

化粧品素材としての利用が可能な乳酸菌の新規育種技術の開発

早稲田大学理工学部

桐村 光太郎・宇佐美 昭次

A gene relating to β -glucoside utilization of *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* IFO 12968 was cloned and expressed in *Escherichia coli* JM 109. In a 3.4 kb-gene fragment, two open reading frames (ORF1, 1.47 kb; ORF2, 0.98 kb) were sequenced. Although functions of these genes were not correctly determined through the homology research on the genes and proteins. However, since the ORF2 protein showed homologies to the *lac* repressor, it seems likely that these genes code proteins relating to β -glucoside transport.

1. 緒言

乳酸菌とは糖類をエネルギー源として乳酸を主要な代謝産物とする発酵を行う細菌の総称である。乳酸菌と人類との関わりは古くからあり、人類の歴史の歩みとともに、種々の有用な乳酸菌が選択、育種され、多様な発酵食品が開発された。バター、チーズ、発酵乳、ワイン、漬物等がこれらの代表例である。こうした発酵食品は特有な風味によるおいしさ、乳酸菌の作用による保存性と消化性の向上が特徴である。さらに、食品製造関連のみならず、最近では乳酸菌の有する他の有用機能も明らかにされ始めた。その顕著な例としては腸内乳酸菌の機能があげられ、人間の小腸下部に主に検出される腸内乳酸菌は乳酸を生成することで多種の雑菌の繁殖を抑えることが判明している。また、乳酸菌には免疫賦活作用など多彩な生体調節機構が見いだされており、人間の健康維持・増進に寄与する有用な微生物としての認識が高まっている。一方、乳酸菌の培養液がやけどの回復を早めた

り皮膚の感染症を防ぐことが発見されたことをきっかけとして、約30年前よりこれを化粧品素材として利用することが始められた。実際に乳酸菌培養液を化粧品に添加すると皮膚の保湿作用や抗酸化作用が向上するため、有用な化粧品素材と考えられる。今後は乳酸菌の代謝産物の化粧品素材としての新規機能の調査と、乳酸菌自体を添加した化粧品の開発が予想される。しかし、実用性を考えた場合には、解決しなければならない問題も多く、このためには乳酸菌を遺伝的に改良するための育種技術を確立し、乳酸菌の新規な機能を開発する必要がある。

本研究は、化粧品素材としての利用に適した乳酸菌に関する、遺伝子工学を利用した育種技術を開発することを目的としている。本研究により化粧品素材としての利用に適した多機能性乳酸菌の育種が可能であると考えている。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

供試菌として、セロビオース発酵性を有する *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* IFO12968 を用いた。また遺伝子クローニングの際の宿主菌としては、大腸菌 *Escherichia coli* JM 109 を用いた。

Development of New Breeding Systems for Lactic Acid Bacteria Available as Cosmetic Materials



Kohtaro Kirimura

School of Science and Engineering
Waseda University

2.2 培養方法

*E. faecalis*の液内培養には、ペプトン、酵母エキス、グルコースを主成分とするPYG培地を用い37℃にて静置培養を行った。*E. coli*の培養には、バクトトリプトン、酵母エキス、NaClより成るLB培地を用い、必要に応じて形質転換前培養用にM9培地（最小培地）、本培養に2YT培地（LBより富栄養なもの）を使用しいずれも37℃にて培養した。また、*E. Coli*の形質転換体の選択および培養のときには、上記の培地にアンピシリンを終濃度で100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培地に添加した。

2.3 DNAの調製

*E. faecalis*を培養後集菌し、bufferに懸濁した後、リゾチームおよびSDSを加えて溶菌させ、proteinase K処理、RNase A処理、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、全DNAを精製した。

*E. coli*からの組換えプラスミドおよびシャロミドの抽出は、アルカリSDS法に従って行った。また必要に応じてQIAGENプラスミド精製キットも使用した。

DNAの分子量測定は、アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UVライト照射により行った。

2.4 大腸菌の形質転換

*E. coli*の形質転換はHanahanの方法に従って行った。この際、形質転換体の選択には、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-glu)を利用した。X-gluは β -glucosidaseにより分解されると青く呈色する。そこでX-gluを含む培地で青色に呈色したコロニーを採取し、解析を行った。また、シャロミドベクターを用いた場合は、ファージベクターの場合と同様*in vitro* packagingキットを用いて行った。

2.5 塩基配列の決定

ベクター中の挿入断片の縮小化は、制限酵素による消化およびライゲーション反応を繰り返し行うことにより行った。また、exonuclease IIIおよびmung bean nucleaseの反応を取り入れたDeletionキットも利用した。得られたディレクションプラスミドの塩基配列の決定は、Sangerの方法に従い、蛍光オートマチックシーケンサーを利用して行った。また、必要に応じて既知の塩基配列からDNAシンセサイザーによって合成したプライマーを用いてPCRを行いPCR産物を塩基配列決定の際に用いた。

2.6 *in vivo*における遺伝子発現

各オープンリーディングフレームをPCRにより増幅させ、発現ベクターであるpUC18、pBluescript II、pKK223-3に連結し、組換えプラスミドを構築した。この組み換えプラスミドを用いて*E. coli* JM109に形質転換し、形質転換体を*lac*および*tac*プロモーターの誘導剤であるisopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG)とアンピシリンを添加した培地で培養した。約24時間培養後、集菌・洗菌し、TME bufferに懸濁し、超音波処理により細胞を破碎した。遠心分離した上清をSDS-PAGEにより分離し、クマジーブルー染色でタンパク質の検出を行った。同様の系で、IPTGを添加しない場合の結果と比較することにより目的タンパク質の同定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 セロビオース資化性遺伝子を含むプラスミドpEFG3の塩基配列の決定

*E. faecalis*より全DNAを抽出し、制限酵素EcoRIにて消化後、*E. coli* JM109を宿主、pUC18をベクターとしてショットガンクローニングを行った。X-gluを含有する選択培地上で青色を呈するコロニーが6個得られたが、得られ

たクローンの保持するDNA断片は、サザンハイブリダイゼーションおよび制限酵素分析により、pEFG1、pEFG2、pEFG3の3種に大別できることが判明した。この中で、pEFG3を保持する大腸菌は、セロビオースを唯一の炭素源として生育可能であった。そこでpEFG3について塩基配列を含めた詳細な解析を行うことにした。

pEFG3を縮小化したプラスミドを数種作成し、それらのLB培地上でのX-gluの発色をβ-glucosidase活性として、FIG.1に示した。

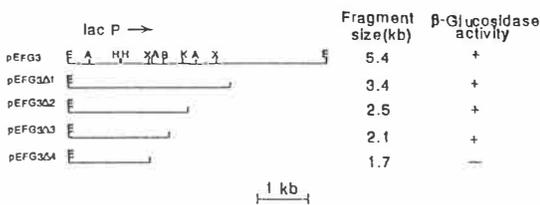


FIG.1. Deletion analysis of the insert of pEFG3. Restriction endonucleases : A, *AccI* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *Hind III* ; K, *KpnI* ; X, *XbaI*.

FIG.1より当該遺伝子を約2.1kbの領域に限定した。このDNA断片の塩基配列の決定を行うために、pBluescript IIをベクターとしてサブクローニングを行いFIG.2に示すようなsequencing strategyで塩基配列を決定した。その結果951bpと978bpの2つのオープンリーディングフレーム（以下ORF1、ORF2と略）が存在していることが判明した。しかもこのORF1とORF2

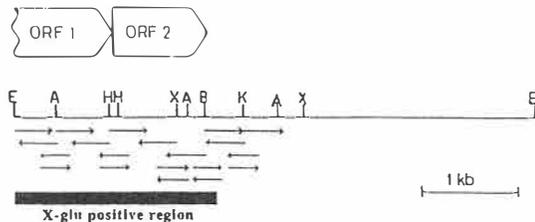


FIG.2. Sequencing strategy for the X-glu positive region of pEFG3

The arrows denote the direction and extent of sequence determination. The open reading frames are shown as ORF1 and ORF2. Restriction endonucleases : A, *AccI* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *Hind III* ; K, *KpnI* ; X, *XbaI*.

2は18bpしか離れておらず非常に近接していた。ORF2の終止コドンの直後には、安定なステム・ループ構造の形成可能な配列が見出され、ORF2の終止コドンで転写は終結するものと考えられた。なお、ORF1は完全長ではなく上流部分が欠けていることが示唆された。

3.2 pEFG3の上流域のクローニング

*E.faecalis*の全DNAを抽出した後*Kpn I*で完全消化後、コスミドベクターの一種であるCharomid 9-36をベクター、宿主は*E.coli* JM 109を用いて*E.faecalis*のゲノムDNA 2-16Kb断片を含む組み換え体を約5000個取得した。pEFG3の*EcoR I*-*Kpn I*断片約2.4Kbをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところハイブリダイズするクローンを3個取得した。その組み換えシャロミドを抽出し、*Kpn I*で消化後、電気泳動し、サザンハイブリダイゼーションを行った結果をFIG.3に示した。

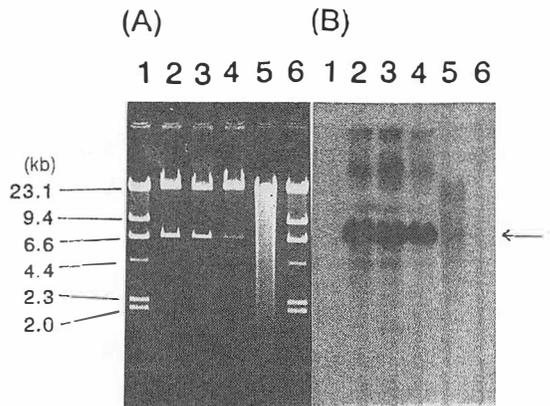


FIG.3. Southern hybridization analysis.

(A) Lane 1,6, λ DNA digested with *Hind III*. Lane 2, recombinant charomid (1) digested with *Kpn I*. Lane 3, recombinant charomid (2) digested with *Kpn I*. Lane 4, recombinant charomid (3) digested with *Kpn I*. Lane 5, *E. faecalis* chromosomal DNA digested with *Kpn I*.

(B) Hybridization analysis of the Southern transfer of the DNAs from gel (A), using labelled 2.4kb *EcoRI*-*KpnI* fragment of pEFG3 as a probe.

この約6.7Kbの *Kpn* I断片をpBluescript IIKS +にサブクローニングし、FIG.4に示すようなディレーションプラスミドを得て塩基配列を決定した。これにより完全長のORF1は1470bpから成るオープンリーディングフレームであることが判明した。ORF1の上流にはプロモーターやSD配列と推測できる領域が存在していた。決定した塩基配列のうち2.7KbをFIG.5(次頁)に示した。

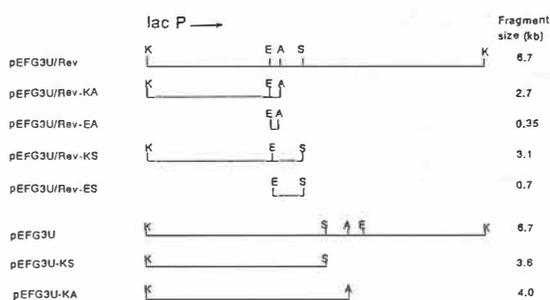


FIG.4. Deletion plasmids of pEFG3U and pEFG3U/Rev. The arrow indicates the direction of *lac* promoter in pBluescript II. Restriction endonuclease used are as follows: A, *Apa*I; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; S, *Spe*I.

3.3 各オープンリーディングフレームの機能についての検討

ORF1、ORF2それぞれについてアミノ酸レベルでの相同性を調べたところ、ORF1、ORF2ともに他生物起源の β -glucosidaseとの相同性は低かった。むしろORF1はsucrose-6-phosphate hydrolaseやsucrose α -glucosidaseと高い相同性を示し、ORF2は*lac*リプレッサータンパク質と高い相同性を示した。

さらに各々のORF産物の機能を調べるために、塩基配列のデータをもとにORF1のみを含む領域、ORF2のみを含む領域、ORF1とORF2双方を含む領域をPCRにより増幅し、ベクターpUC18、pBluescript II、pKK223-3にクローニングした。ORF2のみを含む領域と、ORF1とORF2双方を含む領域をクローニングしたものは、IPTGの存在下X-gluを分解して青色を呈するクローンが得られた。これより特にORF2

産物が、*E. coli*の β -glucosideの利用に深く関わっていることが判明した。さらに遺伝子発現と遺伝子産物同定のために*in vivo*での遺伝子発現状況を調べた結果、FIG.6に示すように約36 KDaのタンパクが発現していることが判明した。これはORF2の塩基配列より推定した分子量と一致していた。ORF1、ORF2ともに β -glucosidase遺伝子をコードしている可能性は極めて低いにも関わらず、*E. coli* JM109に β -glucosidase資化能を与えている理由についての詳細は不明である。しかし、以上の結果は、*E. faecalis*由来のORF産物が直接的に、または他の糖取り込み制御機構の抑制によって、*E. coli*のcryptic β -glucoside-PTSを活性化したことを強く示唆している。

4. 結 言

*E. faecalis*由来の β -glucoside資化性遺伝子の塩基配列を決定したところ、約3.4Kbの領域

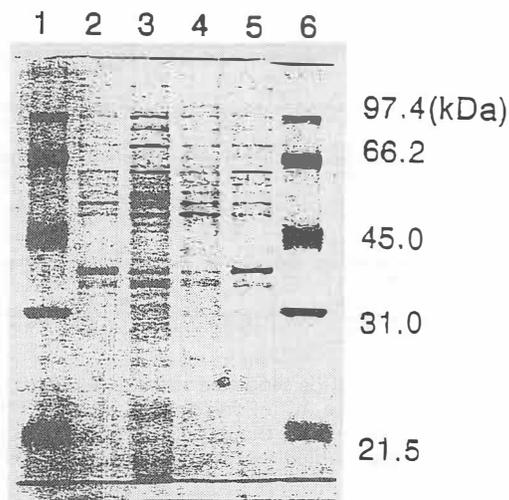


FIG.6. SDS-PAGE of the crude extract from *E. coli* transformants harboring ORF2 gene. Lanes 1,6, molecular weight markers. Lanes 2,5, transformants with IPTG (inducer) Lane 3, transformants without IPTG Lane 4, *E. coli* JM109 harboring pUC18

```

10      20      30      40      50      60
AACCGCTTATCATARAATGTAATTTATARAATATTTTGGATTAAATAGATTATAT
70      80      90      100     110     120
ATGTTATACCGTTCGATTTCTGCAATTTGTTTATACCTATAGACTACTACTATTTCT
-35
130     140     150     160     170     180
AATAAGGACCACTTACTTATGTCACCACTATGACCACTGACTGATGATACCTTAA
50
H S S I A H H D U T O E L A Y

190     200     210     220     230     240
TGGCCCTTATCTTCTGGACATCTGCTACCTCGAARATCTACTTCTATATCGGCA
A P Y S S U T S A H L E H L T S I I A Q

250     260     270     280     290     300
ATCTAGTGGCGTTTAAAGTATCATATTCACACCAAGCAGGACTAATGATCCCA
S S U A F K V L H I O P Q T G L L H D P H

310     320     330     340     350     360
CGGTTTTTCGATTTCAATACCAAGTGCATTTATTTATCAGCGCTTCCCTTTGGG
G F S V F H H Q U H L F Y Q A F P F G S

370     380     390     400     410     420
TGTTCAGCGACTAARAAGTTGGCCCACTTACTTCCCACTTAAATCTACTGGGAT
U H G L K S U A H L T S S G L I H U O Y

430     440     450     460     470     480
TGAAGGAATTGCCTTCTCCGACTCGAATGATTCATGCGCTATACGCGCTC
E G I A L S P O B S E V O S H O U V S O S

490     500     510     520     530     540
AGCTTTACCACTAGATACCACTACTGTTTATTTATACAGAAATGTTTCGATCA
A L P I O H Q L C L F Y T O H U A O O T

550     560     570     580     590     600
TTGGCAGGATTCGATATCAAAATATGCAATGGCTGAAATCTTAGTGCCATCA
U O R A F Y Q N I A U L H S L O A I T K

610     620     630     640     650     660
GGAACTACCACTTCCCTACCAATGACCACTTACTTCCCACTTTCGATCCGAT
E S T P F L P I O P H V S S H F A O P H

670     680     690     700     710     720
GGTATTTCTTATCAGACGACTGTTTATTTATGCTGACTAGTATTAATGACCA
U F P V Q E G O L U L I O A S O L H O Q

730     740     750     760     770     780
AGGAARAATTTGGTGTATTTTCTAAGATCGAAGTACCACTTTCATCACTGG
G K I U V Y F S K G A R H U V K H F H O L G

790     800     810     820     830     840
CGAATGACGTTCCACCAAGCAATGAGCTACATGGTTGAAATGCCCCAATTTG
E L T F T G O E L O V H U E C P H L U V

850     860     870     880     890     900
TATGATGCGAGCTGCTTATTTATTTCCCAAGGCTTACTTCCATCTGTAARA
I O G A P U L L F C C O G L S P S U V K S

910     920     930     940     950     960
TTATCAGAAATCTATCCAAATATGACCACTGGCTGAAACGTTGATTTGAAAT
V O H I V P H H V T L A E E T F O L E H L

970     980     990     1000    1010    1020
TTCTTATGCTCAGCGTGGACCTTTTAAATTTAGATGAGGGTTTGTGCTCAGCC
S L U Q O A G P F E H L G E O F O U V A T

1030    1040    1050    1060    1070    1080
TCAGCCCTTATGACCGCAATGGCTGACTGGCTGCGTGGATGGATGGATGGCA
O P F H A P O O A R A L A U S M I O L P E

1090    1100    1110    1120    1130    1140
AATCACTTACCAAGTATGTTGGAGGTTGGCAAAATGGCTTAACTGTTTAAAG
I T Y P S O U E O U A H O L S L U K E L

1150    1160    1170    1180    1190    1200
CACAAATCACACCGAARACTATTCARATTCAGTTCGAAACGAAATGCTTCG
T I H H O K L F Q Y P U S E T E H L A Q

1210    1220    1230    1240    1250    1260
ATCCGCCACTACTTATCAAAATGGCTGCAATTTTATCTACTGCTTCTTTGAA
S A T T L S H O C H F L S T A S F E L E

1270    1280    1290    1300    1310    1320
AGTGGATATCCCAAAATGAGATTGCTTTATTCGGCTTTAGCGAAGCAAGCGGT
U O I P K H E I A F I A L L A H E T O S

1330    1340    1350    1360    1370    1380
AARAAGACTTTTAACTTATGATACCACTCAAGTAAATACCCCTGATCGAAR
K O L L I C T I O T I H G K I T L O A T F

1390    1400    1410    1420    1430    1440
TGC TGGCCACCTTTTCTGTAARAATGTCGCACCACTCTCGTGAARCTAARAT
A O O P F A E K V G C I A E T K I A K H

1450    1460    1470    1480    1490    1500
TAACTCACTGATTAACCTATTTTGTGATGCTGCTGCTGCAAGAACTAIO
K S U Q L T I F U O G C S U A E I V U H K

1510    1520    1530    1540    1550    1560
AGTGAARAARACGATGACTGCTGCTTCCAGATTAAGCCGACCACTTCTCTCT
G E K T H T G A F F P O K A Q O V L W L

1570    1580    1590    1600    1610    1620
ATCCAAAGCCGAAAGCTGTTTATGACTGGAAATACGAAATTAAGATGATG
S K T A K A C F V E L E H T H H *

1630    1640    1650    1660    1670    1680
GTGAATTTGATGGTGAATTAACCTGACTGAGCAAGCTTCTGCGGCTGAGCC
H U U K L T O G U A K L A G U S P T

1690    1700    1710    1720    1730    1740
AAGGTAAGCCGCTGATTAATTAATGATTTAGTCTGCTCAAAARACTTGAAR
T U S A U I H H V O V L S O K T I G K U

1750    1760    1770    1780    1790    1800
TCATCAAGCACTGGAARATTAATTAACCACTTACTGATTAAGCCGAAAT
H O A H E E L H V Q P H O L A A S L Q O

1810    1820    1830    1840    1850    1860
AARAAGTACCGCTGATTTGATGCTTCCCTCTGCTGATTAAGCTTCTGCTG
K S T Q L I G L U F P S U S H P F F G E

1870    1880    1890    1900    1910    1920
ATTAATTAACCACTGGAARACTTCTGCTGACTGATTAAGCTTCTGCTG
L I E T L E A K L F A T O G V K U I L C O

1930    1940    1950    1960    1970    1980
TAGTGAARAAGTCCGAAARACCGCCCTTACTGATTAAGCTTCTGCTG
S E K O P E K E A A V L A H L A A H K U

1990    2000    2010    2020    2030    2040
GGACCGTATTAACCTGATTAAGCTTACTGATTAAGCTTACTGATTAAGCT
G O U I T O S H H L A I H E V E H U S L

2050    2060    2070    2080    2090    2100
ACCAATGCTTCCCTTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
P I U S F O A F L A P G I P I U S S O G

2110    2120    2130    2140    2150    2160
CTTTCAGCGGCAAAARACCGCTTACTGATTAAGCTTCTGCTGCTGCTGCTG
F O O O Q K A T E A L F A S O S O K I A

2170    2180    2190    2200    2210    2220
AATTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
I I T O A H H T O A P S O V A L C O V A G K

2230    2240    2250    2260    2270    2280
ACAAARACTGAAARACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
Q T H E K Y G A R O K T I L Q I G H O T S

2290    2300    2310    2320    2330    2340
ACCAARACTGAAARACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
T T L K H L E I E A L L Q H K T U G O I

2350    2360    2370    2380    2390    2400
CTTTCAGCGGCAAAARACCGCTTACTGATTAAGCTTCTGCTGCTGCTGCTG
F C T O G L T A I T U H H I A O K L K I

2410    2420    2430    2440    2450    2460
ATCACTTCTGAAARACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
S I P E E L K U I G V O G T K L I K A I

2470    2480    2490    2500    2510    2520
TCCCTTCACTACTACCACTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
A P Q L S T I U O P I G E H C O U H I O

2530    2540    2550    2560    2570    2580
CTTTCAGCGGCAAAARACCGCTTACTGATTAAGCTTCTGCTGCTGCTGCTG
L L L A R A H N D P O G U A L E E H Y P I P

2590    2600    2610    2620    2630    2640
GATTCAGCTACTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
I Q L S L S E S C *

2650    2660    2670    2680    2690    2700
ATCTTATCTCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ATCTTATCTCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG

```

FIG. 5. Nucleotide sequence of the genes from *E. faecalis*, which control β -glucoside utilization in *E. coli*. Putative initiation codons (ATG) are at bp140 and 1631. In the downstream of the termination codon (*), the putative transcriptional terminator at bp2610 to 2639 is indicated by inverted arrows, which represent the proposed stem of the stem-loop structure.

の中に2つのオープンリーディングフレーム (ORF1: 約1.5Kb; ORF2: 約1.0Kb) が存在していることが判明した。ORF1、ORF2は両者とも β -glucosidaseをコードする遺伝子ではなく、むしろ*E. coli*の β -glucoside輸送機構に

関与するタンパク質である可能性が高い。これらの遺伝子を*E. coli*内で発現させた場合、 β -glucoside輸送が可能になり、 β -glucoside資化能を獲得していることが示唆された。