

耐冷性乳酸菌の低温適応機構の解析

後藤 清太郎¹・川本 純²・栗原 達夫²・壺岐 隆¹・渡辺 至¹・江崎 信芳²

¹日本ハム株式会社 商品開発研究所

²京都大学 化学研究所 環境物質化学研究系 分子微生物科学

¹〒308-0042 茨城県筑西市みどり町 2-1-1 電話: 0296-24-1059

²〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄 電話: 0774-38-4710

¹Fax: 0296-24-1074 E-mail: se.goto@nipponham.co.jp

発酵食品に有効利用され健康的なイメージが強い乳酸菌であるが、乳酸菌の中には加熱食肉製品の品質を劣化させるものがある。品質劣化を引き起こす乳酸菌群は製品流通温度である 10°C 以下でも急速に増殖することができる。品質劣化の原因乳酸菌の汚染予防および検出系の開発を目的に、低温耐性乳酸菌の生育速度と、低温での細胞膜の脂肪酸組成や低温誘導的に生産されるタンパク質の解析を試みた。

1. はじめに

乳酸菌は味噌や醤油、ヨーグルトなどの発酵食品に昔から有効に利用されてきた有用微生物である。しかしながら日本酒の火落ち菌やビールの混濁菌など食品に対して悪影響を及ぼすことも知られている。特に我々のような食肉加工品製造会社にとっては、乳酸菌による加熱食肉製品の品質劣化が非常に問題である。加熱殺菌後の製品に乳酸菌が付着し増殖してしまうと、酸味を呈し、製品表面にスライム状の粘性物質が形成され、また菌の産出する炭酸ガスによってパッケージが膨張してしまい、消費者に著しい不快感を与え、結果として製造会社に大きな損失を与える。

食肉加工品の変敗菌検出については、特に変敗を引き起こすことが分かっている菌種に限った検出法の開発が行われているが、検出対象が変敗を引き起こす全ての乳酸菌種を網羅する系となっておらず、検出法として充分とはいえない。食肉加工品の変敗菌を検出・制御する最適な方法が開発されていない原因として、変敗を引き起こす乳酸菌に共通する性質、特に乳酸菌の低温適応メカニズムを把握していないことが原因と考えられる。変敗性乳酸菌は、食肉加工品の流通温度である 10°C 以下においても急速に増殖することができる。そこで、これら低温増殖性の高い変敗性乳酸菌群の低温増殖メカニズムを明らかにするために、低温で培養した変敗性乳酸菌の細胞膜脂質およびタンパク質組成を解析した。

2. 方法

低温増殖性乳酸菌の特徴的な因子の探索

変敗したソーセージから単離された *Leuconostoc mesenteroides* NH04 株を用いた。比較対象株として、16S rRNA の塩基配列が NH04 株と 99% 以上の相同性を示す *L. mesenteroides* NBRC3832 と ATCC8293 を用いた。これらの菌株を 10°C 及び 25°C で培養し、脂肪酸組成の解析、2 次元電気泳動によるプロテオーム解析、低温誘導性遺伝子群のリアルタイム RT-PCR 解析、ジヒドロエチジウムを用いた細胞内活性酸素種の定量を行った。

3. 結果と考察

(1) 細胞膜の脂肪酸組成

標準株 NBRC3832 と変敗製品からの分離株 NH04 をそれぞれ 10°C で培養し (図 1)、細胞膜の脂肪酸組成を解析した。

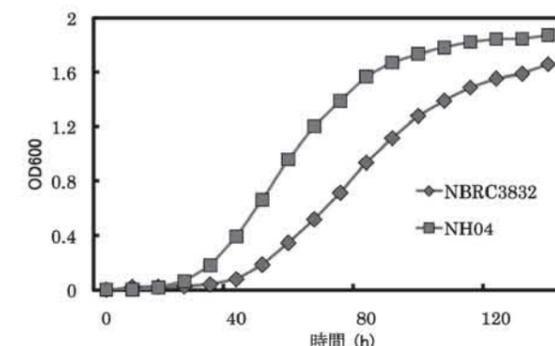


図 1. 10°C における *Leuconostoc mesenteroides* 増殖曲線

その結果、両株とも主要な脂肪酸はシクロプロパン脂肪酸であった。NBRC3832 ではオレイン酸が全脂肪酸の約 25% を占めているのに対し、NH04 ではオレイン酸含量は約 15% であり、シクロプロパン脂肪酸 (約 55%) や分岐脂肪酸 (約 5%) の占める割合が高く、アラキジン酸 (約 2%) の割合が低くなっていることがわかった。細菌の細胞膜は、低温環境で流動性を確保するために融点の低い不飽和脂肪酸の生産を誘導することが知られているが、低温増殖性の高い NH04 株では、不飽和脂肪酸よりもシクロプロパン脂肪酸、分岐脂肪酸を多く含むことが分かった。

(2) 低温誘導性タンパク質の解析

低温で培養した変敗菌が生産するタンパク質を解析するために、分離株 NH04 と標準株 NBRC3832 が生産するタンパク質を 2 次元電気泳動に供した。その結果、抗酸化に働くタンパク質 (AhpC) のホモログが NH04 株で低温誘導的に多く生産されており、NBRC3832 と比較しても約 6 倍多く生産されていた (図 2)。

またより多くの低温誘導的なタンパク質を見出すためにゲノム配列の解明された ATCC8293 株を用いてペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 解析を行った。その結果、AhpC を含む 4 種の抗酸化タンパク質や、その他の機能を有する 7 種のタンパク質を同定することができた。

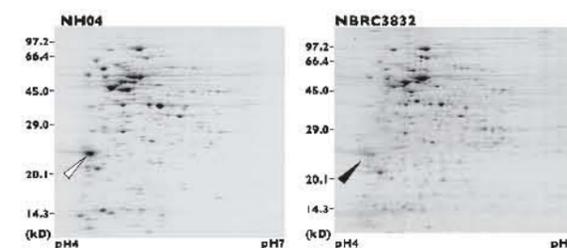


図 2. 10°C で培養した NH04 と NBRC3832 の可溶性タンパク質の 2 次元電気泳動 (矢印は AhpC を示す)

(3) 低温誘導性タンパク質群の発現量の解析

PMF 解析にて同定した 11 種類のタンパク質について、ATCC8293 株の遺伝子配列を元にプライマーを作製し、NH04 株、NBRC3832 株における転写量を解析した。その結果、NH04 株において実施した 11 種類全て低温で転写量が増加していた。また、10°C において、抗酸化機能を有することが予想される 2 種類のタンパク質 (AhpC, UspA) の転写量は、NH04 株が NBRC3832 株の約 3 倍高いことがわかった。

(4) 細胞内活性酸素種の比較

上記実験 1-3 から NH04 が低温で増殖した時、酸化耐性の強い脂肪酸組成となり、また抗酸化タンパク質の生産量が増加していたことから、NH04 は抗酸化機構の優れた株であると予想された。そこで、細胞内活性酸素種 (ROS) の蓄積量を、ジヒドロエチジウムを用いて測定した。その結果、NH04 の細胞内には NBRC3832 に比べて 1.7 倍多く蓄積していることがわかった。以上の結果から、NH04 は、その高い低温増殖性の結果、細胞内に蓄積した ROS に対する防御機構が発達した菌株であることが示唆された。通常、細胞内で生成した ROS は過酸化水素やヒドロキシラジカルへと変換され、細胞膜脂質やタンパク質、核酸の過酸化を生じると考えられるが、NH04 は低温で酸化されないシクロプロパン脂肪酸や分岐脂肪酸を含む細胞膜を形成し、抗酸化タンパク質の生産量を増加させることで、低温での増殖に伴う細胞内の酸化ダメージを軽減させる機構を有していることがわかった (図 3)。

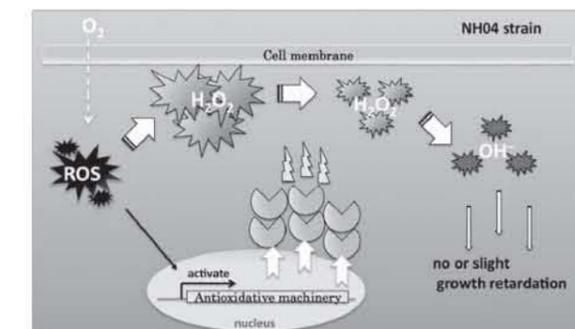


図 3. 10°C における ROS 応答の模式図

4. 今後の展望

我々は食肉加工品を品質劣化させる原因乳酸菌の一群を検出・制御することを目的として、それらの低温増殖のメカニズムの解明に取り組んでいる。今回、実際の変敗製品から単離された株が低温での増殖性に優れ、かつ特徴的に優れた抗酸化機構を有していたことは、食肉変敗菌の生存戦略を知る上で非常に興味深い知見である。抗酸化メカニズムと生育能力の関係を更に詳細に調べる必要はあるが、今回見出した特徴的な因子は、食肉加工品の変敗性乳酸菌を検出・制御することを可能にする重要な因子と考えられ、食肉加工品製造会社として今まで以上に安定した最良な製品を消費者に提供できることに繋がるものと期待している。