Microb. Resour. Syst. **33**(1): 31-37, 2017

技 術 報 告

ユーザーの求める機能性乳酸菌株のオンライン選抜システムの開発

田中尚人[1)]*，宮崎　智[2)]，鈴木智典[1)]，冨田　理[3)]，梶川揚申[1)]，内野昌孝[1)]，
五十君靜信[1)]，岡田早苗[4)]

[1)]東京農業大学応用生物科学部　〒156-8502　東京都世田谷区桜丘 1-1-1
[2)]東京理科大学薬学部　〒278-8510　千葉県野田市山崎 2641
[3)]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門　〒305-8642　茨城県つくば市観音台 2-1-12
[4)]木曽町地域資源研究所　〒397-8588　長野県木曽郡木曽町福島 2326-6

東京農業大学菌株保存室（NRIC）は独自に分離した多くの乳酸菌株を有する．これら菌株に付加価値を付与し，応用利用に展開させるための有用な菌株情報の充実化とそのデータベース化および検索システムの開発を行った．供試菌株は食品へ利用可能な条件を有する 1,891 株を用い，プロバイオティクス特性や各種有用物質生産，糖類発酵能などのデータを実験により収集した．試験項目は 81 項目であり，各項目のデータは質的データや量的データである．検索システムは完全一致方式とし，量的データはデータに基づく性状の優劣を記号で表現した質的データに変換し，ユーザーが直感的に検索できるような仕組みを構築した．本検索システムはホームページに公開し，保存菌株からユーザーが求める機能性乳酸菌株を選抜することを可能にした．

1．はじめに

カルチャーコレクションは菌株の品質を保ちながら保存することに加えて，今後は保存株の活用による社会貢献も求められる．微生物資源の有効活用を促進するには，菌株情報のオンラインでの公開とユーザーが求める性質をもつ候補菌株をいかに早く提案できるかにある．そこで，有用性の幅広い乳酸菌をモデルケースとして，求める性質を有する菌株を検索するシステムを開発したので報告する．

東京農業大学菌株保存室（NRIC）は独自に分離した 5,000 株以上の乳酸菌株を有する．乳酸菌は有機酸やバクテリオシン，γ-アミノ酪酸（GABA）などといった食の風味や保存，そして健康効果にかかわる多くの有用物質の生産能と菌体そのものの機能性が報告されており（藤澤ら，2010；木村ら，2010；米山ら，2010），有用な微生物資源の一つといえる．そして，有用な性状や機能は菌株レベルで多様である．NRIC 保存株の 5,000 株のなかにはまだ潜在的に価値のあるものが存在することが期待されている．

一方で，乳酸菌の性質を利用した分離手法が一般的になった現在では，企業や公的研究機関でも応用利用に向けた分離が盛んに行われている．しかし，乳酸菌を分離し機能を評価し，目的の菌株を獲得することは時間やコストの面で負担が大きい．この問題解決に NRIC が保有する乳酸菌株の分譲が貢献できると考え，保有株の性質をデータベース化し，ユーザーにオンラインで情報を提供することで微生物資源である乳酸菌株の活用を推進するためのシステムを開発することとした．

2．供試菌株と性状項目の設定

NRIC が保有する乳酸菌株のうち，国際酪農連盟が提示した食への応用利用に適していると判断できる菌種（Bourdichon *et al*., 2012）および分離源が食品である 1,819 株を本研究の供試菌株とした．種の同定は 16S rRNA 遺伝子配列に基づき行った．

ユーザーが求める機能性乳酸菌株の選抜に有用な情報として，学名や分離源，分類学的な指標でもある pH 耐性，温度耐性や各種糖類発酵性，さらに多糖産生，プロバイオティクス特性，抗生物質耐性，各種有用物質生産など表 1 に示す 81 の性状項目（data items）を設定した．

3．各種性状項目試験

供試菌株に対して以下（1）～（7）の応用利用に必要

*Corresponding author
E-mail: n3tanaka@nodai.ac.jp

表 1　Data items in a hierarchical database in this study

Large Field	Medium Field	Small Field
General Information	General	NRIC
		TUA
		Isolation source
		Species
		Accession No.
		16S rDNA sequence
		Shape
		Fermentation type
		Isomer of lactic acid
		Peptidoglycan type
		Motility
		Nitrate reduction
	Litmus test	Acidification (Litmus)
		Reduction (Litmus)
		Coagulation (Litmus)
		Liquefaction (Litmus)
	Initial pH	pH 3.5
		pH 4.0
		pH 4.2
		pH 4.5
		pH 4.8
		pH 5.0
		pH 6.0
		pH 7.0
		pH 7.5
		pH 8.0
		pH 8.5
		pH 9.0
		pH 9.6
	Temperature	Temp 10
		Temp 15
		Temp 20
		Temp 25
		Temp 30
		Temp 37
		Temp 40
		Temp 45
		Temp 50
	Fermentation of sugar	Arabinose
		Ribose
		Xylose
		Gluconate
		Glucose
		Fructose
		Galactose
		Mannose
		Rhamnose
		Cellobiose
		Lactose
		Maltose
		Melibiose
		Sucrose
		Raffinose

表 1 Continued

Large Field	Medium Field	Small Field
General Information	Fermentation of sugar	Salicin Trehalose Melezitose Mannitol Sorbitol Starch Sugar free
	NaCl tolerance	5% NaCl 6.5% NaCl 10% NaCl
Polysaccharide	Wall Teichoic acid/Anionic CPS	Detection/Type
	Neutral CPS	Detection
	EPS	Production
Probiotic trait	Probiotic potential	Acid tolerance Bile tolerance Mucin adherence
	Immunological property	IL-12p40 induction
Resistance	Antibiotic	Ampicillin Vancomycin Gentamicin Kanamycin Streptomycin Erythromycin
Antimicrobial activity	Bacteriocin production	Against Escherichia coli Against Micrococcus luteus
Product	Production	GABA Vanillin from ferulic acid
	Degradation	Ferulic acid

な情報や期待される有用な性状を試験し，合計で 81 の性状項目の情報を収集した．基本培地にはいずれも Difco Lactobacilli MRS 培地（日本 BD）を用いた．

(1) 発酵生産への利用において重要な情報となる各種糖類発酵性試験や生育 pH 試験，生育温度試験およびその他一般的な分類学的指標となる供試菌株の性状試験は乳酸菌実験マニュアル（小崎ら，1992）に従った．データは量的データと質的データからなる．(63 項目)

(2) 多糖産生については，菌体外多糖（EPS），細胞壁多糖（WPS），細胞壁テイコ酸（WTA）の3種類の産生の有無を調べた．いずれも供試菌株を定常期まで培養後，EPS 産生は遠心分離後の沈殿物の粘性により判定した．WPS と WTA については，Tomita *et al.*（2009）の方法に従い細胞壁多糖画分を分画し，DEAE-Toyopearl 650M（Tosoh）を用いて中性画分と酸性画分に分画後，それぞれの画分に多糖が含まれるかフェノール硫酸法で検出した．中性画分で検出された場合は中性 WPS 産生，一方，酸性画分で検出された場合は WTA もしくは酸性 WPS 産生と判定した．加えて，酸性画分については，Tomita *et al.*（2012）の方法に従い，NMR を用いて多糖の構造を推定した．データは質的データである．(3 項目)

(3) プロバイオティクス特性については，供試菌株がヒトに摂取された後，生菌体のまま小腸まで到達し免疫調節作用を示すプロセスを想定し，胃酸耐性，胆汁酸耐性，ムチン接着性，IL-12p40 誘導能を試験項目として定めた．そして供試菌株の胃酸耐性試験は Kimoto *et al.*（1999）の方法，胆汁酸耐性試験は Hernandez-Hernandez *et al.*（2012）の方法を，ムチン接着性試験は Muñoz-Provencio *et al.*（2009）の方法で行った．IL-12p40 誘導能試験はヒト単球性白血病細胞（THP-1）を用い，Drago *et al.*（2010）の方法で行った．いずれのデータも量的データである．(4 項目)

(4) 薬剤耐性は水平伝播による他の微生物への拡散の危険性があるため，菌株に耐性がないほうが望ましいとされている．抗生物質耐性試験は BD センシ・ディスク（日本 BD）を用いて，アンピシリン，エリスロマイシン，ゲンタマイシン，カナマイシン，ストレプトマイシン，バンコマイシンの 6 種類に対する供試菌株の耐性を調べた．データは質的データである．(6 項目)

(5) 食品の保存性を高める効果が期待される供試菌株のバクテリオシン産生は spot-on-lawn 法（Ennahar *et al.*, 2001）により判定した．指示菌にはグラム陰性細菌とグラム陽性細菌の各代表種として *Escherichia coli* JCM 18426 および *Micrococcus luteus* NRIC 1094^{T} を用いた．データは質的データである．(2 項目)

(6) 近年，乳酸菌を用いた発酵食品に付加価値を与える GABA 産生能を評価した．GABA 産生能は上野ら（2007）が報告した薄層クロマトグラフィーによる方法で判定した．データは質的データである．(1 項目)

(7) 植物原料に含まれるフェルラ酸の還元能または脱炭酸能，加えてその産物の一つとして風味への関与が知られているバニリンまたはその前駆体（古川・片倉，2012）の産生能は以下の条件で検討した．基本培地に終濃度 100 μg/m*l* のフェルラ酸を添加した培地で供試菌株を 48 時間培養し，培地中のフェルラ酸の減少およびバニリンの産生を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて判定した．HPLC は LC-10 システム（Shimadzu）を使用し，カラムは Shodex C18M 4E（Showa Denko），溶離液は水，アセトニトリル，メタノール，酢酸（74.7:15:10:0.3, v/v/v/v）とした．カラム温度は 40℃，流速は 0.8 m*l*/min とした．物質の検出波長は，フェルラ酸は 321 nm，バニリンは 254 nm とした．データは質的データである．(2 項目)

4．データベース構築

供試菌株の性状データのデータベースを構築し web 上に公開してキーワード検索を可能とするシステムを構築した．ユーザーが 81 の性状項目に対して効率的に検索できるようなシステムとするために，データベースは表 1 に示した大項目（Large Field），中項目（Medium Field），小項目（= 性状項目，Small Field）のツリー構造からなる階層型データベースとした．すなわち，供試菌株の小項目に対するデータ（= 性状データ）がまとめられたデータベースである．

性状データは質的データと量的データが混在している．質的データは“球菌”か“桿菌”かといった選択的なデータと性状の有無や強弱を示す“+”と“–”で表すデータがある．このような質的データはユーザーの直感的なキーワード検索が比較的容易である．しかし，量的データは実験測定値であり，数値をキーワードとすることになる．測定値はユーザーにとって重要な情報だがキーワード検索として設定するのは難しいため，量的データを質的データに変換するためのパラメータ設定を管理者権限で行えるようにした．図 1 に示すようにパラメータごとに“code 番号”を付与して

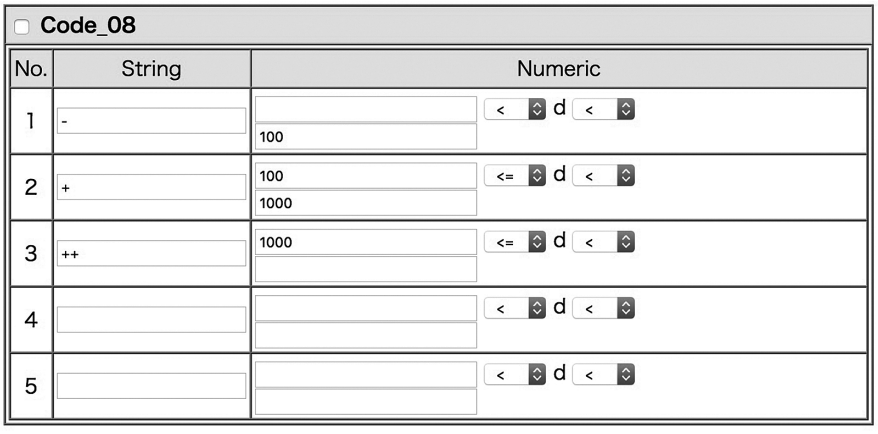

図 1　Screen shot of a parameter settings window. In this example, parameters for Code_8 are set. Quantitative data are delimited and assigned qualitative values: “–” for <100; “+” for ≥100 to <1000; “++” for ≥1000.

それぞれの設定を行う．そして，パラメータは性状項目によって異なるため，性状項目ごとに該当する“code 番号”を指定する仕組みとした．その結果，管理者権限で実験測定値（量的データ）を強弱や優劣に区分することで質的データに変換し，“+”や“–”の記号を定めた値の範囲ごとに与え code で管理することが可能となった．加えて，質的データも同様に code で管理することとした．したがって，データベース上のすべての小項目のデータが code で管理される質的データとなり，次に述べるキーワード検索システムでユーザーが直感的なキーワード検索ができることとなった．

５．キーワード検索

キーワード検索は基本的に完全一致検索である．例外の小項目である菌株番号（NRIC）や種名（Species）は部分一致検索である．検索システムのキーワード設定画面を 図２に示す．ユーザーが検索対象の性状項目を指定するためには，最初に Large Field で大項目をプルダウンで指定し，続いて Medium Field では指定大項目に割り当てられた中項目がプルダウンのリストに表示されるので選択して指定し，小項目（Small Field）も同じくプルダウンで指定する．キーワードとなる性状データは，前述のとおり小項目ごとにそれぞれ異なる．したがって，小項目が指定されたときは，その小項目に割り当てられた code をキーワードとしてプルダウンで選択できるようにした．

本システムは１つの小項目に対して最大５つまでキーワード（性状データ）の設定が可能で，複数のキーワードが設定された場合は OR 検索により該当菌株を抽出する．そして，検索対象とする小項目（性状）は最大５つまで指定可能で，複数の小項目を指定した場合は AND 検索によりすべての小項目のキーワード条件を満たした菌株が抽出される．たとえば，図２の指定は pH 4.0 できわめて良好に生育し，かつ，強弱は問わずアラビノース発酵能を有し，かつ IL-12p40 誘導能がある菌株が抽出されることになる．

検索結果では図３に示すように該当菌株のリストが基本情報と検索対象の性状のデータとともに表示される．リストに表示される TUA 番号（菌株番号）をク

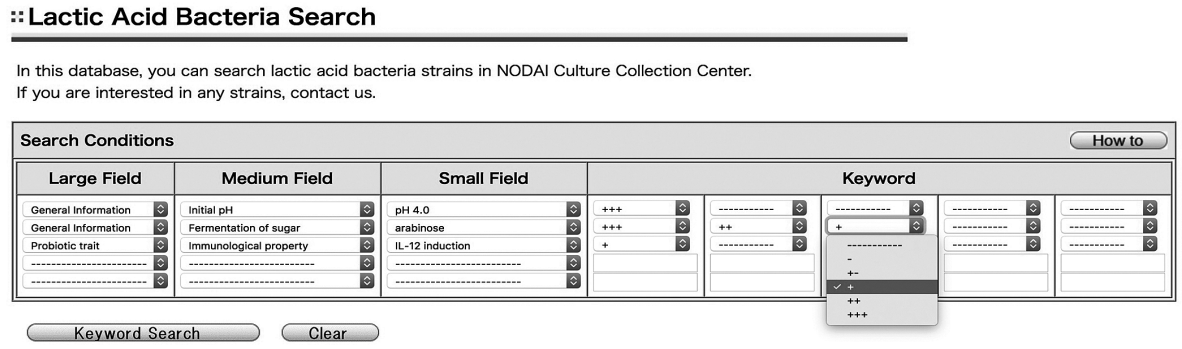

図２ Screen shot of a keyword settings window. In this example, the first keyword is “+++” for growth ability at pH 4.0; the second keywords are “+++”, “++”, or “+” for ability to ferment arabinose; and the third keyword is “+” for ability to induce IL-12p40. Strains fulfilling all three keyword conditions are extracted from the database by keyword search, where “+” indicates positive and “–” indicates negative.

Results 3

General Information	General Information	General Information	General Information	General Information	General Information	Probiotic trait
General	General	General	General	Initial pH	Fermentation of sugar	Immunological property
NRIC ▲▼	TUA ▲▼	Isolation source ▲▼	Species ▲▼	pH 4.0 ▲▼	arabinose ▲▼	IL-12 induction ▲▼
	0888L	Olive preserved in salt	Lactobacillus nagelii	+++	+	103.7
	1009L	Murcha	Lactobacillus paracasei	+++	+	182.1
1761	1750L	Goishi-cha	Lactobacillus plantarum	+++	+++	393

図３ Screen shot of search results window. This example shows strains growing well at pH 4.0, able to grow on basal medium containing arabinose as a carbon source, and able to induce IL-12p40. The results include species name and isolation source of listed strains. NRIC assigns 1 or 2 numbers to strains: the NRIC public number and the TUA internal number.

リックすると菌株についての詳細データの閲覧が可能である．検索システム上で質的データに変換された小項目のデータは，検索結果のリストにおいてはデータベース上の量的データが表示されるので，実データが確認できる．また，それぞれの小項目の量的データの数値の意味については，“How to”画面で確認できる．

6．まとめ

本研究で開発した機能性乳酸菌株の選抜システムは http://www.ps.noda.tus.ac.jp/labdb/jsps/index.jsp に公開した．このシステムは多数の供試菌株から目的の性質をもつ菌株を効率的に抽出する新たなシステムである．ユーザーは検索してヒットした菌株の分譲を希望する場合，NRIC にコンタクトを取り（web 画面の Contact Us），研究利用目的（商品開発のための研究も含む）または商業利用目的のための契約手続きをする．

今後，NRIC では登録株数を増やしていくことに加えて，たとえばバクテリオシン試験では指示菌の追加や新たな有用物質産生能の追加など試験項目も増やしていく予定である．また，検索システムについても完全一致検索では複数の性状を検索対象にするとヒットしない確率が高くなるので，完全一致しなくてもユーザーが求める性状に最も近い菌株を提示できるようなシステムの改良も検討している．

データベースの項目設定は管理者権限で追加や変更ができるフレキシブルなものとしている．菌株の性状データの更新は csv ファイルのアップロードで行える簡単な仕組みとなっている．今回は機能性乳酸菌株の選抜システムとしてデータベースと検索システムを開発したが，このシステムはどのような微生物資源も有用性状を菌株ごとに表にまとめることができれば基本的に同様に対応できる．このシステムが微生物資源の活用に貢献することを期待する．

謝　辞

本研究開発は東京農業大学総合研究所の大学戦略研究プロジェクトの助成金により実施された．

文　献

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S. & Hansen, E.B. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. Int. J. Food Microbiol. **154** (3): 87–97.

Drago, L., Nicola, L., Iemoli, E., Banfi, G. & De Vecchi, E. 2010. Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an *in vitro* model. BMC Res Notes **3**: 44.

Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. Int. J. Food Microbiol. **70** (3): 291–301.

藤澤倫彦，中村康則，早川和仁，近藤しずき，細野明義，八村敏志，保井久子，福島浩平，鈴木秀幸，高橋賢一，志田　寛，清水金忠，榎本雅夫，何　　方，原田　岳，飯野久和，信田幸大，鈴木重徳，五十君靜信 2010．第 7 章 プロバイオティクスの機能と利用，日本乳酸菌学会（編），乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス，p. 495–541，京都大学学術出版会，京都．

古川壮一，片倉啓雄 2012．乳酸菌と酵母の共存と共生．日本生物工学会誌　**90**(4)：188–191.

Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F.J., Montilla, A., Sanz, M.L. & Ricke, S.C. 2012. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. Food Microbiol. **30** (2): 355–361.

Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S. & Okamoto, T. 1999. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. Lett. Appl. Microbiol. **29** (5): 313–316.

木村勝紀，福井宗徳，佐々木泰子，瀬戸泰幸，橋場炎，島川康久，安田源太郎，岡田早苗，根岸晴夫，遠藤明仁，丸山佳美，若井芳則，柳田藤寿，前村久，樋口　猛，蔡　義民，善藤威史，園元謙二，鈴木康司，土居克実，門多真理子，左古知行，桜井稔三，緒方靖哉 2010．第 5 章 乳酸菌・ビフィズス菌の食品・家畜飼料中での挙動と利用，日本乳酸菌学会（編），乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス，p. 367–410，京都大学学術出版会，京都．

小崎道雄，内村　泰，岡田早苗 1992．同定項目（形態的性質・生理的性質），乳酸菌実験マニュアル―分離から同定まで，p. 29–72，朝倉書店，東京．

Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolín, M., de Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G. & Monedero, V. 2009. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. Arch. Microbiol. **191** (2): 153–161.

Tomita, S., Furihata, K., Nukada, T., Satoh, E., Uchimura, T. & Okada, S. 2009. Structures of two monomeric units of teichoic acid prepared from the cell wall of *Lactobacillus plantarum* NRIC 1068. Biosci. Biotechnol. Biochem. **73** (3): 530–535.

Tomita, S., Furihata, K., Tanaka, N., Satoh, E., Nukada, T. & Okada, S. 2012. Determination of strain-specific wall teichoic acid structures in *Lactobacillus plantarum* reveals diverse α-D-glucosyl substitutions and high structural uniformity of the repeating units. Microbiology **158** (11): 2712–2723.

上野義栄，平賀和三，森　義治，小田耕平 2007．漬物から γ-アミノ酪酸（GABA）高生産性乳酸菌の分離とその応用．生物工学会誌　**85**(3)：109–114.

米山史紀，善藤威史，園元謙二，川井　泰，荒川健佑，齋藤忠夫，森田英利，田中　治，山本直之，早川和仁，小原仁実，遠野雅徳，北澤春樹，北条研一 2010．第 4 章 乳酸菌・ビフィズス菌の産生する有用物質，日本乳酸菌学会（編），乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス，p. 309–360，京都大学学術出版会，京都.

Online system for screening functional lactic acid bacteria strains

Naoto Tanaka[1)], Satoru Miyazaki[2)], Tomonori Suzuki[1)], Satoru Tomita[3)], Akinobu Kajikawa[1)], Masataka Uchino[1)], Shizunobu Igimi[1)] and Sanae Okada[4)]

[1)]Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture,
[2)]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,
[3)]Food Research Institute, The National Agriculture and Food Research Organization,
[4)]Institute of local resources of Kiso Town

We developed an online system for screening of functional lactic acid bacteria (LAB) strains deposited in the NODAI Culture Collection Center (NRIC). We defined 81 characteristics as desired and useful functions of LAB and characterized 1819 strains by experiments. Characteristics include the ability to tolerate stresses, the production of functional materials, carbon assimilation, and probiotic traits. We constructed a hierarchical database of LAB strains with both qualitative and quantitative data. As it is difficult to query on quantitative data with search algorithms designed to find exact matches, the quantitative data are converted to qualitative data on the basis of data characteristics. The user can retrieve useful strains of interest by simple keyword search using only qualitative data such as "+" and "–" and can efficiently retrieve strains with multiple useful functions. The system is available online at http://www.ps.noda.tus.ac.jp/labdb/jsps/index.jsp. Identified functional strains can be distributed on request.