

未培養微生物の培養を実現するマメ類・ナッツ類由来 増殖促進物質の解明ならびに 未培養微生物単離培養法の開発

小山工業高等専門学校 物質工学科 准教授

高屋 朋彰

1. はじめに

自然界には数百万種以上の微生物が存在すると推定されているが、その大半（99%以上）は発見・培養できておらず、「微生物ダークマター」と呼ばれている¹⁾⁴⁾。近年では環境 DNA 解析等の発展により、培養を介さずに自然界の微生物菌叢を解明することができるようになってきているが、あくまで分子系統学的な情報が得られるのみであり、未培養微生物の詳細な性質を明らかにして利用することは困難である⁵⁾。申請者は、乳酸菌に用いられる一般的な培養条件（炭素源：グルコース、pH 6.0～7.0）では増殖しない未培養微生物であった新属新種の乳酸菌 WR16-4^T 株（NBRC 115064^T=DSM 112857^T）を発酵野菜エキスから単離することに成功し、*Philodulcिलactobacillus myokonensis* と命名した⁶⁾。さらに、WR16-4^T 株の培養法の確立に取り組んだ結果、①炭素源（スクロース）や pH（4.0～5.0）を工夫することで液体培地を用いた培養に成功し、さらに②ゲランガムを固化剤として用いることで、寒天培地では生育困難な WR16-4^T 株の固体培地における安定的な培養を実現した。

しかし、有用微生物の単離培養や食品工業で日常的に用いられている、微生物を培地に混釈してから固化させて培養・単離する方法（例：ISO/IEC17025 認定試験）では、ゲランガムのゲル化温度（70～80℃）は寒天（35～45℃）より高温であるため、目的の微生物が培地混釈時に殺菌されてしまい単離培養できないという課題がある。そのため、寒天培地を用いた未培養微生物の単離・培養法の確立が切望されている。

申請者は豆乳や大豆タンパク質を寒天培地に添加することによって、新属新種の乳酸菌 *P. myokonensis* WR16-4^T 株の生育が特異的に促進されることを偶然、発見した。さらに、様々なマメ類・ナッツ類を原料とした熱水抽出液を調製して予備検討を行った結果、植物の種類によって増殖促進作用に顕著な差異があることを見出した。そこで本研究では、様々なマメ類・ナッツ類に含まれる増殖促進物質を網羅的に解析し、さらに新奇な未培養微生物（特に乳酸菌）の単離・培養に適した方法を開発することを目的として、以下の調査を行ったので報告する。

2. マメ類・ナッツ類由来の新奇な増殖促進物質の網羅的な解明

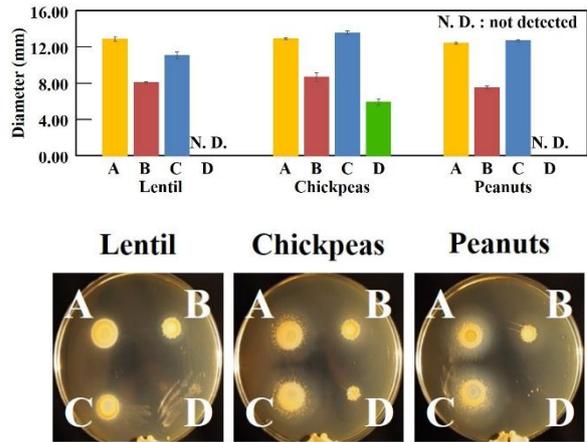
本研究では、予備検討で用いたマメ類・ナッツ類のうち、*P. myokonensis* WR16-4^T 株に対して増殖促進作用が認められたレンズ豆、ヒヨコ豆、ピーナッツに含まれる増殖促進物質の精製を行った。市販の各マメ科植物（レンズ豆、ヒヨコ豆、ピーナッツ）を超純水に浸漬し、植物：超純水=1：1（w/v）となるように混合して均質化、煮沸を行った後、遠心分離によって上澄みを回収した。得られたマメ科植物抽出液に等量の 1-ブタノールを用いて溶媒抽出し、遠心分離を行った。さらに、得られた水相に 80%飽和濃度となるよう硫酸アンモニウムを添加し、静置、遠心分離を行い、上清と沈殿を回収した。各精製段階で得られた 4 つの画

分（画分 A：マメ科植物抽出液、画分 B：硫酸沈殿物、画分 C：水相、画分 D：1-ブタノール相）を凍結乾燥した後に等量の滅菌超純水に再懸濁・溶解し、寒天平板拡散法による増殖促進性の評価を行った。

各マメ科植物抽出液の増殖促進試験の結果を図 1 に示す。いずれのマメ科植物においても、画分 A：マメ科植物抽出液、画分 B：硫酸沈殿物、および画分 C：水相に活性がみられた。また、各マメ科植物の画分 A~画分 C には、タンパク質が数千~数万 $\mu\text{g/mL}$ で含まれており、画分 B：硫酸沈殿物でも増殖促進効果を示したことから、タンパク質が増殖促進物質の 1 つであることが示唆された。また、ヒヨコ豆では画分 D：1-ブタノール相にも増殖促進円が確認された。タンパク質量の結果、タンパク質量は抽出液の 1%未満であったことから、ヒヨコ豆には疎水性成分にも増殖促進物質が含まれていることが示唆された。そこで次に、各マメ科植物抽出液から得られた画分 B：硫酸沈殿物について、逆相クロマトグラフィー（RP-HPLC）による精製および電気泳動（SDS-PAGE）による分子量の評価を行った。

レンズ豆由来硫酸沈殿物の RP-HPLC による精製を行った（図 2a）。その結果、66 個の画分が得られ、そのうち 11 個の画分が増殖促進性を示した（図 2b）。これらの画分には、タンパク質が数百~数千 $\mu\text{g/mL}$ で含まれていた。さらに、これらの画分について SDS-PAGE を行った結果、分子量 6,500~60,000 に複数のバンドが確認された（図 2c）。Shrestha らの報告と比較した結果、これらのタンパク質はレグミンやビシリンなどのグロブリン（貯蔵タンパク質）のサブユニットであることが示唆された⁷⁾。

ヒヨコ豆由来タンパク質の RP-HPLC による精製を行った（図 3a）。その結果、51 個の画分が得られ、そのうち 4 個の画分が増殖促進性を示した（図 3b）。これらの画分



Sample		Protein conc. ($\mu\text{g/mL}$)		
		Lentil	Chickpeas	Peanuts
A	Bean extract	29,462	45,327	31,182
B	Ammonium sulfate precipitate	7,623	3,162	1,373
C	Aqueous phase	32,153	34,365	34,173
D	1-butanol phase	480	376	474

図 1. 各マメ科植物抽出液の増殖促進効果

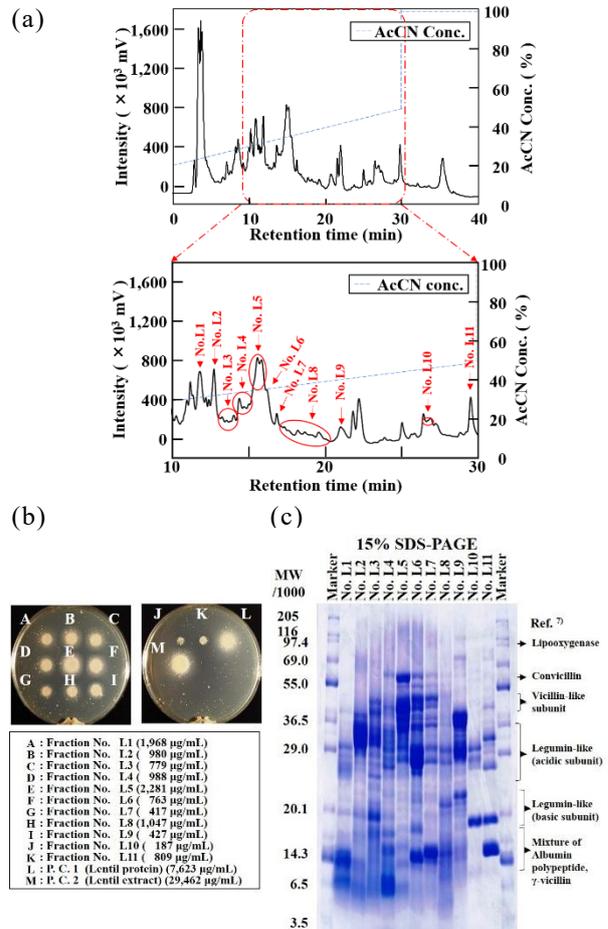


図 2. レンズ豆由来増殖促進物質の精製

には、タンパク質が数百~数千 $\mu\text{g/mL}$ で含まれていた。さらに、これらの画分について SDS-PAGE を行った結果、分子量 5,000~50,000 に複数のバンドが確認された (図 3c)。Francesco らの報告と比較した結果、レンズ豆と同様、これらのタンパク質はレグミンやビシリンなどのグロブリン (貯蔵タンパク質) のサブユニットであることが示唆された⁸⁾。

ピーナッツ由来タンパク質の RP-HPLC による精製を行った (図 4a)。その結果、52 個の画分が得られ、そのうち 4 個の画分が増殖促進性を示した (図 4b)。これらの画分には、タンパク質が数百~数千 $\mu\text{g/mL}$ で含まれていた。さらに、これらの画分について SDS-PAGE を行った結果、分子量 5,000~50,000 に複数のバンドが確認された (図 4c)。Beyer らの報告と比較した結果、これらは Ara h 1、Ara h 3 などのグロブリンや、Ara h 2 などのアルブミン (貯蔵タンパク質) のサブユニットであることが示唆された⁹⁾。

以上の結果から、各マメ科植物 (レンズ豆、ヒヨコ豆、ピーナッツ) に含まれる増殖促進物質はタンパク質であり、少なくとも数百~数千 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で *P. mykonensis* WR16-4^T 株の増殖を促進することが明らかとなった。

3. 未培養微生物の単離培養法の開発

自然界から花、果実、野菜などを採取し、2% (w/v) フルクトースおよび各マメ科植物抽出液を 2.5% (v/v) の割合で添加した MRS 寒天培地 (BD DifcoTM, pH 6.5) を用いて、未培養微生物の単離・同定に取り組んだ。その結果、最も相同性の高かった乳酸菌として、*Levilactobacillus*、*Apilactobacillus*、*Holzapfelia*、および *Lactiplantibacillus* のような乳酸菌を分離、同定することができた (表 1)。

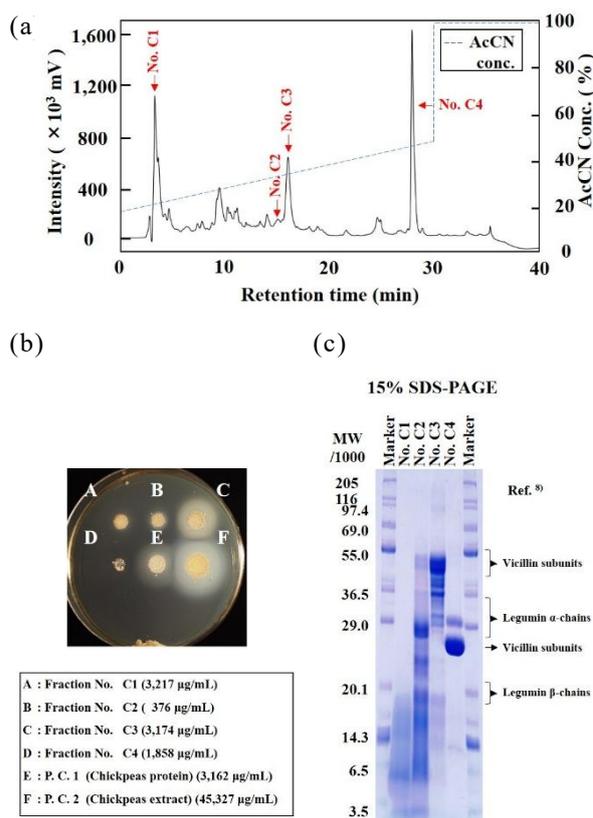


図 3. ヒヨコ豆由来増殖促進物質の精製

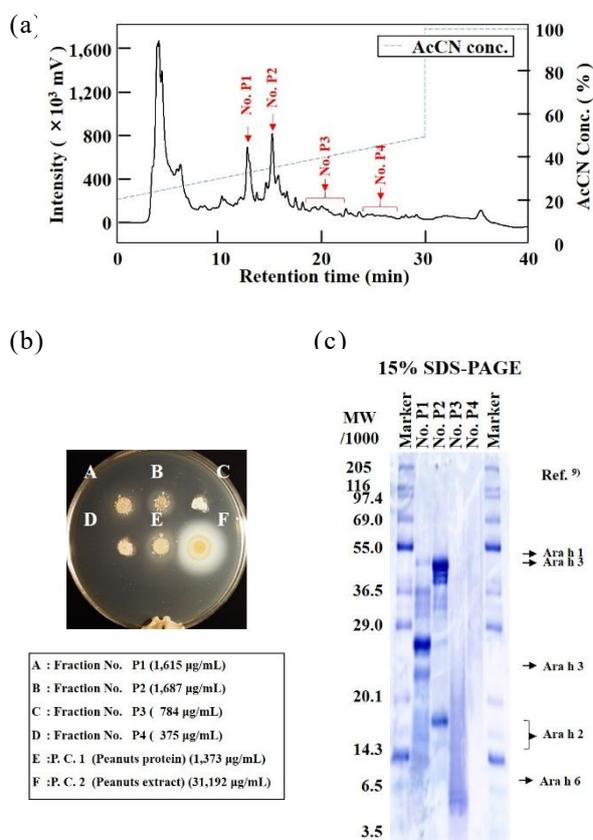


図 4. ピーナッツ由来増殖促進物質の精製

表1. 本研究で単離した乳酸菌の16S rRNA 遺伝子配列による相動性検索

分離源	培地に添加した植物抽出液	最も相同性の高かった候補株
ケイトウ	レンズ豆抽出液	<i>Levilactobacillus brevis</i>
シロツメクサ	レンズ豆抽出液	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>
ムラサキツユクサ	ヒヨコ豆抽出液	<i>Holzappelia floricola</i>
マリーゴールド	ピーナッツ抽出液	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

4. まとめ

本研究では、マメ類・ナッツ類に含まれる増殖促進物質を網羅的に解析し、さらに新奇な未培養微生物（特に乳酸菌）の単離・培養に適した方法の開発を行った。結果として、レンズ豆、ヒヨコ豆、ピーナッツに含まれるタンパク質が指標菌（*Philodulcिलactobacillus myokonensis* WR16-4^T株）の増殖を促進することが示唆された。また、これらのマメ科植物抽出液を添加した MRS 寒天培地を用いることで、様々な属の乳酸菌を単離・同定することができた。これらの乳酸菌が各マメ科植物抽出液の添加によって特異的に増殖が促進されたかについては、今後、マメ科植物抽出液未添加の MRS 寒天培地との比較を行う予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) C. Lok., Mining the microbial dark matter., *Nature*, **522**, 270-273 (2015)
- 2) M. Fakruddin *et al.*, Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective, *ISRN Microbiol.*, 1-6 (2013)
- 3) 青井 議輝, 培養できない微生物とは? どうしたら培養できるのか? —培養手法の革新—, *環境バイオテクノロジー学会誌*, **16(1)**, 59-64 (2016)
- 4) 鎌本洋一, 難培養微生物とは何か, *環境バイオテクノロジー学会誌*, **7(2)**, 69- 73, (2007)
- 5) 奥田 修二郎, メタゲノムデータ解析から見る環境微生物像, *日本食品科学工学会誌*, **2(1)**, 1-6 (2021)
- 6) T. Kouya *et al.*, *Philodulcिलactobacillus myokoensis* gen. nov., sp. nov., a fructophilic, acidophilic, and agar-phobic lactic acid bacterium isolated from fermented vegetable extracts., *PLOS ONE*, **18(6)**, e0286677 (2023)
- 7) S. Shrestha *et al.*, Comparative study on molecular and higher-order structures of legume seed protein isolates: Lentil, mungbean and yellow pea., *Food Chem.*, **411**, 135464 (2023)
- 8) A. Di Francesco *et al.*, Mass Spectrometry Characterization of the SDS-PAGE Protein Profile of Legumins and Vicilins from Chickpea Seed., *Foods*, **13(6)**, 887 (2024)
- 9) K. Beyer *et al.*, Effects of cooking methods on peanut allergenicity., *J. Allergy Clin. Immunol.* **107(6)**, 1077-1081 (2001)