

研究報文

プトレシン生産能を有する新規な醤油乳酸菌

真岸 範浩, 坂本 洋子, 松尾 和吉, 須見 洋行*

(ヒガシマル醤油株式会社・研究所, *倉敷芸術科学大学・生命科学部)

(令和元年11月8日受理)

New soy sauce-lactic acid bacterium having putrescine-biosynthetic ability

Norihiro Magishi, Yoko Sakamoto, Kazuyoshi Matsuo, and *Tadayuki Sumi

(Research Laboratory, Higashimaru Shoyu Co., Ltd

*Faculty of Life Science, Kurashiki University of Science and The Arts)

ポリアミンは核酸やたんぱく質合成系の活性化など様々な生理活性をもつことが明らかとなっており, 近年ではアンチエイジングファクターとして働くことも報告されている。我々は醤油諸味中からポリアミン生産能を有する微生物の探索を行い, ポリアミンの1種であるプトレシンを生産する *Tetragenococcus halophilus* PAM26株を分離した。これまで高い耐塩性を有するプトレシン生産菌の報告はなく, PAM26株について微生物学的な諸性質やプトレシン生産能を明らかにした。PAM26株はオルニチン経路でプトレシンを生産し, 20% (w/v) 食塩濃度での高塩条件下においてもプトレシン生産能を有し, オルニチンからの変換効率は約76% (モル比) であった。

諸言

ポリアミンはアミノ基を2つ以上もつ脂肪族アミンで, 細胞増殖・分化に重要な役割を果たす低分子生理活性物質である。代表的なポリアミンであるプトレシン, スペルミジン, スペルミンはRNAと相互作用することで核酸合成系やたんぱく質合成系を促進し, 細胞増殖因子として機能する¹⁻⁵⁾。また最近の研究では, マウスを用いた実験によりポリアミンが心臓機能改善⁶⁾や寿命延長⁷⁾といった生体調節機能以外にもアンチエイジング効果をもつことが報告されている。

これらの3種のポリアミンは細胞増殖因子として類似の機能を有しており, 図1に示すようにアルギニンからオルニチンもしくはアグマチンを経てプトレシンが生成され, プトレシンを前駆体としてスペルミジン, スペルミンが生成されるが, これら3種のポ

リアミンは相互変換することにより生体内におけるポリアミンとしての至適濃度が厳密に保たれている⁸⁾。

井部氏は市販の醤油中に含まれるポリアミンを調査し, プトレシン, スペルミジン, スペルミンは70%を超える多くの市販醤油で検出されたことを報告している⁹⁻¹¹⁾。さらに濃口醤油と淡口醤油ではプトレシン, スペルミジン, スペルミンの検出量や検出率に差がみられず, 原料からも同レベルで検出されていることから, それらのほとんどが原料由来であるとしている⁹⁻¹¹⁾。本研究では, 醤油諸味よりプトレシン生産能を有する醤油乳酸菌PAM26株を分離し, 食塩存在下におけるプトレシン生産能を解析した。これまで耐塩性を有するポリアミン生産菌は報告されておらず, PAM26株はプトレシン生産能を有する新規な醤油乳酸菌と考えられた。

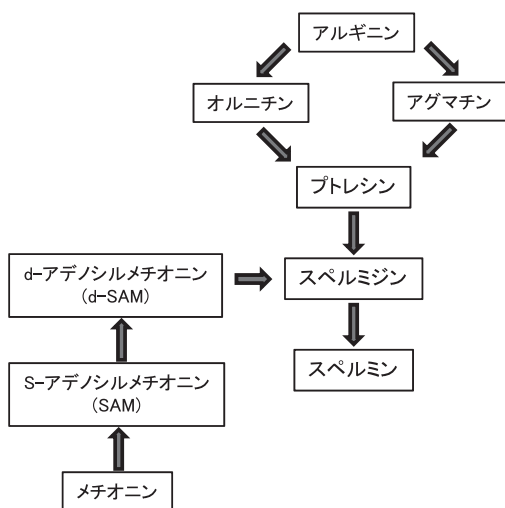


図1 ポリアミン生合成経路

実験方法

1. 生揚培地

酵母添加前の醤油諸味をろ過し、得られた生揚を全窒素0.5% (w/v)、グルコース(和光純薬工業株式会社) 5% (w/v)、各試験条件に合わせ食塩、L(+)-オルニチン一塩酸塩(和光純薬工業株式会社)、L-アルギニン(和光純薬工業株式会社)を添加し、炭酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)で培地pHを6.5に調整した。

2. 薄層クロマトグラフィーによるポリアミンの検出

薄層クロマトグラフィーによるポリアミンの検出は衛生試験法¹²⁾に準じて行った。薄層板はTLC Silica gel 60 F254(メルク社製)を使用し、培養液10 μ Lをアプライした後、展開溶媒(メタノール(和光純薬工業株式会社):28%アンモニア水(ナカライテスク):クロロホルム(和光純薬工業株式会社)=50:40:25)にて展開した。ポリアミンは呈色指示薬として0.1% (w/v) ニンヒドリン(和光純薬工業株式会社)を用いて検出した。

3. 糖の資化性

PAM26株の糖資化能はシスメックス・ビオメリュー社製 API50CHLを用いて検査した。

4. 高速液体クロマトグラフィーによるプトレシン測定¹³⁾

試料は培養液を0.1N塩酸で100倍希釈し、0.45 μ m フィルター(ADVANTEC)でろ過を行ない調製した。高速液体クロマトグラフィーのカラムにはShodex Asahipak ODP-50 4 D (4.6mm \times 150mm)を用い、移動相は50mM ホウ酸塩緩衝液(pH9.9)と、2mM オルトフタルアルデヒド(和光純薬工業株式会社)および2mM NaCl(和光純薬工業株式会社)を含むアセトニトリル(和光純薬工業株式会社)を77:23に混合した溶媒を使用し、カラム温度40 $^{\circ}$ C、流速0.5ml/分で送液した。検出器にはSHIMADZU 蛍光検出器 RF-20A(励起330nm、蛍光430nm)を用いた。

結果および考察

(i) プトレシン生産菌「PAM26株」の単離

酵母発酵前の醤油諸味より10% (w/v) 食塩濃度の生揚培地で生育する菌を分離し、0.2% (w/v) オルニチン塩酸塩または0.2% (w/v) アルギニンを含む10% (w/v) 食塩濃度の生揚培地で培養した。その培養液のポリアミンを薄層クロマトグラフィーで確認し、プトレシン生産能を有する1株(PAM26株)を単離した(図2)。

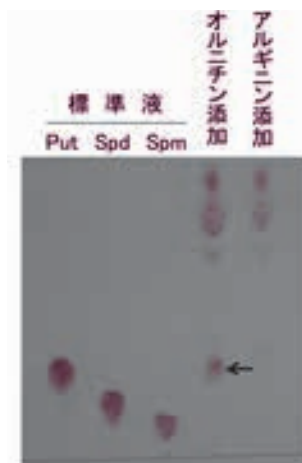


図2 PAM26株のポリアミン生産能(薄層クロマトグラフィー)

オルニチン添加: 生揚培地にオルニチン塩酸塩0.2% (w/v) 添加, アルギニン添加: 生揚培地にアルギニン0.2% (w/v) 添加, Put: プトレシン, Spd: スペルミジン, Spm: スペルミン

PAM26株はオルニチン添加培地からプトレシンを生産し、アルギニン添加培地からはプトレシンを生産しなかった。また、スペルミジン、スペルミンの生産能は有していなかった。

(ii) PAM26株の同定

PAM26株の菌学的、生理学的性質を示す。PAM26は直径0.8 μ mの四連球菌でグラム染色性が陽性、カタラーゼ反応が陰性、乳酸を産生することから *Tetragenococcus halophilus* であることが推測された。次に糖の資化性をAPI50CHL (シスメックス・バイオメリュー社製)で確認したところ、ガラクトース、グルコース、フルクトースを資化し、D-アラビノース、D-キシロースは資化しなかった(表1)。糖の資化性よりID99.9%で *Tetragenococcus halophilus* と判定された。さらに、16S rRNAの塩基配列による微生物同定をタカラバイオ株式会社に委託し、GeneBank Non-redundantデータベースに対してBlastn検索した結果、*Tetragenococcus halophilus* と98.5%以上の相同性を示した。これらの結果より、プトレシン生産菌として単離した「PAM26株」は *Tetragenococcus halophilus* であると同定した。

(iii) PAM26株のプトレシン生産能

食塩濃度を6%, 10%, 15%, 20% (w/v) に調整したオルニチン塩酸塩0.5% (w/v) を含む生揚培地でPAM26株を30°Cで静置培養し、各食塩濃度でのプトレシン生産量を経時的に解析した。PAM26株は食塩濃度6%, 10%では培養3日目に定常期に達し、食塩濃度15%では4日目で定常期に達した。食塩濃度20%においてもゆるやかに増殖し、9日目で定常期に達した(図3A)。培地pHはPAM26株の増殖に合わせ、低下した(図3B)。プトレシン生産能では菌数の推移と同様に食塩濃度6%, 10%では3日目に、食塩濃度15%では4日目に、食塩濃度20%では9日目に最終生成濃度の約2000ppmに達した(図3C)。PAM26株は高食塩濃度下でもプトレシンを生産し、今回培地に添加したオルニチン塩酸塩量からプトレシンへの変換率はモル比で約77%であり、食塩濃度6%から20%では差はみられなかった。

次にオルニチン塩酸塩の添加濃度を0.5%, 1.0%, 2.0% (w/v) に調整した生揚培地(食塩濃度15% (w/v))で30°C, 15日間静置培養し、プトレシン生産量を測定した。プトレシン生産量はオルニチン塩酸塩添加量に

表1 PAM26株の糖資化性

糖	資化性	糖	資化性	糖	資化性	糖	資化性	糖	資化性
コントロール	-	D-ガラクトース	+	メチル- α -D-マンノピラノシド	-	D-メリビオース	-	D-ツラノース	+
グリセロール	-	D-グルコース	+	メチル- α -D-グルコピラノシド	-	D-スクロース	-	D-リキソース	-
エリスリトール	-	D-フルクトース	+	N-アセチルグルコサミン	+	D-トレハロース	-	D-タガトース	+
D-アラビノース	-	D-マンノース	+	アミグダリン	+	イヌリン	-	D-フコース	-
L-アラビノース	+	L-ソルボース	-	アルブチン	+	D-メレジトース	-	L-フコース	-
D-リボース	-	L-ラムノース	-	エスクリン	+	D-ラフィノース	-	D-アラビトール	-
D-キシロース	-	ズルシトール	-	サリシン	+	デンプン	-	L-アラビトール	-
L-キシロース	-	イノシトール	-	D-セロビオース	+	グリコーゲン	-	グルコン酸	-
D-アドニトール	-	D-マンニトール	-	D-マルトース	+	キシリトール	-	2-ケトグルコン酸	-
メチル-D-キシロピラノシド	-	D-ソルビトール	-	D-ラクトース	-	ゲンチオビオース	+	5-ケトグルコン酸	-

PAM26株の糖資化性をAPI50CHLにより調べた。+: 資化性あり, -: 資化性なし

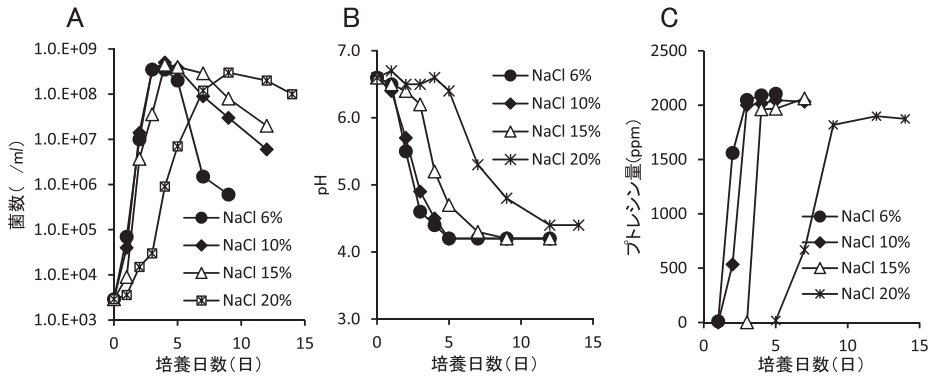


図3 PAM26株の食塩存在下におけるプトレシン生産能

オルニチン塩酸塩0.5% (w/v) を含み、食塩濃度を6%, 10%, 15%, 20% (w/v) に調整した生揚培地でPAM26株を静置培養(30℃)した。A: 菌数の経時変化, B: 培地pHの経時変化, C: 培地プトレシン量の経時変化

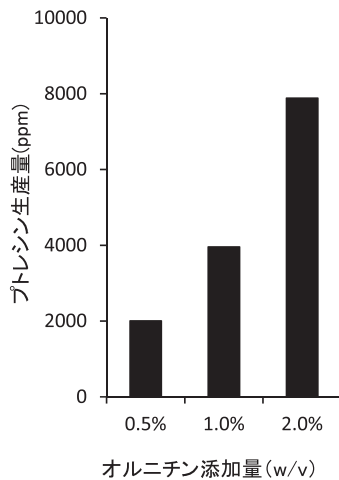


図4 PAM26株のオルニチン添加によるプトレシン生産量の変化

オルニチン塩酸塩の添加濃度を0.5%, 1.0%, 2.0% (w/v) に調整した生揚培地(食塩濃度15% (w/v)) でPAM26株を静置培養(30℃, 15日間)し、プトレシン生産量を比較した。

比例して高くなり、0.5%添加では約2,000ppm、1.0%添加では約4,000ppm、2.0%添加では約8,000ppmであった(図4)。オルニチン塩酸塩からプトレシンへの変換率はいずれもモル比で約76%であった。

(iv) プトレシン生産時のPAM26株の増殖能

アスパラギン酸を脱炭酸しアラニンを生産する *Lactobacillus* 属は、アスパラギン酸添加により増殖が促進されることが報告されている¹⁴⁾。そこで、

PAM26株も同様にオルニチン添加による増殖促進について検討した。オルニチン塩酸塩0.5% (w/v) またはプトレシン二塩酸塩0.37% (w/v) を添加した食塩濃度15% (w/v) の生揚培地で静置培養した際のPAM26株の増殖と培地のpH推移を調べた。OD660nmにより菌体量の推移を測定したところ、オルニチンを添加した培地では無添加の培地と比べ、増殖速度が速く、菌体量も2倍に増加した。一方で、プトレシンを添加した培地では無添加の培地と同様の増殖を示し(図5A)、培地のpH推移にも違いはみられなかった(図5B)。アスパラギン酸を脱炭酸しアラニンを生産する *Lactobacillus* 属においては脱炭酸によりエネルギー生成を行っている¹⁴⁾ ことから、PAM26株ではオルニチンを脱炭酸することでエネルギー生成を行い、増殖が促進された可能性が示唆された。

以上の結果より、プトレシン生産能を有するPAM26株はオルニチンからプトレシン変換能を有する *Tetragenococcus halophilus* であり、20%という高食塩濃度下であってもプトレシンを生産し、オルニチンからプトレシンへの変換率はモル比で約76%であった。これまで *Tetragenococcus halophilus* を含め耐塩性微生物においてプトレシンをはじめポリアミンを生産するという報告はなく、PAM26株は新規なポリアミン生産能を有する醤油乳酸菌であると考えられる。PAM26株は培地にプトレシンを添加しても増殖は促進されず、オルニチンを添加することにより増殖

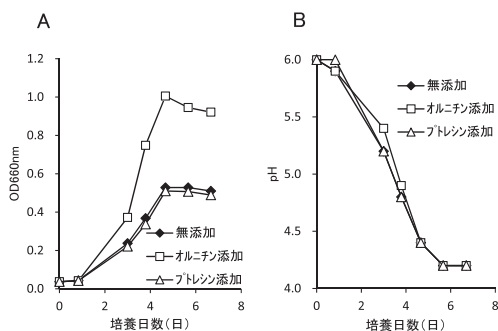


図5 オルニチン添加, プトレシン添加による PAM26株の増殖能変化

オルニチン塩酸塩0.5% (w/v) またはプトレシン二塩酸塩0.37% (w/v) を添加した食塩濃度15%の生揚培地でPAM26株を静置培養(30℃)した。A: 増殖(培地OD660nm)の経時変化, B: 培地pHの経時変化

が促進されたことから, 大腸菌で報告されているように¹⁵⁾, 培地中のオルニチンを取り込み, 脱炭酸によりプトレシンを合成し培地中に放出する過程で種々の栄養源を取り込むために必要なプロトン駆動力とヌクレオチド合成に必要なCO₂が形成されることでエネルギーを生成し増殖が促進されたものと考えられる。

大豆を原料とする納豆や醤油, 味噌などの発酵食品にはポリアミンが多く含まれているが, 醤油や味噌などの食塩を含む発酵食品に含まれるポリアミンは原料由来であるとされている⁸⁾。今回分離したPAM26株は高食塩濃度下でもプトレシン生産能を有しており, 食塩を含む発酵食品においても耐塩性微生物によるポリアミン生産が行われている可能性が示唆された。

要 約

1. 醤油諸味よりオルニチンをプトレシンに変換する新規醤油乳酸菌PAM26株を分離した。
2. PAM26は糖の資化性および16s rRNAの塩基配列より *Tetragenococcus halophilus* と同定された。

3. PAM26株は20% (w/v) の高食塩濃度下でもプトレシンを生産し, オルニチンからの変換能はモル比で約77%であった。

4. PAM26株はオルニチンを脱炭酸することでエネルギー生成を行い, 増殖を促進することが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり, 終始ご指導とご助言をいただきました古林万木夫 取締役研究所長, 築山アドバライザーに厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Cohen S. S.: "A Guide to the Polyamines," Oxford University Press.(1998)
- 2) Tabor C. W., Tabor H.: *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749-790 (1984)
- 3) Igarashi K, Kashiwagi K: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271** (3), 559-564 (2000)
- 4) Igarashi K, Kashiwagi K: *J. Biochem.*, **139**, 11-16 (2006)
- 5) Igarashi K, Kashiwagi K: 化学と生物, **35**, 442-450 (1997)
- 6) Sarah C.: *Nat. Med.*, **22**, 1428-1438 (2016)
- 7) Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, et al: *Nat Cell Biol.*, **11**, 1305-1314 (2009)
- 8) Ogasawara T, Ito K, Igarashi K: *J. Biochem.*, **105**, 164-164 (1989)
- 9) 井部明広: 東京健安研七周年報, **55**, 14-22 (2004)
- 10) 井部明広, 上村尚, 田端節子ら: 東京衛研年報, **46**, 102-107 (1995)
- 11) 井部明広, 田村行弘, 上村尚ら: 衛生化学, **37**, 379-386 (1991)
- 12) 衛生試験法(日本薬学会編)(1955)
- 13) 須見洋行, 瀬良田充: 平成23年度特別電源所在県科学技術振興事業報告書, 1-14 (2012)
- 14) 七谷圭, 阿部敬悦: 醸協, **106** (4), 190-201 (2011)
- 15) 五十嵐一衛: *YAKUGAKU ZASSHI*, **126** (7), 455-471 (2006)