乳酸菌菌体外プロテアーゼによる卵白タンパク質の分解と機能性ペプチドの生成について

岡山大学大学院環境生命科学研究科・助教　荒川　健佑

■　緒　言

近年、新たな卵の加工法として、従来とは異なる呈味や機能を付与する目的で、乳酸菌を用いた発酵液卵の開発が試みられている。一般的に、卵白に豊富に存在する抗菌タンパク質(リゾチーム等)とプロテアーゼ阻害タンパク質(オボインヒビター等)が乳酸菌による液卵発酵を困難にしていると考えられているが、乳酸菌の生育を促進するペプチド混合物(酵母エキス等)の添加により、液卵発酵が可能となることが示されている[1)]。しかし、酵母エキス等の利用は、乳酸菌が窒素源としてそれらを優先的に資化することを意味しており、一義的には卵を発酵しているとは言い難い。本来、ペプチドに乏しい乳のような食品素材の発酵では、第一ステップとして乳酸菌の菌体外プロテアーゼによる食品タンパク質の分解・ペプチドの遊離が必須であるが[2)]、外因性のペプチドの富化は、乳酸菌の菌体外プロテアーゼ発現を著しく抑制し、食品タンパク質の分解を大幅に阻害する[3)]。このことは液卵においても同様と考えられ、酵母エキス等を添加した液卵発酵は、やはり、卵タンパク質の分解を伴わない広義的な発酵に過ぎないと見なすのが妥当である。

ところで、発酵に伴う乳酸菌菌体外プロテアーゼによる食品タンパク質の分解は、乳や肉を発酵基材とした場合、機能性ペプチドの遊離に繋がる[4,5)]。卵タンパク質においても、酵素分解によって種々の機能性ペプチド(血圧調節作用、免疫調節作用、抗酸化作用、抗菌作用、ミネラル吸収促進作用、抗肥満作用)を生じることが数多く報告されているが[6)]、発酵によって液卵からそれらが生じた事例はほぼ皆無である。

そのような背景の中で、我々は昨年度、酵母エキス等の添加無しに、加糖のみで、卵白発酵可能な乳酸菌株を選抜した。選抜乳酸菌株はいずれもリゾチーム耐性を有しており、リゾチーム耐性が卵白中での乳酸菌の生育に重要であることを明らかにした。しかし、リゾチーム耐性を持つ乳酸菌株全てが卵白を発酵したわけではなく、リゾチーム耐性があるにも関わらず、卵白発酵しなかった乳酸菌株も存在していた。このことは、リゾチーム耐性以外の卵白発酵要因が選抜乳酸菌株にあることを示唆している。ペプチド添加の無い卵白発酵の場合、前述の通り、菌体外プロテアーゼによる卵白タンパク質の分解・ペプチドの遊離が起こる。すなわち、卵白のプロテアーゼ阻害タンパク質による活性阻害を受けない、もしくは受けづらい菌体外プロテアーゼを有することが、リゾチーム耐性の他に、卵白発酵乳酸菌に必要な能力の1つなのではないだろうか。

そこで本研究では、選抜乳酸菌株による卵白発酵のメカニズムの一端を解明する目的で、まず、選抜乳酸菌株の菌種同定と菌体外プロテアーゼ遺伝子の検出を行った。次いで、発酵による卵白タンパク質の分解およびペプチドの遊離を観察・測定した。さらに、菌体外プロテアーゼの作用により遊離する機能性ペプチドを探索する第一歩として、卵白発酵上清の抗菌活性測定(抗菌ペプチドの探索)を行った。

■材料と方法

1) 卵白発酵乳酸菌株の菌種同定

昨年度に卵白発酵乳酸菌として選抜した7菌株(**表1**)のうち、菌種が不明瞭な5菌株(KCTC 3260株、NIAI L-14株、NIAI L-54株、MAFF 401102株、MAFF 401201株)について、以下の通りに菌種同定を行った。対照には、**表1**の5菌株(基準株)を用いた。

まず、菌種不明瞭な5菌株の16S rRNA遺伝子をPCRにて増幅し、DNAシーケンシングを行った。得られた塩基配列は、NCBIのGenBankデータベースを用いてBLASTによる相同性解析に供した。

次いで、**表1**の11菌株全てを用いて、*dnaK*の部分配列をPCR増幅し、増幅断片に対する制限酵素*ApoI*を用いたPCR-RFLPにより菌種・亜種同定を行った[7)]。

さらに、5菌株に関して、API 50 CHLによる糖資化性パターン分析を行い、菌種・亜種を確定した。

2) 菌体外プロテアーゼ遺伝子の検出

Lactobacillus casei グループ乳酸菌(*Lb. casei*、*Lb. paracasei*、*Lb. rhamnosus*、*Lb. zeae*)のうち、ゲノム公開株から既知の菌体外プロテアーゼ遺伝子(*prtP1*、*prtR*)および推定の菌体外プロテアーゼ遺伝子(*prtQ*；peptidase S8 ファミリー遺伝子)を抽出し、それぞれの配列アライメントから各遺伝子検出用の PCR プライマーを設計・合成した。本プライマーを用いて、表 1 の 11 菌株全てに対して各遺伝子の PCR 検出を行った。

3) 選抜乳酸菌 2 菌株を用いた卵白発酵における生育性試験

殺菌加糖卵白に JCM 11302^{T} 株および NIAI L-14 株を接種し、37℃で 14 日間培養した。培養開始 0、3、7、14 日後の培養液 pH および生菌数を測定することにより、両菌株の卵白発酵中の生育性を評価した。

4) 選抜乳酸菌 2 菌株を用いた卵白発酵におけるペプチドの遊離と卵白タンパク質の分解

殺菌加糖卵白に JCM 11302^{T} 株および NIAI L-14 株を接種し、37℃で 14 日間培養した。培養開始 0、3、7、14 日後の培養液が 4%になるように 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)を添加し、遠心分離後、上清を膜ろ過(孔径 0.45 μm)することで菌体除去した。菌未接種の殺菌加糖卵白を同様に処理して対照に用いた。各無菌上清はトリクロロ酢酸(TCA)によるタンパク質沈殿の後、上清を蛍光比色法によるペプチド定量に供した。

また、発酵卵白から得られた 4%無菌上清を SDS-PAGE に供することで、発酵中の卵白タンパク質の分解を観察した。

5) 卵白発酵上清の抗菌活性測定

殺菌加糖卵白に卵白発酵乳酸菌 7 菌株を接種し、37℃で 7 日間培養した。培養開始 7 日後の培養液を 3-6 N HCl および 3-6 N NaOH にて pH4.0、7.0、10.0 に調整し、遠心分離後、膜ろ過滅菌(孔径 0.45 μm)した。pH 調整した各無菌培養上清は、食中毒細菌・食品汚染細菌 10 菌株(表 2)を被検菌とした抗菌活性測定に供した。抗菌活性測定は寒天平板拡散法により行い、菌未接種の殺菌加糖卵白を同様に処理して対照とした。

■結果および考察

1)卵白発酵乳酸菌株の菌種同定

菌種不明瞭の 5 菌株について、16S rRNA 遺伝子配列の相同性から菌種同定を試みたところ、いずれも *Lb. casei* グループ乳酸菌であったが、菌種・亜種までは同定できなかった。そこで、*Lb. casei* グループ乳酸菌の菌種・亜種判定に用いられる *dnaK* 部分配列の PCR-RFLP を行ったところ、対照株(基準株)との比較により、3 菌株(KCTC 3260、NIAI L-14、NIAI L-54)を *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*、2 菌株(MAFF 401102、MAFF 401201)を *Lb. rhamnosus* と同定した(図 1)。さらに、5 菌株の同定菌種が正しいことを API 50 CHL を用いた糖資化性パターン分析により確認した。

2)菌体外プロテアーゼ遺伝子の検出

表 1 の 11 菌株における菌体外プロテアーゼ遺伝子の保有状況を PCR を用いて精査した。標的とする菌体外プロテアーゼ遺伝子は、*Lb. casei* グループ乳酸菌に特異的な既知の *prtP1* と *prtR*、および推定の *prtQ* とした。その結果、乳や液卵中で生育しない *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* NBRC 15906^{T} を除く全ての菌株で *prtP1* の保有を確認した。また、*prtP1* の他に、*L. zeae* JCM 11302^{T} および *Lb. rhamnosus* の 3 菌株で *prtR* を、*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* の 5 菌株で *prtQ* を検出した。本結果から、*Lb. casei* グループ乳酸菌の菌体外プロテアーゼ遺伝子は菌種ごとに特異性があると推察され、このことは公開されているゲノム情報からも確認された。

3)選抜乳酸菌 2 菌株を用いた卵白発酵における生育性試験

卵白発酵乳酸菌のうち 2 菌株(*prtP1* と *prtR* を有する 3 菌株から *L. zeae* JCM 11302^{T}、*prtP1* と *prtQ* を有する 4 菌株から *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* NIAI L-14)を選抜して、加糖卵白中での長期生育性試験(14 日間)を行った。その結果、両菌株の生菌数は 3 日目で最大になり、それ以降は減少することが分かった(図 2)。一方で、培養液 pH は 3 日目には pH 4 付近まで減少し、それ以降の大幅な変化は見られなかった。

4) 選抜乳酸菌 2 菌株を用いた卵白発酵におけるペプチドの遊離と卵白タンパク質の分解

JCM 11302^{T} 株と NIAI L-14 株を用いた卵白発酵で遊離するペプチド量を測定したところ、両菌株ともに十分な菌数上昇があるにも関わらず、3 日目までほとんどペプチドを遊離していないことが分かった(**図 3**)。一方で、死滅期に当たる培養開始 7 および 14 日目の遊離ペプチド量は、1.4-1.8mg/mL(発酵卵白の 4%希釈上清中)に上昇していた。この値は卵白タンパク質量(卵白の約 10.5%)の 33-43%に相当し、定常期もしくは死滅期に卵白タンパク質の分解が進んだことを表している。また、発酵卵白の 4%希釈上清の SDS-PAGE から、両菌株ともに、培養 3 日間ではほとんど卵白タンパク質を分解しないことが観察された(**図 4**)。一方で、培養開始 7 および 14 日目の泳動結果では、バンドの濃さの低下や消滅が見られたことから、定常期から死滅期において卵白タンパク質の分解が活発化したことが示唆された。これら SDS-PAGE の結果は、遊離ペプチドの定量結果と概ね一致していた。

5) 卵白発酵上清の抗菌活性測定

上記の結果から、1 週間培養した卵白発酵上清にペプチドが豊富に含まれていることが認められたため、次に、発酵卵白における機能性ペプチドの探索を行うこととした。本年度はまず、抗菌ペプチドの探索を行う目的で、発酵卵白上清(pH4.0、7.0、10.0)の抗菌活性測定を行った。被検菌には食中毒細菌・食品汚染細菌 10 菌株(**表 2**)を用いた。その結果、一部の被検菌に対して抗菌活性が検出されたが、そのほとんどは菌未接種の未発酵卵白上清でも抗菌性が認められた。加えて、発酵上清と未発酵上清の抗菌活性に大きな差は見られなかった。以上の結果から、発酵卵白上清に強力な抗菌ペプチドが含まれる可能性は低いと考えられた。

■ 要 約

卵白発酵乳酸菌は、昨年度明らかにしたリゾチーム耐性以外に、卵白のプロテアーゼ阻害タンパク質に大きく影響されない菌体外プロテアーゼを有していることが推察される。そこで本研究では、まず、卵白発酵乳酸菌株の共通性を明らかにするために、菌種同定と菌体外プロテアーゼ遺伝子の保有状況を調べた。その結果、卵白発酵乳酸菌株はいずれも *Lb. casei* グループ乳酸菌であり、そのうち *Lb. zeae* と *Lb. rhamnosus* は *prtP1* と *prtR* を、*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* は *prtP1* と *prtQ* を菌体外プロテアーゼ遺伝子として保有することが示された。そして、卵白発酵乳酸菌株から 2 菌株(*L. zeae* JCM 11302^{T} と *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* NIAI L-14)を選抜し、加糖卵白中での生育性およびタンパク質分解を測定・観察したところ、菌数が最大となった培養 3 日目では卵白タンパク質の分解は限定的で、死滅期の培養 7 および 14 日目で卵白タンパク質の分解(ペプチドの遊離)が活発になることが明らかとなった。最後に、発酵卵白中の機能性ペプチドを探索する第一歩として、培養上清の抗菌活性測定を行ったが、有意な結果は得られなかった。今後は、卵白発酵中のタンパク質分解・資化のメカニズムを明らかにしていくとともに、遊離する機能性ペプチドの探索を継続していく予定である。

■ 文 献

1. 有満和人，兒嶋高志，松岡亮輔，成田琴美，出井明子(2015)卵白を乳酸発酵した新素材「ラクティーエッグ」が拡げる世界．*日本食品工学会誌* 16：79-82.
2. Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P.(2006)Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71：394-406.
3. Griffiths, M. W., Tellez, A. M.(2013)*Lactobacillus helveticus*：the proteolytic system. *Front. Microbiol.* 4：30.
4. Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I.(2014)Dairy protein hydrolysates：Peptides for health benefits. *Int. Dairy J.* 38：82-100.
5. Schmid, A.(2010)Bioactive substances in meat and meat products. *Fleischwirtschaft Int.* 25：127-133.
6. Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Chen, F., Liu, J.(2014)Application and bioactive properties of proteins and peptides derived from hen eggs：opportunities and challenges. *J. Sci. Food Agric.* 94：2839-2845.
7. Huang, C. H., Lee, F. L.(2011)The *dnaK* gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99：319-327.

表 1．本研究で用いた乳酸菌株：同定菌種と菌体外プロテアーゼ (CEP) 遺伝子の保有状況

Strain	Species	Species formerly identified	CEP Gene		
			prtP1	*prtR*	*prtQ*
Selected strain for egg fermentation					
JCM 11302^{T}	*Lactobacillus zeae*		+	+	-
ATCC 25598	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*		+	-	+
KCTC 3260	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	*Lactobacillus casei*	+	-	+
NIAI L-14	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	*Lactobacillus acidophilus*	+	-	+
NIAI L-54	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	*Lactobacillus acidophilus*	+	-	+
MAFF 401102	*Lactobacillus rhamnosus*	*Lactobacillus helveticus*	+	+	-
MAFF 401201	*Lactobacillus rhamnosus*	*Lactobacillus helveticus*	+	+	-
Control strain					
NBRC 15883^{T}	*Lactobacillus casei*		+	-	-
NBRC 15889^{T}	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*		+	-	+
NBRC 15906^{T}	*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*		-	-	-
JCM 1136^{T}	*Lactobacillus rhamnosus*		+	+	-

+, 遺伝子保有有り; -, 遺伝子保有無し

表 2．食中毒細菌・食品汚染細菌に対する卵白発酵上清 (pH4.0，7.0，10.0 に調整) の抗菌活性

Species	Strain	Antibacterial activity of cell-free supernatant											
		Lb. zeae JCM 11302^{T}			*Lb. paracasei* ATCC 25598			*Lb. paracasei* KCTC 3260			*Lb. paracasei* NIAI L-14		
		pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0
Escherichia coli	JCM 1649^{T}	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
Salmonella enterica subsp. *enterica*	JCM 1652	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vibrio vulnificus	JCM 3725^{T}	+++	++	±	+++	++	+	+++	+	±	+++	++	+
Yersinia enterocolitica subsp. *enterocolitica*	JCM 7577^{T}	+	±	±	++	+	±	++	+	±	++	+	±
Bacillus cereus	JCM 2152^{T}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	JCM 7675	++	+	+	++	+	±	++	±	+	++	+	±
Micrococcus luteus	JCM 1464^{T}	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	JCM 20624^{T}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	JCM 5803^{T}	±	-	-	±	-	-	+	±	-	+	±	±
Enterococcus faecium	JCM 5804^{T}	±	-	-	-	-	-	±	±	-	±	±	-

Species	Strain	Antibacterial activity of cell-free supernatant											
		Lb. paracasei NIAI L-54			*Lb. rhamnosus* MAFF 401102			*Lb. rhamnosus* MAFF 401201			Control		
		pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0	pH 4.0	pH 7.0	pH 10.0
Escherichia coli	JCM 1649^{T}	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-
Salmonella enterica subsp. *enterica*	JCM 1652	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-
Vibrio vulnificus	JCM 3725^{T}	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	+	±
Yersinia enterocolitica subsp. *enterocolitica*	JCM 7577^{T}	++	±	±	++	+	±	++	+	±	+	+	±
Bacillus cereus	JCM 2152^{T}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	JCM 7675	++	+	±	++	±	+	++	±	+	++	±	+
Micrococcus luteus	JCM 1464^{T}	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Staphylococcus aureus subsp. *aureus*	JCM 20624^{T}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	JCM 5803^{T}	±	±	±	+	±	-	±	±	-	±	±	±
Enterococcus faecium	JCM 5804^{T}	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	±

Culture solution was adjusted to pH 4.0, 7.0 and 10.0 with 3-6 N HCl and NaOH followed by centrifugation and filtration to prepare sample solution (cell-free supernatant).
Diameter of wells filled with sample solution is 6 mm. No activity is shown as "-". >10, 8-9, 7-8 and 6-7 mm in diameter of inhibitory zone are indicated as "+++", "++", "+" and "±", respectively.

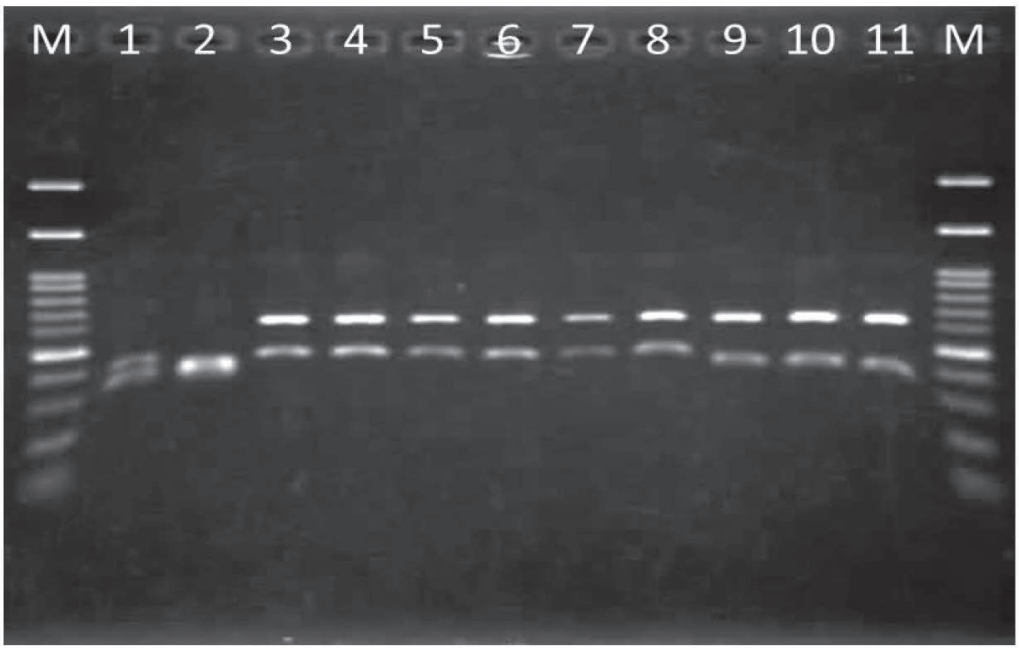

図 1．供試 11 菌株の *dnaK* 部分配列を用いた PCR-RFLP 電気泳動図
M, マーカー; 1, *Lactobacillus zeae* JCM 11302^{T}; 2, *Lactobacillus casei* NBRC 15883^{T}; 3, KCTC 3260; 4, NIAI L-14; 5, NIAI L-54; 6, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NBRC 15889^{T}; *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 25598; *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* NBRC 15906^{T}; 9, *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136^{T}; MAFF 401102; MAFF 401201.

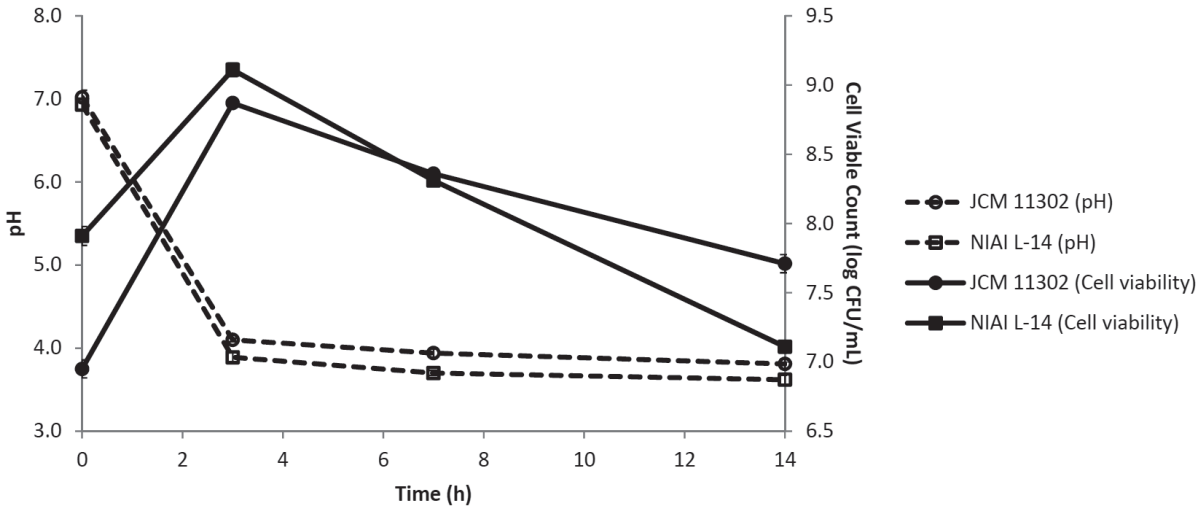

図 2．*Lactobacillus zeae* JCM 11302^{T} と *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NIAI L-14 の加糖卵白中での生育性

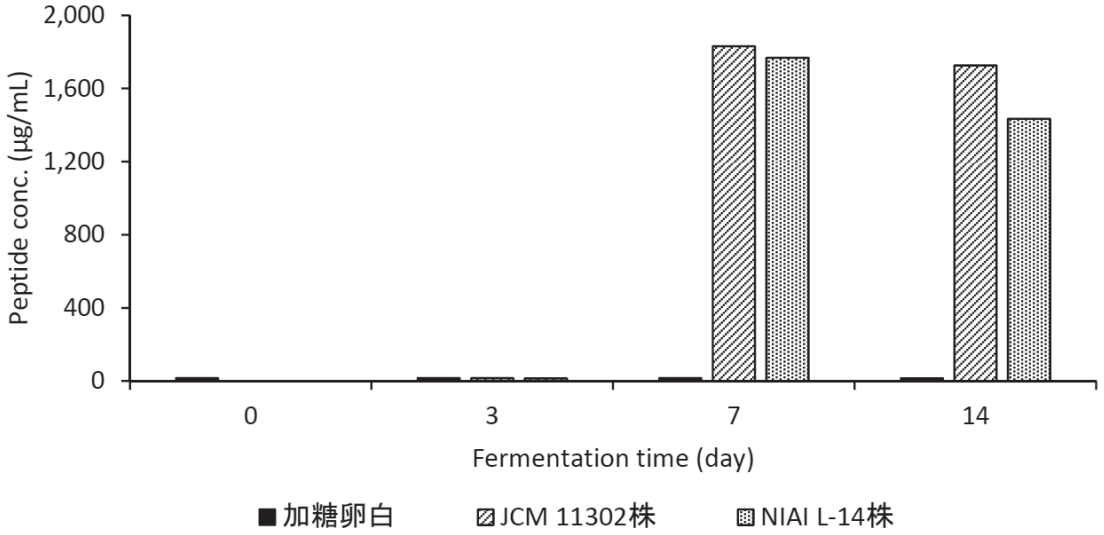

図 3．*Lactobacillus zeae* JCM 11302^{T} と *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NIAI L-14 を用いた発酵卵白（4%）におけるペプチド遊離量

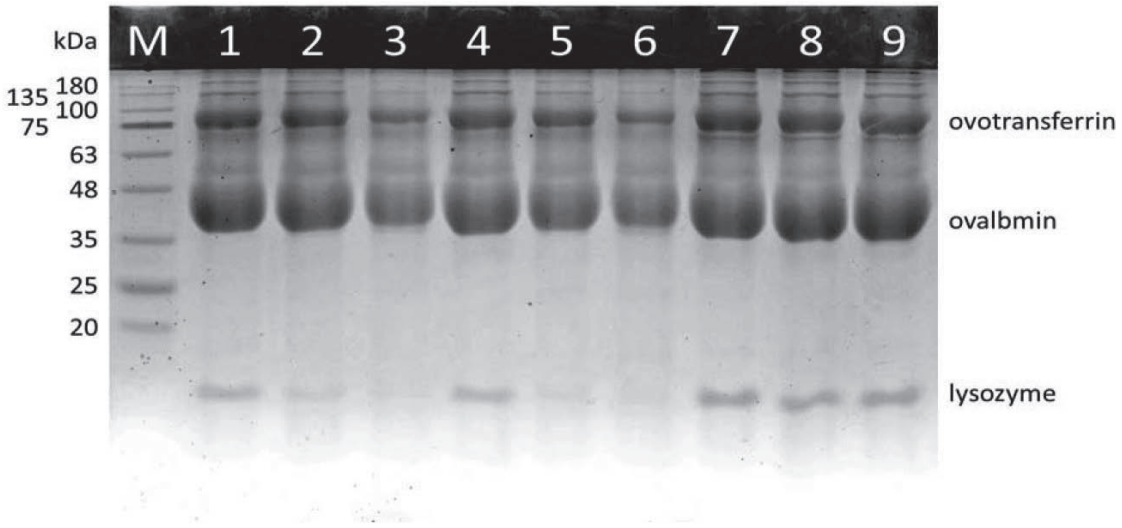

図 4．*Lactobacillus zeae* JCM 11302^{T} と *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NIAI L-14 を用いた発酵卵白（4%）における卵白タンパク質分解

M, マーカー; 1-3, *Lactobacillus zeae* JCM 11302^{T}; 4-6, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NIAI L-14; 7-9, 菌未接種加糖卵白; 1, 4, 7, 培養3日目; 2, 5, 8, 培養7日目; 3, 6, 9, 培養14日目.