

バイオテクノロジーと乳酸菌研究

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
巻/号	245
掲載ページ	p. 331-340
発行年月	1998年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



バイオテクノロジーと乳酸菌研究

佐々木 隆*

Biotechnology and Current Research on Lactic Acid Bacteria

SASAKI Takashi*

* Central Research Institute, Meiji Milk Products Co., Ltd.,
540, Naruda, Odawara Kanagawa 250-0862

近年、バイオテクノロジーの進展によって生命現象が深く解明され、次々に膨大な情報が得られた結果、旧来の生命観の変更が迫られるなどその影響は広く各分野に及んでいる。言うまでもなく、バイオテクノロジーはすでにわれわれの生活に深く根をおろしており、人類が受けている恩恵はきわめて大きい。たとえば、各種医薬品の製造をはじめ食品の加工や製造にもバイオテクノロジーが大いに役立っており、その利用は今後いっそう盛んになるであろう。食品製造と密接に関係する乳酸菌でも近年バイオテクノロジーが進展し、食品はもちろん健康関連分野でも乳酸菌の応用を目指す研究が活発に行われている。

食品の製造、研究などにたずさわる人間にとってバイオテクノロジーを正確に理解することはますます重要になると思われるが、この技術についてあまり詳しくない読者もおられると思い、本文ではまず微生物について簡

単な紹介をしたのち、バイオテクノロジー、特に細菌のバイオテクノロジーの理解に役立ついくつかのポイントについて私なりの解説を試みる。そして最後に、乳酸菌のバイオテクノロジーに関する動向を紹介したい。

本文は、本年2月4日に東京農業大学で開催されたIFT Japan講演会で行った話をもとにして気軽に読んでいただける読み物となることを目指して書いた。

1 細菌のバイオテクノロジー

(1) 微生物とは？

現在の地球上の生物を大別すると、動物・植物・微生物などに分類される。これらは同一の祖先から長時間にわたる進化の結果生まれたものである。すなわち、今から46億年前に地球が誕生したが、その後約十億年にわたる化学進化を経て最初の生命体（単細胞生物と考えられる原初生物）が生まれた（Fig. 1参照）。

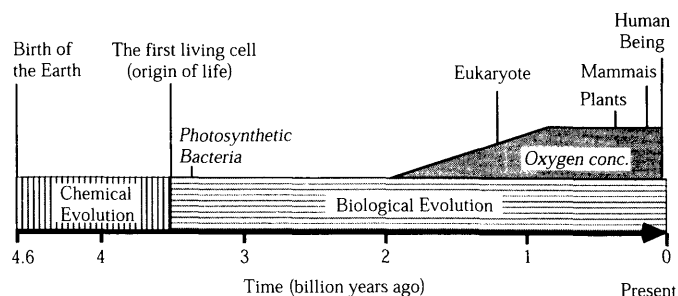


Fig. 1 Historical view of living things on the earth

その最初の生命体から派生し約35億年も長時間の末に、想像を超える多様で複雑な生物進化を経て子孫を残したのが現存する生物である。動物や植物は目に見えるのでその形も作用も理解しやすいが、微生物は人間の目には見えない小さな存在であるため日常生活で意識されることはほとんどない。

微生物の存在が認識されたのは、17世紀にオランダのレーウェン・フックが自作の顕微鏡で各種細胞や微小生物の形態を観察したのが最初だとされている。そして、微生物が自然発生するのではなく各々の親から生まれて増殖することや、微生物の中にはブドウ酒の発酵などを行う酵母のように人類に役立つものもあるが、コレラやペストなど伝染病の原因になるものもある、ということが理解されたのは19世紀後半になってからである¹⁾。

微生物は多様であり様々な作用を及ぼしているが、人間は自分の都合によって微生物を区別する。発酵食品や抗生物質など有用な物質を作ったり、環境浄化に役立つものなどを有用微生物(有用菌)と呼び、病気の原因となったり、毒素を生産し、または食品を腐らせるものなどを有害微生物(有害菌)と呼んでいる。

これまでに分離、同定され働きが解明された微生物は極めて多数にのぼる。そして、今までに得られた微生物の情報は膨大であり、ごく最近では大腸菌、枯草菌や酵母などいくつかの微生物の染色体DNAの全塩基配列が決定されるなど、微生物に関する知識の集積は目覚ましいものがある。しかし、これら人類が認知しているものは地上に存在する微生物のごく一部で、多くのものは未だに知られていないという。今後の研究によって地上の微生物の全貌が解明され、そして人類に有用な働きをする新しい微生物が次々と見つかることが期待される。

微生物は人類が誕生するはるか以前から長い時間をかけて多様に進化し、地上のあらゆるところで繁殖していた。Table 1には微生物が息する極限的環境の一部を示したが、微生物は多様でどこにでも存在し様々な働き

をしている。そしてごく小さい生き物であるが、微生物総体を地球規模で観察するとそのパワーは想像を超えるほど大きい。

一例をあげると、大気中の酸素が現在の濃度になり、ヒトをはじめとする高等生物が呼吸できるようになったのは微生物の作用のおかげである²⁾。今から20億年以上前の地球大気には酸素がほとんどなかった。進化の比較的初期の過程で、酸素を放出する微生物(光合成細菌)が出現し膨大な時間にわたる作用によって、大気中の酸素濃度が現在のレベルになった(Fig. 1参照)。そのおかげで、酸素呼吸をすることによって効率良くエネルギーを得る生物が現われ、ヒトの誕生へとつながった。もちろん現在では地上の緑色植物による酸素の放出も膨大であるが、海洋や湖沼などにいる無数の目に見えない微生物による酸素の放出は、依然として地球規模で重要なものである。

その他に、窒素や炭素などの元素の循環についても、また地球環境の維持にとっても、微生物が総体として果たしている役割はきわめて大きい。

(2) 微生物、細菌の持つパワーとは？

それでは、目に見えない小さな微生物がどうしてそのような強力なパワーを発揮できるのでしょうか？

その原因の第1は、多くの微生物が細胞分裂によって増殖するため、ネズミ算式に急速に増えることができるからである。

そのことを実感するために、大腸菌1個が最大速度で分裂する場合をシュミレートしてみよう。条件が良ければ大腸菌は約20分に1回ずつ細胞分裂できるが、細胞の大きさを(1×1×2 μm³: 1 μmは千分の1mm)と仮定すると、その重さは約2×10⁻¹² gとなる(Table 2)。最初は1個であるが、1時間後には細胞の総数は8個、2時間後には64個、3時間後には512個になる。この調子で細胞分裂を繰り返すと、12時間後には6.9×10¹⁰ 個、約0.14 gとなり細胞の塊が肉眼でも見えるよう

Table 1. Extreme conditions under which microbes can grow

Conditions	Range	Example of location
Temperature	-18 °C ~95°C	north and south poles; hot spring
Pressure	~1,400 atom.	deep sea, etc.
Dryness	almost always dry	desert, etc.
Osmotic pressure	nearly saturation nearly zero	Dead Sea, salty lake ; syrup fresh-water lake, etc.
pH	below 2 ~ 13	acidic spring ; alkaline lake

Table 2. Calculated total cell number and weight of bacterial cell which divides in every 20 min.

Hours	Total cell number	Total weight
0	1	2.0×10^{-12} g
1	8	
2	64	1.3×10^{-10} g
3	512	
4	4.0×10^3	8.0×10^{-9} g
6	2.6×10^5	
12	6.9×10^{10}	0.14 g
18	1.8×10^{16}	36 kg
24 (1 day)	4.7×10^{21}	9.4×10^3 ton
36	3.2×10^{32}	6.4×10^{14} ton
48 (2 days)	2.2×10^{43}	4.4×10^{25} ton

(The earth : about 6×10^{21} ton)

になる。そして18時間後には 1.8×10^{16} 個、約36kgに、24時間後には 4.7×10^{21} 個、約9,400tonにもなる。たった2日後にはなんと 2.2×10^{43} 個、約 4.4×10^{25} tonとなり、地球の重さ(約 6×10^{21} ton)の1万倍近くにもなってしまふ凄まじさである。もちろん、これは計算上のことで実際にはこのようなことは起こらない。

しかし、栄養や温度など生育条件がととのえば数十分に1回程度の速度で分裂する細菌はたくさんいるので、上記のように猛烈な速度で増殖することは、局所的にはあり得ることである。感染菌の増殖によって急激に病気が悪化したり、室温に放置した食品が一晩で腐ったりするのは、有害微生物がきわめて速く増殖した結果である。また、一方で、例えば乳酸菌や納豆菌、酵母、放線菌などが順調に増殖することによって、おいしいヨーグルトやチーズ、納豆、ビール、ワインなどの食品や、アミノ酸、抗生物質など有用物質が効率良く作られるのも、微生物のこの増殖力のおかげである。

微生物パワーの他の原因として、長時間の進化によってきわめて多様な性質をもつものが存在していること、さらに、環境の変化に応じて比較的容易に遺伝子を変化させたり、他の微生物から遺伝子を得て新しい環境に適応する性質を獲得できること、などもあげられる。

人類は微生物を認識する以前から、伝統的に微生物を活用してきた。食品について言えば、世界各地で作られている酒、漬物、その他多くの発酵食品の製造は、人類の誕生以前から存在していた微生物の中で、食品の製造や保存に役立つものを上手に培養して得られたものである。すなわち、発酵原料や容器に生息する有用微生物(酵母、麹かび、乳酸菌、納豆菌など)を植え継ぎ、そのパワーを利用して伝統的発酵食品が作られてきた。発

酵食品の中には、ビール、ワイン、日本酒、ヨーグルト、チーズ、味噌・醤油、食酢、漬け物などのように大量に工業生産されているものもある。

さらに、微生物によるアミノ酸や核酸、食品用の各種酵素などの生産も重要である。また、食品以外にも抗生物質をはじめ多くの医薬品や各種有用物質(乳酸、酢酸などの有機酸、酵素など)の製造、廃棄物処理などの環境浄化、さらには我々人間の腸内に定住して健康維持に働くなど、微生物はきわめて多様で重要な働きをしている。

これら各種の食品や有用物質の生産、腸内の生理に関与する数多くの微生物の分離、同定、生理、発酵方法などの解明や有用微生物の育種は人類にとって重要であり、古くから研究が行われてきた。目に見えない微生物ではあるが、そのパワーをうまく活用すれば有用な働きをさせることができる。そのため、バイオテクノロジーを活用する研究が精力的に進められている。

(3) バイオテクノロジーとは？

バイオテクノロジーとはなにか？。実は、この間に答えることはきわめて難しい。広義には生物を対照とする各種技術の総称であるが、一般には生命現象を解明し、または生物機能を利用するのに有用な最近の技術(遺伝子組換え技術、細胞融合技術、バイオリアクター技術、動植物のクローン技術など)を指す。そしてそれらの技術の中でも、特に「遺伝子組換え技術」を指す場合が多いようである。

遺伝子組換え技術が特に注目される理由は、他の方法ではできないことがこの技術で可能になり、応用性が広く効果が大きいからである。例えば、ヒト成長ホルモンを大腸菌などに大量に作らせ、医薬品として利用するこ

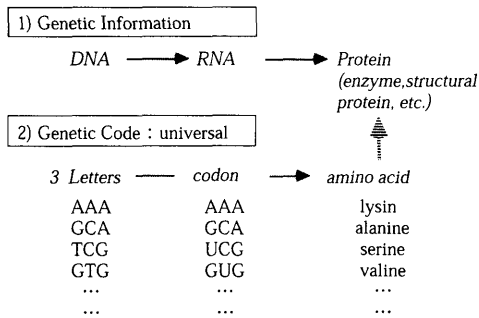


Fig. 2 Rules of genetic information

とは、従来の他の技術ではできなかったことである。

ではなぜこのようなことができるかといえば、地上の生物が基本的に同一の遺伝原理に従っているからである。すなわち、遺伝情報を核酸（主にDNA）に蓄えて子孫に伝えその情報からRNAや蛋白質を作り出し様々な生命現象を展開する、という基本原理は地球生物に共通である。しかも、遺伝情報が基本的に同じ暗号で書かれているので、ヒトが持つ遺伝情報が例えば大腸菌のような下等生物にも同じ情報として働く（Fig. 2参照）。すなわち、DNAは4種類の塩基がつながってできているが、塩基3個ずつの並びが1つの単位となって特定のアミノ酸に対応する。そして、塩基配列に対応して順々にアミノ酸の並び方が指定されタンパク質が作られる。このやりかたが生物に共通なのである。

これは、地球に誕生した最初の生命体が、ヒトをはじめ現存するすべての生物の共通の祖先と考えられるからである。すなわち、地上の動物・植物・微生物は原初生命体から同一の遺伝原理を受け継いでいるために、遺伝情報の内容・流れが基本的に同じなのである。これが、ヒトの遺伝子を大腸菌で発現させることのできる生物学的基礎である。

もちろん、ヒトのような高等動物と大腸菌のような下等な微生物には細胞構造や遺伝様式などに違い（壁）が存在するため、自然界で両者の遺伝子が行き来して発現することはない。遺伝子組換え技術によって、初めてこのようなことが可能になったのである。

さて前置きが長くなったが、細菌のバイオテクノロジーを理解するのに役立つポイントの解説に移ろう。遺伝子を細菌に導入して、酵素などのタンパク質を作る場合を例にして説明する。この場合、遺伝子は必ずしも細菌由来である必要はない。しかし、ヒトなど高等生物の遺伝子では、最終的にタンパク質となる遺伝情報が分断さ

れて存在する機会が多いので、こういう場合は、予めメッセンジャーRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを作成して、細菌が読める形に遺伝情報を書き換えておく必要がある。遺伝情報は全生物で基本的に同じなので、最終的にできるタンパク質のアミノ酸配列は同じになり同一のタンパク質ができる。

遺伝子を細菌に導入してその遺伝子から目的のタンパク質を作るためには、その細菌（宿主）で働く「プロモーター」と呼ばれる塩基配列が必要である。プロモーターは、遺伝子情報をもとにしてメッセンジャーRNAが作られる（転写という）反応を開始させるのに必要なもので、発現しようとする遺伝子の上流に結合する。プロモーターの配列はかなり共通しているが、種によって異なるので宿主に適するものを選ぶ必要がある。プロモーターは転写を調節するが、その種類によって、常に、または、ある限定条件下（リン酸や糖などの存否、培養温度など）でのみ転写を行わせることができる。さらにプロモーターによって、転写量（最終的には遺伝子の発現量、すなわち目的タンパク質の生産量）の制御を行うことができる。プロモーターの指令によってメッセンジャーRNAが作られるが、その終りを指令するのがターミネーターと呼ばれる塩基配列である（Fig. 3）。

次に、遺伝子をどのように宿主細菌の細胞内に導入するか、その方法について述べる。

まず、導入したい遺伝子を単離してベクターに結合する。ベクターとは多くの場合プラスミドDNAで、目的

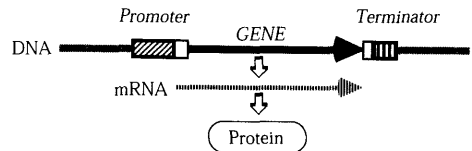


Fig. 3 A model of a bacterial gene structure and gene expression

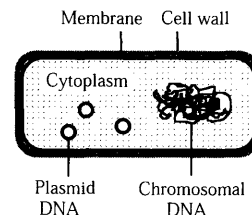


Fig. 4 A typical structure of a bacterial cell

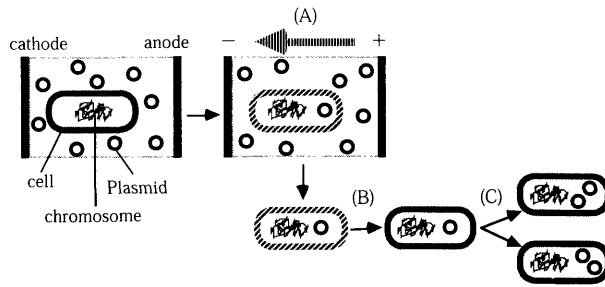


Fig. 5 Transformation by electroporation

Host cells and plasmid DNA are suspended in a hypertonic buffer.
 (A) A high-voltage electric pulse is discharged and cell surface is damaged temporarily. (B) Cell containing plasmid (transformant) is restored, and (C) cell division begins under a selective condition.

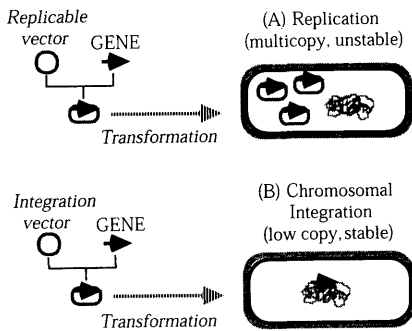


Fig. 6 Two ways of existence of the introduced gene in a bacterial cell

(A). Replication : the gene (black arrow) is multiplied owing to the replicable vector. (B). Chromosomal integration : the gene is integrated in the chromosome because the integration vector cannot replicate in the host. The integrated gene is duplicated according to the replication of the host chromosome.

の遺伝子を増幅し宿主に導入するための「運搬手段」である。プラスミドに目的遺伝子を結合して細胞内に導入（形質転換）するが、一般にプラスミドが細胞内にうまく入る確率はあまり高くない。そのため、細胞内でプラスミドが導入されて複製するもの（形質転換体という）を選ぶことが必要で、ベクターには抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーを付与しておく。

細菌の場合、細胞質膜の外側に多糖などからなる細胞壁という構造も持っているので (Fig. 4), 外からDNAを入れることはそれほど容易ではない。細菌の種類によって適用できるいくつかの方法があるが、効率よく多くの細菌に使える方法は、エレクトロポレーション法

(電気穿孔法) と呼ばれるものである (Fig. 5)。プラスミドDNAと宿主細胞を高張液に懸濁し、瞬間的に高電圧電気パルスを印可して、細胞表面構造を部分的に破壊し（孔をあけ）プラスミドを導入する方法である。この処理により宿主細胞はダメージを受けるが、注意深く培養すると、プラスミドが導入された細胞を増やすことができる。このような方法で、選択条件（抗生物質添加など）で生育する「形質転換体」を得ることができる。

さて、導入する遺伝子を宿主細胞中でどのように存在させるか大別して2つのやり方がある。1つは、導入したプラスミドを宿主細胞内で複製させる方法で、他は宿主染色体に組み込む方法である (Fig. 6)。どちらの方法を取るかは目的による。

前者は、宿主の細胞内で複製できるベクターを用い、導入した遺伝子から作られるタンパク質やペプチドを生産することを目的とする場合などに用いられる。ベクターや培養条件にもよるが、目的の遺伝子を細胞当たり数個から百個くらいに増幅できるのでタンパク質などの大量生産が期待できる。しかしこの方法の欠点は、導入したプラスミドの構造が変化したり、非選択条件下で失われるために不安定なことが多いということである。

一方、染色体組み込みは、宿主で複製できないベクターに目的の遺伝子を挿入して「組み込みプラスミド」を構築し、組換え反応によって宿主染色体に組み込ませる方法である。多くの場合、染色体と相同な塩基配列をベクターに付けて、宿主の組換え能を利用して（相同組換え）組み込み頻度を高める。この方法による遺伝子導入効率は、複製できるベクターの場合に比べると極めて低いが、その利点は、導入した遺伝子が細胞分裂に伴う染色体の複製と同調して複製されるため、安定に保持されることで

ある。ただし多くの場合、染色体に組み込まれるプラスミドは1ないし数コピー程度であるため、遺伝子の数を多くすることは難しい。

今までの微生物育種・改良は、自然界からの選抜、突然変異、または接合、プロトプラスト融合などで行ってきたため、目的とする性質をもつ改良株の作成はいわば運まかせて、きわめて困難な作業であった。しかし、遺伝子さえ取得できれば上記のような方法で、目的の遺伝子を導入したり、染色体の遺伝子を付加・交換・欠失したりできる。すなわち、バイオテクノロジーによって、産業的に有用な微生物を合理的かつ効率良く改良することが可能である。しかも遺伝的な改良を、宿主微生物の他の遺伝情報を変えずに実行できるので、産業的に有用な性質を残したまま育種ができる点が従来の技術より優れている。したがって、今後この手法が広く応用されることは確実であると考えられる。

以上が、細菌のバイオテクノロジー（遺伝子組換え技術）の理解に役立つと思われる簡単な解説である。これらを参考にして、以下を読んで頂きたい。

2 乳酸菌と人間のかかわり

(1) 乳酸菌とはなにか

乳酸菌は、食品製造をはじめ最も身近で有用な働きをする細菌で、今後も広い分野での応用が期待されている³⁾。

御承知のように、「乳酸菌」とは特定の菌種を指す科学用語ではなく、ある共通な性質を持つ一群のグラム陽性細菌の総称である。乳酸菌に共通な性質として、糖を代謝し多量の乳酸を生成する、嫌気条件や弱酸性でもよく生育する、アミノ酸やビタミンなど多くの栄養素を生育に要求する、運動性がなく孢子形成をしない、病原性がないなどであるが、なんとと言っても、我々の食生活とのつながりが強いことが特徴であろう。分類学の進展により、現在では乳酸菌は、*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Atopobium*, などの属に分類される⁴⁾。

乳酸菌は、世界中の数多くの発酵食品の製造に関わっている⁵⁾(Table 3)。乳を原料としてチーズ・ヨーグルトなど、畜肉・魚肉からは、発酵ソーセージ、アンチョビ、ふなずしなど、さらに植物を原料として、各種の漬物、味噌・醤油、日本酒・ワイン、サワーブレッドなどが作られる。これらの原料には多くの栄養素が含まれており、栄養要求性を示す乳酸菌が増殖するのに適しているため昔から住みついてきたと思われる。乳酸菌が関

Table 3. Foods fermented by lactic acid bacteria

Original food	Fermented food (feed)
MILK	Cheese, Yogurt, Kefir, Fermented butter
MEAT, FISH	Fermented sausage, Anchovy, Funa-zushi
VEGETABLE	Sauerkraut, Kimuchi, Takuwan, (Silage)
CEREALS	Wine, Sake, Miso, Soy sauce, Sour bread

わる発酵食品の数はきわめて多いが、逆に、日本酒の火落ちや生ビールの混濁など、乳酸菌が食品汚染の原因となることもある。

そのほかにも、乳酸菌は家畜の保存飼料であるサイレージの生産や、乳酸・デキストラン・ナイシンなどの有用物質製造にも使われる。また、一部の乳酸菌はヒトの腸内有用菌として働いているが、その作用を活かして整腸剤や乳酸菌製剤が作られている。

(2) 乳酸菌の利用と研究の歴史

以上のように乳酸菌は有用であり産業的にも重要な菌である。乳酸菌が発見されたのは今から百年ほど前であるが、人類はるか以前から乳酸菌を利用してきた。

ヒトが生まれ出たのは、微生物が進化し様々な環境で棲息し多様な作用を及ぼしている、いわば、地球が無数の微生物に満ちている中であつた。したがって、ヒトが誕生した時には乳酸菌はすでに現在と同様な働きをしていたと思われる。乳酸菌によって好ましく変化した食品（おいしく、保存性の増した発酵食品）を、人類は偶然発見し、自然の恩恵として享受した。

その後、これら乳酸菌による発酵食品を自らの手で作るべく人類は様々な工夫をしてきた。ヨーグルトのように発酵食品の一部を乳酸菌の「種(たね)」として使ったり、ワインなどのもとも原料に付着していた乳酸菌を知らずに利用し、数多くの経験から失敗の少ない製造法を確立していった。この過程は、いわば有用菌を同一条件で培養して望ましい菌株を選択する操作でもあった。乳酸菌の中にはこのような過程によって影響を受け変化したものがある（例えば、チーズ製造に用いられる乳酸菌のうちクレモリス菌は、自然界から分離されずほとんどチーズなど発酵乳製品にのみ存在する。いわば発酵乳を自らの棲息場所にしたかのようである）。

人類の移動に伴って乳酸菌はいろいろな所に伝播され、世界中で乳酸菌を用いた多様な発酵食品が作られるよう

になった。そして19世紀半ばになって、チーズなどの発酵乳製品が工業規模で作られるようになり、より良い製品を安定して大量に作るため乳酸菌の研究が本格的に進められた。

乳酸菌を発見したのは、かの有名なフランスのルイ・パスツールであり1857年のことである。その後、発酵乳製品をはじめ多くの発酵食品から乳酸菌が分離され分類が試みられ、近代的な研究が開始された⁶⁾。

初期の研究の中で特筆すべきものは、主として欧米の研究者によるチーズ製造用乳酸菌 (*Lactococcus*属) の研究である。チーズは、腐敗しやすい牛乳を原料として、乳酸菌の作用などで作られる栄養豊かな保存食である。チーズ製造は酪農国でもある欧米にとって経済的にきわめて重要であり、多くの研究が行われてきた。そして、チーズ乳酸菌の乳糖取込みと代謝、ならびに牛乳中のタンパク質分解、ペプチドの取込みとアミノ酸への分解などが詳細に研究された。また、チーズ製造は開放系で行われるため、ファージ (乳酸菌に感染するウイルス) の被害が甚大でその研究も盛んに行われた。さらに、チーズ製造に関わるいくつかの重要な性質 (カゼインなどを分解する蛋白質分解活性、乳糖の資化性、ファージに対する耐性、制限修飾活性、クエン酸資化性など) が、*Lactococcus*属ではプラスミド上の遺伝子にコードされていることが判明しプラスミドの研究が行われた⁷⁾。また、これらのプラスミドが、時として乳酸菌から失われチーズ製造停滞の原因となることも判明した。そして、プラスミドの接合伝達⁸⁾、乳酸菌ファージによる形質導入⁹⁾、プロトプラストによる細胞融合¹⁰⁾ や形質転換¹¹⁾ などの方法による育種が試みられた。

これら産業的应用を目指して行われた一連の研究は、今日の乳酸菌バイオテクノロジーの発展に直接つながる重要な研究成果となっている。

3 乳酸菌のバイオテクノロジー

乳酸菌のバイオテクノロジーは1980年代の研究によってその基礎が確立し、ここ十年ほどの間に次々と技術が開発されて、応用研究がさかんになった。食品製造はもちろん「健康」との関連で乳酸菌が持つ可能性が広く注目されていることを背景として、世界の多くの研究者がこの分野に加わり、急速に研究が進展している¹²⁾。

(1) 各種基礎技術の確立

技術的進展としてまず、エレクトロポレーション法 (前述のFig. 5 参照) による形質転換の成功が挙げられる。1987年に細菌では初めてインタクト細胞を用いた形質転換がチーズ製造乳酸菌 *Lactococcus lactis* (*L.*

lactis) で報告された¹³⁾。それまで乳酸菌では一部の例外を除いて形質転換が困難であったが、本方法によって乳酸菌のほとんどの属で形質転換が可能となった。制限修飾系を欠損した宿主を用いて1 μg DNAで 10^7 個もの形質転換体が得られる場合もある¹⁴⁾。

また、乳酸菌プラスミドをもとにして、乳酸菌用の広宿主域ベクターが構築され、様々な発現ベクター、分泌ベクターなども作られた。したがって、今のところ *Lc. lactis* をはじめとする一部の菌株では、異種遺伝子の導入やその発現がかなり自由に出来るようになった。

さらに、乳酸菌染色体への遺伝子導入法の確立も重要である。遺伝子操作した乳酸菌を食品などへ応用する場合、「安全性」が何よりも求められる。したがって、目的の遺伝子のみを染色体に組込んで、ベクターなど不要な配列が残らないようにする事が必要である。この基準を満たすものとして、2回の「相同組換え」を経て目的遺伝子を染色体に組込む方法¹⁵⁾ が用いられている。また、高温感受性の複製を示すベクター¹⁶⁾ を用いて、低温で形質転換体を1個以上得たのち、高温の選択条件で培養してプラスミドを染色体に組込む方法も用いられている。これは、形質転換効率が低い染色体へ直接遺伝子を組込むことが困難な「産業株」などへの応用に適する。

(2) 乳酸菌染色体の解明

各種の乳酸菌遺伝子がクローニングされ、多くの情報が集積している。特に、乳糖資化に関する遺伝子、カゼインなどを分解するプロテアーゼ遺伝子や各種のペプチダーゼ遺伝子、乳酸脱水素酵素遺伝子、ファージ耐性遺伝子、バクテリオシン関連遺伝子、など産業的利用と関連が深い多くの遺伝子が解明されている。

またここ数年の間に、いくつかの乳酸菌の染色体制限酵素地図が作成され、乳酸菌染色体が環状で約1.8~2.6 Mbの大きさであることが判明した¹⁷⁾。制限酵素地図上に、すでに解明された遺伝子や細菌で広く保存されている遺伝子がマップされて、乳酸菌で初めて染色体地図が作成された。接合や形質導入などの手法が使えないため作成できなかった乳酸菌の染色体地図が作られた意義は大きい。

最近、大腸菌、枯草菌や酵母をはじめ各種の微生物で染色体の全塩基配列が決定されたが、乳酸菌でもゲノム解析計画が進行中である (Table 4)。早ければ今年中にも、乳酸菌で初めて染色体全塩基配列が決定されると思われる。ただし、多くの計画は食品企業などがからんでいるため、塩基配列情報が自由に利用できるかどうかはわからない。いずれにせよ、染色体の全塩基配列情報が得られるようになれば、乳酸菌バイオテクノロジーの

Table 4. Genome Project of Lactic Acid Bacteria

Stage	Species or strain (Nation ; Organization)
In Progress	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403 (France ; INRA & dairy company ?) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (U. S. A. ; North Carolina State Univ. & companies?) <i>Lactobacillus johnsonii</i> (Switzerland ; Nestle S. A.)
Planned	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (EU, The Netherlands ; Univ. of Groningen)
Uncertain	<i>Streptococcus thermophilus</i> (?) <i>Lactobacillus acidophilus</i> (?) (Europe; food companies?)

基礎および応用研究は確実に新たな段階に突入し、より一層の進展が期待できる。

(3) バイオテクノロジーの研究例

乳酸菌バイオテクノロジーの応用研究は世界中で精力的に行なわれている。そのうちのほんの少数であるが、いくつかの例を紹介する。

① 乳中では遊離アミノ酸の量が少ないので、乳で生育する乳酸菌はカゼインなどの蛋白質を分解してアミノ酸を補給しなければならない。チーズ製造乳酸菌 *Lc. lactis* ではこの反応系が詳細に調べられた。

細胞表層に結合する蛋白質分解酵素の遺伝子がプラスミドにコードされていることが判明した¹⁸⁾ が、本遺伝子を染色体に組込んで安定化し、同時に遺伝子増幅によって蛋白分解活性を増強した研究がある¹⁹⁾。また、ペプチドを細胞内に取込む系や、細胞内に存在する各種のペプチダーゼとそれらの遺伝子も解明され、遺伝子破壊によって各々の役割までが検討されている²⁰⁾。

これらの研究の応用として、例えば苦味ペプチドを作らない菌株を育種するなど、チーズの香味改良に役立つ研究が進んでいる。そのほか、発酵停滞の原因となるフェージに対する耐性を付与する研究など²¹⁾、チーズ乳酸菌の改良を目指す研究は欧米で広く行われ、実用まであと一歩の所に来ている。

② 一部の乳酸菌は、近縁菌に対して抗菌作用を示すペプチド (バクテリオシン²²⁾) を産生する。その中でもナイシンは、欧米を含む多くの国で汚染菌を抑えるための防腐剤として使われている。その生産及び免疫に関する遺伝子がクローニングされ、蛋白質工学を用いて改変して活性を高めたり抗菌スペクトルを広げるなどの試みが行なわれている。

また、ナイシン自身が、ナイシンの産生をポジティブに制御することが判明した²³⁾。すなわち、細胞外に分泌されたナイシン分子が細胞表層にあるレセプターに結合し、その情報が細胞内に伝達されて、ナイシンのプロモーターが活性化される。この現象を応用して、蛋白質の大量発現を目指す研究が活発に行われている。すなわち、目的の蛋白質遺伝子にナイシンプロモーターをつけ、このプラスミドで形質転換した株を、生育が阻害されなごく低濃度のナイシンを加えて培養すると、プロモーターが活性化されて蛋白質が大量に作られる²⁴⁾ 例が示され、広い応用が期待されている²⁵⁾。

③ 遺伝子操作で改良した乳酸菌を食品に応用する場合、「安全性」が必須要件である。実験的に選択マーカーとして用いられている抗生物質耐性遺伝子ではなく、食品に応用できる「安全な選択マーカー」が求められる。乳酸菌由来のバクテリオシン耐性遺伝子、糖代謝遺伝子、核酸合成酵素遺伝子など、種々の検討が行なわれている。

また、前述の様に、2回の相同組換えで目的の遺伝子のみを染色体に導入して安全性を確保する試みも種々行なわれている。筆者らのグループは、ヨーグルト生産菌であるブルガリア菌染色体の乳酸脱水素酵素 (LDH) 遺伝子を、同じヨーグルト生産菌であるサーモフィルス菌のLDH遺伝子と交換してL-乳酸を生成する株 (遺伝子交換株) を作成した²⁶⁾。元の株と比べると、LDH遺伝子のみが異なっていることが確かめられたため、このような育種法は安全性確保に適しているといえる。

④ さらに、新しい応用として注目すべきものは、乳酸菌を抗原運搬体とする「経口ワクチン」の開発であり、乳酸菌が多量に経口摂取しても安全である点を活かそうとしている²⁷⁾。各種の方法が検討されており、目的の抗

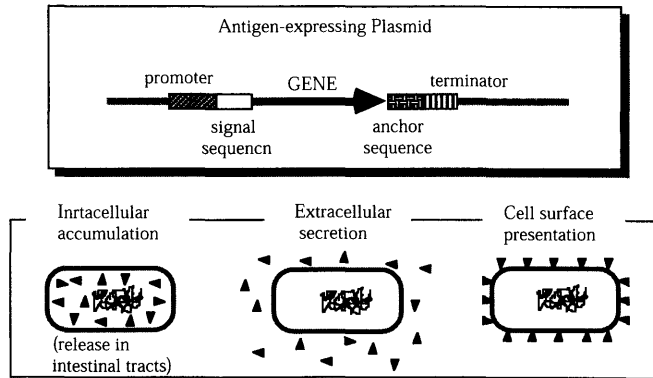


Fig. 7 Antigen-expressing plasmid (upper) and three tactics (below) for production of the antigen molecules (closed triangles)

原を細胞内で作らせ腸内で乳酸菌が溶菌する時に放出する、菌体外に分泌生産し直接経口的に摂取する、あるいは膜アンカーシグナルを利用して乳酸菌細胞表層に抗原分子を提示する、などである (Fig. 7)。

主に欧州の研究機関で研究が進められているが、多くの抗原蛋白質・ペプチドの発現が試みられ、動物実験で効果が確かめられたものもあり今後の展開が期待される。

⑤ 食品以外のほかの例として、家畜の保存飼料であるサイレージ生産を効率良く進めるために、乳酸菌に植物多糖を分解する酵素の遺伝子を導入した研究などがある²⁸⁾。

また、乳酸を原料とする生分解性の「ポリ乳酸樹脂」の生産も注目される。これには乳酸生成効率の良い菌株が使われているが、遺伝子操作によってさらに生産効率が上がればコストが低下して生分解性樹脂の消費が増大し、地球環境の保全に寄与することも考えられる。

おわりに

以上、数例で不十分ではあるが、乳酸菌のバイオテクノロジーが近年急速に進展している姿を紹介したつもりである。今まで困難だった産業株の育種はもはや単なる夢ではなく、合理的な設計さえできれば実現可能な課題となっている。

遺伝子操作を応用して、既存食品については失敗のない効率的な生産、香味など品質の改良を進めることが充分期待できる。さらに将来の応用として、乳酸菌の持つ顕在的及び潜在的な可能性を最大限に引き出し、健康関連分野で活用することが有望である。乳酸菌に「健康生理効果」のある蛋白質やペプチドを作らせ、健康の維持・増進効果をもつ食品を作り出すことも可能であろう。

今のところは実用例はないが、おいしく体に良い乳酸菌発酵食品や、乳酸菌を利用した新しい医薬品が作られ、人類に多くの貢献をするを期待される。もちろん遺伝子操作した乳酸菌株を応用するには、なんといっても安全性の確保が大前提であり、開発にあたっては慎重な科学的検討が必須である²⁹⁾。今までの研究によって、食品製造に用いてきた乳酸菌の遺伝子のみを使い、安全な方法で乳酸菌を改良する技術は確立しつつある。乳酸菌には多くの可能性と未来がある、と筆者は信じている。乳酸菌についてもっと詳しく知りたい方は、書籍「乳酸菌の科学と技術」(学会出版センター)を参照することをお勧めしたい。

なお、前半の解説が長くなったが少しでも参考になると感じていただければ幸いです。

文 献

- 1) 柳田友道：微生物科学第1巻 (学会出版センター、東京)、p.30 (1980)
- 2) 中村桂子ら監訳：細胞の分子生物学第3版 (ニュートンプレス、東京)、p.16 (1995)
- 3) 森知敏樹：ミルクサイエンス、**46**, 1 (1997)
- 4) 鈴木健一郎：乳酸菌の科学と技術 (学会出版センター、東京、乳酸菌研究集談会編)、p.37 (1996)
- 5) 橋場炎ら：乳酸菌の科学と技術 (前出)、p.229 (1996)
- 6) SANDINE W. E. : *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 205 (1987)
- 7) MCKAY, L. L. : *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 259 (1983)
- 8) GASSON, M. J. and DAVIES F. L. : *J. Bacteriol.*,

- 143, 1260 (1980)
- 9) ALLEN, L. K. *et al.* : *J. Dairy Res.*, **30**, 351 (1962)
- 10) GASSON, M. J. : *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 99 (1980)
- 11) KONDO, J. K. and MCKAY L. L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1213 (1984)
- 12) 佐々木隆 : バイオサイエンスとインダストリー, **53**, 950 (1995)
- 13) HARLANDER, S. K. : "Streptococcal Genetics" (ASM, Washington D. C.), p.229 (1987)
- 14) HOLO, H. and NES I. F. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3119 (1989)
- 15) 佐々木泰子 : バイオサイエンスとインダストリー, **52**, 106 (1994)
- 16) BISWAS, I. *et al.* : *J. Bacteriol.*, **175**, 3628 (1993)
- 17) LE BOURGEOIS, P. *et al.* : *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 109 (1993)
- 18) KOK, J. : *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 15 (1990)
- 19) LEENHOUTS, K. J., *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2568 (1991)
- 20) KUNJI, E.R.S., *et al.* : *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 187 (1996)
- 21) HILL, C. : *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 87 (1993)
- 22) NES, I. F., *et al.* : *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 113 (1996)
- 23) PASCALLE, G. G. A, *et al.* : *J. Bacteriol.*, **178**, 3434 (1996)
- 24) KUIPERS, O. P., *et al.* : *Trends Biotechnol.*, **15**, 135 (1997)
- 25) EICHENBAUM, Z., *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2763 (1998)
- 26) 佐々木隆・佐々木泰子・伊藤喜之 : ミルクサイエンス, **47**, 77 (1998)
- 27) WELLS, J. M., *et al.* : *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 317 (1996)
- 28) FITZSIMONS, A., *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3529 (1994)
- 29) VERRIPS, C. T. and D. VAN DEN BERG J. C. : *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 299 (1996)
-