

研究ノート

*Lactobacillus brevis* の凝集を引き起こす物質の探索

齋藤 勝一\*, 富田 理, 中村 敏英

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所  
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Screening of materials that cause the aggregation of *Lactobacillus brevis*

Katsuichi Saito\*, Satoru Tomita, and Toshihide Nakamura

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO),  
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

Screening of materials that cause the aggregation of *Lactobacillus brevis* was conducted in order to elucidate the adhesion and the aggregation mechanism of lactic acid bacteria, which involved in such as expression of probiotic effects of the bacteria. In addition to xylan and mucin, it was found that the macromolecules, especially to polysaccharides as dextran, polygalacturonic acid, pectin, and also DNA, could cause the aggregation of the strains. Furthermore, it was revealed that the autoaggregation was occurred by addition of fermentable sugars such as glucose and sucrose.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis*, aggregation, adhesion, polysaccharide

緒言

乳酸菌は、チーズやヨーグルトなどの乳製品から、漬物や味噌、醤油、日本酒といった植物を原料とする様々な発酵食品の製造に関わる主要な発酵微生物である。また、プロバイオティクスとして、乳製品由来の乳酸菌を中心に整腸作用や免疫調整作用、アレルギー抑制作用などの保健機能の解明が進められている<sup>1)</sup>。特に近年では、乳製品由来の乳酸菌とは異

なる特性を有するプロバイオティクスとして植物に由来する乳酸菌が注目され、その食品への積極的利用が進められている<sup>2,3)</sup>。また、ヨーグルトのスターターである *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* の2種の乳酸菌がサンシュユという植物から分離され、乳製品の製造に用いられる乳酸菌も元来植物に由来すると考えられた<sup>4)</sup>。このように乳酸菌は植物との関わりが深い菌種である。しかし、乳酸菌の機能解析は、その保健機能の観点から動物宿主や腸内細菌との相互作用解析に焦点が当てら

\* 連絡先 (Corresponding author), k.saito@affrc.go.jp

れ、植物や植物成分との作用解析は研究が立ち遅れている現状にある。

以上を踏まえ、植物との関わりという観点からの乳酸菌の新機能の解明を目指し著者らが検討を行った結果、*Lactobacillus brevis*がキシランに付着し凝集するという作用を見出した<sup>5)</sup>。この付着機構を解析したところ、菌体表層とキシランの電荷による静電的な作用により付着作用が生じることを明らかにした。また、細胞表面に存在する細胞表層タンパク質 (surface layer protein: SLP)<sup>6)</sup>が電荷の安定性に関与し、SLPの状態や分子種が電荷の強弱や対象基質との親和性などに関与しているものと考えられた。更に胃腸管粘膜成分であるムチンにもキシラン同様に付着・凝集することを確認した<sup>5)</sup>。このことから、*L. brevis*が、植物、動物といった成分・環境を問わず静電的な非特異的な作用により幅広い対象に付着するものと考えられた。乳酸菌の付着作用は、人や動物の腸管への付着といった保健機能発現や、食品における乳酸菌の発生や発酵などに大きく関わっている。しかし、その詳細については未だ不明な部分が多く、乳酸菌がどのような物質に付着可能でどのような基質によって凝集が促進されるのか十分に明らかになっていない。

そこで本研究では、乳酸菌の付着・凝集作用の機構解明に向け、*L. brevis*の凝集を引き起こすキシラン、ムチン以外の物質の探索を行った。

## 実験方法

### 1. 使用菌株及び培養方法

乳酸菌として (独) 製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門 (NBRC) より分譲の *L. brevis* NBRC 3345, 3690, 12005, 12520, 13109, 13110, 107147<sup>T</sup> の 7 株を用いた。各菌株を MRS 培地 (Difco<sup>TM</sup> Lactobacilli MRS Broth (Becton Dickinson and Company)) で 30℃, 24時間静置培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を生理食塩水により洗浄後、菌体量の指標として OD<sub>600</sub> の濁度が約 2.0 となるように生理食塩水 (9.0 g/l NaCl, pH 無調整) に懸濁し以降の実験に供した。

### 2. 凝集作用の判定・評価

探索対象の物質として、表 1 に示す単糖、二糖、多糖などの糖類、DNA などの核酸、アルブミンなどのタンパク質やアミノ酸の合計 79 種を用いた。各物質を生理食塩水 (同上)、リン酸緩衝生理食塩水 (ダ

ルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Sigma-Aldrich), 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.0 g/l NaCl, 1.15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydrous), pH7.4), あるいはリン酸緩衝液 (23.4 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O と 53.7 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O を混合し pH7.2 に調整, pH7.2) に 2% となるように懸濁し、室温で 1 時間振盪後、遠心分離により得られた上清を試料溶液とした。菌体懸濁液と試料溶液を等量混合し、30℃ で 2 時間保温後、菌体の凝集・沈降の発生を目視にて観察した。加えて、一定量の懸濁液を試験管の中間点から抜き取りその OD<sub>600</sub> を測定することにより凝集作用の判定・評価を行った。凝集作用の評価は、(試料未添加 (対照) の OD<sub>600</sub>) - (試料添加の OD<sub>600</sub>) / (試料未添加 (対照) の OD<sub>600</sub>) により定量的な相対凝集度<sup>7)</sup>を算出し、0 (凝集作用なし) ~ 1 (凝集作用大) の値を 0.25 毎に区切り 4 段階で評価を行った。各試料溶液の pH を測定し、pH を中性に調整する際には、緩衝能がリン酸緩衝液に劣るものの塩化ナトリウム濃度が生理食塩水に近いリン酸緩衝生理食塩水を用い検討を行い、リン酸緩衝生理食塩水では十分な緩衝能が得られなかった物質についてリン酸緩衝液を用いた評価を行った。以上の凝集作用の判定・評価方法の概要を図 1 に示した。

## 実験結果及び考察

各物質の添加による *L. brevis* の凝集作用の評価結果を表 1 に示した。また、凝集作用が確認できた物質については、pH 無調整の生理食塩水を用いた場合とリン酸緩衝生理食塩水あるいはリン酸緩衝液を用い pH を中性に調整した場合の作用を比較した。そのパターンにより、(A) 生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水あるいはリン酸緩衝液の両方の場合に凝集が確認できるもの、(B) 生理食塩水の場合にのみ作用が確認でき物質添加時の pH が 4 以上のもの、(C) 生理食塩水の場合にのみ作用が確認でき物質添加時の pH が 4 未満のもの 3 つのタイプに分類した。pH がおよそ 4 を下回る場合には物質を添加しなくとも菌体が自己凝集することを確認しており、このため pH を指標に B と C の区分を行った。

まず、A のタイプでは、pH が中性、酸性を問わず、デキストラン、ポリガラクトロン酸、ペクチン、CMセルロースナトリウム塩、そして DNA など、多糖を中心とする高分子でキシラン、ムチンと同様の凝集作用が見られた。*L. brevis* の菌体は負の電荷を有しており、同じく負の電荷を有するキシランとムチンに溶液

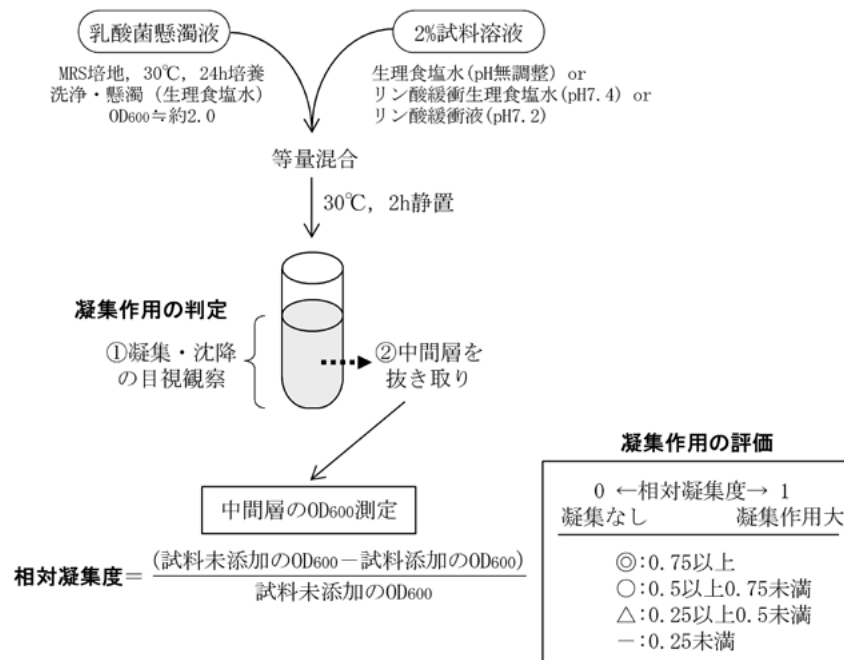


図1. 各種物質の添加による凝集作用の判定・評価方法

中のイオンを介し付着しているものと考えられている<sup>5)</sup>。DNAをはじめ今回凝集が確認できたAタイプの高分子も少なからず負の電荷を有するものと考えられ、キシラン、ムチンと同様に静電的な作用により菌体が付着し凝集するものと考えられた。一方で、同じく電荷を有する牛血清アルブミンやカゼインなどのタンパク質や各種アミノ酸では凝集作用が確認できなかった。デキストリンをはじめ作用が確認できなかった多糖に比べ作用が確認できた多糖は分岐や修飾などの側鎖構造が多い傾向にあり、ムチンやDNAも糖鎖や糖残基を含む。このため、本菌の付着・凝集には静電作用に加え糖の種類や構造も重要な要因であると考えられた。菌株間の比較では、キシラン、ムチンで作用が確認できた6菌株でいずれの高分子でも概ね作用が確認できた。先行研究<sup>5)</sup>においてキシラン、ムチンで作用が確認できなかった*L. brevis* NBRC 107147<sup>T</sup>は今回用いた物質でも作用が見られなかった。*L. brevis* NBRC 107147<sup>T</sup>では、生理食塩水に懸濁してDNAを添加した場合に菌体の凝集が確認できたが、これはpHが2.1と強酸性となったため自己凝集したものと考えられた。一方、低分子であるイノシン、ウリジンでも

一部菌株で凝集が確認できた。しかし、作用が一部菌株に限られpHを中性に調整した場合に若干作用が低下する傾向が見られたことから、これら物質の構成成分であるD-リボースと同様のBのタイプに分類されることが考えられた。

B, Cタイプでは、共に生理食塩水の場合のみ凝集が見られた。Cタイプの場合、pHがおよそ3前後であり物質自体の直接的な作用ではなくpHによる自己凝集であると考えられた。一方、Bタイプでは、自己凝集が生じるほどのpH条件ではなく、低分子物質が中心でありAタイプのような付着による凝集でもないと考えられた。Bタイプの物質は、グルコースをはじめ*L. brevis*が利用可能な発酵性糖質である。このことから、添加した物質が*L. brevis*により発酵され、生成した乳酸等によりpHが低下し自己凝集するものと考えられた。乳酸等が生成しても緩衝液を用いた場合や中性付近で添加した場合には自己凝集が生じるpHには至らないため、凝集が生じないと考えられた。このような発酵に伴うpH低下による凝集作用はこれまでに報告例がなく、現在詳細な検討を行っている。

B, Cタイプでは、Aタイプで凝集作用が見られた

表1. 各種物質の添加による *Lactobacillus brevis* の凝集作用の評価

添加物質	pH	懸濁 溶液*	<i>Lactobacillus brevis</i> NBRC No.						凝集 タイプ***	
			3345	3960	12005	12520	13109	13110		107147 <sup>T</sup>
キシラン (Oat)	6.3	(S)	◎**	◎	◎	◎	◎	◎	-	A
	7.2	(PBS)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	
	7.1	(PB)	◎	◎	○	◎	◎	◎	-	
キシラン (Birch)	6.0	(S)	△	◎	-	-	◎	◎	-	(A)
	4.2	(S)	◎	◎	-	-	◎	◎	-	(A)
ポリガラクトロン酸ナトリウム	4.3	(S)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	A
	7.1	(PBS)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	
ベクチン (シトラス) †	3.2	(S)	◎	◎	○	◎	◎	◎	-	A
	7.0	(PB)	○	○	△	△	△	△	-	
ベクチン (リンゴ) †	2.6	(S)	-	-	○	◎	-	-	-	A
	6.9	(PB)	△	○	△	△	△	△	-	
デキストラン	4.4	(S)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	A
	7.2	(PBS)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	-	
ゲルコマンナン	4.5	(S)	○	◎	○	○	○	○	-	A
	7.2	(PBS)	○	○	○	○	○	○	-	
CMセルロースナトリウム塩	6.0	(S)	○	◎	○	○	◎	◎	-	A
	7.1	(PBS)	○	○	○	○	○	○	-	
	6.2	(S)	-	○	△	△	○	○	-	
ムチン	6.5	(PBS)	○	○	○	○	○	○	-	A
	7.1	(PB)	△	◎	-	△	◎	◎	-	
DNA (サケ精液) †	2.1	(S)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	A
	6.8	(PB)	◎	◎	○	○	◎	◎	-	
イノシン	6.0	(S)	○	-	-	-	◎	○	-	A
	6.8	(PBS)	△	-	-	-	-	△	-	
ウリジン	4.3	(S)	○	-	-	-	◎	△	-	A
	7.1	(PBS)	△	-	-	-	△	△	-	
グルコース	4.8	(S)	△	○	-	-	◎	△	-	B
	7.3	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
	7.0	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
スクロース	4.6	(S)	△	○	-	-	◎	△	-	B
	7.3	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
D-リボース	4.8	(S)	○	-	-	-	◎	○	-	B
	7.0	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
フルクトース	4.0	(S)	△	-	-	-	-	○	-	(B)
イソマルトオリゴ糖	4.1	(S)	△	△	-	-	◎	△	-	(B)
マルトオリゴ糖	4.7	(S)	△	△	-	-	◎	△	-	(B)
フルクトオリゴ糖	4.2	(S)	△	○	-	-	○	△	-	(B)
キシロオリゴ糖	3.1	(S)	◎	△	-	-	◎	◎	-	C
	7.3	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
ガラクトロン酸 †	2.2	(S)	○	◎	○	○	◎	◎	-	C
	6.5	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
デキストリン	3.1	(S)	○	-	-	-	◎	◎	-	C
	7.0	(PBS)	-	-	-	-	-	-	-	
ゲンチオオリゴ糖	3.7	(S)	△	-	-	-	◎	△	-	(C)
L-アスパラギン酸 †	3.0	(S)	△	△	-	-	◎	△	-	C
	6.1	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
L-グルタミン酸 †	3.2	(S)	○	-	-	-	◎	◎	-	C
	6.2	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
L-システイン塩酸塩 †	1.4	(S)	△	◎	-	-	-	-	-	C
	6.3	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	
アデニン †	2.7	(S)	○	△	-	-	◎	○	-	C
	6.4	(PB)	-	-	-	-	-	-	-	

\* (S) 生理食塩水, (PBS) リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4), (PB) リン酸緩衝液 (pH7.2), PBS で十分な緩衝能が得られなかった物質 (†) について PB を実施, \*\* 相対凝集度: (◎) 0.75 以上, (○) 0.5 以上 0.75 未満, (△) 0.25 以上 0.5 未満, (-) 0.25 未満, \*\*\* A: (S) (PBS or PB) で共に凝集, B: (S) のみで凝集 (pH4 以上), C: (S) のみで凝集 (pH4 未満), 括弧書きは PBS, PB 未実施のため推定

以下の物質は (S) において全菌株で凝集なし (-): キシロース, アラビノース, セロビオース, デンプン (米, バレイショ, 可溶性), マンノース, ガラクトース, ラムノース, トレハロース, ラクトース, ラフィノース, N-アセチルグルコサミン, キシリトール, グリセロール, ソルビトール, イヌリン, キチン, 牛血清アルブミン, カゼイン, カゼインナトリウム, スキムミルク, 大豆ペプトン, 大豆ペプチド, L(+)フェニルアラニン, L(+)アルギニン, L(+)イソイソリン, L(+)グルタミン, L-アスパラギン, L-アラニン, L-アルギニン塩酸塩, L-グルタミン酸ナトリウム, L-システイン, L-スレオニン, L-セリン, L-チロシン, L-トリプトファン, L-バリン, L-ヒスチジン, L-プロリン, L-メチオニン, L-リシン, L-リシン塩酸塩, L-ロイシン, グリシン, メタリン酸ナトリウム, ポリリン酸ナトリウム, 乳酸ナトリウム, グアノシン, ウラシル, チミン

*L. brevis* NBRC 12005, 12520株では作用がほとんど見られなかった。*L. brevis*の自己凝集は、SLPが部分的に解離し生じることを確認しており、今回用いた菌株間でSLPの分子種がそれぞれ異なる事も明らかにしている<sup>5)</sup>。このため、これら菌株による作用の差異は、菌株間のSLPの分子種の差異によるものと考えられ、SLPの分子種により自己凝集が生じるpHが異なるものと推察された。また、Aタイプの菌株間の作用の強弱の差異についても、このSLPの分子種の差異が影響しているものと考えられた。乳酸菌の中にはSLPを保持しない菌種も多く、保持する菌種でもSLPの分子種は多様性に富むことが知られている<sup>6)</sup>。このような表面構造の多様性が、電荷の強弱や各種物質との作用などに影響し、ひいては、乳酸菌の各種性質の多様性をもたらす一因となっていると推察される。一方、*Lactobacillus* 属乳酸菌のSLPの等電点 (pI) は、およそ10前後と高いことが知られており<sup>6)</sup>、今回検討を行った酸性、中性のpH条件は*L. brevis*の電荷の正負には影響しないと考えられた。

以上、今回の検討によりキシラン、ムチンに加え多糖を中心とする数種の高分子の存在により*L. brevis*が凝集することが明らかになった。また、発酵性糖質を添加した場合にも、発酵に伴うpH低下に起因すると思われる自己凝集が生じることを確認した。今回見出した糖質を中心とする各種物質への乳酸菌の付着・凝集作用はこれまでに知られていない新知見である。乳酸菌の付着作用は、乳酸菌の保健機能の発現や、食品における乳酸菌の発酵や発酵過程に関わっている。これまでに、乳酸菌の細胞表層に存在するレクチン様のタンパク質や糖鎖が、宿主腸管粘膜のムチンや糖鎖、あるいは、人血液のA型抗原を認識し付着すること<sup>8-12)</sup>、同様の作用により腸内細菌や酵母にも付着すること<sup>13-16)</sup>が確認されている。更に乳酸菌の付着や凝集は、自然環境中や口腔内におけるバイオフィーム形成や歯垢形成などに関与すると考えられている<sup>17,18)</sup>。本研究で得られた知見は、これらの先行研究の発展、進展に有用な新知見であり、乳酸菌の付着・凝集機構の解明、ひいては、乳酸菌の保健機能発現や発酵過程の解明など様々な分野での本知見の活用が期待できる。

## 要 約

植物との関わりの観点からの乳酸菌機能の解明を目指しこれまでに検討した結果、*Lactobacillus brevis*が

キシラン、ムチンに付着・凝集することを見出した。そこで乳酸菌の保健機能発現などに関与する付着・凝集作用の機構解明に向け、*L. brevis*の凝集を引き起こす各種物質の探索を行った。その結果、キシラン、ムチンに加え、デキストラン、ポリガラクトロン酸、ペクチンなどの多糖や、糖鎖や糖質を含むムチン、DNAなどの高分子の添加により*L. brevis*が凝集することを明らかにした。また、菌株によってはグルコースやスクロースなどの発酵性糖質を添加した場合に、発酵に伴うpH低下に起因すると思われる自己凝集が生じることを確認した。

## 文 献

- 1) 日本乳酸菌学会編、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 (2010)。
- 2) 岡田早苗、植物性乳酸菌世界とその秘める可能性、日本乳酸菌学会誌、**13**, 23-36 (2002)。
- 3) 五十嵐俊教、植物性乳酸菌を利用した飲料・食品の開発、*BIO INDUSTRY*, **24**, 32-39 (2007)。
- 4) Michaylova, M., Minkova, S., Kimura, K., Sasaki, T. and Isawa, K., Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **269**, 160-169 (2007)。
- 5) Saito, K., Nakamura, T., Kobayashi, I., Ohnishi-Kameyama, M., Ichinose, H., Kimura, K. and Funane, K., Xylan-mediated aggregation of *Lactobacillus brevis* and its relationship with the surface properties and mucin-mediated aggregation of the bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **78**, 2120-2127 (2014)。
- 6) Hynönen, U. and Palva, A., *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 5225-5243 (2013)。
- 7) Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J. and Matosić, S., Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 981-987 (2003)。
- 8) Vélez, M.P., De Keersmaecker, S.C. and Vanderleyden, J., Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, **276**, 140-148 (2007)。
- 9) Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J. and Roy, N.C., The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe

- interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.*, **2013**, 237921 (2013).
- 10) Uchida, H., Kawai, Y., Kinoshita, H., Kitazawa, H., Miura, K., Shiiba, K., Horii, A., Kimura, K., Taketomo, N., Oda, M., Yajima, T. and Saito, T., Lactic acid bacteria (LAB) bind to human B- or H-antigens expressed on intestinal mucosa. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 3073-3076 (2006).
  - 11) Uchida, H., Kinoshita, H., Kawai, Y., Kitazawa, H., Miura, K., Shiiba, K., Horii, A., Kimura, K., Taketomo, N., Oda, M., Yajima, T. and Saito, T., Lactobacilli binding human A-antigen expressed in intestinal mucosa. *Res. Microbiol.*, **157**, 659-665 (2006).
  - 12) Gross, G., van der Meulen, J., Snel, J., van der Meer, R., Kleerebezem, M., Niewold, T.A., Hulst, M.M. and Smits, M.A., Mannose-specific interaction of *Lactobacillus plantarum* with porcine jejunal epithelium. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **54**, 215-223 (2008).
  - 13) Ledder, R.G., Timperley, A.S., Friswell, M.K., Macfarlane, S. and McBain, A.J., Coaggregation between and among human intestinal and oral bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **66**, 630-666 (2008).
  - 14) Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P.A., Lambert, J., de Vos, W.M., van der Meer, R., Smits, M.A. and Kleerebezem, M., Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, **187**, 6128-6136 (2005).
  - 15) Furukawa, S., Nojima, N., Yoshida, K., Hirayama, S., Ogihara, H. and Morinaga, Y., The importance of inter-species cell-cell co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1430-1434 (2011).
  - 16) Katakura, Y., Sano, R., Hashimoto, T., Ninomiya, K. and Shioya, S., Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 319-326 (2010).
  - 17) 吉田明弘, 口腔細菌のクオラムセンシングとバイオフィーム形成, 環境バイオテクノロジー学会誌, **10**, 9-14 (2010).
  - 18) 花田信弘, 今井奨, 口腔乳酸菌のバイオフィーム形成と様々な生き残り戦略, 日本乳酸菌学会誌, **17**, 47-50 (2006).