

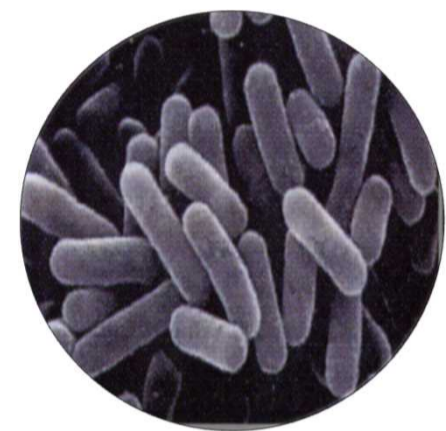
乙黒美彩（山梨大学ワイン科学研究センター）

【今後の展開 商品イメージ応用できる分野】

運動性乳酸菌の新機能に期待！！ プロバイオティクス・ワイン醸造・ワクチン開発

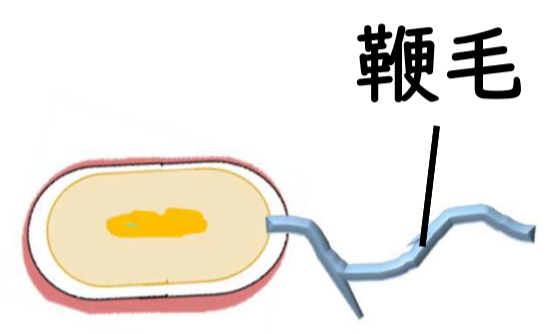
背景

乳酸菌とは



- ◆糖から著量の乳酸を産生する菌の総称
- ◆自然界、発酵食品中に存在する桿菌及び球菌
- ◆一般的にグラム陽性、無芽胞形成、**非運動性**

運動性乳酸菌とは

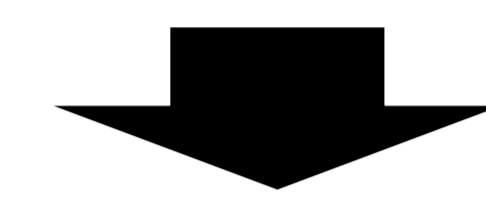


- ◆鞭毛をもち、水中で遊泳する乳酸菌
- ◆栄養素の獲得、有害物質からの回避など
- ◆鞭毛はフラジェリンというタンパク質で構成

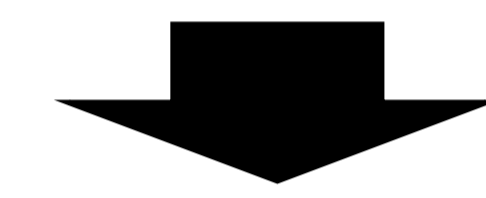
ヒトの自然免疫系活性化の役割を担っている可能性があり、プロバイオティクスやワクチンとしての利用が考えられている¹⁾

目的

乳酸菌の多くは *Lactobacillales* 目 6 科 33 属 300 種以上に分類
しかし、運動性乳酸菌の報告は約 20 種と非常に少なく、
生態や分布などは未解明かつ産業利用は皆無である



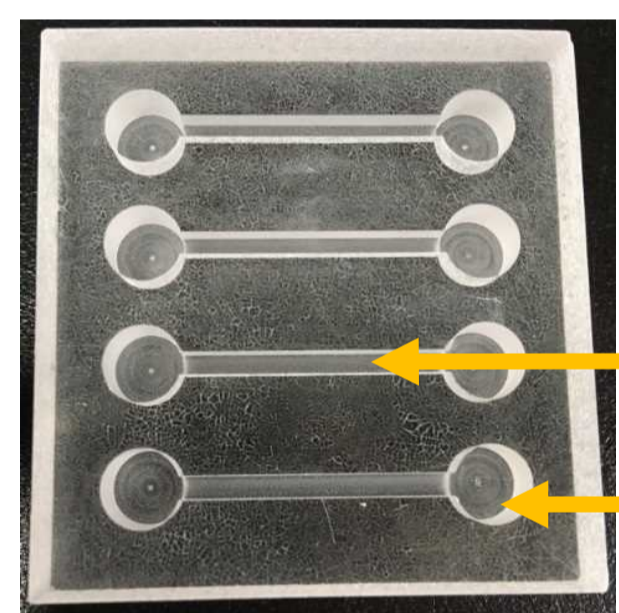
自然界には未だ発見されていない運動性乳酸菌が存在??
運動性乳酸菌を効率的に分離する方法がない??



運動性乳酸菌の選択分離法を構築

① 開発した分離方法

毛細管捕集法



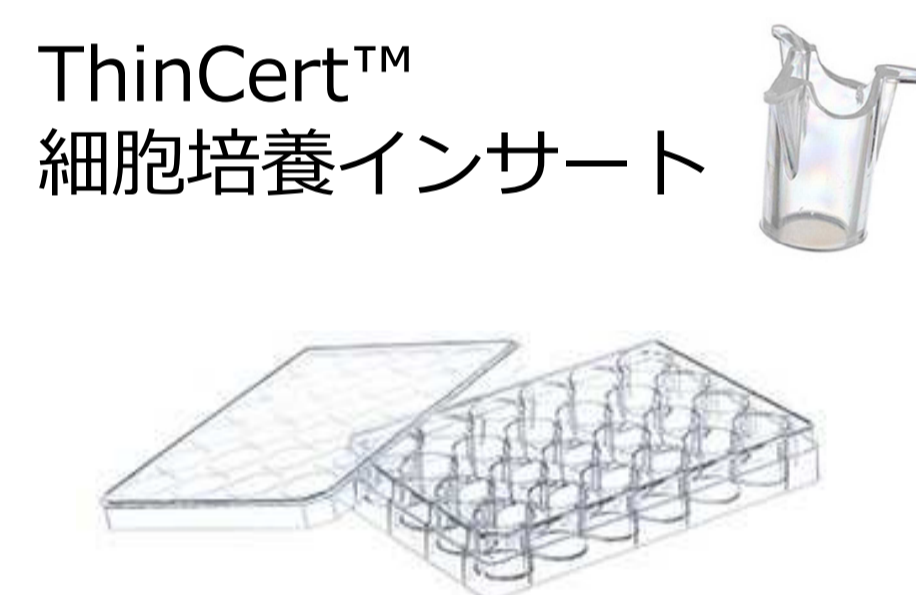
- ◆化学走性を利用した運動性放線菌の選択分離法
 - ◆4 属の運動性放線菌の選択分離を可能とした
 - ◆フェネチルアルコールが乳酸菌に有効
- 毛細管(化学物質充填)
サンプル試料を添加

特殊チェンバー (特注)

問題点

- ・使用できるサンプル量が少ない
- ・特殊な装置を使用するため一般的でない
- ・密度勾配により選択性に難あり?

マルチウェルプレート法



◆化学走性を利用して運動性乳酸菌を上層に釣り上げる

誘引剤

PET メンブレン
ポアサイズ 8.0 μm

サンプル
マルチウェルプレート

改善点

- ・1 well で 3 レーン分のサンプル量
- ・市販されているものを使用
- ・化学走性を示さない株は下部ウェルに

② 誘引剤の運動性への影響

供試菌株	試験化合物	濃度
<i>Liquorilactobacillus ghanensis</i> JCM 15611 ^T	メチオノール	0 mM
<i>Liquorilactobacillus vini</i> JCM 14280 ^T	プロピオン酸エチル	1 mM
	イソブチルアルコール	10 mM
		100 mM

前培養

1/2 MRS 液体培地
30°C 2 日 嫌気

濁度調整

OD_{600 nm} = 0.2

本培養

試験化合物を添加した
1/2 MRS 液体培地

48 h 培養後 RNA 抽出、cDNA 合成を行いリアルタイム PCR で発現解析

リファレンス: 16S rRNA 遺伝子
ターゲット: *fliG* 遺伝子

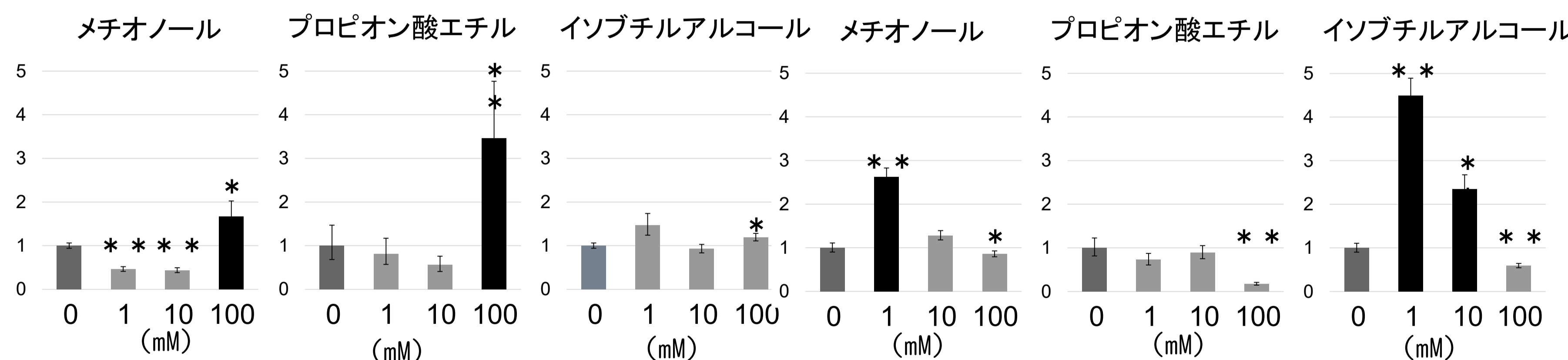
③ 誘引剤の運動性への影響(結果)

L. ghanensis JCM 15611^T

L. vini JCM 12492^T

メチオノールとプロピオン酸エチルの高濃度 発現量増

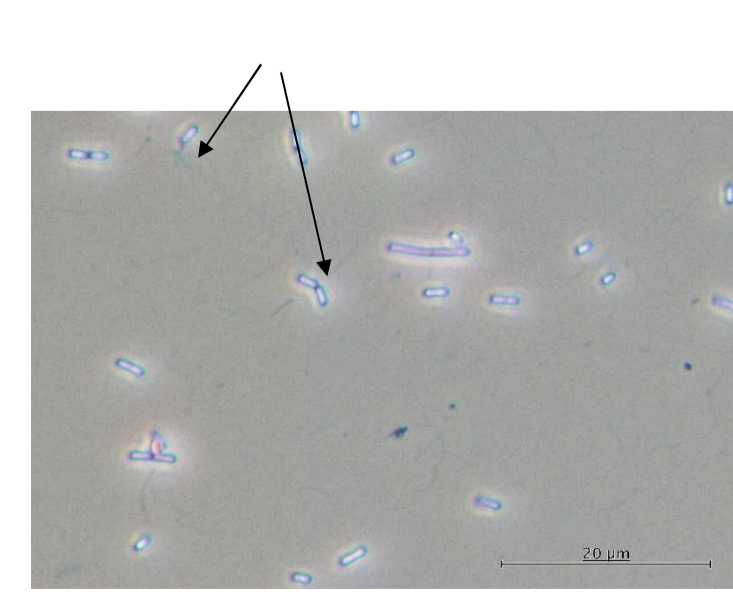
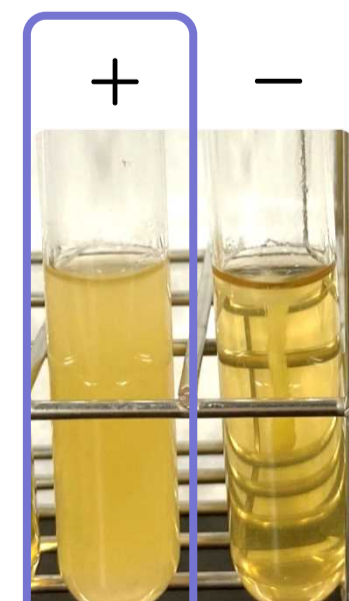
メチオノールとイソブチルアルコールの低濃度



④ ワインからの分離

分離法	誘引剤	濃度	運動性+	<i>L. nagelii</i>
マルチウェルプレート法	フェネチルアルコール	50 mM	0 / 10	0
	プロピオン酸エチル	5 mM	1 / 10	1
	プロピオン酸エチル	50 mM	3 / 10	3
	プロピオン酸エチル	5 mM	2 / 10	2
毛細管捕集法	フェネチルアルコール	50 mM	4 / 10	4
	フェネチルアルコール	5 mM	4 / 10	4
	プロピオン酸エチル	50 mM	4 / 10	4
	プロピオン酸エチル	5 mM	4 / 10	4

ワイン分離株



ワイン中から分離した 80 株中 22 株 (27.5%) が運動性+
22株が *Liquorilactobacillus nagelii*

運動性乳酸菌の分離はサンプル依存的
マルチウェルプレート法でも運動性乳酸菌を分離可能

④ まとめ

■ 土壌からの分離 (データは示していない)
土壌中から弱い運動性を示す乳酸菌 2 種を分離
Enterococcus gallinarum *Enterococcus casseliflavus*

■ 誘引剤の運動性への影響
属種によって運動性に影響のある化合物、濃度が異なる

■ ワインからの分離

分離株 80 株 運動性株 22 株 *L. nagelii* 22 株 27.5%

■ 期待される応用例

マロラクティック発酵スターター

プロバイオティクス

ワクチン開発

参考文献

- Neville BA, Forde BM, Claesson MJ, et al. *PLoS ONE*. 2012;7(7): e40592. doi: 10.1371/journal.pone.0040592.
- Hayakawa M, Ariizumi M, Yamazaki T, Nonomura H. *Actinomycetol.*, 9, 152-163 (1995)

謝辞

本研究は平成26年度発酵研究所一般助成並びにJSPS科研費 JP 18K05923 の支援を受けて実施しました。