

伊豆赤沢海洋深層水（静岡県）から単離した *Lactiplantibacillus plantarum*の特徴

Characteristics of *Lactiplantibacillus plantarum* collected from deep seawater
at Izu-Akazawa in Shizuoka prefecture

山田勝久¹・山本 樹¹・柴田雄次¹・野村道康¹・今田千秋²

Katsuhisa YAMADA, Tatsuki YAMAMOTO, Yuji SHIBATA, Michiyasu NOMURA and Chiaki IMADA

Abstract

Regarding the characteristics of deep seawater (DSW), one of the resources that matches the concept of sustainable development goals (SDGs), is that it contains various kinds of useful substances for human life unlike solar, wave, wind and geothermal resources. In this study, microorganisms from DSW which have not been fully utilized were the focus. Especially, lactic acid bacteria which have been used in the health care industry were chosen among them. Four isolates were randomly selected from 19 lactic acid bacteria candidates isolated from DSW at Izu-Akazawa and were identified species by 16S rDNA sequence analysis. As a result, all of four isolates were identified as *Lactiplantibacillus plantarum*. There was a slight difference in physiological and biochemical characteristics between the isolates from DSW and the type strain of *L. plantarum*. Furthermore, there was also a little difference in enzyme production between the isolates and the type strain. Then, it was suggested that the culture supernatant of the isolate BF1-13 increased expression of tight junction related proteins (TJs) and aquaporin 3 (AQP3) genes *in vitro* using normal Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. On the other hand, there was no effect in the supernatant of the type strain.

Key Words: aquaporins, physiological and biochemical characteristics, SDGs, sustainable resource, tight junctions

要 旨

Sustainable development goals (SDGs) の概念に合致した持続可能なエネルギー資源の一つである海洋深層水 (DSW) の特徴は、太陽、波、風、地熱等とは異なり、それ自身に人類に役立つ様々な物質を含んでいることである。本研究では、DSW中に存在するが未だ十分に利活用されていない微生物に着目した。その中でも特に健康産業分野に利用されてきた乳酸菌を選択した。これまでに伊豆赤沢海洋深層水から分離されている19株の乳酸菌候補株から無作為に4株を選出して同定した。その結果、4株はいずれも *Lactiplantibacillus plantarum* であり、分離株は基準株との比較において、生理・生化学的諸性状に若干の違いがあることが示唆された。さらに、分離株が生産する酵素にも相違がみられた。DSWからの分離株であるBF1-13株の培養上清が、正常イヌ腎臓尿管上皮由来細胞 (MDCK細胞) を用いた研究でタイト結合関連タンパク質 (TJs) およびアクアポリン3 (AQP3) の遺伝子発現を亢進することを示した。一方、基準株の培養上清には効果はなかった。

キーワード: アクアポリン, SDGs, 持続可能資源, 生理生化学的諸性状, タイト結合

¹ 株式会社 ディーエイチシー (〒108-0023 東京都港区芝浦2-7-1 DHC芝浦2丁目ビル7F)

² 国立大学法人東京海洋大学学術研究院 (〒108-8477 東京都港区港南4-5-7)

1. 緒 言

2015年9月の国連サミットで加盟国の全会一致で採択され、「持続可能な開発のための2030アジェンダ」に記載された、2030年までに持続可能で、よりよい世界を目指す国際目標である17のゴールと169のターゲットから構成されるSustainable Development Goals (以後、SDGs)の達成に対して、DSWには大いに期待が寄せられている。なぜならば、DSWを単純にエネルギー（冷熱）源としてとらえた場合には、既に利用が進んでいる太陽光、風力、地熱、水力などの持続可能な再生資源の中の一つに過ぎないが、DSWはこれらの再生資源とは異なり、エネルギーの利用だけに留まらず、水をはじめ人類が必要とする金属類や肥料などの多種多様な物質資源を含んでいるからである。しかもDSWの量は莫大である（高橋，2000）。このDSW中に存在し、かつ人類の生活を豊かにしてくれる可能性がある有用資源として微生物（有用微生物）も挙げられる。本研究では、DSW中に存在する有用微生物の中でも、人類の生活を豊かにしてきた歴史を持つ乳酸菌に着目した。乳酸菌については、1857年にパスツールが発酵した牛乳中に微生物の存在を報告し、1873年にリスターがその単離に成功して以来、数多くの研究者によって多種の乳酸菌の分離が報告されるようになった（森地，1997）。その分離対象は牛乳や植物、あるいは土壌などの陸上環境に留まらず、海洋環境からも乳酸菌の分離が報告されるようになり、2005年にはIshikawa *et al.*は、海洋環境塩分要求性を有し、アルカリ側の環境下で増殖するという海洋環境に馴化した生理・生化学的特徴を有する乳酸菌を分離し、これを「海洋乳酸菌」として報告しており、その後も海洋乳酸菌の特徴を有する分離株の報告が見られる（鈴木ら，2020）。海洋環境からの乳酸菌の探索研究はさらに進展して、1989年の高知県室戸市を皮切りに、日本各地で取水されるようになった富山湾の海洋深層水（DSW）から、ヒト腸管の正常細菌叢を構成することが知られている *Enterococcus* 属の乳酸菌が分離されている（林ら，2007）。DSWから分離された乳酸菌を的確に利活用するためには、

まずそれらの分離菌が持つ特徴について調査研究することが必要となるが、今日までのところDSW由来の分離株に関するそれらの報告は殆どみられない。

そこで本研究では、あらかじめ伊豆赤沢のDSWから分離された乳酸菌候補株19株から、まず無作為に4株を選出し、分子生物学的手法により種の同定を行った。その結果、選出された4株は、いずれも *Lactiplantibacillus plantarum* であった。そこでこれら4株の生理・生化学的諸性状の特徴および発酵液としての機能性などの特徴について、*L. plantarum* の基準株を比較対照として検討した。その結果、若干の知見が得られたのでここに報告する。

2. 材料と方法

2.1 乳酸菌の分離

DSW（伊豆赤沢，北緯34°50′19″，東経139°08′11″，深度800 m）は取水管から外気に触れることなくインラインで取水施設に送水されるが、この取水施設内に設置されている懸濁物除去装置中のフィルター（バッグフィルター，φ180 mm，長さ800 mm，平均孔径；0.5 μm，2008年11月採取）を分離源とし、その底部を無菌的に約3 cm角に切除した後、滅菌DSW 10 mLを入れた50 mL容遠心チューブに移してボルテックスで攪拌し、懸濁液を調製した。得られた懸濁液0.1 mLを田中（2019）の方法に準じて、0.05%アジ化ナトリウムおよび1%炭酸カルシウムを添加したMRS寒天培地上に塗抹して培養（27°C，暗所，静置，3-14日間）を行った。培養後、目視でコロニーの形状（凸型や色調など）を観察するとともに、コロニー周辺に透明なハローを形成していた株を乳酸菌候補株として釣菌し、上述のMRS寒天培地上に画線して再び培養（3日間）を行った後、画線末尾部の単一コロニーから菌株を単離した。次に単離した菌株のコロニーに3%過酸化水素を滴下し、発泡が確認されなかった株を乳酸菌と判定した。これらの分離株はMRS液体培地を用いて静置培養（27°C，3日）後、10%グリセロールに懸濁してグリセロールストックを調製した後、-80°Cで保存した。なお、本研究での培養は、特に規定するもののほかはすべて

27°C, 暗所, 静置条件で行った。

2.2 乳酸菌の同定

2.1節で分離された乳酸菌候補株の中から無作為に4株を選出してMRS寒天培地で培養(3日, 27°C)後, 寒天培地上に生じたコロニーから常法により市販キット(クリーンカラム; バクテリア用, トーホー)を用いてDNAを抽出・精製し, これを試料として9F, 1492Rのプライマー(Table 1)およびGo Taq Green Master Mix(プロメガ)を用いてPCR(My Cycler™ thermal cycler, BIO-RAD)を行い, PCR産物を調製した。PCRによる増幅は94°Cで2分間初期加熱後, 94°C(1分間), 57°C(1分間), 72°C(1分間)を1サイクルとし, このサイクルを27回繰り返した後, 72°C(10分間)の加熱処理を行った。得られたPCR産物はエタノール沈殿法により精製した。すなわち, PCR産物20 µLに99.5%エタノール50 µLおよび10 M酢酸アンモニウム2 µLを添加して氷上で20分間静置した後, 遠心分離(20,000×g, 10分間, 4°C)を行った。遠心分離後, 沈殿物に70%エタノール250 µLを添加して再度遠心分離(20,000×g, 10分間, 4°C)し, 得られたペレットを風乾した後, 超純水10 µLに溶解して鋳型DNAを調製した。得られた鋳型DNAおよび9F, 907R, 1492R(Table 1)のプライマーを用いてシーケンスを北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。得られた16S rDNAの塩基配列(約1,400 bp)について, BLAST法によりデータベース上の既知の塩基配列との相同性を調べた。

Table 1 Primers used for sequence PCR of lactic acid bacteria isolated from DSW of Izu-Akazawa

Primer name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
9F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
907R	CCGTCAAATTCCTTTGAGTTT
1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT

2.3 供試菌株

2.2節の操作で同定された4株の *L. plantarum* (Strain 1-1, 1-13, 2-1および2-14)をGYP液体培地で培養した。またこれとは別に, *L. plantarum*の基準株(NBRC15891株, 独立行政法人製品評価技術基盤機

構)を入手し, 分離株と同様にGYP液体培地を用いて培養し, 本研究の比較対照菌株とした。

2.4 培地濃度の検討

DSW中から分離した *L. plantarum*の生理・生化学的特徴を検討するにあたり, 服部・服部(1977)の報告を参考に, 分離株が棲息していたと考えられる栄養環境を考慮して, 低栄養条件下での培養を検討することにした。そこで培地組成が単純なGYP液体培地を基本にして, 精製水の代わりにDSWを用いた培地(GYP・DSW培地, Table 2)を調製した。このGYP・DSW培地を基に, DSWを用いてさらに2倍, 4倍, 8倍に希釈した各々の培地10 mLに対して, 供試菌株液(OD₆₆₀値: 0.01/well, 100 µL, 96穴プレート)を20 µL接種後7日間静置培養して, 増殖を経日的に観察した。分離株の増殖は, 別に2.3節の基準株を用いてGYP・DSW培地で培養した培養液の濁度をOD₆₆₀値(100 µL, 96穴プレート)で測定するとともに, 生菌数(cfu法)と濁度(OD₆₆₀値)の相関(Fig. 1)に基づいて生菌数として表した。

Table 2 Composition of GYP・DSW culture medium

Component/Grade, Producer	Concentration (% , w/v)
D (+) glucose/Special grade	1.0
Yeast extract/Bacto yeast extract, BD	1.0
Polypepton/Polypepton N,	0.5
Meet extract/Meet extract from Skipjack	0.2
DSW	100.0 mL

2.5 生理・生化学的諸性状

2.4節の検討で本研究に好適と考えられた希釈倍率のGYP・DSW培地で7日間培養した分離株について, 市販キットを用いて糖の資化性(api 50 CHL, ビオメリュー・ジャパン)および生産酵素(api ZYM, ビオメリュー・ジャパン)の特徴を調べた。なお, 基準株を用いて同様に操作して比較検討を行った。

次に2.4節で検討したGYP・DSW培地を用いて低温(15°C)および高温(30°C)の二温度条件で供試菌株を7日間静置培養後の増殖を観察した。またクエン酸が本研究の供試菌である *L. plantarum*の生育に影響を受けやすいことが知られていることから, 森田・老川(2015)の報告を参考にして, GYP・DSW

培地のグルコースの代わりにガラクトース(特級, 富士フィルム和光純薬)を用いて作製した。この培地を2.4節で検討した希釈率に調製後, 0.1 (w/v, %) のクエン酸アンモニウム(特級, 富士フィルム和光純薬)を添加した後, 初発pHを4.5および6.0の異なるpHに調整した培地で7日間培養して分離株の増殖性を観察した。さらに分離株の棲息環境を考慮して, 一般の微生物では容易には資化されない低う蝕性炭水化物を用いて, 2.3節の検討で好適であった希釈率のGYP・DSWのグルコースに代えた。なお, 低う蝕性炭水化物(飯島・高木, 1998)としては, イソマルトオリゴ糖(生化学用, 富士フィルム和光純薬), ガラクトオリゴ糖(富士フィルム和光純薬), フラクトオリゴ糖(1級, 富士フィルム和光純薬)トレハロース(特級, 富士フィルム和光純薬), パラチノース(生化学用, 富士フィルム和光純薬)およびラクツロース(富士フィルム和光純薬)の計6種類を用い, グルコースを低う蝕性炭水化物に代えて調製したGYP・DSW培地をDSWで4倍希釈した培地に, 2.4節の方法に準じて分離菌を接種し, 7日間静置培養して増殖性を調べた。なお, 上述と同様に操作した基準株を比較対照とした。

2.6 分離株の培養上清の機能性

2.4節の検討で本研究に好適と考えられた希釈倍率のGYP・DSW培地で培養した供試菌株の機能性を検討するために, BF1-13株の培養液を作製し, これを遠心分離(9,840×g, 20°C, 5分間)して得られた上清を除菌ろ過処理した液(孔径0.2 μm, Minisart, ザルトリウス)を評価試料として, MDCK細胞(NBL-2, JCRB9029)を用いてTJsを構成するタンパク質であるクローディン(CLDN)2, CLDN4, オクルディン(OCLN), zonulaオクルディン1(ZO-1)および水チャネルであるAQP3の各遺伝子発現に及ぼす影響を定量PCR法で検討した。MDCK細胞は10% (v/v) ウシ胎児血清(以後, FBS)(MPバイオメディカル)含有イーグルMEM培地(ナカライテスク)で培養後, 常法にて処理して96穴マイクロプレート(細胞培養用, コーニング)に20,000個/穴となるように播種した。播種から1日後に培地を血清不含のイー

グルMEMに置換してさらに1日間培養(37°C, 5% CO₂)することで細胞を血清飢餓状態にして, あらかじめ細胞周期を同調させた(Wilmut *et al.*, 1997)。本評価系では, 1穴に180 μLのイーグルMEM, 10 μLのFBS(終濃度, 5%, v/v)および上述の操作で得られた菌株の培養上清(BF1-13株; 基準株, NBRC15891株)10 μL(終濃度5%, v/v)を混合した評価培地(合計200 μL系)を用いてMDCK細胞を1日間培養(37°C, 5%CO₂)した。培養後, Chomczynski and Sacchi (2006)の方法に従ってRNAを抽出および精製し, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix(東洋紡)を用いてcDNAを合成した。次にTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)を用いてPCR反応液を調製し, リアルタイムPCR装置(StepOnePlus, Applied Biosystems)で定量PCRを行い, GAPDH遺伝子に対する上述の各遺伝子のmRNAの相対発現量を比較C_T法により解析した。定量PCRに用いた各遺伝子のプライマーの塩基配列をTable 3に示す。なお評価試料無添加区(Blank)として, 上述の評価試料に代えて滅菌精製水(細胞培養用, 富士フィルム和光純薬)で調製した培地を用いたほかは, 分離株と同様に操作して試験を行った。

2.7 統計処理

本研究では, 糖の資化性および生産酵素の特徴を除き, すべて $n=3$ で行い, 得られた結果は平均値±標準偏差で表した。統計学的解析にはStudent's *t*-testによる二群間検定により有意差を判定した。

3. 結 果

3.1 供試菌株

2.1節の方法で分離された19株の乳酸菌候補株から無作為に選出した4株について, 16S rDNAの塩基配列を解析した結果, いずれも*Lactiplantibacillus plantarum*と99.9%の相同性を示した。本研究では, これら4株を1-1, 1-13, 2-1および2-14株とそれぞれ命名して以後の研究に供した。

Table 3 Primers used for qPCR of TJs-related protein and AQP₃ genes

Gene name		Oligonucleotide sequence	Reference
OCLN	Forward (5'→3')	TGGCGTACTCTTCCAATGGT	Moinard, A. <i>et al.</i> (2020)
	Reverse (5'→3')	CCGTCGTGTAGTCTGTCTCA	
ZO-1	Forward (5'→3')	CTAAACCTGGGGCTGTCTCA	
	Reverse (5'→3')	AGGTAGGACGCCATCAGATG	
CLDN2	Forward (5'→3')	GGTGGGTGGAGTCTTCTTCA	
	Reverse (5'→3')	CCAGCTACCAGGGAGAACAA	
CLDN4	Forward (5'→3')	TGCACCAACTGCGTGGAGGATGAG	García-Hernández, V. <i>et al.</i> (2015)
	Reverse (5'→3')	ACCACCAGCGGTTGTAGAAGTCC	
AQP ₃	Forward (5'→3')	ACCCTCATCCTCGTGATGTTTG	Self-prepared
	Reverse (5'→3')	GGTCACAGCAGGGTTCAGGT	

3.2 培地濃度の検討

2.4節の方法でGYP・DSW培地のDSWによる各希釈率の培地における分離株の増殖性を調べた。その結果、DSWによる無希釈および2倍希釈のGYP・DSW培地における増殖は、陸上環境由来の基準株(NBRC15891)が優勢であったが、4倍希釈では両者の増殖性に大きな差異がみられなくなった。さらに8倍まで希釈すると、両者共にほとんど増殖しなかった (Fig. 2)。これらの結果から、本研究では以降の実験にはDSWで4倍に希釈したGYP・DSW培地を用いることにした。

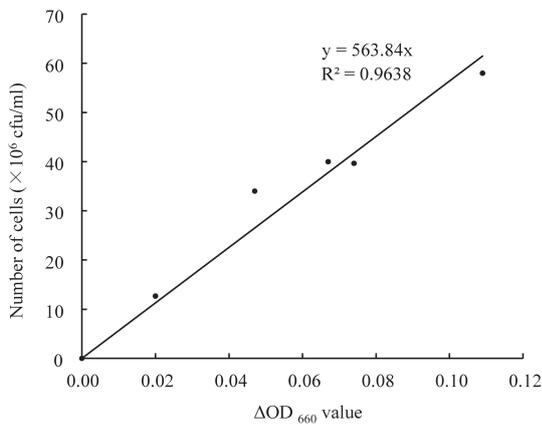


Fig. 1 Calibration curve for the determination of cell growth.

3.3 生理・生化学的諸性状

2.5節の方法で行った分離株の糖の資化性および生産酵素の特徴を基準株のそれらと比較した結果をTable 4および5に示す。これらの表から明らかなように、糖の資化性においては、基準株が資化できなかったリボースとラクトースを4株の分離株はすべて資化したほかは、分離株と基準株の間に大きな差

異はみられなかった。一方、生産酵素の特徴については、Valine-arylformamidaseは分離株BF1-13にだけ明瞭な生産が認められず、Cystein-arylformamidaseは分離株BF1-13と基準株に明瞭な生産が認められなかった。 α -キモトリプシンは、分離株BF2-14にのみ、明瞭な生産がみられた。 β -Galactosidaseは分離株BF1-1と基準株に明瞭な生産が認められなかった。 α -Glucosidaseは分離株BF2-1にのみ明瞭な生産が認められたように、分離株と基準株の間に相違がみられた。

次に、低温 (15℃) および高温 (30℃) の二温度条件での増殖性を調べた結果、低温条件ではいずれの菌株にも増殖がみられなかったが (データ未提示)、高温条件では、分離株は基準株に比べて早期から対数増殖期に入ることが示唆された (Fig. 3)。さらに、2.4節の4倍希釈GYP・DSW培地のグルコースに代えてガラクトースを用い、クエン酸アンモニウム (一級、富士フィルム和光純薬) を加えて初発のpHを4.5およびpH 6.0に調整した4倍希釈GYP・DSW培地 (クエン酸アンモニウムの終濃度、2 mM) に供した培養では、分離株、基準株ともにpH 4.5よりもpH 6.0に調整した評価培地で高い増殖性がみられた。しかし、いずれのpH条件においても、分離株は基準株よりも高い増殖性がみられた (Fig. 4)。

また一般に微生物に利用され難い低う蝕性炭水化物の利用性を検討したところ、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、トレハロース、パラチノースは、分離株、基準株ともにグルコースよりも増殖性が低かった (データ未提示)。しかしラクツロースには特異性がみられ、Fig. 5に

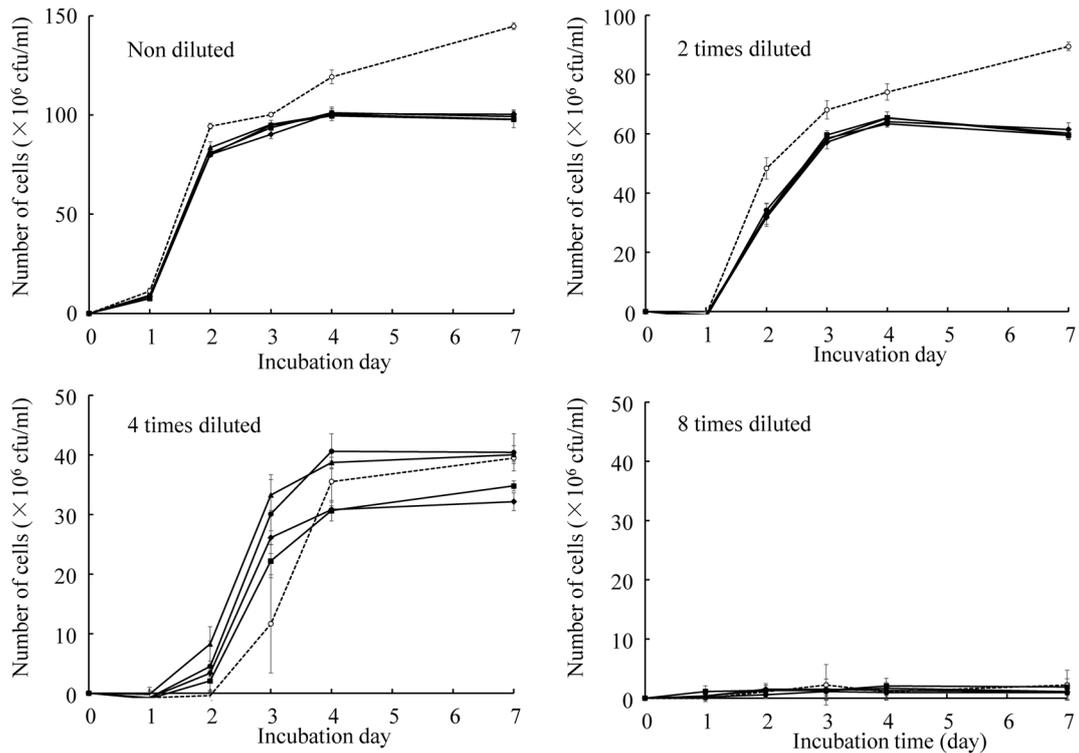


Fig. 2 Cell growth ability in GYP medium diluted by DSW for various dilution rates.
 ---○---, NBRC15891; —■—, BF1-1; —●—, BF1-13; —▲—, BF2-1; —●—, BF2-14
 $n=3$, Bars mean \pm SD

示すように分離株はいずれも基準株に比べて高い増殖性を示したのに対し、基準株の増殖性は有意に低かった ($p < 0.05$).

3.4 分離株の培養上清の機能性

培養細胞を用いて分離株の機能性を探索するにあたり、極性をもつ単層上皮シートを形成する細胞として細胞生物学の分野で最も頻繁に使用されているMDCK細胞(秋山・河府, 2008)を用いることにした。MDCK細胞で構築された上皮様シートには、生体膜としての特徴的な機能に関与するCLDN2, CLDN4, OCLN, ZO-1などのTJs関連タンパク質(Van Itallie *et al.*, 2003)および水の輸送チャネルであるAQP3の発現が知られている(Matsuzaki *et al.*, 2001)。なお本評価にあたり、生理・生化学的諸性状において分離株間に大きな違いがなかったことから、BF1-13株の培養上清を評価試料として、2.6節の操作に従ってMDCK細胞に供し、TJsおよびAQP3遺伝子発現を調査した。その結果評価試料には、本研究で調査対象とした4種のTJs関連タンパク質の遺伝子発

現を亢進する傾向がみられ、特にZO-1遺伝子に対しては有意な ($p < 0.05$) 発現亢進効果がみられた。一方、基準株の培養上清には、TJs関連タンパク質のいずれの遺伝子発現も亢進する傾向はみられなかった(Fig. 6)。また腎臓の機能として重要なAQP3遺伝子の発現を調査したところ、評価試料にはAQP3遺伝子の発現を亢進する傾向がみられた。一方、基準株の培養上清にはその作用はみられなかった(Fig. 7)。

4. 考 察

著者らはこれまでに伊豆赤沢のDSWから30菌株以上の乳酸菌候補株を分離している(データ未開示)。既往研究によると、乳酸菌は約20属、約200種が知られているが(岡田, 2002)、その殆どが陸上環境から分離された株であり、海洋環境、特にDSWからの分離例の報告は数少なく、さらに分離株の特徴に関する報告は殆ど見られない。その理由として、DSWは表層水(以後、SSW)に比べて生菌

Table 4 Characteristics of each strain on assimilation of carbohydrates

Carbohydrate	Strain				
	BF1-1	BF1-13	BF2-1	BF2-14	NBRC15891
Glycerol	-*	-	-	-	-
Elythritol	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+**	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	-
D-Xylose	-	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+
Methyl-αD-Mannopyranoside	+	+	+	+	+
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-	-
N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+
D-Celobiose	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	-
D-Melbiose	+	+	+	+	+
D-Sucrose	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	+	+
D-Rafinose	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+
2-keto-gluconate	-	-	-	-	-
5-keto-gluconate	-	-	-	-	-

* -, negative; ** +, positive

Table 5 Characteristics of each strain on enzyme production

Enzyme	Strain				
	BF1-1	BF1-13	BF2-1	BF2-14	NBRC15891
Alkaline phosphatase	-*	-	-	-	-
Esterase (C4)	±**	±	±	-	±
Esterase lipase (C8)	±	±	±	±	±
Lipase (C14)	-	±	±	±	-
Leucine-arylformamidase	+***	+	+	+	+
Valine-arylformamidase	+	±	+	+	+
Cystein-arylformamidase	+	±	+	+	±
Trypsin	±	±	-	±	-
α-Chymotrypsin	-	±	±	+	-
Acid phosphatase	-	-	-	-	-
Naphtol-AS-BI-phosphohydase	-	-	-	-	-
α-Galactosidase	±	-	-	±	-
β-Galactosidase	±	+	+	+	±
β-Glucuronidase	-	±	-	-	-
α-Glucosidase	±	±	+	±	±
β-Glucosidase	±	+	+	+	+
N-Acetyl-β-glucosamidase	-	-	-	±	-
α-Mannosidase	±	±	-	-	-
α-Fucosidase	-	-	-	-	-

* -, negative; ** ±, doubtful; *** +, positive

数が少ない（清浄性が高い）ので分離が難しいこと（今田ら，2017），これに加えて，分離に成功した乳酸菌を同定しても，多くの場合，陸上環境由来の種に合致することなどから，微生物学的研究の有用性が見出せず，菌株の特徴を検討するまでに至らなかったものと思われる。しかしながら，2015年の国連での採択以後，世界的な目標となっているSDGsの達成にあたり再生可能な地球資源として注目されている太陽光をはじめ，風力や波力，地熱などとは異なり，DSWはその冷熱エネルギー利用だけに留まらず，ミネラルをはじめ，希少金属類，それらを分取した後の水自身の利活用など，人類が必要とするあらゆる資源含んでいることから，これら資源の積極的な利活用研究は急務であると思われる。DSWがSDGsの目標達成に向けて今後利活用が活発化する中で，DSW中に存在する有用資源としての微生物の利活用研究もまた重要となる。DSW中の微生物群集構造については，SSWとDSW間およびその取水地域間の多様性が報告されている（寺原ら，2014）。こうしたDSW中の微生物群集構造の多様性は，DSWに特異的に棲息する微生物，中でも有用物質生産微生物の発見と，それらが生産する有

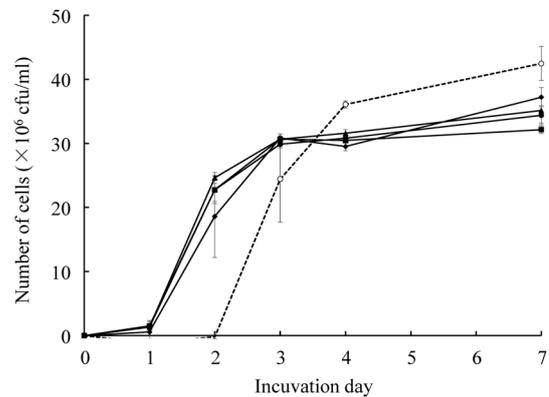


Fig. 3 Cell growth ability of *L. plantarum* at 30°C on cultivation using the GYP medium diluted 4 times by DSW. ---○---, NBRC15891; —■—, BF1-1; —●—, BF1-13; —▲—, BF2-1; —●—, BF2-14
n=3, Bars mean±SD

用物質の分離，同定や機能性など（今田ら，2019），産業利用に向けて意義のある知見が存在する。本研究では特に人類の生活を直接豊かにすることが期待される乳酸菌の利活用研究に向けて，まず既に分離して保存してあった乳酸菌候補株19株から無作為に4株を選出して，種を同定し，その特徴について検討することにした。その結果，4株の乳酸菌分離株は，いずれも *L. plantarum* であった。 *L. plantarum*

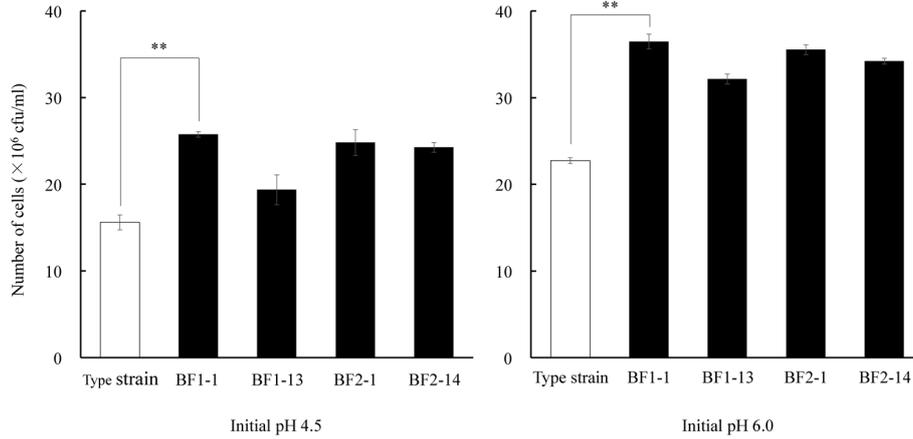


Fig. 4 Effect of two kinds of initial pHs on cell growth of each strain cultured for 7 days using GYP medium of 4 times diluted by DSW.

$n=3$, Bars mean \pm SD, Asterisks indicate a significant difference, $**p<0.01$, Student's t -test

□, Type strain; ■, Isolates

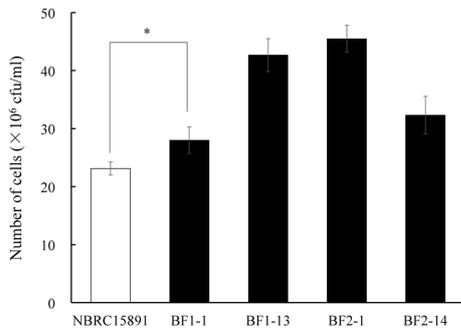


Fig. 5 Alternative effect of lactulose as carbohydrate instead of glucose in the modified GYP medium on cell growth by each strain cultured for 7 days.

□, Type strain; ■, Isolates

$n=3$, Bars mean \pm SD, Asterisk indicates a significant difference, $*p<0.05$, Student's t -test

は、先述の Ishikawa *et al.* (2005) が報告した *Halolactibacillus* 属のように好塩性や好アルカリ性という海洋乳酸菌としての生理・生化学的な特徴は有さず、また林ら (2007) が富山湾のDSWから分離したヒト腸管内に常在する動物由来の乳酸菌ではなく、陸上の植物から普遍的に分離される乳酸菌である。この陸上植物由来の乳酸菌がDSWから分離されたことについては、まず分離操作上で何らかのバイアスが影響した可能性が考えられたが、海洋深層水の取水から分離源であるバッグフィルターまでは外的環境と接触する機会がないシステムになっているので、コンタミネーションは考えにくい。それでは乳酸菌株としての生理・生化学的特徴に起因するのか、あ

るいは、海洋の表層からDSWに到達したと考えられる乳酸菌の移動経路にどのようなメカニズムがあるのかなど、微生物学的には多くの検討すべき課題があると考えられたが、それらについては今後の課題として残し、本研究の目的である分離株の利活用に向けた分離株としての特徴について検討を進めた。DSW中から得られた4株の *L. plantarum* としての分離株の特徴を客観的に検討するために、その基準株と比較した。なおDSWという環境は、資源密度が極めて低いことが既に知られていることから (藤田・高橋, 2006)、微生物にとっての栄養成分濃度も極めて低いことがあらかじめ推察されたので、DSW環境からの分離株の特徴を検討するにあたり、最初に培地の栄養成分濃度についての検討を行うことにした。そこでGYP・DSW培地をさらにDSWで段階的に希釈して、等倍、2倍、4倍および8倍の4段階の希釈濃度に調製した培地を用いて分離株の増殖性を検討したところ、等倍および2倍希釈のGYP・DSW培地では基準株の増殖が旺盛で、分離株の増殖はそれに比べて緩慢であった。このことは基準株では馴化・許容されている2倍希釈までのGYP・DSW培地では、分離株にとっては栄養成分濃度が高すぎることを示唆しているものと推察された。4倍希釈GYP・DSW培地では、両者間に増殖性の差異が殆どみられなかった。しかし、8倍希釈では両者ともに増殖がみられなくなったことから、*L.*

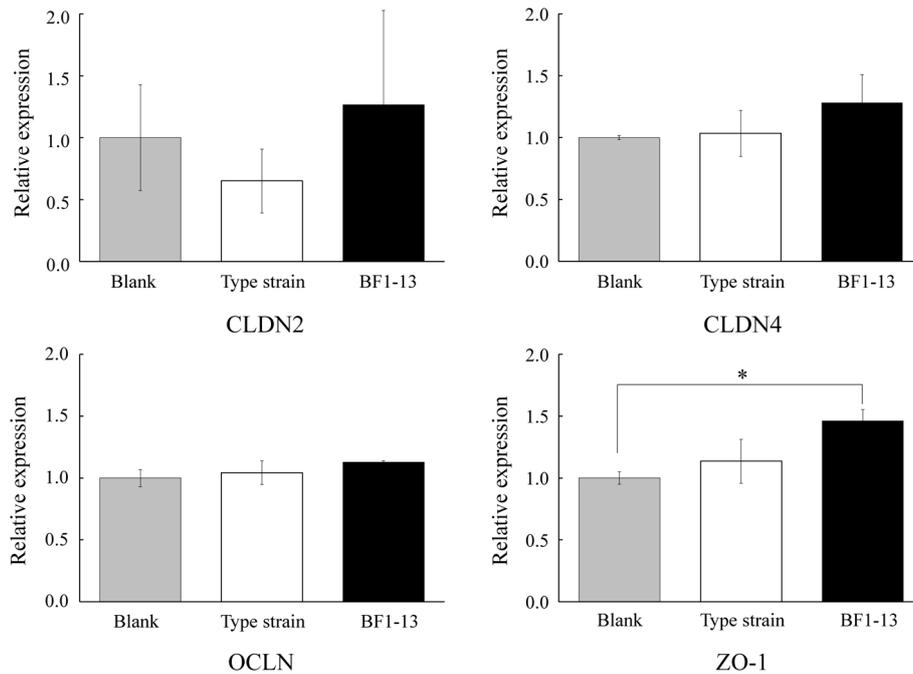


Fig. 6 Supplementation effect of culture supernatants of *L. plantarum* strains on the expression of TJ-related protein genes. $n=3$, Bars mean \pm SD, Asterisk indicates a significant difference, $*p<0.05$, Student's *t*-test

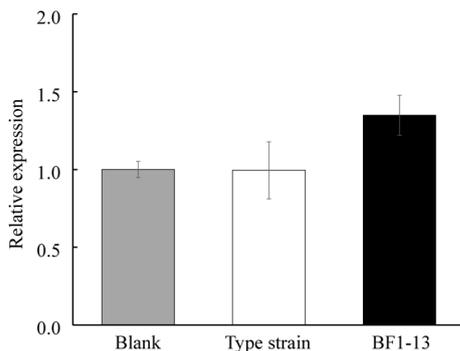


Fig. 7 Supplementation effect of culture supernatants of *L. plantarum* strains on the expression of AQP₃ gene. $n=3$, Bars mean \pm SD

plantarum の増殖には栄養成分濃度が低すぎると考えられたので、本研究では以後、4倍希釈GYP・DSW培地を供することとした (Fig. 2)。この培地を用いて、分離株の生理・生化学的特徴として糖の資化性および生産酵素について検討した。その結果、糖の資化性については分離株と基準株との間に大きな差異はみられなかったが、生産する酵素の特徴には基準株と分離株間および分離株間にも若干の相違がみられた。これはDSW環境からの分離株が、その棲息環境に馴化した結果による表現型の変化と考えられるが、生産酵素の特徴は、DSW環境からの *L. plantarum* を様々な産業分野に利用するにあつ

ての有用な情報の一つであると考えられる。培養温度と増殖性の検討では、15℃という低温での培養では、7日間の観察期間を通して分離株および基準株ともに増殖がみられなかった。近年分子生物学的手法を用いて環境中の微生物の存在や群集構造を知ることが可能となり、実際、乳酸菌をはじめ (今田, 2010)、海洋深層水中に多様な微生物群集組成構造の存在が報告されている (寺原ら, 2014)。しかし、これらの微生物が海洋深層水中で増殖していたか否かを直接確認する方法はない。またこれらの微生物は、実験室での培養が困難な、Viable but non-culturable (以後、VBNC; 保科, 2002) 細菌である場合が多い。上述を考慮すると、DSWの温度環境がおおよそ4℃であることから、本研究で得られた分離株はDSW中では増殖することなく存在していた可能性があり、好適な温度環境 (27℃) が与えられたことで増殖した可能性がある。また30℃の高温で、接種2日後から分離株に増殖がみられ、3日後には定常期に到達した。一方基準株は、分離株に比べて1日遅れた増殖曲線を示したことから (Fig. 3)、分離株は海洋深層水という特殊な環境に適応する中で、増殖温度域に何らかの変化が生じた可能性が考えられる。次に森田・老川 (2015) の報告にみられ

る *L. plantarum* の生育に及ぼすクエン酸の影響に関する知見を参考に、GYP・DSW培地のグルコースをガラクトースに代えて、クエン酸アンモニウムを添加した4倍希釈GYP・DSW培地を用いて、初発pHを4.5および6.0の異なる条件で培養(7日間)した結果、いずれのpHでも、分離株は基準株に比べて高い増殖性を示した(Fig. 4)。これは基準株に比べて分離株は、ガラクトースやクエン酸をエネルギーとして利用できる能力が高いことを示唆しており、低い栄養濃度環境にあるDSW中で棲息している分離株の環境馴化を示唆するものと推察される。さらにグルコースに代えて一般の微生物では容易に利用できない低う蝕性炭水化物用いたGYP・DSW培地をDSWで4倍希釈した培地を用いて分離株の増殖性を検討したところ、分離株はラクツロースの利用性が基準株に比べて優れていることが示唆された(Fig. 5)。なお、乳酸菌の環境馴化における生理・生化学的な特徴の変化については、Suzuki *et al.* (2006) がビールという特殊な環境への馴化に関する報告がある。最後に、4株の *L. plantarum* 中の培養上清が持つ機能性を、BF1-13株を使って腎臓由来のMDCK細胞を用いて評価されることが多い(秋山・河府, 2008) TJs関連タンパク質遺伝子およびAQP3の遺伝子発現について検討した結果、この培養上清にはこれらの遺伝子発現を亢進する傾向がみられた。一方、比較対照の基準株の培養上清にはこれらの遺伝子発現に変動がみられなかったことから、BF1-13株が有する特徴の一つと考えられた。なお本研究で無作為に選出した4株は、いずれも *L. plantarum* と99.9%の相同性を示しながら、基準株との比較において菌株の培養試験および培養上清の機能性には幾つかの相違が見られたことについては、古川(1996)の報告を参照すると、分離株が海洋深層水という環境に存在する多種多様な物質を分解資化する機能を獲得するにあたり、多様な遺伝子の構造変化と移動が起こり、新規な機能が生じた可能性が考えられるが、詳細については今後の検討が必要である。

本研究の結果、DSW環境からの分離株は、基準株に比べて培地の栄養成分やpHおよび培養温度の

変化に対して高い環境馴化能を有し、さらにその培養上清は、上皮組織の形成と機能発現について有用な作用を有する可能性が示唆された。本研究から、DSW環境から分離された *L. plantarum* は陸上由来の基準株と相違する特徴を有していることから、今後その特徴を生かした利活用が期待される。なお、本研究では検討着手できなかった残り15株の分離株についても、今後順次検討を進めて行きたいと考えている。

参考文献

- 秋山 徹・河府和義(2008) 細胞・培地活用ハンドブック. 羊土社, 東京, pp. 45-46.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, 1, 581-585.
- 藤田大介・高橋正征(2006) 海洋深層水利用学—基礎から応用・実践まで—. 成山堂書店, 東京, p. 23.
- 古川謙介(1996) 環境微生物の遺伝子伝播と環境適応・進化. *Microbes Environ.*, 11, 19-24.
- García-Hernández, V., C. Flores-Maldonado, R. Rincon-Heredia, O. Verdejo-Torres, J. Bonilla-Delgado, I. Menezes-Morales, P. Gariglio and R. G. Conteras (2015) EGF regulates claudin-2 and -4 expression through Src and STAT3 in MDCK cells. *Cell. Physiol.*, 230, 105-110.
- 服部 勉・服部黎子(1977) 微生物の生育と栄養条件—低濃度栄養性細菌を中心として. *化学と生物*, 15, 535-541.
- 林 篤志・嶋田貴志・尾仲宏康・古米 保(2007) 富山湾深層水からの *Enterococcus* 属乳酸菌の分離と諸性状の検討. *Jpn. J. Acid Bacteria*, 18, 58-64.
- 保科定頼(2002) Viable but non culturable (VBNC) の微生物学. *耳展*, 45, 139-143.
- 飯島洋一・高木興氏(1998) 砂糖代替甘味料の *in vitro* における再石灰化能. *口腔衛生学会雑誌*, 48, 691-696.
- 今田千秋(2010) 海洋深層水の利用—微生物の宝探し. *日本水産学会誌*, 76, 727.
- 今田千秋・柴田雄次・山田勝久(2017) 深層水由来の海洋微生物の期待. *海洋深層水研究*, 18, 205-207.
- 今田千秋・梁 太熙・山田勝久・周 韜・春成円十朗・五十嵐康弘・池上康之(2019) 海洋深層水

- からの放線菌の分離と抗癌物質の生産. OTEC, 24, 35-40.
- Ishikawa, M., K. Nakajima, Y. Itamiya, S. Frukawa, Y. Yamamoto and K. Yamasato (2005) *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group 1. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55, 2427-2439.
- Matsuzaki, T., T. Suzuki and K. Takata (2001) Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells. Am. J. Physiol., Cell Physiol., 281, 55-63.
- Moinard, A., C. Payen, K. Ouguerram, A. Andre, J. Hernandez, A. Drut, V. C. Biourge, J. S. Suchodolski, J. Flanagan, P. Nguyen and V. Leray (2020) Effects of high-fat diet at two energetic levels on fecal microbiota, colonic barrier, and metabolic parameters in dogs. Vet. Sci., 7, 566282.
- 森地敏樹 (1997) 乳酸菌の特性と利用：最近の研究動向. Milk Sci., 46, 1-20.
- 森田朱香・老川典夫 (2015) ケエン酸が乳酸菌の生育と代謝に及ぼす影響. Trace Nutr. Res., 32, 86-89.
- 岡田早苗 (2002) 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.
- Suzuki K., K. Iijima, S. Asana, H. Kuriyama and Y. Kitagawa (2006) Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic acid bacteria. J. Inst. Brewing, 112, 295-301.
- 鈴木敏弘・海野良輔・山里一英・小泉幸道・石川森夫 (2020) 海水天日塩からの好塩性・好アルカリ性乳酸菌の分離と生理学的性状. 日本乳酸菌学会誌, 31, 129-134.
- 高橋正征 (2000) 海にねむる資源 海洋深層水. あすなろ書房, 東京, pp. 26-31.
- 田中尚人 (2019) 乳酸菌を分離するための基本. 日本乳酸菌学会誌, 30, 3-7.
- 寺原 猛・山口貴大・山田勝久・小林武志・今田千秋 (2014) DGGE法による海洋深層水中の微生物群集組成解析. 海洋深層水研究, 15, 11-17.
- Van Itallie, C. M., A. S. Fanning and J. M. Anderson (2003) Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 285, F1078-F1084.
- Willmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind and K. H. S. Campbell (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385, 810-813.
- (2022年4月5日受付；2022年6月8日受理)