

研究の動向

乳酸菌はミルクのタンパク質をどのようにして利用するのか

和洋女子大学大学院総合生活研究科 中島 肇

ミルクは哺乳動物が、生まれた子供のために与える食料です。ヒトが食料として利用している食品のほとんどは最初から食料になるために作られたものではありません。現在目にする食品は食料生産や私たちの嗜好に適するような品種改良がおこなわれておりますので、分かりにくくなっていますが、穀類、豆類、果実、卵は種の保存に関係する器官、いも類はエネルギーとなるデンプンを蓄積した器官、肉類や魚介類は生き物自体を食品としています。意外なことですが、最初から食料になることを目的に生産されている唯一の食品がミルクです¹⁾。

日本では、主に牛のミルクを牛乳として利用しています。牛乳はどこにでもある食品というイメージですが、飲用牛乳が日常食になったのはそんなに遠い昔ではありませんし、最近は飲用牛乳の消費動向は大きく変化しています。食料需給表²⁾によりますと、1960年では飲用牛乳向けの生乳生産量が約100万トンでしたが、1994年に5倍以上の約526万トンとなり、この時が最高の生産量でした。その後、飲用向け生乳生産量は減少に転じ、2016年では約391万トンと1994年の約2/3にまで減少しました。これに対して、発酵乳（日本ではヨーグルトという規格はなく、発酵乳が相当します）は、2009年以降2015年まで生産量が増加し、2015年で約127万klとなっています³⁾。総務省統計局の家計調査⁴⁾から読み解くと、日本が本格的に人口減少期に入り食品の消費も全体的に減少する中で、発酵乳は消費が増加している数少ない食品群の一つです。平成27年度の全国二人以上の世帯での家計支出は、牛乳が年約1.5万円であるのに対し、ヨーグルト（家計調査ではヨーグルトというカテゴリーになっていません）は約1.2万円と近接しており（総務省家計調査）、牛乳と同じようにヨーグルトも「家庭内常備食」になっているという指摘もあります⁵⁾。

言うまでもないことですが、発酵乳はミルクを乳酸菌で発酵して酸性化した食品です。「乳酸菌」という名前からの印象か、全ての乳酸菌がミルクでの増殖に適応しているような印象を持っている方も少なくないと思われませんが、ミルクと乳酸菌の関係は、もう少し複雑です。菌種や菌株によって数は異なりますが、乳酸菌は炭素源だけではなく、タンパク質を作るためのアミノ酸の一部を自分で生合成することが出来ません。そのため、アミノ酸を菌体の外部から、ミルクで増殖する時は乳タンパク質から、切り出して、取り込む必要があります。ヨーグルト、チーズといった発酵食品は、ミルクで増殖するための、これからお話しするような仕組みを持っている乳酸菌を使うことが必要なのです。同じ乳酸菌でも、プロバイオティクスとされている乳酸菌の中には、ミルクではほとんど増殖することが出来ないものもあります。本稿では、ミルクでの増殖に適応している代表的な乳酸菌種の一つである *Lactobacillus helveticus* を中心に、他の乳酸菌を含めて、ミルクで増える仕組みとそれを構成するタンパク質の特徴について紹介します。

1. 乳酸菌は意外とワガママです

乳酸菌が増殖に必要なアミノ酸、つまり乳酸菌が自らの菌体内で生合成できず、栄養素として取り入れる必要があるアミノ酸（大雑把にいうとヒトの「必須アミノ酸」と同じ）は何かという研究は1980年代に盛んに行われてきました。乳酸菌の必須アミノ酸を調べる時には、アミノ酸を含む全ての成分を化学構造のわかっている化学物質のみから作り上げる完全合成培地（Chemically Defined Medium）から一つずつアミノ酸を除いて、増殖の有無を評価するという地道な作業を行います。ちなみに、*L. helveticus* が増殖するという報告のある完全合成培地では42種類もの化学物質を組み合わせる培地を作ります。この実験の結果、*L. helveticus* のアミノ酸要求性は、実験対象となる *L. helveticus* によって結果が異なる（菌株特異性がある）ことが明らかになってきました。つまり、*L. helveticus* に属する A という株はアスパラギ

Hadjime NAKAJIMA

和洋女子大学大学院総合生活研究科
〔著者紹介〕(略歴) 1983年、雪印乳業株式会社（研究開発部問・国際部門）1994年、オランダ・フローニンゲン大学研究員（2年間）2013年、和洋女子大学大学院総合生活研究科教授
〔専門分野〕 応用微生物学（乳酸菌の機能性と利用）、食品学

ンが必須アミノ酸であるのに対し、Bという株はアスパラギンを生合成することができ、増殖には必要ではない、といったことが起こることが徐々にわかってきました。

唐突に思われるかもしれませんが、2003年に終了した「ヒトゲノム計画」が乳酸菌研究も大きく変えました。ヒトのゲノム情報の解読は、約 3×10^9 (30億=3G塩基対)ある4種類の塩基対を読んで行くという地道な作業を行うことです。30億個の塩基配列分析をするためには高速で、かつ安価な費用で分析が可能な読み取り装置 (DNAシーケンサー) の開発が必要です。塩基配列の速度を単純に比較すると、1980年にノーベル化学賞を受賞したサンガーが開発した方法で解析しますと1回の解析で約500塩基の配列を読むことができるのに対して、現在最も早い次世代シーケンサーと呼ばれる製品の一つであるイルミナ社の解析装置のカタログ値ではありますが、1回の解析で最高で6,000億塩基対が解析できます。乳酸菌のゲノムは、ヒトの1,000分の1程度の $1-3 \times 10^6$ (1-3M塩基対)と小さいこともあり、次世代シーケンサーを使うことによって、簡単に乳酸菌のゲノム解析を行うことができるようになったわけです。2016年9月の時点でNCBI (National Center for Biotechnology Information) には、読み取りが不完全なもの (DNA配列の信頼性が高くないもの) も含めると *L. helveticus* では23株のゲノム情報が公開されています。ゲノム解析の結果によると、世界的に研究が進んでいる *L. helveticus* CNRZ32において、A, N, C, S, Gは、ゲノム上にアミノ酸を生合成するため

の遺伝子が全て揃っていること、つまり、この5種類のアミノ酸は *L. helveticus* CNRZ32は菌体外から取り込む必要のない非必須アミノ酸であることが明らかとなりました⁶⁾。

2. ミルクのタンパク質を乳酸菌が利用する仕組みは意外に複雑です

ミルクの中には *L. helveticus* が生育するために十分な遊離アミノ酸はありませんので、菌体内で生合成できないアミノ酸は菌体外にある乳タンパク質から得る必要があります。ヒトの消化吸収と同じように *L. helveticus* も乳タンパク質を直接菌体内に取り込むことはできませんので、①菌体外で乳タンパク質を分解するプロテイナーゼ (Cell Envelope Proteinase, CEP), ②菌体外で分解したペプチドやアミノ酸を菌体内に取り込むトランスポーター, ③取り込んだペプチドを乳酸菌の菌体内でアミノ酸まで分解するペプチダーゼ、の3種類のタンパク質からなる装置が必要となります (図1)。アミノ酸を取り込むアミノ酸トランスポーターが、菌体内で不要になったアミノ酸やペプチドを排出する仕組みを兼ねることもあるようです。

なお、CEPは酵素学的にはエンドペプチダーゼに分類されるタンパク質分解酵素ですが、乳酸菌の場合、菌体外に存在して乳タンパクを質加水分解する酵素として CEPと呼ばれます。また、乳タンパク質を分解して生成したペプチドを乳酸菌体の中でさらに分解するペプチ

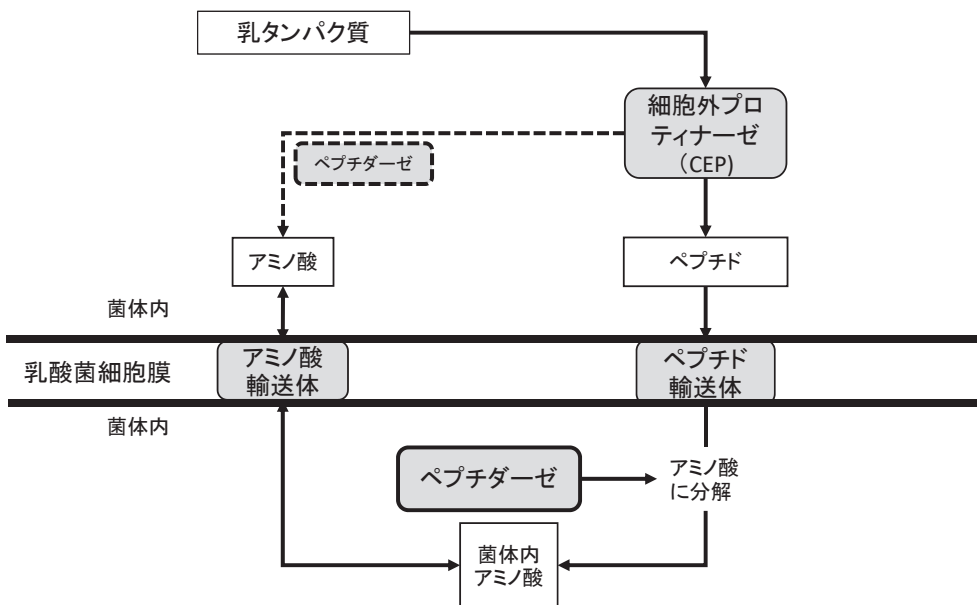


図1. 乳酸菌のタンパク質分解経路 (乳酸菌が窒素源を獲得する仕組み) の模式図

乳酸菌は、乳タンパク質を菌体外プロテイナーゼ (CEP) により菌体外で低分子化してからペプチドやアミノ酸として菌体内に取り込む

・ □は乳タンパク由来の天然物, □内は乳酸菌が生産するタンパク質分解経路にかかわるタンパク質

ダーゼと区別するためにプロティナーゼ (Prt) とともに記載されることもあります。特に、遺伝子から推定したタンパク質の場合は、他の生物の生産する酵素との関連性を見るために Prt を使うこともあります。若干複雑で申し訳ないのですが、本稿では、CEP を基本として使いますが、遺伝子から推定した酵素でオリジナルの報告が Prt を使っている場合は、Prt を使っています。本稿では、CEP と Prt は同じ意味で使われていると考えて下さい。

トランスポーターには、オリゴペプチド輸送体 (Opp) とアミノ酸残基が 2~3 個のペプチドを取り込む 2 種類のトランスポーター (di-/tri-peptide transporter, DtpT と dipeptide permease, Dpp) があることがわかっています。ゲノム解析の結果、*L. helveticus* の菌株によっては、トランスポーターが偽遺伝子 (pseudogene) で機能していないものもあるようです⁷⁾。アミノ酸要求性においても菌株特異性が高いことを記しましたが、*L. helveticus* は乳酸菌の中でも遺伝子の変異を誘発する挿入配列 (Insertion Sequence) が多いため、遺伝子の変異が起こりやすいことが、菌株特異性が高くなる原因の一つであると考えられています。

また、ゲノム解析の結果から、*L. helveticus* CNRZ32 にあるペプチダーゼは、oligoendopeptidase タイプが 7 種類、general aminopeptidase タイプが 3 種類、proline-specific peptidase タイプが 5 種類、di-/tri-peptidase タイプが 8 種類、これらに分類されないものが 6 種類以上あることが報告されています⁸⁾。*L. helveticus* 以外の乳酸菌も含めて、一つのペプチダーゼが働かないような変異株を取得してもミルク中での増殖がほとんど変化しないことが知られていましたが、同一種類のペプチダーゼが複数菌体内に存在するのであれば、不活性化したペプチダーゼを他の同じタイプのペプチダーゼが補っていたのだということが直感的にわかるかと思えます。

3. ミルクのタンパク質を菌体外で分解する乳酸菌の酵素 CEP は意外と沢山あります

ミルク中で *L. helveticus* が増殖する時に、タンパク質を菌体外で加水分解し、ミルクでの増殖の起点となる CEP にはどのような種類があるのでしょうか。*L. helveticus* CNRZ32 のゲノム情報からは、PrtH1 から PrtH4 までの 4 種類の CEP があると報告されています⁸⁾。これらの CEP は、いずれもズブチリシン様セリンプロテアーゼ (subtilisin-like serine protease) に属しており、プロテアーゼとしては同じ種類に属しています。1999年にアメリカのグループが初めて酵素の精製と酵素をコードする遺伝子配列を決定したのが PrtH1 です⁹⁾。後の研究で明らかになったのですが、生乳、チーズ、発酵乳から分離された *L. helveticus* では、後に性質が明らかになった PrtH2

だけを持つ菌が多いことが分かっています¹⁰⁾。

乳酸菌のゲノム情報がわかると、そのタンパク質がどのようなアミノ酸配列になっているか (一次配列) が分かります。タンパク質のアミノ酸一次配列比較することで、特定のタンパク質の進化の過程がわかることがあります。*L. helveticus* CNRZ32 にある 4 種類の CEP と、我々が中国の伝統発酵乳アイラグから分離した *L. helveticus* が保有している CEP¹¹⁾ を、アミノ酸一次配列に基づき、類似性を比較したものが図 2 です。おおよそのイメージとして、タンパク質の類似度が高いものが近くに位置し、円環の中心に仮想した大本の CEP からの距離は、それぞれの CEP がどれだけ変異したかを示しています。5 種類の CEP は、中心からの距離に大きな差はありませんが、PrtH1 は、他の 3 つの CEP とある時期に別の進化を始め、異なる系統で変化してきた酵素であることがわかります。また、我々がモンゴルの伝統発酵乳から分離した *L. helveticus* SBT11087 が保有している CEP は、生乳、チーズ、発酵乳から分離された *L. helveticus* の多くが保有している PrtH2 タイプではなく、PrtH1 の変異体であることがわかります。*L. helveticus* SBT11087 が保有する PrtH1 変異体は、タンパク質加水分解活性が PrtH1 に比べてはるかに低く、至適温度が 30℃ と、PrtH1 とは異なる酵素学的な特徴があることがわかっています¹²⁾。

4. タンパク質分解酵素はミルクでの増殖が得意ではない乳酸菌もあります

我々が「馬乳酒」として知られているモンゴルの伝統発酵乳アイラグから分離した *L. helveticus* SBT11087 は PrtH1 変異体を持つものの、ミルクではほとんど増殖することができません。一つの原因として、PrtH1 変異体の酵素活性が低いことが考えられています。アイラグ中は、強いものだけが生き残る「弱肉強食」の世界ではなく、ミルクでの増殖に劣る乳酸菌も一定の割合で生き残ることができる世界ようです¹¹⁾。

これまでは、ミルクでの増殖に適応した *L. helveticus* に絞って話を進めてきましたが、視野を少し広げて、乳酸菌の中で CEP がどのように分布しているかを簡単に述べてみます。PrtH のアミノ酸一次配列をもとに、乳酸菌が持っている CEP の類似度を Blast という手法で解析したのが図 3 です。*L. helveticus* CNRZ32 が保有する 4 種類の類似度を図 2 に示しましたが、PrtH1~PrtH4 は他の乳酸菌と比べると、PrtH グループという一群としてまとまっていることがわかります。PrtH タイプの CEP を持つ乳酸桿菌には、ヒトや動物の消化管内での増殖に適応している有用菌 (プロバイオティクス) の仲間である *L. acidophilus* グループ 6 菌種 (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*) のう

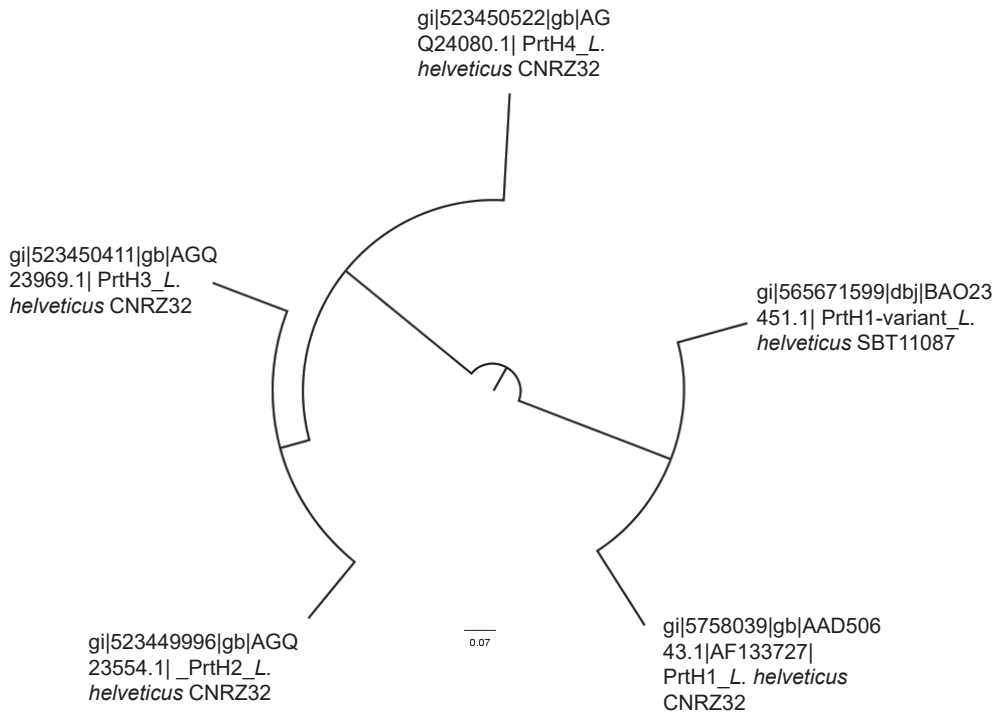


図 2. *Lactobacillus helveticus* が保有する代表的な Cell Envelope Proteinase の系統樹

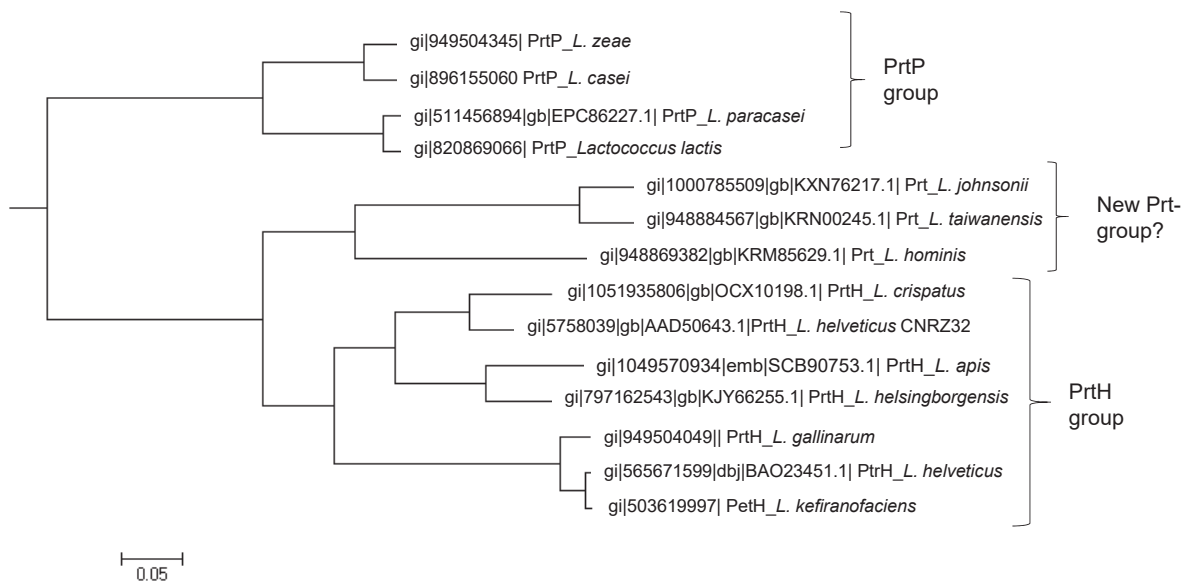


図 3. アミノ酸相同性に基づく、プロテイナーゼ (Prt) の系統解析

乳酸球菌 (*Lactococcus* 属) が保有するプロテイナーゼである PrtP に相同性の高いタンパク質は、乳酸桿菌である *Lactobacillus* 属の *delbrueckii* グループに属する菌種にも分布している

ち、*L. gallinarum* と *L. crispatus* が含まれています。不思議なことに、我々が分離した *L. helveticus* SBT11087 が保有する PrtH1 変異体とアミノ酸一次配列が 99% 同じタンパク質が異なる菌種である *L. kefiranofaciens* にも存在していることがゲノム情報から明らかになりました。面白いことに、PrtH や PrtH 変異体とも異なるクラスターに属する CEP を持っている菌種である *L. apis* や *L. hels-*

ingborgensis は、ミツバチの消化管内から分離された乳酸菌です¹³⁾。穀類や果実を使った「自然発酵」種は欧米ではサワードウとして知られていますが、果実を使った「自然発酵」は、ミツバチが媒介した酵母によって起きていることをイタリアの研究グループが明らかにしています¹⁴⁾。サワードウは「酸性の発酵種」という意味ですから、サワードウには乳酸菌が存在しています。酵母と

同じように、穀類や果実に存在する乳酸菌の一部も、ミツバチが受粉をする時に運んでいる可能性を指摘する報告も最近出始めています。ミツバチの消化管内から分離される乳酸菌が、ミルクでの増殖に適応している乳酸菌が持つ CEP と類似度の高いタンパク質加水分解酵素を持っているのには何らかの生物学的な意味が潜んでいるのかもしれません。

その他に、アミノ酸一次配列の類似度から、PrtP グループと、*L. johnsonii*, *L. waiwannensis*, *L. hominis* が保有する CEP のクラスターに分かれることが明らかになりました。PrtP のクラスターは、これまでよく知られていましたが、これらの乳酸桿菌が属するクラスターは新しいクラスターのようです。

乳酸菌は、菌体の形状から分けられており、代表的なものとして、球状の *Lactococcus* 属と桿状の *Lactobacillus* 属があり、系統分類上はこの二種類は異なることがわかっています。ところが、興味深いことには、PrtP グループの CEP を保有する乳酸菌には球菌である *Lactococcus lactis* と桿菌である *Lactobacillus casei* グループの両方が存在しています。

5. さいごに

微生物の分類によく用いる 16S-rDNA の配列に基づく *Lactobacillus* 属の相同性解析からも指摘されてきたことではありますが、乳での生育に高度に適応している *L. helveticus* は、ヒトや動物の消化管内での増殖に適応している有用菌（プロバイオティクス）の仲間である *L. acidophilus* グループと系統的に近いのです。このことは、乳酸菌のゲノム（全遺伝子）情報をもとにした相同性解析でも、同じ結果が得られています¹⁵⁾。系統進化による近さが、必ずしも生物学的な意義をあらわしてはみませんが、生育環境としては、ミルクと消化管内は大きく異なります。ミルクとヒト消化管内での増殖に適応した二種類の乳酸菌にどのような関係があるかは、非常に興味深い話だとは思いませんか。

参 考 文 献

- 1) 伊藤敏敏. ミルク 至高の食品がわかる. ヒューマンビニングス, 2007
- 2) 農林水産省. 平成26年度食料需給表
- 3) (一社) 全国発酵乳乳酸菌飲料協会. 統計情報
- 4) 齋藤忠夫. 我が国の酪農産業の動向と機能性を付与した酪農乳製品の現状と将来. ミルクサイエンス. 2016, **65**, 119-121
- 5) 総務省. 平成27年度総務省家計調査
- 6) Christiansen, J. K.; Hughes, J. E.; Welker, D. L.; Rodriguez,

B. T.; Steele, J. L.; Broadbent, J. R. Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. Appl. Environ. Microbiol. 2008, **74**, 416-423

- 7) Cremonesi, P.; Chessa, S.; Castiglioni, B. Genome sequence and analysis of *Lactobacillus helveticus*. Front. Microbiol. 2012, **3**, 1-13
- 8) Griffiths, M. W.; Tellez, A. M. *Lactobacillus helveticus*: The proteolytic system. Front. Microbiol. 2013, **4**, 1-9
- 9) Pederson, J. A.; Mileski, G. J.; Weimer, B. C.; Steele, J. L. Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. J. Bacteriol. 1999, **181**, 4592-4597
- 10) Genay, M.; Sadat, L.; Gagnaire, V.; Lortal, S. PrtH2, Not prtH, Is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. Appl. Environ. Microbiol. 2005, **75**, 3238-3249
- 11) 渡邊正行, 宮本真理, 橋場炎, 中島肇. *Lactobacillus helveticus* の多様性: 伝統発酵乳中の *L. helveticus* 同士に「協力関係」が存在する可能性はある. ミルクサイエンス. 2015, **64**, 25-34
- 12) Miyamoto, M.; Ueno, H. M.; Watanabe, M.; Tatsuma, Y.; Seto, Y.; Miyamoto, T.; Nakajima, H. Distinctive proteolytic activity of cell envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* isolated from airag, a traditional Mongolian fermented mare's milk. Int. J. Food Microbiol. 2015, **197**, 65-71
- 13) Olofsson, T. C.; Alsterfjord, M.; Nilson, B.; Butler, È.; Vásquez, A. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isol. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014, **64**, 3109-3119
- 14) Stefanini, I.; Dapporto, L. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, **109**, 13398-13403
- 15) Sun, Z.; B. Harris, H. M.; McCann, A.; Guo, C.; Argimón, S.; Zhang, W.; Yang, X.; Jeffery, I. B.; Cooney, J. C.; Kagawa, T. F.; Liu, W.; Song, Y.; Salvetti, E.; Wrobel, A.; Rasinkangas, P.; Parkhill, J.; Rea, M. C.; O'Sullivan, O.; Ritari, J.; Douillard, F. P.; Paul Ross, R.; Yang, R.; E. Briener, A.; Felis, G. E.; de Vos, W. M.; Barrangou, R.; Klaenhammer, T. R.; Caufield, P. W.; Cui, Y.; Zhang, H.; O'Toole, P. W. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. Nat. Commun. 2015, **6**, Article 8322