳産物のアミノ酸配列にバクテリオシンに特徴的なダブルグリシン配列 (Gly-Gly) を有していた (Fig. 5-1)。また、InterPro を用いたドメイン解析により、バクテリオシン遺伝子と推定された (第四章 4-3-4 参照)。そこで、*orf1* および *orf2* が PUK6 株において実際に発現しているのかを RT-PCR によって調べた。また、*orf1* および *orf2* の下流に存在している *orf3* を、第四章の機能解析の結果より、バクテリオシン免疫タンパク質遺伝子であると推定している。一般的に、バクテリオシン免疫タンパク質遺伝子はバクテリオシン構造遺伝子の近傍に位置する。例えば *plantaricin* EF の免疫タンパク質遺伝子である *plnI* は、バクテリオシン構造遺伝子 *plnEF* 遺伝子のすぐ下流に位置し、オペロンを形成している⁴⁾。同様に *orf1*、*orf2* および *orf3* がオペロンを形成し、ポリシストロン性 mRNA として転写されているのであれば、これらの遺伝子が関連しながら機能している可能性が高い。そこで、*orf1*、*orf2* および *orf3* の発現解析を行った。まず、*L. plantarum* PUK6 より RNA を抽出するため、まずは PUK6 株の菌体濁度と生菌数との関係を調べ、検量線を作成した (Table 5-12 and Fig. 5-2)。

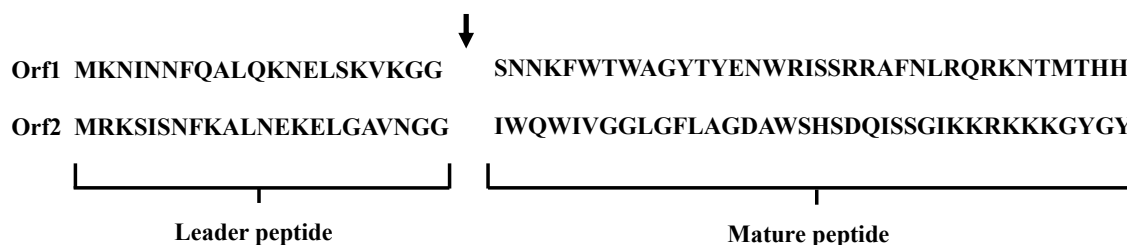
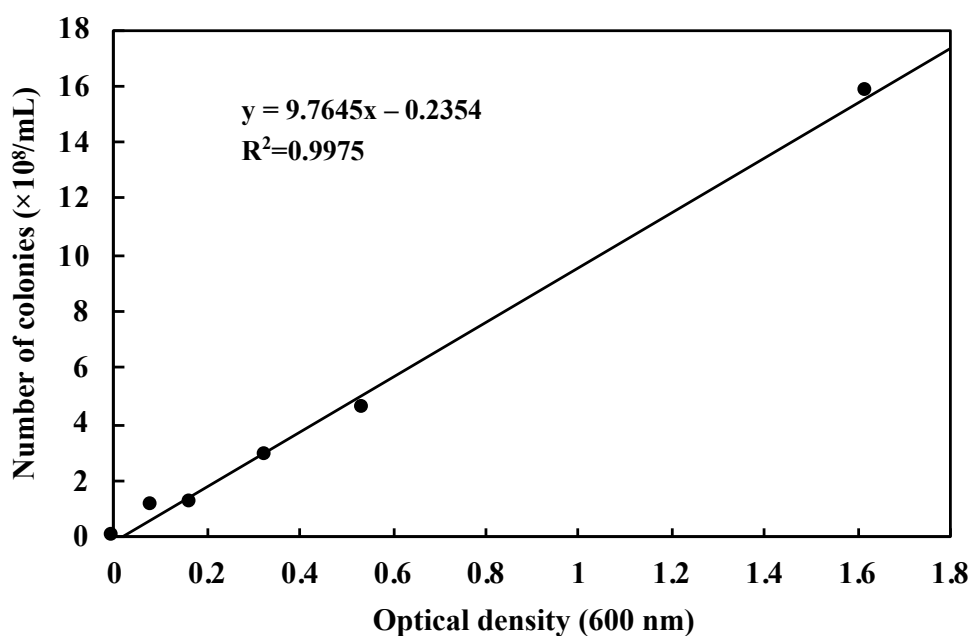


Fig. 5-1 Putative amino acid sequences of Orf1 and Orf2. The vertical arrow indicates the putative processing sites.

Table 5-12 Number of growing colonies of *L. plantarum* PUK6

CFU/ mL	1 x dilution	2 x dilution	3 x dilution	4 x dilution	5 x dilution	10 x dilution	20 x dilution
Absorbance at 600 nm	1.62	0.788	0.536	0.406	0.326	0.163	0.084
×10 ⁵	—	—	—	—	—	117750000	069250000
×10 ⁶	—	600000000	460000000	345000000	250000000	112500000	112500000
×10 ⁷	1400000000	425000000	450000000	200000000	325000000	—	—
×10 ⁸	1750000000	—	—	—	—	—	—

**Fig. 5-2** Calibration curve prepared from the viable cell count of *L. plantarum* PUK6

以後、OD₆₀₀をXとしたときに、生菌数(CFU×10⁸/mL) Y = 9.7645 × X - 0.2354 として求めることにした。また本実験では、*L. plantarum* PUK6 の *pln* locus 上の *orf1*、*orf2* および *orf3* 遺伝子の発現の有無を調べるにあたり、対数増殖期中期にあたる8時間目および定常期にあたる20時間目の total RNA を抽出した(8時間後の RNA は 26 μg/μL、20時間後の RNA は 13 μg/μL)。これらの RNA を用いて RT-PCR を行った結果、8時間目および20時間目において、*orf1-orf2* 間および *orf1-orf3* 間で特異的な増幅が見られたことから発現していることがわかり、8時間後よりも20時間後に抽出した RNA サンプルの方が発現量が多いと考えられた (Fig. 5-3)。なお、逆転写酵素を添加せずに RT-PCR を行った場合 (negative control) では、増幅産物は得られなかった (data not shown)。以上の結果より、*orf1* および *orf2* はバクテリオシン様遺伝子、*orf3* はバクテリオシン免疫タンパク質様遺伝子として、一つのオペロンとして PUK6 株で発現していることが示唆された。また、*pln* locus 上の *orf1*、*orf2* および *orf3* の下流に隣接する *orf4* についても RT-PCR を行った結果、*orf1-orf3* と一緒に発現しておらず、単独で発現していたことから、*orf4* は何らかの機能を有する遺伝子であることが示唆された (data not shown)。

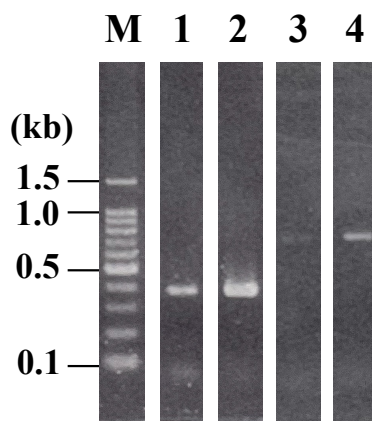


Fig. 5-3 RT-PCR analysis for determining *orf1-3* expression

M, 100 bp DNA ladder marker; 1 and 2, *orf1-orf2* products amplified from the RNA extracted after 8 and 20 h of cultivation, respectively; 3 and 4, *orf1-orf3* products amplified from the RNA extracted after 8 and 20 h of cultivation, respectively.

5-3-2 抗菌活性試験

Orf1 および Orf2 が実際にバクテリオシンとして機能を有するか否かを調べるため、*orf1* および *orf2* の推定翻訳産物における、ダブルグリシン配列以降の推定成熟ペプチド (Fig. 5-1) を化学合成 (mOrf1 および mOrf2) し、バイオアッセイを行った。その結果、mOrf1 および mOrf2 単独では Table 5-1 に示した指標菌に対して抗菌活性を示さなかった (data not shown)。しかし、mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物 (各 5 μ M) では、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T および *W. coagulans* JCM 2257^T に対してのみ、明瞭ではないものの生育阻止円を確認できたことから、mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物は、上記の2株に対して、弱いながらも抗菌活性を示すことがわかった (data not shown)。それゆえ、感受性の高い *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌として、以下に述べる作用機序を調べることにした。

5-3-3 作用機序

mOrf1 および mOrf2 は弱いながらも抗菌活性を示したため、より詳細な増殖阻害試験を行った。このとき、mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物 (各 5 μ M) の抗菌活性が微弱であったため、培地には 10 倍希釈した MRS 培地を用いた。指標菌の培養開始時に各合成ペプチドを添加した結果、mOrf2 単独を添加した場合はコントロールと同様に指標菌は増殖し、抗菌活性を示さなかった (Fig. 5-4A)。しかし、mOrf1 単独および mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物を添加した場合は指標菌の増殖を阻害した。

次に、指標菌の対数増殖期にあたる培養4時間目に各合成ペプチドを添加した結果、mOrf2 単独では指標菌の増殖に影響せず、抗菌活性を示さなかった (Fig. 5-4B)。しかし、mOrf1 単独では指標菌の増殖を抑制し、静菌作用を示した。さらに、mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物は指標菌の増殖を最も抑制し、殺菌作用を示した。これは2つの mOrfs が相乗作用したことを示していると考えられる。また、mOrf1 単独でも静菌作用を示し、mOrf1 および mOrf2 を等モルで混合したときに最も強い殺菌作用を示すという挙動は、2分子ペプチドバクテリオシンに見られる特徴である⁵⁾。以上のことから、mOrf1 および mOrf2 は2分子ペプチドからなる Class IIb バクテリオシンであることが強く示唆された。

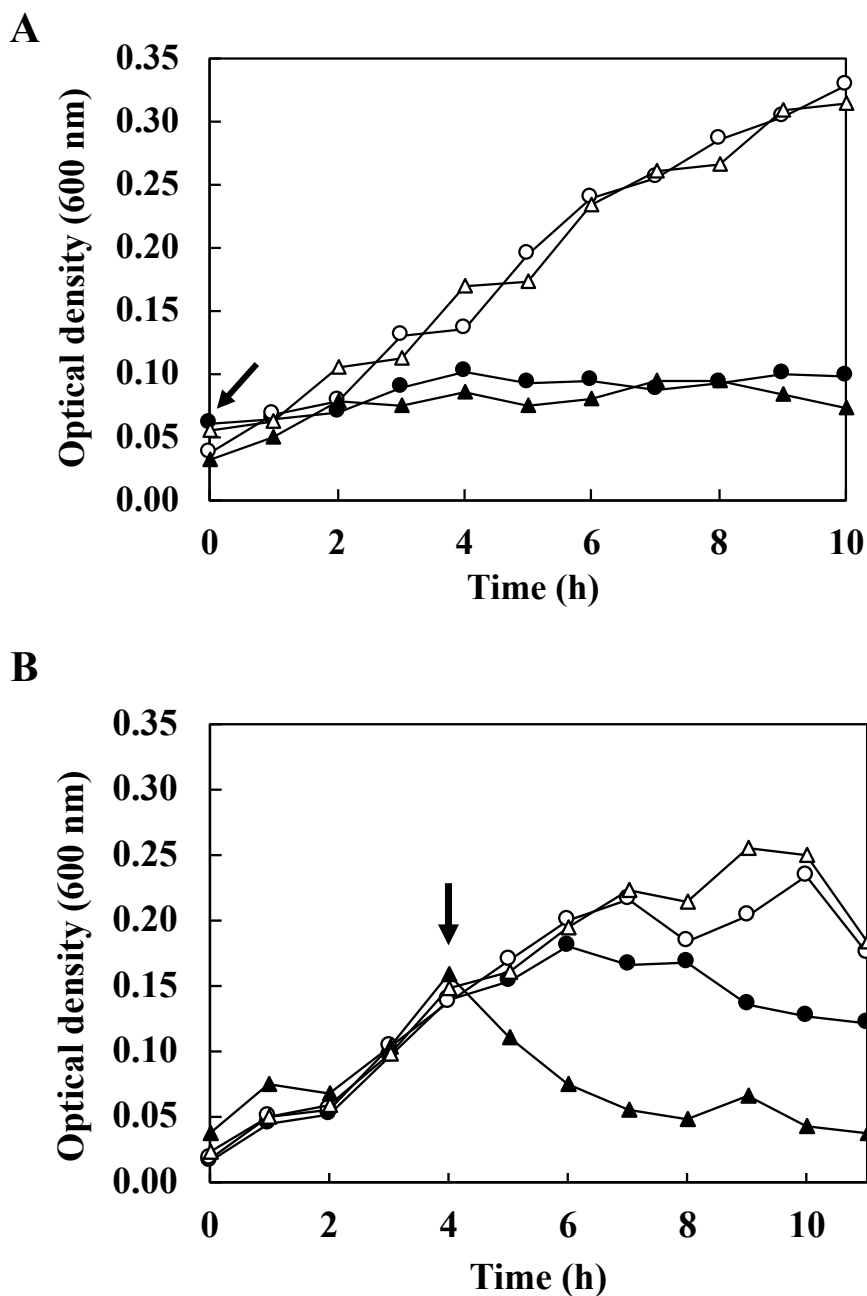


Fig. 5-4 Effects of the chemically synthesized peptides (mOrf1 and mOrf2) on the growth of *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T.

Cell growth was monitored by measuring the OD at 600 nm. The synthetic peptides were added to the medium at a final concentration of 1 μ M (mOrf1 and mOrf2) or 0.5 μ M (mixture of mOrf1 and mOrf2) at the start of culture (A) and after 4 h of cultivation (B). Closed circles, mOrf1; open circles, mOrf2; closed triangles, an equimolar mixture of mOrf1 and mOrf2; open triangles, 0.1% Tween 80 containing 0.0005% TFA as the control. Arrows indicate the time when the samples were added.

次に、各合成ペプチド添加前（指標菌培養 4 時間目）と添加 1~4 時間後（指標菌培養 5~8 時間目）の指標菌の菌体を DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）および PI（propidium iodide）を用いて染色し、蛍光染色の経時変化を観察した。その結果、コントロールではほとんどの指標菌は青色のままで生存していることがわかり、mOrf2 を添加した場合は、コントロールと比較して大きな違いは見られなかった (Fig. 5-5)。一方で mOrf1 を添加すると、コントロールと比較して経時的に紫の割合が増加した。さらに、mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物を添加すると、添加 1 時間後にはほぼすべての指標菌が紫色に変化し、添加 3 時間後には膜破壊によって菌が破裂・死滅したものが観察され、mOrf1 と mOrf2 を混合したものが最も強い抗菌活性を示した。このことから、両者を混合することで抗菌活性を相乗的に高め、指標菌を死滅させる（膜破壊する）ことがわかった。

指標菌に対する増殖阻害試験および蛍光顕微鏡観察の結果より、*orf1* および *orf2* 遺伝子を 2 分子ペプチドバクテリオシン遺伝子と結論し、*plnPUK6α* および *plnPUK6β* と名付けた。そしてそれらが発現したバクテリオシンを plantaricin PUK6 と命名した。さらに、第四章の結果より Orf3 は膜貫通領域を持つことが推定され、本章の発現解析の結果より *orf3* は *orf1* および *orf2* とオペロンを形成することから、*orf3* は plantaricin PUK6 の免疫タンパク質遺伝子と予想されたため、これを *plnPUK6c* と名付けた。

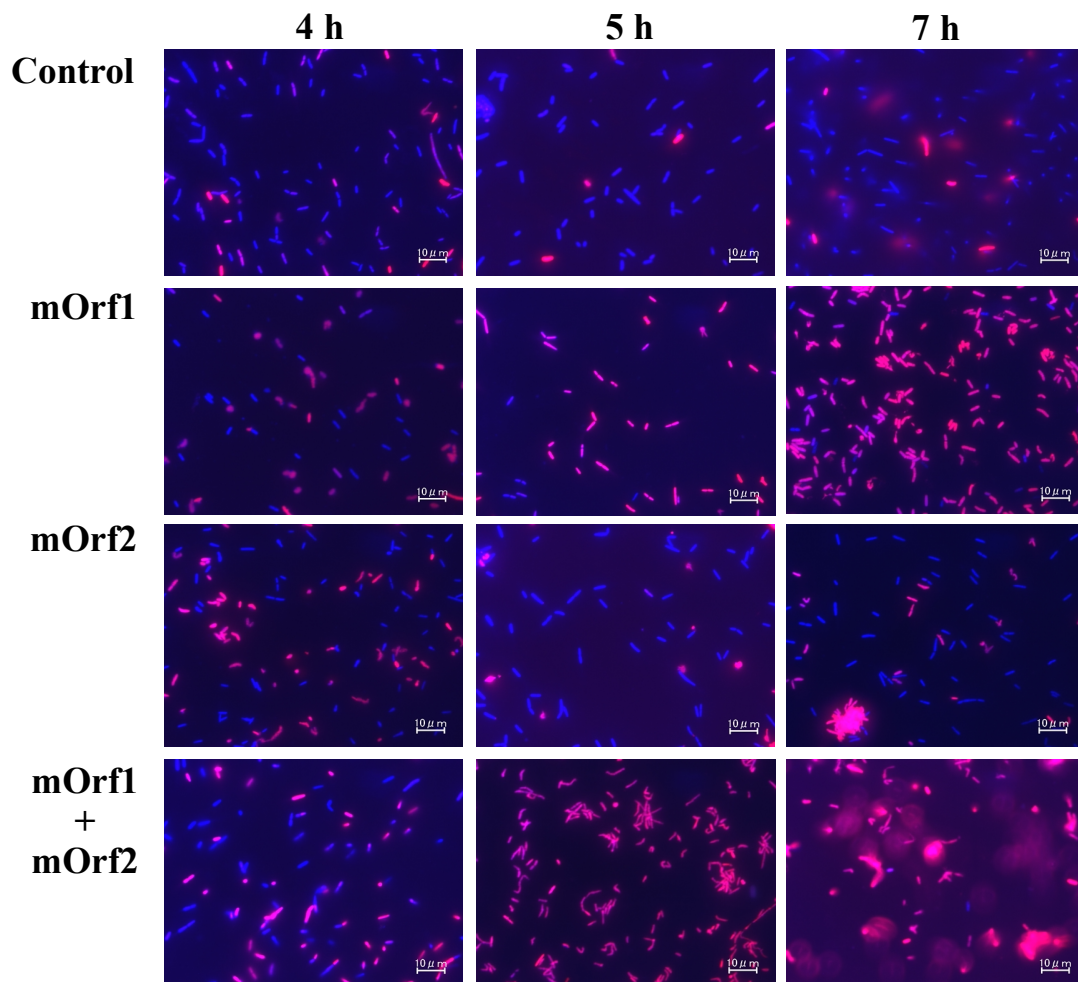


Fig. 5-5 Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy via DAPI/PI staining. *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T cells treated either singly with or without mOrf1 or mOrf2, or with an equimolar mixture of both mOrf1 and mOrf2. Synthetic peptides were added to the culture broth of *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T after 4 h of cultivation, and images were taken at 4, 5, and 7 h timepoints.

5-4 小括

本章では、*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産するバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) 上に存在する機能不明遺伝子 (*orf1* および *orf2*) の機能を明らかにすることを試みた。

はじめに、*orf1* および *orf2* の下流に存在する *orf3* も含めた遺伝子発現解析を行った結果、PUK6 株の培養期間における対数増殖期 (8 h) および定常期 (20 h) において、*orf1-orf2* および *orf1-orf3* の遺伝子の発現を確認し、これらがオペロンを形成して何らかの機能を有していることが示唆された。また、*orf1*、*orf2* および *orf3* の下流に隣接する *orf4* についても発現解析を行った結果、単独で発現しており、何らかの機能を有していると考えられた。

次に、*orf1* および *orf2* の翻訳産物の推定成熟ペプチド (以下、mOrf1 および mOrf2) を化学合成し、その機能解析を行った。Table 5-1 に示した 15 種の指標菌に対して、mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物を用いた抗菌活性試験を行った結果、*Weizmannia coagulans* JCM 2257^T および *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T にのみ、明瞭ではないものの抗菌活性を示した。そこで、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を用いて増殖阻害試験を行った。*L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T の培養開始時 (0 時間目) および対数増殖期 (4 時間目) に mOrf1 のみ、mOrf2 のみ、または mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物を添加した結果、mOrf2 の単独添加では指標菌に対する増殖阻害が見られなかった。一方で、mOrf1、または mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物を添加した場合、指標菌に対して静菌的あるいは殺菌的に作用した。さらに、4 時間後に添加した場合、mOrf2 の単独添加では指標菌に対する増殖阻害作用は見られなかったものの、mOrf1 は指標菌の増殖を抑制し、静菌作用を示した。さらに、mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物を添加したとき、指標菌の増殖を阻害し、殺菌作用を示した。次に、培養 4 時間後に化学合成ペプチドを添加した際の培養液を 1 時間毎にサンプリングし、指標菌を DAPI/PI で染色して蛍光顕微鏡にて観察した。mOrf2 のみを添加した場合は指標菌の生菌数に変化は見られなかったが、mOrf1 のみを添加した場合は、指標菌が経時的に膜破壊された様子が観察され、mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物を添加すると、指標菌の膜破壊による菌体の破裂・死滅が認められた。

以上より、PUK6 株の *pln* locus 上に存在する *orf1* および *orf2* は 2 分子ペプチドからなるバクテリオシン遺伝子であると結論し、*plnPUK6 α* および *plnPUK6 β* と名付け、それらが発現した活性型の成熟バクテリオシンを plantaricin PUK6 と命名した。そして、*orf3* はその免疫タンパク質遺伝子と予想され、*plnPUK6 α* (*orf1*) および *plnPUK6 β* (*orf2*) とオペロンを形成することから、*plnPUK6 c* と名付けた。

第六章

Lactiplantibacillus plantarum PUK6 が生産する
多成分バクテリオシンの抗菌スペクトル

6-1 緒言

従来の微生物制御技術において、有害微生物の生育を阻害するために抗生物質が使用されてきた。しかしながら、近年、抗生物質耐性の細菌が出現し、特に多剤耐性グラム陰性菌 (multidrug resistance in Gram-negative bacteria, MDR-GNB) の存在が、世界共通の課題となっている¹⁾。多剤耐性菌には、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant enterococci: VRE)、多剤耐性緑膿菌 (multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDR) などが挙げられ、臨床や身近な環境において深刻な問題となっている。このように、有害微生物が特定の抗生物質や抗菌物質に対して耐性を獲得しないように、新しい抗菌剤の研究が行われている。

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、ヒトをはじめとした哺乳類の消化管に存在するプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素で容易に分解されるため、環境中へ排出される心配が少ない²⁾。また、抗生物質と異なり、多くのバクテリオシンの抗菌スペクトルは狭く、特定の病原細菌を標的とすることができる³⁾。このような特徴から、バクテリオシンは多剤耐性菌出現を抑制できる抗菌物質として期待されている。

バクテリオシンを食品に取り入れるには、さまざまな方法があり、①バクテリオシンを生産する乳酸菌を食品へ直接用いる、②保存料として精製バクテリオシンを添加、③バクテリオシン生産乳酸菌を含む発酵生成物を添加する、などが挙げられる⁴⁾。このように、バクテリオシンの応用方法を検討する上で、バクテリオシンの特性評価や抗菌スペクトルの決定が重要となる。

本論文のこれまでの研究で、味噌漬け豆腐から *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 を分離し、4種類のバクテリオシン (plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin PUK6) を生産することを明らかにしてきた。*L. plantarum* PUK6 のような複数のバクテリオシンを生産する乳酸菌を発酵食品のスターター菌として用いることは、上述した耐性菌が出現しにくく、かつ安全性の高い食品保存が可能となる。そこで本章では、*L. plantarum* PUK6 が生産する4種類のバクテリオシンの抗菌スペクトルを決定し、比較した。

6-2 実験操作

6-2-1 使用菌株

以下の菌株を用いて研究を行った (Table 6-1)。

Table 6-1 Strains used in this study

Strain	Medium
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6	MRS
<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 ^T	MRS
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	MRS
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JCM 1465 ^T	NB
<i>Weizmannia coagulans</i> JCM 2257 ^T	NB
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	M17G
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	NB
<i>Escherichia coli</i> JM109	LB

JCM, Japan Collection of Microorganisms

ATCC, American Type Culture Collection

【使用培地】

- MRS 寒天平板培地、ねじ口試験管培地および液体培地
Appendix -1 (Table A-1) 参照。
- M17G 培地
Appendix -1 (Table A-1) 参照。
- LB 寒天平板培地および液体培地
Appendix -1 (Table A-1) 参照。

6-2-2 化学合成ペプチドの調製

PUK6 株が生産する各バクテリオシンの抗菌スペクトルを明らかにするためにペプチドを化学合成した (Greiner Bio-One, Tokyo, Japan) (Table 6-2)。まず、粉末状の各合成ペプチドを 1 mM になるように 0.05% TFA および 0.1% Tween 80 含有滅菌水に溶解し、ガラス容器に入れ、-25 °C で冷凍保存した。なお、使用時には 0.1% Tween 80 を用いて 100 μM になるよう希釈した。

Table 6-2 Amino acid sequence and molecular weight of plantaricins A, EF, NC8 and PUK6

Name	Amino acid sequence of mature peptide	Molecular weight
plantaricin A	KSSAYSLQMGATAIKQVKKLFKKWGW	2985.301
plantaricin E	FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR	3545.924
plantaricin F	VFHAYSARGVRRNNYKSAVGPADWVISAVRGIHG	3702.448
plantaricin NC8 β	SVPTSVYTLGIKILWSAYKHKRTIEKSFNKGFYH	4000.797
plantaricin NC8 α	DLTTKLWSSWGYYLGKKARWNLKHPYVQF	3587.855
plantaricin PUK6 α	SNNKFWTWAGYTYENWRISRRAFNLRQRKNTMTHH	4559.470
plantaricin PUK6 β	IWQWIVGGLGFLAGDAWSHSDQISSGIKKRKKKGYGY	4138.520

6-2-3 抗菌活性試験

6-2-2 で調製した各合成ペプチドについて、0.1% Tween 80 を用いて、100 μ M の各合成ペプチドを順次 2 倍希釈して、spot-on-lawn 法によるバイオアッセイを行った (Appendix-2)。また、2 分子ペプチドバクテリオシンである plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin PUK6 は、2 分子のペプチドが相乗作用的に抗菌活性を示すことを考慮し、各合成ペプチドを混合した後、使用前に氷上にて 30 分間保持し、用いた。

6-3 結果および考察

第三章、第四章、第五章の結果より、*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 は4種類のバクテリオシン、plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin PUK6 を生産することを明らかにした。そこで、これらの多成分バクテリオシンの抗菌スペクトルを調べるために、各バクテリオシンを化学合成し、10種類の指標菌を用いてバイオアッセイを行った。

各バクテリオシンについて、化学合成ペプチドを100 μM になるように調製した。2分子ペプチドバクテリオシンである plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin PUK6 については、2分子ペプチドが相乗作用的に抗菌活性を示すことを考慮して使用前に両ペプチドを混合し、氷上で30分放置してから用いた。その結果、PUK6株が生産する4種類のバクテリオシンは共通して *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T および *Weizmannia coagulans* JCM 2257^T に対して抗菌活性を示した (Table 6-3)。加えて、plantaricin A、plantaricin EF および plantaricin NC8 はアメリカ等で食中毒の主要原因菌として問題となっている *Listeria monocytogenes* に比較的近縁の *Listeria innocua* ATCC 33090^T および *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885 に対して抗菌活性が検出された。また、plantaricin EF および plantaricin NC8 は *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* JCM 1164^T に対して抗菌活性を示し、plantaricin EF は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T に抗菌活性を示した (Table 6-3)。一方で、*Enterococcus faecalis* JCM 5803^T およびグラム陰性の *Escherichia coli* JM109 に対しては、4種の plantaricin はいずれも抗菌活性を示さなかった。

また、第三章において調べた PUK6 株の培養液上清および硫酸沈殿・透析サンプル (粗精製バクテリオシン) の抗菌スペクトルのうち、本章で用いた指標菌の表を Table 6-4 に示す。これらの抗菌スペクトルと、各合成ペプチドを用いた抗菌スペクトル (Table 6-3) を比較した結果、4種類の各バクテリオシンでは抗菌活性を示さなかった *E. faecalis* JCM 5803^T に対して、粗精製バクテリオシンでは抗菌活性を示した。これは、4種類のバクテリオシンが組み合わせることで抗菌活性を示した可能性が考えられた。しかしながら、*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T および *L. innocua* ATCC 33090^T では、培養液上清および粗精製バクテリオシンで抗菌活性が検出されず、各合成ペプチドを用いた場合に抗菌活性を検出した。これらの差異は、培養液上清や粗精製バクテリオシンの濃度が低いことや夾雑タンパク質が多いことが原因かもしれない。また、先に述べたように PUK6 株が生産する4種類のバクテリオシンは、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T および *W. coagulans* JCM 2257^T に対して抗菌活性を示し、培養液上清および粗精製バクテリオシンにおいても高い抗菌活性を示した。

以上より、PUK6株が生産する plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin PUK6 はそれぞれ異なる抗菌スペクトルを有することが明らかとなった。それゆえ、PUK6株を発酵食品のスターターとして使用することによって、耐性菌出現の抑制やさまざまな環境下での応用が可能となる。そのためにも、各バクテリオシンの諸性質や生産量、高塩分濃度条件下でのバクテリオシン生産などの調査が待たれる。

Table 6-3 Antimicrobial spectra of the plantaricins A, EF, NC8, and PUK6 produced by *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6.

Strain	Minimum inhibitory concentration (MIC) (µM)					
	Plantaricin A	Plantaricin EF	Plantaricin NC8	Plantaricin PUK6	Plantaricin NC8	Plantaricin PUK6
<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	6.25	3.13	0.78	12.5	0.78	12.5
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 ^T	>100	50	100	>100	100	>100
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	12.5	3.13	50	>100	50	>100
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JCM 1465 ^T	25	50	25	25	25	>100
<i>Weizmannia coagulans</i> JCM 2257 ^T	25	50	25	25	25	25
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	>100	6.25	>100	>100	>100	>100
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	25	50	50	50	50	>100
<i>Escherichia coli</i> JM109	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Table 6-4 Antimicrobial spectra of the culture supernatant and crude bacteriocin produced by *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6.

Stain	Antimicrobial activity (AU/mL)	
	Culture supernatant of PUK6	Crude bacteriocin
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	1,600 - 3,200	6,400 - 12,800
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 ^T	100 - 200	200 - 400
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC14917 ^T	0	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	0	100
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> JCM 1465 ^T	100 - 200	1,600 - 3,200
<i>Weizmannia coagulans</i> JCM 2257 ^T	0	1,600
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC19435 ^T	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	0	100
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	0	0
<i>Escherichia coli</i> JM109	0	0

AU; Arbitrary Unit

6-4 小括

本章では、*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する 4 種類のバクテリオシン (plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin PUK6) の抗菌スペクトルを調べた。その結果、PUK6 株が生産する 4 種類のバクテリオシンはそれぞれ異なる抗菌スペクトルを有していた。また、一部の plantaricin は、現在欧米で問題視されている食中毒細菌 *L. monocytogenes* と比較的近縁な *L. innocua* ATCC 33090^T に対して抗菌活性を示した。一方で、4 種の plantaricin は *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T および *Escherichia coli* JM109 に対して抗菌活性を示さなかった。また、PUK6 株が生産する 4 種類のバクテリオシンは、それぞれ異なる抗菌スペクトルを有していたことから、PUK6 株が生産するバクテリオシンへの耐性菌出現を抑制する可能性が考えられた。

次に、第三章で調べた、PUK6 株の培養液上清および粗精製バクテリオシンの抗菌スペクトルと比較した結果、4 種類の各バクテリオシンでは抗菌活性を示さなかった *E. faecalis* JCM 5803^T に対して、硫酸沈殿後の粗精製サンプルは抗菌活性を示した。一方、*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T および *L. innocua* ATCC 33090^T は、各合成ペプチドを添加すると抗菌活性を示したが、培養液上清および粗精製バクテリオシンでは抗菌活性を示さなかった。このことから、4 種類のバクテリオシンのうち、複数のバクテリシンがお互いに作用しながら抗菌活性を高める可能性があるものの、培養液上清および硫酸沈殿・透析による粗精製の段階では夾雑タンパク質除去や高純度でのバクテリオシンの精製・回収が難しく、それらの抗菌活性を示すのに十分でないことが考えられた。しかしながら、第四章で決定したバクテリオシン生合成関連遺伝子群をもとに、多成分バクテリオシン生合成メカニズムをより詳細に解析し、より効率の良いバクテリオシン生産方法が確立された暁には、PUK6 株の発酵食品製造におけるスターターカルチャーとしての利用価値が非常に高まると考えられる。すなわち、多成分バクテリオシンを生産する PUK6 株をスターターカルチャーに用いることで、発酵食品中の耐性菌出現を抑制できることに加えて、食品微生物制御技術への応用も期待される。

第七章

総括

論文課題「*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の特性とその多成分バクテリオシンに関する研究」として、味噌漬け豆腐から分離した *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の特性評価と、それが生産するバクテリオシンの同定およびその生合成関連遺伝子群の解析を行った。

第一章「序論」では、本研究のキーワードであるバイオプリザベーション、乳酸菌、プロバイオティクス、バクテリオシン、*L. plantarum* とその菌種が生産するバクテリオシン、そして本研究の目的について述べた。

近年の消費者の天然・自然志向から、安全で安心な食品保存方法の需要が高まっている。そこで近年、バイオプリザベーションが注目されている。バイオプリザベーションとは、「植物、動物および微生物起源の抗菌性物質で、何らの害作用なしに食品として長期間食べられてきたもの（バイオプリザバティブ）を用いて食品を保存する技術」のことであり、日本において、古くからこの手法による食品保存は発酵食品などを例に用いられてきた。私たちは発酵食品を古くから摂取しており、その食経験の豊富さから、バイオプリザバティブの安全性を確立してきた。その発酵食品の保存性に寄与する主たる微生物に、乳酸菌が挙げられる。

乳酸菌とは糖を消費して発酵生産物として乳酸(50%以上)を生産する細菌を指す。古くから発酵食品や農作物などの食経験豊富な食品に生息している微生物であり、近年はヒトに有益な作用をもたらすとしてその機能が注目されている。“宿主に保健効果を示す生きた微生物”をプロバイオティクスとよび、胃酸耐性や胆汁酸耐性などの特徴を持つ。コレステロール低下作用や抗酸化作用などを示すプロバイオティクスもこれまでに報告されており、乳酸菌が生産する抗菌物質のバクテリオシンも、腸内細菌叢の組成を調整するものとして報告されている¹⁾。

バイオプリザバティブのひとつであるバクテリオシンとは、細菌が生産するタンパク質性の抗菌物質であり、中でも食経験豊富な乳酸菌が生産するバクテリオシンは、ヒトの腸管内の消化酵素で分解されること、食品の風味に影響を与えないことから、安全性の高い天然の食品保存料として注目されている。現在食品保存料として利用されているものに *nisin A* が挙げられるが、酸性領域でのみ安定であること、単独使用ではグラム陰性菌には抗菌活性を示さないなどの特性から、その使用用途が牛乳やチーズをはじめとした乳製品や缶詰などの一部の食品に限られている。そこで現在、さまざまな特徴を持つバクテリオシンおよびバクテリオシン生産乳酸菌の探索が行われている。

Lactiplantibacillus plantarum (旧名 *Lactobacillus plantarum*) は、古くから植物性の発酵食品やサイレージ、ヒトの唾液などさまざまな環境から分離されてきた乳酸菌である。一部の *L. plantarum* は、プロバイオティクスとしての機能が調べられ、機能性食品や口腔内のワクチンへの応用化、あるいは、乳製品や野菜等の漬物のスターター菌として利用されている^{2,3)}。

L. plantarum の生産するバクテリオシンは *plantaricin* と呼ばれ、一種類のみ生産す

るものから複数種類の plantaricin を生産するものまで多岐にわたる。複数の plantaricin を生産する株の多くは、plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin JK のいずれかを生産し、それらはさまざまな生態系から分離されている。これら plantaricin 生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) について、最も詳細に調べられているのは C11 株であり、この菌株の *pln* locus は、5 つのオペロンで構成されている (*plnABCD*、*plnEFI*、*plnJKLR*、*plnMNOP*、*plnGHSTUV*)^{4,5)}。Plantaricin A (PlnA) はヒスチジンキナーゼ (PlnB) およびレスポンスレギュレーター (PlnCD) のリン酸化反応の引き金となる。次いで、リン酸化されたレスポンスレギュレーターは、5 つのオペロン (*plnABCD*、*plnEFI*、*plnJKLR*、*plnMNOP*、*plnGHSTUV*) の転写を誘導する⁶⁾。*plnEFI* と *plnJKLR* は、plantaricin EF と plantaricin JK をコードするオペロンであり、*plnI*、*plnL*、*plnR* および *plnP* はそれらバクテリオシンの自己免疫機能に関わる遺伝子である。PlnG は ABC トランスポーター、PlnH は PlnG のアクセサリタンパク質と推定されている。また、*plnO* および *plnN* (バクテリオシン様タンパク質遺伝子) の機能は未だ解明されていない。一方、PlnTUVW はバクテリオシンの自己免疫機能に関与することが示唆されている⁷⁾。これらと類似の生合成関連遺伝子クラスターが *L. plantarum* において見出されているが、多成分 plantaricin 生合成機構は完全には明らかとなっていない。

我々は、熊本県球磨地方で 800 年以上続く伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から、*L. plantarum* PUK6 を分離・同定している。この菌株が生産するバクテリオシンが、味噌漬け豆腐の保存性に寄与していると予想し、本研究では、この PUK6 株の特性評価とそれが生産するバクテリオシンの同定、生合成関連遺伝子群の決定、遺伝子解析および新規バクテリオシン様遺伝子の機能解析を目的とした。

第二章「*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の特性」では、*L. plantarum* PUK6 の特性として、耐塩性、乳酸生産性、胃酸耐性、胆汁酸耐性、コレステロール吸収・吸着作用について調べた。耐塩性試験の結果、PUK6 株は 7.5 % NaCl 耐性であった。次に、乳酸生産量を測定した結果、12 時間後の乳酸生産量は、D-乳酸が 4.8 g/L、L-乳酸が 3.4 g/L、総乳酸生産量が 8.2 g/L、D/L 乳酸比は 1.42 であり、PUK6 株は L-乳酸よりも D-乳酸を多く生産することがわかった。また、PUK6 株は pH 2.5 の人工胃液に対しても強い耐性を示し、生残率は 100 %であったことから、PUK6 株はヒトの胃液に対しても強い耐性をもつと考えられた。さらに、PUK6 株はタウロコール酸含有培地でも良好な増殖を示し、コレステロール吸収・吸着率は 28.7%でこれまでに本研究室で分離した他の乳酸菌 5 株と比べて高い値を示した。これらのことから、PUK6 株は DL-乳酸生産株であり、耐塩性、胃酸および胆汁酸に耐性であることから、それを摂取した場合、胃酸や胆汁酸に耐えて腸に届くことに加え、コレステロール低下作用が期待されることから、有力なプロバイオティクス候補株といえる。ただし、今後、PUK6 株をプロバイオティクスとして利用していくためには、ラットやマウスを用いた動物実験を行い、より詳細な試験が必要である。

第三章「*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産するバクテリオシンの精製」では、

PUK6 株のバクテリオシン生産における培養条件の検討およびその精製を行った。まず、培養条件を検討した結果、MRS 培地にて 30 °C、9 時間培養を行った際にバクテリオシンを最も生産した。次に、PUK6 株の培養液上清から、硫酸沈殿、透析、Sep-Pak plus tC18、および逆相 HPLC を行った。逆相 HPLC (1st HPLC) では、7 つの画分 (Fraction 1~7) を回収し、*Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌に用いて抗菌活性を調べた。その結果、Fraction 1 および 4 にて抗菌活性が検出された。Fraction 4 は単一ピークで分離できたため、アミノ酸配列分析を行ったところ、既報のバクテリオシンと相同性を示さず、機能不明タンパク質の分解物が抗菌活性を示したと考えられた。一方、Fraction 1 は複数のピークが重なっていたため、逆相 HPLC におけるアセトニトリル濃度勾配を緩やかに変更し、Fraction 1 を再び逆相 HPLC に供した (2nd HPLC)。その結果、Fraction 1 はさらに A~H の 8 つのピークに分けることができ、それぞれ回収して抗菌活性を調べたところ、全てのピークで抗菌活性が検出された。そこで、特に抗菌活性値が高く、単一ピークで精製できた Fraction 1-D、1-G および 1-H についてアミノ酸配列分析を行った結果、Fraction 1-D は plantaricin A、Fraction 1-G は plantaricin F、Fraction 1-H は plantaricin NC8 β と相同性を示した。このことから、PUK6 株は plantaricins A、EF および NC8 あるいはそれらの構造類似体を生産すると予想された。

第四章「*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産するバクテリオシンの生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の同定および機能解析」では、PUK6 株が生産するバクテリオシンの同定と、それらの生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の同定および機能解析を行った。第三章において PUK6 株が生産すると予想された plantaricin の構造遺伝子に特異的なプライマー、および PUK6 株と類似の *pln* 遺伝子クラスターを有する他の *L. plantarum* に共通する遺伝子に特異的なプライマーを用いて、PUK6 株の *pln* locus 上遺伝子のクローニングとプライマーウォーキングを行って、*pln* locus の全塩基配列 (21,847 bp) を決定した。さらに BLAST 検索により、*pln* locus 上の 29 個の遺伝子の機能解析を行い、各遺伝子の機能を決定・推測した。また、複数の機能不明遺伝子の中で、*orf1* および *orf2* については、その推定翻訳産物のアミノ酸配列中にバクテリオシン前駆体に特徴的なダブルグリシン配列 (Gly-Gly) を見出し、また BLAST 検索により、バクテリオシン様遺伝子であることが予想された。さらに、Orf3 は膜貫通領域を有することが示唆され、自己免疫機能を有するタンパク質であることが推察された。加えて、PUK6 株と同様の *pln* locus を有する *L. plantarum* J51 の *pln* locus 上にも、PUK6 株の *orf1*、*orf2* および *orf3* と相同性を有する *orf3*、*orf4* および *orf5* が存在し、これらについては 2 分子ペプチドバクテリオシン遺伝子 (*orf3* および *orf4*) とその免疫タンパク質遺伝子 (*orf5*) と推測されているが、未だその機能は証明されていない⁸⁾。

第五章「*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の *pln* locus 上に存在する機能不明遺伝子 (*orf1* および *orf2*) の機能解析」では、PUK6 株の *pln* locus 上に存在する *orf1* および *orf2* についての機能解析を行った。発現解析の結果、*orf1* および *orf2* は、その下流に位置する *orf3* とポリシストロン性 mRNA を形成していた。また、Orf1 および Orf2 の

推定成熟ペプチドを化学合成し (mOrf1 および mOrf2)、抗菌活性試験を行った。その結果、mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物 (各 5 μ M) を用いた場合、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T および *Weizmannia coagulans* JCM 2257^T に対して、明瞭ではないものの生育阻止円を形成した。そこで、さらに詳細な作用機序を調べるために、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌に用いて増殖阻害試験および蛍光染色による蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、mOrf2 単独では指標菌の増殖を阻害しなかった。一方、mOrf1 単独では静菌作用を示し、mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物では指標菌の生育を最も阻害し、殺菌作用を示した。さらに、培養 4 時間後に化学合成ペプチドを添加した際の培養液を 1 時間毎にサンプリングし、DAPI/PI を用いて指標菌の染色を行った。mOrf2 単独では指標菌の生菌数に変化は見られなかったが、mOrf1 単独では、指標菌が経時的に膜破壊された様子が観察され、mOrf1 および mOrf2 の等モル混合物を添加すると、指標菌の膜破壊による菌体の破裂・死滅が認められた。このことから、*orf1* および *orf2* は 2 分子ペプチドバクテリオシン遺伝子であると結論し、それぞれを *plnPUK6 α* および *plnPUK6 β* と名付け、それらが発現した活性型の成熟バクテリオシンを plantaricin PUK6 と命名した。また、*orf3* は RT-PCR による発現解析やドメイン解析の結果より、plantaricin PUK6 の免疫タンパク質遺伝子であると予想され、*plnPUK6c* と命名した。以上の結果を踏まえ、PUK6 株が生産する多成分バクテリオシン生合成メカニズムを提唱した (Fig. 7-1)。PUK6 株はバクテリオシン前駆体である pre-PlnA、pre-PINC8 β / α 、pre-PlnE/F および pre-PlnPUK6 α / β を生産し、それらは PlnG/H によってリーダー配列が切断され、菌体外へ活性型バクテリオシン (plantaricin A、EF、NC8 および PUK6) として排出・分泌されると推測した。また、plantaricin A は自身が誘導ペプチドとして働き、PlnB がそのセンサー (ヒスチジinkinナーゼ) として plantaricin A を感知すると、ATP を消費してレスポンスレギュレーターである PlnC/D をリン酸化し、タンパク質の発現を調節すると考えられる。そして、PUK6 株が生産するバクテリオシンに自身が抗菌作用を受けないように、バクテリオシン免疫タンパク質 (PINC8c、PlnI および PlnPUK6c) が細胞膜上に存在すると考えられる。加えて PlnTUVW も細胞膜上に存在し、これは PUK6 株が生産する 4 種のバクテリオシンのいずれかの免疫タンパク質として機能すると推定した。

第六章「*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの抗菌スペクトル」では、PUK6 株が生産する 4 種類のバクテリオシン (plantaricin A、plantaricin EF、plantaricin NC8 および plantaricin PUK6) の抗菌スペクトルを調べた。その結果、4 種類のバクテリオシンはそれぞれ異なる指標菌に対して抗菌活性を示した。このことから、PUK6 株を発酵食品等のスターター菌と用いることで、耐性菌出現の抑制が可能であると考えられる。

以上より、本博士論文研究において、*L. plantarum* PUK6 の特性評価とそれが生産するバクテリオシンの同定、多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の同定および *pln* locus 上遺伝子の機能解析、*pln* locus 上に見出したバクテリオシン様遺伝

子の機能解析および新規バクテリオシンの同定および命名、さらに PUK6 株が生産する 4 種類のバクテリオシン (plantaricins A、EF、NC8 および PUK6) の抗菌スペクトルを決定した。この研究成果は、多成分バクテリオシンを生産する乳酸菌を用いた食品保存技術の新たな糸口になることを期待する。加えて、PUK6 株は胃酸・胆汁酸耐性を有していることから、*in vivo* 試験なども精力的に進めることで、保存性と健康機能性の両方を有する発酵食品の優れたスターター菌として今後の研究の発展が期待される。

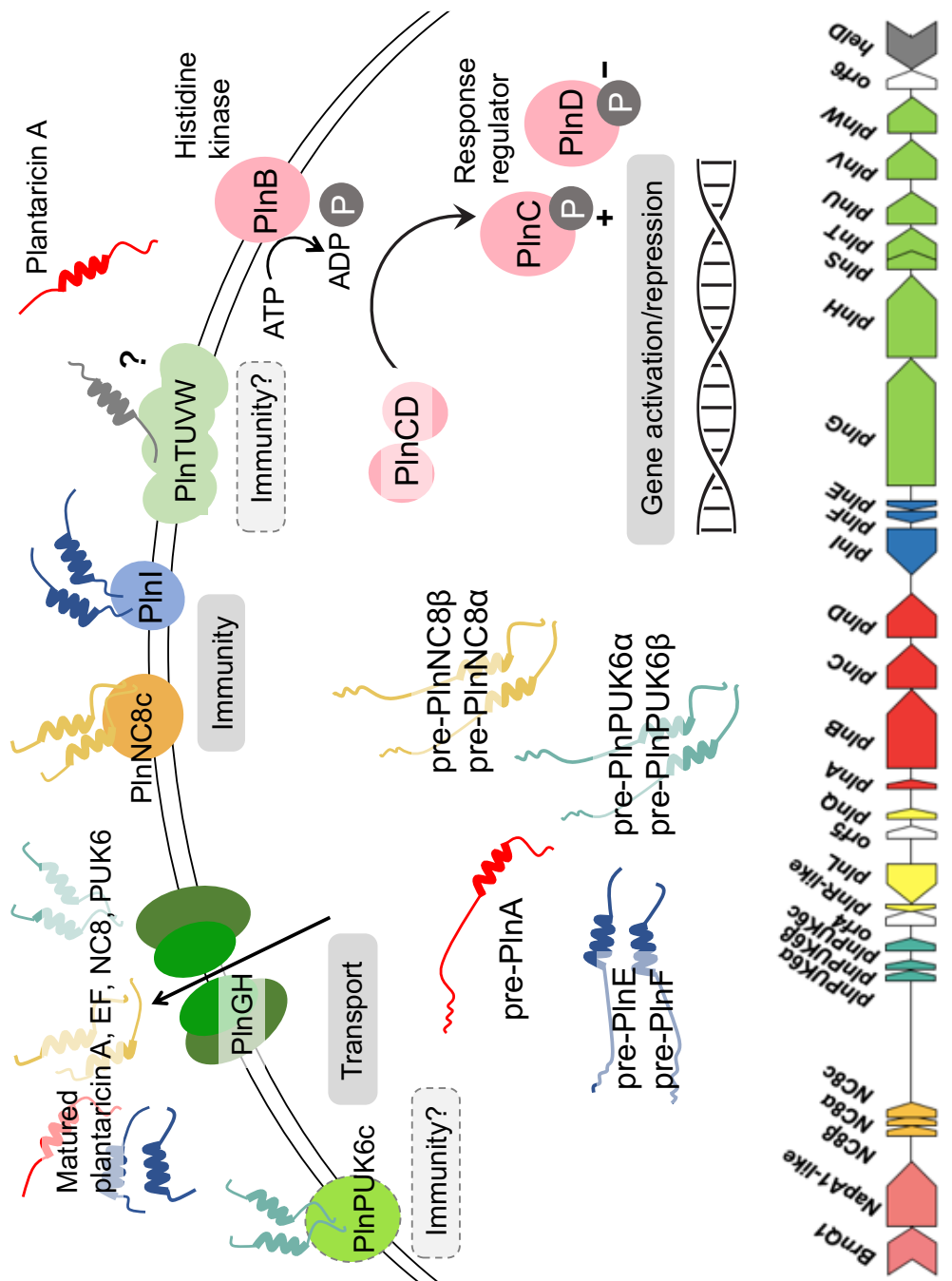


Fig. 7-1 Proposed mechanism for the biosynthesis of multiple plantaricins in *L. plantarum* PUK6.

引用文献

第一章

1. 内閣府食品安全委員会, 令和2年度食品安全モニター課題報告「食品の安全性に関する意識等について」
(https://www.fsc.go.jp/monitor/monitor_report.data/2020kadai-gaiyou.pdf)
2. 石田真己, 久田孝, 小長谷幸史, 小柳喬, 佐子芳彦, 里見正隆, 土戸哲明, 中野宏幸, 藤川浩, 宮本敬久, 森田幸雄, 吉田天士 (2013) 食品微生物学の基礎、講談社
3. 厚生労働省, 食品添加物
(https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuten/index.html)
4. 河端俊治, 春田三佐夫 (1998) 食品微生物制御技術の進歩, 中央法規出版
5. 森地敏樹, 松田敏生 (1999) バイオプリザベーション, 一乳酸菌による食品微生物制御一, 幸書房
6. 日本乳酸菌学会編 (2010) 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会
7. 上野川修一 (2007) 乳酸菌の保健機能と応用, シーエムシー出版
8. 岡田早苗 (2002) 植物性乳酸菌世界とその秘める可能性, *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, **13**, 23-35
9. 石川森夫 (2012) 近年の乳酸菌の分類体系と *Carnobacteriaceae* 科および *Aerococcaceae* 科の分類学的特徴, *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, **23**, 14-23
10. 平山洋佑, 遠藤明仁 (2016) 乳酸菌分類の現在とビフィズス菌・乳酸菌分類小委員会が提言した 新規乳酸菌種提唱のための最少基準, 腸内細菌学雑誌, **30**, 17-28
11. Liu, D.D. and Gu, C.T. (2020) Proposal to reclassify *Lactobacillus zhaodongensis*, *Lactobacillus zae*, *Lactobacillus argentoratensis* and *Lactobacillus buchneri* subsp. *silagei* as *Lacticaseibacillus zhaodongensis* comb. nov., *Lacticaseibacillus zae* comb. nov., *Lactiplantibacillus argentoratensis* comb. nov. and *Lentilactobacillus buchneri* subsp. *silagei* comb. nov., respectively and *Apilactobacillus kosoi* as a later heterotypic synonym of *Apilactobacillus micheneri*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**, 6414-6417
12. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. and Lebeer, S. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**, 2782-2858
13. 辨野義巳 (2011) プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能、モダンメディア, **57**, 277-287

14. 加藤丈雄 (1995) 乳酸菌の生産するバクテリオシンについて, *Jpn. J. dairy Food Sci.*, **44**, A79-89
15. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M. and Rowland, I. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.*, **80** (Suppl 1), S147-71
16. 辨野義巳 (2010) 補完・代替医療 プロバイオティクス, 金芳堂
17. 伊藤喜久治 (2005) プロバイオティクスとバイオジェニクス 科学的根拠と今後の開発展望, エヌ・ティー・エス
18. Park, S., Kang, J., Choi, S., Park, H., Hwang, E., Kang, Y., Kim, A., Holzappel, W. and Ji, Y. (2018) Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and its influence on the gut microbiome and propionate level in a murine model. *PLoS One*, **13**, e0203150 (15 pages)
19. Talib, N., Mohamad, N.E., Yeap, S.K., Hussin, Y., Aziz, M.N.M., Masarudin, M.J., Sharifuddin, S.A., Hui, Y.W., Ho, C.L. and Alitheen, N.B. (2019) Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from Kefir samples in Malaysia. *Molecules*, **24**, 2606 (18 pages)
20. Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M. and Gil, A. (2019) Mechanisms of action of probiotics. *Adv. Nutr.*, **10**, 49-66
21. 加藤文雄 (1999) 乳酸菌の生産するバクテリオシンを食品への利用, 食品工業, **42**, 33-42
22. Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, 337-349
23. Zou, J., Jiang, H., Cheng, H. Fang, J. and Huang, G. (2018) Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int. J. Biol. Macromol.*, **177**, 781-789
24. 厚生労働省, ナイシンの食品添加物の指定に関する添加物部会報告書 (https://www.mhlw.go.jp/shingi/2008/02/dl/s0228-8c_0001.pdf)
25. Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I. and Biron, E. (2018) Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof. *Sci. Rep.*, **8**, 9029 (13 pages)
26. Koné, A.P., Zea, J.M.V., Gagné, D., Cinq-Mars, D., Guay, F. and Saucier, L. (2018) Application of *Carnobacterium maltaromaticum* as a feed additive for weaned rabbits to improve meat microbial quality and safety. *Meat Sci.*, **135**, 174-188
27. Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. and Kok, J. (2003) Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1589-1597
28. Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 777-788

29. Alvarez-Sieiro, P., Montalban-Lopez, M., Mu, D. and Kuipers, O.P. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 2939-2951
30. Perez R. H., Zendo T. and Sonomoto K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) : various structures and applications. *Microb. Cell Fact.*, **12**, 1-13
31. Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S. and Visessanguan, W. (2016) Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Sci.*, **120**, 118-132
32. Lai, A.C., Tran, S. and Simmonds, R.S. (2002) Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **215**, 133-138
33. Cavera, V.L., Arthur, T.D., Kashtanov, D. and Chikindas, M. (2015) Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **46**, 494-501
34. Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K. and Mizunoe, Y. (2013) Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 5572-5579
35. Collin, F, Thompson, R.E., Jolliffe, K.A., Payne, R.J. and Maxwell, A. (2013) Fragments of the bacterial toxin microcin B17 as gyrase poisons. *PLoS One*, **8**, e61459 (9 pages)
36. Ng, C.L., Lang, K., Meenan, N.A.G., Sharma, A., Kelley, A.C., Kleanthous, C. and Ramakrishnan, V. (2010) Structural basis for ribosomal 16S rRNA cleavage by the cytotoxic domain of colicin E3. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1241-1246
37. Prado-Acosta, M, Ruzal, S.M., Allievi, M.C., Palomino, M.M. and Rivas, C.S. (2010) Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* surface layer and nisin on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 974-977
38. Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A. and Dicks, L.M.T. (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **49**, 23-28
39. Gillor, O., Giladi, I. and Riley, M.A. (2009) Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiol.*, **9**, 1-7
40. O'Sullivan, L., O'connor, E.B., Ross, R.P. and Hill, C. (2006) Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 135-143
41. Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. (2016) Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 1-6
42. Bouttefroy, A. and Millière, J.B. (2000) Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.*, **62**, 65-75

43. Dicks, L.M.T., Dreyer, L., Smith, C. and van Staden, A.D. (2018) A Review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: do they cross the gut-blood barrier? *Front. Microbiol.*, **9**, 2297 (14 pages)
44. Papenfort, K. and Bassler, B. (2016) Quorum-sensing signal-response systems in gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 576-588
45. Kareb, Q. and Aïder, M. (2019) Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by Lactic Acid Bacteria: a Review. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **12**, 5-17
46. Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J. and de Vos, W.M.D. (1993) Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.*, **216**, 281-91
47. Wen, L.S., Philip, K. and Ajam, N. (2016) Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food control*, **60**, 430-439
48. Ołdak, A., Zielińska, D., Rzepkowska, A. and Kołożyn-Krajewska, D. (2017) Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. *Biomed. Res. Int.*, **2017**, 6820369 (10 pages)
49. Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Díez, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2008) Comparative study of the *pln* locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J51 strain. *Int. J. Food Microbiol.*, **128**, 390-394
50. Amortegu, J., Rodríguez-López, A., Rodríguez, D., Carrascal, A.K., Alméciga-Díaz, C.J., Melendez, A.P. and Sánchez, O.F. (2014) Characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* LE5 and LE27 isolated from ensiled corn. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **172**, 3374-89
51. Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Tarchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W., Stiekema, W., Klein, R.M., Lankhorst, Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M. and Siezen, R.J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1990-1995
52. da Silva sabo, S., Vitolo, M., Gonzalez, J.M.D. and Oliveira, R.P.S. (2014) Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.*, **64**, 527-536
53. Zubaidah, E., Susanti, I., Yuwono, S.S., Rahayu, A.P., Srianta, I. and Blanc, P.J. (2020) Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures in lower salt concentration fermentation on the sauerkraut quality. *Food Res.*, **4**, 1038-1044

54. Polak-Berecka, M., Kubik-Komar, A., Gustaw, K., Michalak, M., Kazimierczak, W. and Wasko, A. (2018) Functional traits of *Lactobacillus plantarum* from fermented *Brassica oleracea* var. *capitata* L. in view of multivariate statistical analysis. *Eur. Food Res. Technol.*, **244**, 1719-1727
55. Liu, H., Zhang, L., Yi, H., Han, X. and Chi, C. (2016) Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. *LWT Food Sci. Technol.*, **71**, 386-390
56. Milioni, C., Martinez, B., Degl'Innocenti, S., Turchi, B., Fratini, F., Cerri, D. and Fischetti, R. (2015) A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LpU4 as a valuable candidate for biopreservation in artisanal raw milk cheese. *Dairy Sci. Technol.*, **95**, 479-494
57. Sihombing, D.E., Arief, I.I. and Budiarti, S. (2015) Application of antimicrobial agents produced by *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 as natural preservative on beef during room temperature storage. *J. Food Sci. Technol.*, **8**, 251-255
58. Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. and Nes, I.F. (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, **147**, 643-651
59. Daeschel, M.A., McKenney, M.C. and McDonald, L.C. (1990) Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.*, **7**, 91-99
60. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L. and Jimenez-Diaz, R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 383-389
61. Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Jiménez-Díaz, R., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2008) Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Arch Microbiol.*, **189**, 491-499
62. Sand, S.L., Nissen-Meyer, J., Sand, O. and Haug, T.M. (2013) Plantaricin A, a cationic peptide produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked to glycosylated membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1828**, 249-259
63. Calasso, M., Cagno, R. D., Angelis, M.D., Campanella, D., Minervini, F. and Gobbetti, M. (2013) Effects of the peptide pheromone plantaricin A and cocultivation with *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA174 on the exoproteome and the adhesion capacity of *Lactobacillus plantarum* DC400. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 2657-2669
64. Tsapieva, A., Duplik, N. and Suvorov, A. (2011) Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Benef. Microbes*, **2**, 255-261

65. Ekblad, B., Kyriakou, P.K., Oppegård, C., Nissen-Meyer, J., Kaznessis, Y.N. and Kristiansen, P.E. (2016) Structure-function analysis of the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochemistry*, **55**, 5106-5116
66. Zhang, X., Wang, Y., Liu, L., Wei, Y., Shang, N., Zhang, X. and Li, P. (2016) Two-peptide bacteriocin PlnEF causes cell membrane damage to *Lactobacillus plantarum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1858**, 274-280
67. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L. and Jimenez-Diaz, R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 383-389
68. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L. and Jimenez-Diaz, R. (2004) Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch. Microbiol.*, **181**, 8-16
69. Jiang, H., Tang, X., Zhou, Q., Zou, J., Li, P., Breukink, E. and Gu, Q. (2018) Plantaricin NC8 from *Lactobacillus plantarum* causes cell membrane disruption to *Micrococcus luteus* without targeting lipid II. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 7465-7473
70. Sturme, M. H. J., Francke, C., Siezen, R.J., de Vos, W.M. and Kleerebezem, M. (2007) Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology*, **153**, 3939-3947
71. Moll, G.M., van den Akker, E., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konings, W.N. and Driessen, A.J.M. (1999) Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J. Bacteriol.*, **181**, 4848-4852
72. Hauge, H.H., Mantzilas, D., Eijsink, V.G.H. and Nissen-Meyer, J. (1999) Membrane-mimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. *J. Bacteriol.*, **181**, 740-747.
73. Oppegård, C., Kjos, M., Veening, J.W., Nissen-Meyer, J. and Kristensen, T. (2016) A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Microbiologyopen*, **5**, 700-708.
74. Ekblad, B., Nissen-Meyer, J. and Kristensen, T. (2017) Whole-genome sequencing of mutants with increased resistance against the two-peptide bacteriocin plantaricin JK reveals a putative receptor and potential docking site. *PLoS One*, **12**, e0185279 (11 pages)
75. Tai, H.F., Foo, H.L., Rahim, R.A., Loh, T.C., Abdullah, M.P. and Kimura, Y. (2015) Molecular characterisation of new organisation of *plnEF* and *plw* loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb. Cell Fact.*, **14**, 89-101
76. Diep, D. B., Håvarstein, L.S., Niseen-Meyer, J. and Nes, I.F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, **178**, 4472-4483

77. Straume, D., Johansen, R.F., Bjørås, M., Nes, I.F. and Diep, D.B. (2009) DNA binding kinetics of two response regulators, PlnC and PlnD, from the bacteriocin regulon of *Lactobacillus plantarum* C11. *BMC Biochem.*, **10** (11 pages)
78. Di Cagno, R., De Angelis, M., Calasso, M., Vincentini, O., Vemocchi, P., Ndagijimana, M., De Vincenzi, M., Dessi, M. R., Guerzoni, M. E. and Gobbetti, M. (2010) Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: Induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and caco-2 cells. *Proteomics*, **10**, 2175-2190
79. Pal, G. and Srivastava, S. (2015) *In vitro* activity of a recombinant ABC transporter in the processing of plantaricin E pre-peptide. *Arch. Microbiol.*, **197**, 843-849
80. Moll, G.N., Akker, E., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konings, W.N. and Driessen, A.J.M. (1999) Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J. Bacteriol.*, **181**, 4848-4852
81. Pei, J., Mitchell, D.A., Dixon, J.E. and Grishin, N.V. (2012) Expansion of type II CAAX proteases reveals evolutionary origin of γ -secretase subunit APH-1. *J. Mol. Biol.*, **410**, 18-26
82. 北垣 浩志 (2018) 日本の伝統発酵食品の健康機能性解明に向けて 日本食の重要な健康エビデンスに, *化学と生物*, **56**, 710-711
83. 草野崇一, 田村弘司, 岡崎勝一郎 (2015) フルクタン資化性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* S506 株の分離とニンニク発酵食品への応用, *日本食品工学会誌*, **16**, 125-131
84. Sandagdorj, B., Hamajima, C., Kawahara, T., Watanabe, J. and Tanaka, S. (2019) Characterization of microbiota that influence immunomodulatory effects of fermented *Brassica rapa* L. *Microbes Environ.*, **34**, 206-214
85. Horie, M., Sato, H., Tada, A., Nalamura, S., Sugino, S., Tabei, Y., Katoh, M. and Toyotobe, T. (2019) Regional characteristics of *Lactobacillus plantarum* group strains isolated from two kinds of Japanese post-fermented teas, Ishizuchi-kurocha and Awabancha. *Biosci. Microbiota Food Health*, **38**, 11-22
86. 森地敏樹 (2008) 食品における乳酸菌の利用とその働き, *日本調理科学会誌*, **41**, 55-60
87. 善藤威史, 石橋直樹, 園元謙二 (2014) 乳酸菌バクテリオシンの探索と利用, *日本乳酸菌学会誌*, **25**, 24-33
88. Kawahara, A., Murakami, C., Hayashi, R., Zendo, T. and Matsusaki, H. (2022) Characterization of multiple bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 isolated from *misozuke-tofu*. *Food Sci. Technol. Res.*, **28**, in press

第二章

1. 一般社団法人日本食品添加物協会 (<https://www.jafaa.or.jp/>)
2. Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H. and Frank, J.R. (1995) Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**, 221-231
3. 辻秀人, 筏義人 (1997) ポリ乳酸-医療・製剤・環境のために-, 高分子刊行会
4. 日本化学会 (2020) 持続可能社会をつくるバイオプラスチック, 化学同人
5. 上野川修一 (2007) 乳酸菌の保健機能と応用, シーエムシー出版
6. Yang, S.J., Lee, J.E., Lim, S.M., Kim, Y.J., Lee, N.K. and Paik, H.D. (2019) Antioxidant and immune-enhancing effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* 200655 isolated from kimchi. *Food Sci. Biotechnol.*, **28**, 491-499.
7. Toshimitsu, T., Ozaki, S., Mochizuki, J., Furuichi, K. and Asami, Y. (2017) Effects of *Lactobacillus plantarum* strain OLL2712 culture conditions on the anti-inflammatory activities for murine immune cells and obese and type 2 diabetic mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, **83**, e03001-16.
8. Li, C., Fan, Y., Li, S., Zhou, X., Park, K.Y., Zhao, X. and Liu, H. (2021) Antioxidant effect of soymilk fermented by *Lactobacillus plantarum* HFY01 on D-galactose-induced premature aging mouse model. *Front. Nutr.*, **8**, 667643 (17 pages)
9. Watanabe, S., Katsube, T., and Sonomoto, K. (2012). Cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus brevis* isolated from Turnip “Tsuda Kabu”. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 825-834
10. 小崎道雄, 佐藤英一 (2004) 乳酸発酵の新しい系譜, 中央法規出版

第三章

1. 小久保彌太郎 (2016) 現場で役立つ食品微生物, 中央法規出版
2. 森地敏樹, 松田敏生 (1999) バイオプリザベーション, 一乳酸菌による食品微生物制御-, 幸書房
3. Perez R. H., Zendo T. and Sonomoto K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) : various structures and applications. *Microb. Cell Fact.*, **12**, 1-13
4. Kwarteng, J.O., Akabanda, F., Agyei, D. and Jespersen, L. (2020) Microbial safety of milk production and fermented dairy products in Africa. *Microorganisms*, **8**, 752 (24 pages)
5. Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M. and Siezen, R.J. (1995) Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2873-2878
6. 善藤威史, 石橋直樹, 園元謙二 (2014) 乳酸菌バクテリオシンの探索と利用, 日本乳酸菌学会誌, **25**, 24-33

7. Kawahara, A., Murakami, C., Hayashi, R., Zendo, T. and Matsusaki, H. (2022) Characterization of multiple bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 isolated from *misozuke-tofu*. *Food Sci. Technol. Res.* **28**, in press
8. Tai, H.F., Foo, H.L., Rahim, R.A., Loh, T.C., Abdullah, M.P. and Kimura, Y. (2015) Molecular characterisation of new organisation of *plnEF* and *plw* loci of bacteriocin genes harbor concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb. Cell Fact.*, **14**, 89-101
9. Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2001). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food. Microbiol.*, **70**, 291–301
10. Diep, D.B., Håvarstein, L.S. Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F. (1994) The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 160-166
11. Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. and Nissen-Meyer, J. (1998) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2269-2272
12. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L. and Jimenez-Diaz, R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 383-389
13. Kyriakou, P.K., Ekblad, B., Kristiansen, P.E. and Kaznessis, Y.N. (2016) Interactions of a class IIb bacteriocin with a model lipid bilayer, investigated through molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1858**, 824-835
14. Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R. and Ruiz-Barba, J.L. (2004) Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J. Bacteriol.*, **186**, 1556-1564
15. Hauge, H.H., Mantzilas, D., Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J., Eijsink, V.G. and Nissen-Meyer, J. (1998) Plantaricin A is an amphiphilic alpha-helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry*, **37**, 16026-16032
16. Song, D.F., Zhu, M.Y. and Gu Q. (2014) Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS One*, **9**, e105549 (8 pages)
17. Wang, Y., Qin, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Hu, J. and Li, P. (2018) Purification and Characterization of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin produced by

- Lactobacillus plantarum* LPL-1 isolated from fermented fish. *Front. Microbiol.*, **9**, 2276 (12 pages)
18. Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Han, X. and Ai, L. (2018) Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. *Front. Microbiol.*, **9**, 2165 (7 pages)

第四章

1. Shin, J.M., Gwak, J.W., Kamarajan, P., Fenno, J.C., Rickard, A.H. and Kapila, Y.L. (2016) Biomedical applications of nisin. *J. Appl. Microbiol.*, **120**, 1449-1465
2. Brumfitt, W., Salton, M.R.J. and Hamilton-Miller, J.M.T. (2002) Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 731-734.
3. Singh, A.P., Prabha, V. and Rishi, P. (2013) Value addition in the efficacy of conventional antibiotics by nisin against *Salmonella*. *PLoS One*. **8**, e76844 (9 pages)
4. Ng, Z.J., Zarin, M.A., Lee, C.K. and Tan, J.S. (2020) Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: a review. *RSC Adv.*, **10**, 38937-38964
5. Daeschel, M.A., McKenney, M.C. and McDonald, L.C. (1990) Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.*, **7**, 91-98
6. Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L. and Jiménez-Díaz, R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 383-389
7. Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C. and Nes, I. F. (2009) An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, **30**, 1562-1574
8. Kawahara, A., Murakami, C., Hayashi, R., Zendo, T. and Matsusaki, H. (2022) Characterization of multiple bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 isolated from *misozuke-tofu*. *Food Sci. Technol. Res.*, **28**, in press
9. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
10. Remiger, A., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. (1996) Identification of bacteriocin-encoding genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). *System. Appl. Microbiol.*, **19**, 28-34
11. Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Navarro, L., Diez, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2009) Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **134**, 176-183

12. Remiger, A., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. (1996) Identification of bacteriocin-encoding genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). *Sys. Appl. Microbiol.*, **19**, 28-34
13. Tai, H.F., Foo, H.L., Rahim, R.A., Loh, T.C., Abdullah, M.P. and Kimura, Y. (2015) Molecular characterisation of new organisation of *plnEF* and *plw* loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb. Cell Fact.*, **14**, 89-101
14. Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Navarro, L., Díez, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2009) Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **134**, 176-183
15. Tsapieva, A., Duplik, N. and Suvorov, A. (2011) Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. *Benef. Microbes*, **2**, 255-261
16. Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Díez, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2008) Comparative study of the *pln* locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *L. plantarum* J51 strain. *Int. J. Food Microbiol.*, **128**, 390-394
17. Villegas, A. and Kropinski, A.M. (2008) An analysis of initiation codon utilization in the domain bacteria – concerns about the quality of bacterial genome annotation. *Microbiology*, **154**, 2559-2661
18. Diep, D. B., Håvarstein, L.S., Niseen-Meyer, J. and Nes, I.F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, **178**, 4472-4483

第五章

1. 善藤威史, 岩谷駿, 園元謙二 (2019) バクテリオシン生合成遺伝子群の機能解析, 日本乳酸菌学会誌, **30**, 18-26
2. Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Díez, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2008) Comparative study of the *pln* locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *L. plantarum* J51 strain. *Int. J. Food Microbiol.*, **128**, 390-394
3. Hoffman N. and Rehm B.H. (2005) Nitrogen-dependent regulation of medium-chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes in pseudomonads. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 279-282
4. Diep, D. B., Håvarstein, L.S., Niseen-Meyer, J. and Nes, I.F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, **178**, 4472-4483
5. Kasuga, K., Tanaka, M., Harada, Y., Nagashima, H., Yamato, T., Wakimoto, A., Arakawa, K., Kawai, Y., Kok, J. and Masuda, T. (2019) Homologous expression and characterization of gassericin T and gassericin S, a novel class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA327. *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e02815-18 (13 pages)

第六章

1. Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., Heeg, P., Ilschner, C., Kramer, A., Larson, E., Merkens, W., Mielke, M., Oltmanns, P., Ross, B., Rotter, M., Schmithausen, R.M., Sonntag, H.G. and Trautmann, M. (2017) Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg. Infect. Control*, **12**, eCollection (24 pages), doi: 10.3205/dgkh000290
2. Zacharof, M.P. and Lovitt, R.W. (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, **2**, 50-56
3. Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittal, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P. and Hillb C. (2010) Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9352-9357
4. Beshkova, D. and Frengova, G. (2012) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.*, **4**, 419-432

第七章

1. Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A. and Dicks, L.M.T. (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **49**, 23-28
2. Da Silva sabo, S., Vitolo, M., Gonzalez, J.M.D. and Oliveira, R.P.S. (2014) Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.*, **64**, 527-536
3. Zubaidah, E., Susanti, I., Yuwono, S.S., Rahayu, A.P., Srianta, I. and Blanc, P.J. (2020) Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures in lower salt concentration fermentation on the sauerkraut quality. *Food Res.*, **4**, 1038-1044
4. Diep, D. B., Håvarstein, L.S., Niseen-Meyer, J. and Nes, I.F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.*, **178**, 4472-4483
5. Straume, D., Johansen, R.F., Bjørås, M., Nes, I.F. and Diep, D.B. (2009) DNA binding kinetics of two response regulators, PlnC and PlnD, from the bacteriocin regulon of *Lactobacillus plantarum* C11. *BMC Biochem.*, **10** (11 pages)

6. Di Cagno, R., de Angelis, M., Calasso, M., Vincentini, O., Vemocchi, P., Ndagijimana, M., de Vincenzi, M., Dessi, M. R., Guerzoni, M. E. and Gobbetti, M. (2010) Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: Induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and caco-2 cells. *Proteomics*, **10**, 2175-2190
7. Pei, J., Mitchell, D.A., Dixon, J.E. and Grishin, N.V. (2012) Expansion of type II CAAX proteases reveals evolutionary origin of γ -secretase subunit APH-1. *J. Mol. Biol.*, **410**, 18-26
8. Navarro, L., Rojo-Bezarez, B., Sáenz, Y., Díez, L., Zarazaga, M, Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. (2008) Comparative study of the *pln* locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J51 strain. *Int. J. Food Microbiol.*, **128**, 390-394

Appendix

Appendix-1 使用培地

【抗生物質】

※ 下記を開放系で調製する。

- ・ アンピシリン (Amp) (100 mg/mL)

遠沈管にアンピシリンナトリウム (Wako) 1 g を量り取り、滅菌水 10 mL を加え、ボルテックスで溶解させる。

※ クリーンベンチにてフィルター滅菌 (0.2 μ m) し、滅菌遠沈管 (15 mL 容) で -25 °C で保存する。また、これらは、マイクロチューブに 100 μ L ずつ分注しておく。

【誘導物質】

- ・ IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) (0.1 M)

遠沈管に IPTG (Wako) 238 mg を量り取り、滅菌水 10 mL を加え、ボルテックスで溶解させる。フィルター滅菌 (0.2 μ m) を行い、滅菌遠沈管 (15 mL 容) で -25 °C で保存する。

【発色性基質】

- ・ X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)
 β -ガラクトシダーゼに対する発色性基質として使用する。

【培地組成】

- ・ MRS 培地 (OXOID)

Table A-1 MRS medium (1 L)

Typical formula (pH 6.2 \pm 0.2)	(g/L)
Peptone	10
'Lab-Lemco' Powder	8
Yeast extract	4
Glucose	20
Tween 80	1 (mL)
Di-potassium hydrogen phosphate	2
Sodium acetate 3H ₂ O	5
Manganese sulphate 4H ₂ O	0.05

Table A-1 の MRS 培地試薬を 52 g/L となるように蒸留水に溶解し、試験管に 5 mL ずつ分注し、121 °C、15 min オートクレーブ殺菌を行い (特に断らない限り以後も同様の条件で殺菌)、被検菌の前培養にはこの MRS 試験管培地を使用した。また、上記の MRS 培地に 1.2%寒天を加えたものをオートクレーブし、約 20 mL ずつ滅菌

シャーレに分注してプレートを作製した。菌株の短期保存にはこの寒天プレート培地を使用し、4 °C で保存し、菌は1週間、または2週間毎に植え継ぎを行った。

- 20 mM DL-トレオニン含有 MRS 培地

MRS 液体培地試薬 (Table A-1) に、DL-トレオニンを 20 mM になるように添加後 121 °C、15 min オートクレーブ殺菌を行った。PUK6 株ゲノム DNA を調製する際の本培養に用いた。

- M17G 培地

Table A-2 M17 medium (1 L) (OXOID)

Typical formula	(pH 6.9±0.2)	g/L
Pancreatic digest of casein		5.0
Soy peptone		5.0
Beef extract		5.0
Yeast extract		2.5
Ascorbic acid		0.5
Magnesium sulfate		0.25
Disodium-β-glycerophosphate		19.00

Table A-2 の M17 培地試薬 37.25 g を 1 L の蒸留水に溶解し、試験管に 5 mL ずつ分注してシリコ栓をし、121 °C、15 min オートクレーブ滅菌を行った。被検菌の培養にはこの培地に別殺菌した 20% グルコースを無菌的に 125 μL (終濃度 0.5%) 添加したものを使用した。

- LB (lysogeny broth) 液体培地

Table A-3 LB medium (1 L)

Bacto Tryptone (Difco)	10 g
Yeast extract (Difco)	5 g
NaCl	5 g

Table A-3 の成分に蒸留水を加えて 1 L とし、pH 7.0 に調整した後、121 °C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。プラスミド維持のため、必要に応じて抗生物質のストック溶液を培地の 1/1000 量添加する。

- LB 寒天平板培地

Table A-3 の LB 培地を pH 7.0 に調整した後、1.5% 濃度になるように Agar を加え、121 °C、20 min オートクレーブ滅菌を行う。55~65 °C まで放冷後に、必要に応じて

抗生物質のストック溶液を培地の 1/1000 量添加し、混合して滅菌シャーレに 15～20 mL ずつ注ぎ、寒天平板培地を作製する。

- LB (AXI) 寒天平板培地

Table A-3 の LB 培地に、1.5%濃度になるように Agar を加え、121 °C、20 min オートクレーブ滅菌を行う。55～65 °C まで放冷後、Table A-4 に示したように X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド)、およびろ過滅菌 (0.2 μm) した IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) とアンピシリン (Amp) を添加、混合して滅菌シャーレに 15～20 mL ずつ注ぎ、寒天平板培地を作製する。

Table A-4

	終濃度
アンピシリン (Amp)	100 μg/mL
IPTG	0.1 mM
X-gal	40 μg/mL

※ X-gal は疎水性のため、添加時に X-gal を最終濃度が 40 mg/mL となるようマイクローチューブに取り、これが 2%となるようにジメチルホルムアミドに溶解させたものを添加。

- SOB 培地

Table A-5 SOB medium (1 L)

		終濃度
Bacto Tryptone (Difco)	20 g	2.0%
Bacto Yeast extract (Difco)	5 g	0.5%
5 M NaCl	2 mL	10 mM
2 M KCl	1.25 mL	2.5 mM

Table A-5 の成分に蒸留水を加えて 1 L とし、pH 7.0 に調整後 121 °C、20 min オートクレーブを行う。これに別殺菌した 1 / 100 量の 2 M Mg²⁺溶液 (2 M MgSO₄ · 7H₂O + 2 M MgCl₂ · 6H₂O) を加える。

- SOC 培地

SOB 培地 (2 M Mg²⁺が入っていないもの) (1 サンプルにつき 200 μL 使用) に、オートクレーブした 2 M Mg²⁺溶液と 2 M グルコース溶液を、それぞれ使用する直前に 1/100 量 (2 μL) ずつ加える。

Appendix-2 Protocols

【バイオアッセイ (Spot-on-lawn method)】

<方法>

- 1) 指標菌は最適試験管液体培地を用いて、最適生育温度で一晩振とう培養を行う。
- 2) 98 °C に設定したヒートブロックで、ねじ口試験管に入った 5 mL の寒天培地を溶かし、寒天培地の温度が 50~60 °C 程度まで下がった後、これに指標菌の培養液を 50 µL (ただし、*Kocuria rhizophila* NBRC 12708 は 5 µL、および *Listeria innocua* ATCC 33090^T は 500 µL) 接種し、ボルテックスを用いて菌を均一に攪拌する。
- 3) 無菌状態の寒天平板培地の上に 2) で懸濁した寒天培地 (菌の生育において、MRS 培地および M17G 培地を用いたものは MRS 寒天平板培地、LB 培地および NB 培地を用いたものは LB 寒天平板培地を使用) を直ちに重層し、クリーンベンチ内で固化後、約 15 min 乾燥させる。
- 4) 乳酸による影響を除くため pH 6 付近に調整し、フィルター滅菌したサンプルを順次 2 倍希釈し、3) で乾燥させたプレート上に 10 µL ずつ滴下する。
- 5) サンプルが寒天平板培地に浸透したら、シャーレのふたを下にして、指標菌の最適生育温度で一晩培養し、阻止円の有無を観察後、各指標菌の抗菌活性を算出する。

《抗菌活性測定法 (算出法)》

$$(式) \quad \text{抗菌活性 (AU/mL)} = (1/D) / (\text{抗菌物質の滴下量 (mL)})$$

AU ; Arbitrary Unit

D ; 抗菌活性を示す最大希釈率

《活性回収率 (算出法)》

$$(式) \quad \text{活性回収率 (\%)} =$$

$$= \frac{\{\text{各精製過程後の抗菌活性 (AU/mL)} \times \text{各精製過程後の液量 (mL)}\}}{\{\text{培養液上清の抗菌活性 (AU/mL)} \times \text{培養液上清の液量 (mL)}\}}$$

【Tricine-SDS-PAGE】

<試薬>

- ・ 40%アクリルアミド/ビス混合溶液 (40% T、3.3% C)

	必要量
Acrylamide (BIO RAD)	38.66 g
Bis (BIO RAD)	1.34 g
超純水	約 100 mL
	計 100 mL

• 3.0 M Tris-HCl (pH 8.45)

	必要量
Tris	36.36 g
超純水	約 100 mL
	計 100 mL

濃 HCl を用いて pH 8.45 にする。4 °C で保存。

• 5.0 M Tris-HCl (pH 6.8)

	必要量
Tris	6.05 g
超純水	約 100 mL
	計 100 mL

濃 HCl で pH 6.8 に調整後、全量を 100 mL になるようにメスアップする。

• 水飽和イソブタノール (2-メチル-1-プロパノール)

2-メチル-1-プロパノールと超純水を 2 : 1 の割合で転倒混和し、静置する。上層が 2-メチル-1-プロパノールである。

• 10 x Tris / Tricine / SDS 泳動バッファー

	必要量
Tris	122.1 g
Tricine	179.1 g
SDS	10.0 g
超純水	約 1,000 mL
	計 1,000 mL

pH 調整不要。

• 1 x Tris / Tricine / SDS 泳動バッファー (0.1 M Tris、0.1 M Tricine、0.1% SDS)

10 x Tricine / SDS 泳動バッファー 100 mL を 900 mL の超純水で 1 L に希釈。

• 10% APS

Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム) 0.1 g を滅菌水 1 mL に溶解する。ボルテックスで攪拌後、4 °C、遮光保存で 2 週間使用可能。

• TEMED

N, N, N', N'-Tetramethylenediamine (BIO-RAD) をそのまま使用する。

• 2 x sample buffer

	必要量
Tricine Sample buffer (BIO-RAD)	49 μ L
2-Mercaptoethanol	1 μ L
	計 50 μ L

随時調製。4 °C 保存。

- 分子量マーカー 1 mg/mL Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (BIO-RAD)
- 染色液 Bio-Safe Coomassie (BIO-RAD)

<方法>

分離ゲル (16.5%) をつくる。

40%アクリルミド／ビス混合溶液	4.1 mL
3.0 M Tris-HCl (pH 8.45)	3.35 mL
50%グリセロール溶液	1.0 mL
超純水	1.2 mL
	計 9.65 mL

- 1) 上記を吸引びんに入れ、スターラーを用いて混合する。その後、減圧下で 15 min 脱気し、スターラーごとビーカーに移す。
- 2) ゲルカセットに注入する直前に 10% APS を 50 μ L、TEMED を 5 μ L を添加してゲル溶液を調製し、素早く混和する。
- 3) 直ちにピペットを用いて、ガラスプレートの上部から 2 cm の位置まで素早く分離ゲル溶液を注入する。
- 4) ゲルが乾燥しないように、注入した溶液の上に直ちに水飽和 2-ブタノール (2-ブタノールの上層) をゲルに重層し、分離ゲルを 1 h 固化させる。
- 5) 濃縮ゲル (4% T、3.3% C) をつくる。

40%アクリルアミド／ビス混合溶液	0.5 mL
3.0 M Tris-HCl (pH 8.45)	1.66 mL
超純水	2.82 mL
	計 4.98 mL

- 6) 上記を吸引びんに入れ、スターラーを用いて混合する。その後、減圧下で 15 min 脱気し、スターラーごとビーカーに移す。
- 7) 分離ゲルが固化した後、水飽和 2-ブタノールをろ紙などを用いて除く。
- 8) 分離ゲルの上部を超純水で満たし、ろ紙で除くという作業を 2 回繰り返す (洗浄)。
- 9) ゲルカセットに注入する直前に 10% APS を 25 μ L、TEMED を 5 μ L を添加し、ゲル溶液を調製する。素早く混和する。

- 10) 直ちにピペットを用いてガラスプレートの上端まで素早く注入し、コームを差し込んで濃縮ゲルを 1 h 固化させる。
- 11) タンパク質溶液（サンプル）を 2 x sample buffer と混合し、98 °C に設定したヒートブロックで、10 min 処理する。
- 12) 泳動槽に、1 x 泳動バッファーを入れる。
- 13) 室温に放置し、冷めたサンプルをゲルにアプライする（マーカーには Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (BIO-RAD) を使用（10 μL））。
- 14) 100 V で約 4 h、電気泳動を行う。
- 15) 泳動後、バットに蒸留水を入れゲルを洗浄する（5 min×3 回）。
- 16) 下記の組成で固定液を調製し、洗浄後のゲルを固定液で 30 min 振とうする。

メタノール	40 mL
酢酸	10 mL
超純水	50 mL
計 100 mL	

- 17) 固定液を捨て、Bio-Safe Coomassie (BIO-RAD) に替えて 1 h 以上振とうする。
- 18) Bio-Safe Coomassie を捨て、蒸留水に替えて 30 min×4 回振とうする。
- 19) 少量の蒸留水とともにハイブリバックに入れ 4 °C で保存する。

【ゲルバイオアッセイ】

<方法>

- 1) SDS-PAGE 泳動後、70%エタノールで殺菌したバットに超純水を入れゲルを洗浄する（15 min×3 回）。
- 2) 98 °C に設定したヒートブロックで、ねじ口試験管に入った 5 mL の MRS 寒天培地を溶かし、寒天培地の温度が 50~60 °C 程度まで下がった後、これに *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T の培養液を 50 μL 接種し、ボルテックスを用いて菌を均一に攪拌する。
- 3) 無菌状態の MRS 寒天平板培地の上に、しわにならないようにゲルを乗せる。
- 4) ゲルが乾燥しないうちに 2) で懸濁した寒天培地を重層し、クリーンベンチ内で固化後、15~30 min 乾燥させる。
- 5) ゲルがはがれ落ちるのを防ぐため、シャーレのふたを上にしたまま 30 °C で 18 h 以上培養し、阻止円の有無を観察する。

【銀染色】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動用銀染色用キット Silver Stain KANTO III（関東化学）を用いた。タンパク質量が少なく、Bio-Safe Coomassie での染色が不十分な際に、銀染色を行った。

<試薬>

キット内容

名称	主成分
試薬 A (増感原液)	ジチオスレイトール
試薬 B (染色原液 I)	硝酸銀
試薬 C (染色原液 II)	けいタングステン酸
試薬 D (現像原液 I)	ホルムアルデヒド
試薬 E (現像原液 II)	炭酸カリウムナトリウム
試薬 F (現像停止液)	クエン酸

・固定液

	必要量
メタノール	50 mL
酢酸	10 mL
蒸留水	40 mL
	計 100 mL

・増感液

	必要量
試薬 A	5 mL
蒸留水	95 mL
	計 100 mL

・染色液

	必要量
蒸留水	90 mL
試薬 B	5 mL
試薬 C	5 mL
	計 100 mL

・現像液

	必要量
蒸留水	90 mL
試薬 D	5 mL
試薬 E	5 mL
	計 100 mL

<方法>

- 1) Tricine-SDS-PAGE 後のゲル、あるいは、Bio-safe Coomassie 染色後のゲルを、固定液 100 mL で 20 min 振とうする。
- 2) 固定液を捨て、増感液 100 mL に替えて 10 min 振とうする。
- 3) 増感液を捨て、蒸留水 100 mL に替えて 10 min 振とうする。
- 4) 蒸留水を捨て、染色液に替えて 10 min 振とうする。
- 5) 染色液を捨て、蒸留水 200 mL に替えて 1 min×2 回振とうする。
- 6) 蒸留水を捨て、現像液に替えて、適度な染色液が得られるまでよく振とうする (5 min~10 min)。
- 7) 適度な染像が得られた時点で、さらに試薬 F を 5 mL 注ぎ、10 min 振とうする。現像液を捨て、ゲルを蒸留水で十分洗浄した後、保存する。

【*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 ゲノム DNA の調製】

<試薬>

- MRS 液体培地 (5 mL、試験管)
- DL-トレオニン含有 MRS 液体培地 (100 mL、300 mL 容フラスコ)
- 0.5 M EDTA (エチレンジアミン四酢酸) (pH 8.0)
EDTA-2Na・2H₂O (エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム二水和物) 18.6 g を超純水 80 mL に溶かし、5N NaOH を用いて pH 8.0 に調整し、超純水で 100 mL にメスアップする。オートクレーブ殺菌を行う。
- 50 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸) (pH 8.0)
0.5 M EDTA (pH 8.0) を 10 倍希釈したものを用意し、121 °C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。
- Lysozyme (Wako)
サンプルに対し、0.5~1.0 mg/mL となるように加える。
- Labiase (生化学工業)
5 mg/mL となるように加える。
- 10% SDS : Sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
30 g を超純水で溶解し、HCl で pH 7.2 に調整して 300 mL にメスアップする。121 °C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。なお SDS は粘膜刺激性薬品であるため、計量する場合は、マスク等を着用する。
- クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1)
クロロホルム、イソアミルアルコールを 24 : 1 (v/v) で混合する。プラスチックを腐食させるので使用する器具に気をつける。
- TE (pH 8.0)
10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA を混合、pH 8.0 に調整し、121 °C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。非常に強い緩衝作用を持ち、DNA や RNA を溶解する基本溶液となる。

- TE 飽和フェノール
核酸抽出用フェノール (Wako) を約 60 °C で温めて溶かし、TE を加えて二層に分かれるまで混合した後、一晩放置した後、下層を使用する。
- 3 M 酢酸ナトリウム (NaOAc)
3 M 酢酸ナトリウム (酢酸ナトリウム 40.8 g を溶解させ 100 mL にしたもの) に 3 M 酢酸 (酢酸原液 12 mL を 70 mL までメスアップしたもの) を徐々に加えて pH 5.2 に調整し、121 °C、20 min オートクレーブ殺菌を行う。
- 100%冷エタノール
耐熱ビンを 121 °C、20 min オートクレーブ殺菌後、室温に冷ましてから 100%エタノールをそのまま入れ、-25 °C で保存する。
- 70%冷エタノール
必要量の超純水を 121 °C、20 min オートクレーブ殺菌する。室温に冷ましてから、エタノール濃度が 70%となるように 100%エタノールを加え、-25 °C で保存する。
- 20 mg/mL Proteinase K (Wako)
滅菌水に溶解後、-20 °C で保存する。

<方法>

- 1) *L. plantarum* PUK6 の単一コロニーをとり、5 mL の MRS 試験管培地に接種し、30 °C にて一晩培養する (120 strokes/min)。
- 2) 1) の培養液 5 mL を、100 mL の 20 mM DL-トレオニン含有 MRS 培地 (300 mL 容三角フラスコ) に移す (接種量 5%)。
- 3) 30 °C で 4~6 h 穏やかに振とう培養する (90 strokes/min)。
- 4) 全量をあらかじめ滅菌した遠心チューブに移し、6,000 rpm、5 min、4 °C 遠心分離する。
- 5) 菌体ペレットを約 50 mL の 50 mM EDTA (pH 8.0) に懸濁し、6,000 rpm、5 min、4 °C の遠心分離を行う (これを 2 回繰り返す)。
- 6) 菌体を 1 mL の 50 mM EDTA に懸濁し、10 mg/mL になるように Lysozyme を加える。
- 7) 37 °C、2 h インキュベートする。
- 8) Labiase (生化学工業) を 5 mg/mL となるように添加し、37 °C で 4 h インキュベートする。
- 9) 10% SDS を 200 μ L 加えて、チューブを上下逆さにしてゆっくりとよく混和する。途中で穏やかによく混ぜながら、60 °C、10 min インキュベートする。
- 10) 400 μ L ずつ 5 本のマイクロチューブに分注する。
- 11) 等量の PCI 溶液 (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)) を加える (フェノール処理)。穏やかに転倒混和 (10 min) した後、12,000 rpm、10 min、4 °C で遠心分離を行う。
- 12) 粘性のある水層 (上層) を新しいマイクロチューブに移す。(フェノール処理は中間

- の白い層がなくなるまで3回繰り返した。中間層の白い層は変性タンパク質)
- 13) 1/10 量 (40 μ L) の 3 M NaOAc、2.5 倍量 (1 mL) の 100%冷エタノールを加え、穏やかによく攪拌する (エタノール沈殿)。
 - 14) -80 $^{\circ}$ C で 10 min 保冷する。
 - 15) 12,000 rpm、10 min、4 $^{\circ}$ C で遠心分離する。
 - 16) 1 mL の 70%冷エタノールでリンスする。
 - 17) 12,000 rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C で遠心分離する。
 - 18) 真空遠心装置を用い、15~30 min ペレットを乾燥させる。
 - 19) 得られたペレットをそれぞれ 195 μ L の TE に溶解する (DNA が溶けない場合は、4 $^{\circ}$ C で一晩静置する)。
 - 20) 20 mg/mL proteinase K 溶液を 5 μ L 加えて、ゆっくりよく混ぜる (転倒混和)。
 - 21) 37 $^{\circ}$ C で 2 h インキュベートする。
 - 22) フェノール処理を数回行い、タンパク質の除去を行う。
 - 23) 1/10 量 (40 μ L) の 3M NaOAc、2.5 倍量 (1 mL) の 100% 冷エタノールを加え、混和、-80 $^{\circ}$ C、10 min 保冷。
 - 24) 12,000 rpm、10 min、4 $^{\circ}$ C 遠心分離し、上清を除く。
 - 25) 1 mL の 70% 冷エタノールでペレットをリンスする。
 - 26) 12,000 rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C 遠心分離後上清を除き、ペレットを真空遠心装置で乾燥させる。
 - 27) それぞれ 200 μ L の TE (pH 8.0) に溶解する (DNA が溶けない場合は、4 $^{\circ}$ C で一晩静置する)。
 - 28) ゲノム DNA 溶液の 8 μ L をアガロースゲル電気泳動に供して、ゲノム DNA の存在を確認し、吸光度計 (NanoVue : GE Healthcare) を用いて、DNA 濃度を測定する。

【RNA の除去】

<試薬>

- TE
- 10 mg/mL Ribonuclease A bovine pancreas (RNase A) (DNase free)

		最終濃度
RNase A (SIGMA)	50 mg	10 mg/mL
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	0.05 mL	10 mM
5 M NaCl (pH 7.5)	0.015 mL	15 mM
滅菌水	up to 5 mL	

※まず、1 M Tris-HCl (pH 7.5) および 5 M NaCl (pH 7.5) でバッファーを作製し、それに RNase A 粉末を溶解する。マイクロチューブに分注し、100 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 15 分処理後、そのまま室温になるまでゆっくりと冷まして作製する。

- クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1)
- TE 飽和フェノール

- ・ 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)
- ・ 100%冷エタノール

<方法>

- 1) ゲノム DNA の調製で得られた 100 μ L の DNA 溶液に TE (pH 8.0) 100 μ L をさらに加える。
- 2) 10 mg/mL の RNase (DNase free) を 2 μ L 添加後、37 °C で 10~30 min インキュベーションを行う。
- 3) 1/10 量 (20 μ L) の 3M NaOAc、2.5 倍量 (500 μ L) の 100% 冷エタノールを加え、混和、-80 °C、10 min 保冷。
- 4) 1 mL の 70% 冷エタノールで沈殿を 2 回リンスする。
- 5) 12,000 rpm、5 min、4 °C で遠心分離する。
- 6) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 分間沈殿物を乾燥させ、100 μ L の TE に溶解する。
- 7) 得られたゲノム DNA は分光光度計およびアガロースゲル電気泳動により濃度および純度を測定、確認する。

【アガロースゲル電気泳動】

<試薬>

- ・ 電気泳動用低融点アガロース LO3 (TaKaRa)
- ・ 50 \times TAE buffer

2 M	Tris
2 M	酢酸
50 mM	EDTA (pH 8.0)
	超純水

※ 1 \times TAE buffer はこれを希釈して用いる。

- ・ EtBr ストック溶液
10 mg/mL の溶液 (市販) を 1 \times TAE buffer で 1,000~2,000 倍程度に希釈し、遮光で室温保存。EtBr は発ガン性物質のため、必ず手袋をして取り扱うこと。
- ・ 分子量マーカー Loading Quick λ /HindIII digest (TOYOBO)
- ・ 色素 Loading Dye (TOYOBO)

<ゲルの作製>

アガロースゲル 1.2 g を三角フラスコに量り取り、1 \times TAE buffer 150 mL を加え、電子レンジで加熱融解させる (ゲル濃度 0.8%)。アガロース溶液を注ぎ、コームをセットして放冷し固化させる。ゲル使用時に、1 \times TAE buffer を加える。

<操作>

- 1) サンプル溶液 5~8 μL に色素 2 μL を混合し、ウェルにアプライする。
- 2) 10 μL の分子量マーカーとともに 100 V、約 30 min 泳動する。
- 3) 電気泳動装置からゲルをそっとはずし、EtBr に 15 min 振とう染色後、蒸留水で
- 4) 15 min 穏やかに振とう洗浄する。
- 5) UV (短波長 254 nm) でバンドを確認し、写真を撮る。

【PCR 産物の精製】

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いた。キットのプロトコールに従う。

【アガロースゲルからの DNA 抽出】

QIAGEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いた。

キットのプロトコールに従う。

【RNA 除去および制限酵素処理】

<試薬>

- 10 mg/mL RNase A (DNase free)
- 制限酵素
- 10 \times buffer
- 3 M NaOAc
- 100%冷エタノール
- 70%冷エタノール

<操作>

- 1) プラスミド溶液を数 μL とり、滅菌水を加えて 19 μL にする。
- 2) 10 mg/ml RNase を 1 μL 加える。
- 3) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min インキュベートする。
- 4) RNA 除去処理後、それぞれに 10 \times buffer を 20 μL 添加し、滅菌水 169 μL を加え、これに制限酵素を各 1 μL 加えて、穏やかに混和する (計 200 μL)。
- 5) 37 $^{\circ}\text{C}$ で 4 h~一晩 インキュベートする。
- 6) 制限酵素処理後、3 M NaOAc を 20 μL と、500 μL の 100%冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行う。
- 7) 12,000 rpm、10 min、4 $^{\circ}\text{C}$ 遠心分離して沈殿を得る。
- 8) 1 mL の 70%冷エタノールで沈殿をリンスする。
- 9) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 min 沈殿物を乾燥させ、ライゲーションに用いる。

【TA クローニング (T-vector pMD20 とライゲーションする場合)】

※ PrimeSTAR シリーズなどの α 型 DNA ポリメラーゼにより増幅された PCR 産物の場合は、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (TaKaRa) を用いて 3'末端に dA を付加した後、T-vector pMD20 とライゲーションする。

<操作>

- 1) dA 付加を行った PCR 産物 (滅菌水を加え計 4 μ L になるように調製) に T-vector pMD20 を 1 μ L 加え混和する。
- 2) サンプルと同量 (5 μ L) の Ligation Mighty Mix を加える (計 10 μ L)。
- 3) 16 °C で 2 h 以上ライゲーションを行う。

【ライゲーション (pUC118 *HincII*/BAP とライゲーションする場合)】

<操作>

- 1) Mighty Cloning Reagent Set <Blunt End> (TaKaRa) を用いて PCR 産物をリン酸化 (kination) 反応を行い、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製を行う。
- 2) 精製した DNA 溶液 5 μ L に pUC118 *HincII*/BAP (50 ng/ μ L) を 1 μ L 加え、混合する。
- 3) Ligation Mighty Mix を 6 μ L 加え、穏やかに混合する。
- 4) 16 °C で 1 h 以上ライゲーションを行う。

【プラスミドの単離 (アルカリ SDS 法)】

<試薬>

・ Solution I (GTE 溶液) ストック

50 mM glucose	1.8 g
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	5 mL
10 mM EDTA (pH 8.0)	4 mL
計 200 mL	

121 °C、20 min オートクレーブする。室温保存。

・ Solution II 試験管 (1.5 mL) 1 本分

0.2 N NaOH	8 μ L
10% SDS	20 μ L
滅菌水	172 μ L
計 200 μ L	

使用時に調製する。

・ Solution III (3 M K, 5 M 酢酸) ストック	
5 M 酢酸カリウム	60 mL
氷酢酸	11.5 mL
超純水	28.5 mL
計 100 mL	

121 °C、20 min でオートクレーブする。室温保存。

<操作>

- 1) プラスミドを保持した大腸菌の単コロニーを 1.7 mL の LB 培地（必要に応じて抗生物質を入れる）に植菌し、37°C で一晩振とう培養（120 strokes/min）を行う。
- 2) 培養液をマイクロチューブに移し 6,000 rpm、3 min 遠心分離する。
- 3) 菌体ペレットを 100 μ L の Solution I に懸濁して室温で 5 min 放置する。
- 4) 200 μ L の Solution II を加え、チューブを上下逆にして穏やかによく混和し、氷上で 5 min 放置する。
- 5) 150 μ L の Solution III を加え、同様に穏やかによく混和し、氷上で 5 分間放置する。
- 6) 12,000 rpm、10 min 遠心分離後、上清を新たなマイクロチューブに移してフェノール処理を数回繰り返す。
- 7) コピー数の少ない広宿主域ベクターなどの場合は、純度よく抽出するために 3 回行った方がよい。
- 8) フェノール処理後、上層を新しいチューブに移し、2.5 倍量の冷エタノールを加えて混和し、-80 °C で 10 min 放置した後、12,000 rpm、10 min、4 °C 遠心分離する。
- 9) 上清を取り除き、70% 冷エタノール (-25 °C) 1 mL でリンス後、12,000 rpm、5 min、4 °C 遠心分離する。
- 10) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 分間沈殿物を乾燥させ、沈殿物を適量の TE もしくは滅菌水に溶解させる。このとき、試験管培地（1.5 mL）1 本あたり、pBluescript II KS⁺などの場合は 20 μ L に溶解させるとよい。

【プラスミドベクターのアルカリフォスファターゼ処理（脱リン酸処理）】

<試薬>

- ・ 10 \times buffer
- ・ CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (TOYOBO)
- ・ 3 M NaOAc
- ・ 100%冷エタノール
- ・ 70%冷エタノール

<操作>

5'突出末端の場合

- 1) 制限酵素で消化したプラスミドベクターの乾燥ペレットを滅菌水 44 μ L に溶解した

後、5 μL の 10 \times buffer、1 μL の CIAP を加える。

- 2) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h インキュベートする。
- 3) 反応終了後、滅菌水で 200 μL にし、等量 (約 200 μL) のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、攪拌する。
- 4) 12,000 rpm、10 min 遠心分離する。
- 5) 上清を新しいマイクロチューブに移し、エタノール沈殿を行う。
- 6) エタノール沈殿後、真空遠心乾燥機で約 15 min 沈殿物を乾燥させ、ライゲーションに用いる。

平滑末端及び3'突出末端の場合

- 1) 制限酵素で消化したプラスミドの乾燥ペレットを滅菌水 170 μL に溶解した後、20 μL の 10 \times CIAP buffer、10 μL の CIAP を加える。
- 2) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min インキュベートする。
- 3) 50 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h インキュベートする。
- 4) 反応終了後、等量 (約 200 μL) のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、攪拌する。
- 5) 12,000 rpm、10 min 遠心分離する。
- 6) 上清を新しいマイクロチューブに移し、1/10 倍量 (20 μL) の 3 M NaOAc と 2.5 倍量 (500 μL) の 100% 冷エタノールを加えて混和し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で 10 min 放置した後、12,000 rpm、10 min、4 $^{\circ}\text{C}$ 遠心分離する。
- 7) 上清を取り除き、70% 冷エタノール 1 mL でリンス後、12,000 rpm、5 min、4 $^{\circ}\text{C}$ 遠心する。
- 8) 上清をよく取り除き、真空遠心乾燥機で約 15 min 沈殿物を乾燥させ、ライゲーションに用いる。

【大腸菌のコンピテントセルの調製】

<試薬>

- LB 液体培地
- SOB 培地
- Transformation Buffer (TB)

Table A-6 Transformation Buffer

Components	Final Concentration	Volume
PIPES	10 mM	3.0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O (CaCl ₂)	15 mM	2.2 g (1.66 g)
KCl	250 mM	18.6 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	55 mM	10.9 g
超純水		950 mL

Up to 1 L

Table A-6 の試薬を超純水に懸濁後、5 N KOH（または HCl）にて pH 6.7-6.8 に調整する。（低 pH では白濁状態だが、pH 調整によって溶解する。）pH 調整後、MnCl₂ · 4H₂O を添加、溶解し、液量をメスアップする。0.2 μm のフィルターを用いて滅菌し、4 °C で保存する（1~2 日）。

- 2 M Mg²⁺ 溶液 : 2 M MgSO₄ · 7H₂O、2 M MgCl₂ · 6H₂O 調整後、121 °C、20 min オートクレーブ殺菌する。
- ジメチルスルホキシド (DMSO) (Wako)

<操作>

- 1) 大腸菌を LB 寒天平板培地にストリークし、シングルコロニーを形成させる。
- 2) LB 液体培地（必要に応じて抗生物質を添加）に大腸菌を接種し、37 °C で一晩培養する。
- 3) 50 mL SOB 培地の入った坂口フラスコ（500 mL 容）に前培養液を 500 μL（1%）接種する。
- 4) 18 °C で 19~50 時間、28 °C で約 4 時間を目安に激しく振とう培養（130 strokes/min）を行う。
- 5) OD₆₀₀=0.4~0.8 に達したら培養を止め直ちに、氷中で約 10 分間冷却する。
- 6) 冷却しておいた滅菌遠心管に培養液を入れ、3,000 rpm、15 min、4 °C で遠心分離し、菌体を回収する。
- 7) クリーンベンチ内で上清を捨て、培養液の 1/3 容量（坂口フラスコ 1 本につき 15 mL）の氷冷した TB を加え氷上で穏やかに攪拌しながら懸濁させる。さらに 10 分間氷冷する。

- 8) 3,000 rpm、15 min、4 °C で遠心分離し、クリーンベンチ内で菌体を回収する。
- 9) 上清を除いたあと、培養液の 1/12.5 容量（坂口フラスコ 1 本つき 4 mL）の氷冷した TB に懸濁し、最終濃度が 7%になるように（坂口フラスコ 1 本につき 300 μL）DMSO（ジメチルスルホキシド）を添加し、さらに 10 分間氷冷する。
- 10) 110 μL ずつ滅菌したマイクロチューブに分注後、直ちに液体窒素に浸し、凍結させる。
- 11) -80 °C で保存。

【形質転換】

< 試薬 >

- ・ LB (AXI) 寒天培地
- ・ SOB 培地
- ・ SOC 培地

< 操作 >

- 1) プラスミドを、5 min 氷冷する。
- 2) 凍結していたコンピテントセル (*E. coli* DH5α など) を融解後、直ちにプラスミドに加える。
- 3) 氷中に 30 min 放置する。
- 4) 42 °C で正確に 90 sec のヒートショックを行う。
- 5) 氷中で 2 min 急冷する。
- 6) 200 μL の SOC 培地を加え、穏やかに懸濁する。
- 7) 37 °C で振とうさせながら、1 h インキュベートする。
- 8) 全量適当な抗生物質あるいは誘導物質を含んだ LB 寒天平板培地にプレーティングする。
- 9) 37 °C で一晩培養する。

【DNA シークエンシング】

《DNA シークエンシング用プラスミド抽出》

FlexiPrep Kit 使用 (GE Healthcare)

< 試薬 >

- ・ LB 試験管培地
- ・ FlexiPrep Kit (GE Healthcare)
- ・ 2-プロパノール (関東化学)
- ・ 5 M NaCl
- ・ 100%冷エタノール
- ・ 70%冷エタノール
- ・ TE (pH 8.0)

<操作>

- 1) ストリークしたプレートから 1 サンプルにつき 4 本の 1.7 mL LB 試験管培地（必要に応じて抗生物質を添加）に植菌する。
- 2) 37 °C で一晩振とう培養する（120 strokes/min）。
- 3) 1.5 mL ずつマイクロチューブに移し、6,000 rpm、3 min 遠心分離を行う。
- 4) DNA シークエンシング用プラスミド抽出キット（FlexPrep Kit）の Solution I を 200 μ L 加え、ピペッティングにより懸濁する。
- 5) Solution II を 200 μ L 加え、チューブを転倒混和し、室温で 5 min 放置する。
- 6) Solution III を 200 μ L 加え、チューブを転倒混和し、室温で 5 min 放置する。
- 7) 12,000 rpm、10 min 遠心分離し、上清を新しいマイクロチューブに移す。
- 8) 上清に 0.7 倍量（420 μ L）の 2-プロパノールを加え、2~3 秒ボルテックスにかけ、室温で 10 min 放置する。
- 9) 12,000 rpm、10 min 遠心分離する。
- 10) 沈殿を取らないように、マイクロピペットで注意深く上清を完全に取り除く。
- 11) マイクロチューブのふたを開け、真空遠心乾燥機で 30 min 乾燥させる。
- 12) Sephaglas FP のボトルを、円を描くようによく振り沈殿物を懸濁し、150 μ L を乾燥ペレットに加え、ペレットが懸濁するまでボルテックスにかける。
- 13) 12,000 rpm、1 min 遠心分離し、上清をマイクロピペットで除く。
- 14) ペレットに 200 μ L の wash buffer を加え、ボルテックスにより懸濁する。
- 15) 12,000 rpm、1 min 遠心分離し、上清をマイクロピペットで除く。
- 16) ペレットに 300 mL の 70%冷エタノールを加え、ボルテックスにより懸濁する。
- 17) 12,000 rpm、1 min 遠心分離し、上清をマイクロピペットで除く。
- 18) 乾燥しやすいように、マイクロチューブをボルテックスにかけ、ペレットを壁面にくっつける。ふたを開けて 37 °C のインキュベーター内でペレットを乾燥させる。
- 19) ペレットに 50 μ L の TE を加え、ボルテックスにより懸濁し、1 min 毎にボルテックスにかけながら室温で 5 min 放置する。
- 20) 12,000 rpm、1 min 遠心分離をし、上清を新しいマイクロチューブに移す。
- 21) 19)、20)の操作をもう一度行い、上清を新しいマイクロチューブに移す（2 本のマイクロチューブを 1 本にまとめる）。
- 22) ペレットに 100 μ L の TE を加え、19)、20)の操作をもう一度行う。
- 23) 12,000 rpm、10 min 遠心分離をし、上清を新しいマイクロチューブに移す。
- 24) この操作を数回（3 回以上行うとよい）繰り返し、完全に Sephaglas を取り除く。
- 25) エタノール沈殿を行い、真空遠心乾燥機を用い、15~30 min ペレットを乾燥させる。
- 26) 適量の TE に溶解し、分光光度計を用いて DNA 濃度を測定する。

《DNA シークエンシング用サーマルサイクリング反応と解析》

DTCS クイックスタートキット（BECKMAN COULTER）を用いた DNA シークエンシング（GenomeLab GeXP/CEQ System）を行った。

<試薬>

- マスターミックス
- シークエンスプライマー (1.6 pmol/μL)
- グリコーゲン (20 mg/mL) : シークエンス反応後、エタノール沈殿に使用
- サンプルローディングソリューション (SLS) : シークエンス産物の精製後に使用
- Mineral Oil
- 100%エタノール
- 70%エタノール
- 3 M NaOAc
- 100 mM Na₂-EDTA (pH8.0)
-

<操作>

* スーパーコイル状のプラスミド DNA の反応効率を上げるために、シークエンス反応前にプレヒートを行い、「ニック」を入れ、スーパーコイルの状態を緩和する。

- 1) PCR チューブに DNA テンプレートと滅菌水を取り、サーマルサイクラーでプレヒート処理を行う。

Components	Volume (μL)
Tempelate DNA (50 fmol)	X
滅菌水	Up to 5

90 °C、1 min プレヒートさせ、直ちに氷冷する

- 2) プレヒートしたテンプレートにプライマー、マスターミックスを加え、下記反応プログラムでサーマルサイクリングを行う (Tables A-7 and A-8)。

Table A-7 Components of reaction mixture

Components	Volume (μL)
Tempelate Pre-Heated DNA (50 fmol)	5
DTCS マスターミックス	4
Primer (1.6 pmol/mL)	1
Total	10

Table A-8 Thermal cycling condition

	Temperature	Time
Preheat	96 °C	2 min
Denature	96 °C	20 sec
Anneal	50 °C	20 sec
Extend	60 °C	3 min (to step 2 x 30)
Cool	4 °C	∞

3) Stop Solution をサンプル+1 の数量分調製する。

Stop Solution/1sample (要時調製)

Components	Volume (μL)
3 M NaOAc	1
100 mM Na ₂ -EDTA	1
20 mg/mL-Glycogen	0.5
Total	2.5

4) 1.5 mL チューブに Stop Solution を 2.5 μL ずつ分注する。

5) シークエンス反応液を全量、Stop Solution を分注したチューブに移し、軽く混和する。

6) 30 μL の 100%エタノールを加え転倒混和する。

7) ただちに、14,000 rpm、15 min、4 °C で遠心する。

*シーケンスサンプルのエタノールへの暴露は最小限にする。

8) 上清をオートピペッターで取り除き、200 μL の 70%エタノールで、14,000 rpm、2 min、4 °C で遠心し、2 回リンスする。

*沈殿物を吸わないように気をつける。

9) 真空遠心装置を用い、3~5 min ペレットを乾燥させる。乾燥させ過ぎに注意する。

10) サンプルローディングソリューション (SLS) を 30 μL 加え、溶解する。

11) SLS に溶解させたサンプル全量をサンプルプレートに移し、Mineral Oil を各ウェルに 1 滴ずつ滴下する。空気を入れないように注意する。

12) GenomeLab GeXP/CEQ System にて解析を行う。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、丁寧なご指導、ご助言を頂きました、熊本県立大学環境共生学部環境共生学科食健康環境学専攻食品バイオ工学研究室の松崎弘美教授に深く感謝申し上げます。学部生の時から、学会発表など多くの貴重な経験を与えてくださり、博士後期課程への進学および研究全般にわたり多大なご支援を賜り、とても感謝いたしております。また、本研究の遂行にあたり、ご多忙な中、丁寧なご指導やご助言を賜り、アミノ酸配列分析のご協力をいただいた九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門システム生物工学講座微生物工学研究室の善藤威史准教授、多大なご支援、ご助言を頂きました本学環境共生学部環境共生学科食健康環境学専攻食品分析学研究室の白土英樹教授に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くの有益なご意見をいただきました、大学院博士前期課程修了の山下奈菜さん、本学卒業の村上千晶さん、田崎美沙さん、林里帆さん、志賀梨沙さんに感謝申し上げます。そして、同研究室で共に研究に励んだ食品バイオ工学研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。

また、学部生から博士後期課程までお世話になった熊本県立大学の諸先生方、職員の皆様ならびに熊本県立大学大学院の皆様は感謝申し上げます。最後に、陰ながら応援し、温かく見守り続けてくださいました友人および家族に心より感謝いたします。

この研究の一部は、2020年度笹川科学研究助成（研究番号 2020-4070）を受けて実施されました。