

明 細 書

発明の名称：新規ビフィドバクテリウム属細菌

技術分野

[0001] 本発明はビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに分類されるビフィドバクテリウム属細菌に関する。

背景技術

[0002] プロバイオティクスが宿主の生理機能に影響を及ぼす要因の一つは、プロバイオティクスが、消化管内に残存する糖源を代謝し、乳酸、酢酸等の短鎖脂肪酸を産生することであると推察される。これまでの検討から、成人の腸管で優占するビフィズス菌種のゲノムには、乳児由来のビフィズス菌種に比べて植物由来の難消化性多糖、特に成人の食事に多く含まれるキシラン類の代謝に関わる遺伝子が多いことが明らかとなっている。

[0003] 本出願人は、これまでに、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有し、キシラン類を効率よく資化できるビフィドバクテリウム属細菌を見出している（特許文献1）。斯かるビフィドバクテリウム属細菌は、成人の腸内での増殖と高い有機酸産生能が期待されることから、成人向けプロバイオティクスの有望な候補である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開公報第2020／203782号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特許文献1に記載のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057は、キシラナーゼ遺伝子を有し、腸内で活発に糖を代謝して有機酸を産生することが期待される。しかしながら、発酵乳製造への利用を考慮したとき、YIT 11057の乳成分含有培地での生残性は必ずしも十分なものではないことが判明した。よって、本発明は、キシラン類を利用可能であり、乳成分含

有培地で優れた生残性を示す新規のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは鋭意検討した結果、キシラン類を効率よく資化でき、乳成分含有培地で優れた生残性を示す新規のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を取得した。

[0007] すなわち、本発明は以下の〔１〕～〔６〕を提供するものである。

〔１〕 キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有し、乳成分含有培地での生残性がビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057 (N I T E B P - 0 2 9 3 0) より高いビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌。

〔２〕 キシラナーゼ遺伝子が配列番号１で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド又は当該塩基配列と７０％以上の同一性を有し、且つキシラナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、〔１〕記載の細菌。

〔３〕 乳成分含有培地で２４時間培養後、低温で２週間保存した場合に生残率が２０％以上である、〔１〕記載の細菌。

〔４〕 ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム Y 51493 (N I T E A B P - 0 3 8 5 2)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 13179 (N I T E A B P - 0 3 8 5 3)、又はこれらと近縁な菌株。

〔５〕 〔１〕～〔４〕のいずれか１項記載の細菌を含有する飲食品。

〔６〕 発酵乳飲食品である〔５〕記載の飲食品。

発明の効果

[0008] 本発明に係る新規のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、成人の食事に多く含まれるキシラン類、特にアラビノキシランを分解資化する能力を有し、且つ乳成分含有培地で優れた生残性を示す。したがって、本発明の細菌は、成人の腸内での増殖と高い有機酸産生能が期待され、成人向けプロバイオティクスとして、医薬品、飲食品等に利用するこ

とができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]乳成分含有培地で培養したY 51493とYIT 11057の保存時の生菌数の変化を示す。

[図2]乳成分含有培地で培養したY 51493とYIT 11057の保存時の生残率の変化を示す。

[図3]ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムのキシラナーゼ遺伝子獲得株（形質転換体）のゲノム構造の一例。各株で対応する一塩基多型（SNPs）を灰色線で示す。

[図4]ドナー（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11027）、レシピエント（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11956）、及び遺伝子獲得株（形質転換体）のmPY-A X培地における増殖曲線。

[図5]ドナー（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11027）、レシピエント（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11956）、及び遺伝子獲得株（形質転換体）のmPY-Search培地における増殖曲線。

[図6]ドナー（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 4072^T）、レシピエント（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 12824）、及び遺伝子獲得株（形質転換体）のTc-mGAML培地におけるコロニー形成。

[図7]ドナーとして（A）生菌体又は死菌体、（B）生菌体、ゲノムDNA又はPCR産物、（C）DNase処理した生菌体を用いた場合の形質転換頻度。

[図8]乳成分含有培地で培養したYIT 13179とY 51493の保存時の生菌数の変化および保存28日目の生残率を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明の細菌は、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有し、乳成分含有培地

で優れた生残性を示すビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌である。一態様において、本発明の細菌は、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有し、乳成分含有培地での生残性がビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057 (N I T E B P - 0 2 9 3 0) より高いビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌である。YIT 11057は、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有する。YIT 11057は、2019年3月25日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託されている。

[0011] 「キシラナーゼ遺伝子」とは、GH10に分類されるキシラナーゼをコードする遺伝子（endo-1,4-beta-xylanase A ; x y n A）を指すが、本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌がそのゲノム上に保有する「キシラナーゼ遺伝子」としては、具体的には、配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド又は当該塩基配列と70%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有し、且つキシラナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが包含される。

ここで、配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、YIT 11057が保有するキシラナーゼ遺伝子を指す。

[0012] また、塩基配列の同一性は、比較すべき2つの核酸配列の塩基ができるだけ多く一致するように両塩基配列を整列させ、一致した塩基数を全塩基数で除したものを百分率で表したものである。当業者であれば、BLAST、ClustalXやGenetyxといったソフトウェアのパラメーターを適当に設定し、塩基配列の同一性を決定することができる。

また、キシラナーゼ活性とは、キシラン類を基質とし、キシラン類のキシロース骨格を加水分解してキシロオリゴ糖及びキシロースを生成する活性（キシラン加水分解活性）を意味する。

ここで、キシラン類としては、キシラン、アラビノキシラン、グルクロノ

キシラン、グルクロノアラビノキシラン、アセチルキシラン等が挙げられるが、キシラン及びアラビノキシランが好ましい。

したがって、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、換言すれば、キシラン類のキシロース骨格を分解する能力を有するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌である。

[0013] 本発明において、「キシラン類を資化する能力を有する」とは、キシラン類を炭素源として増殖できる能力を有していることをいう。具体的には、例えば、キシラン類を唯一の炭素源とする培地において増殖できることをいう。例えば、キシラン類のみを糖源とする培地で72時間培養したときの濁度、例えば、OD₆₀₀増加量が0.1以上であることを言う。濁度は、OD₆₀₀増加量が0.3以上であるのが好ましく、0.4以上がより好ましい。また、不溶性画分の多いキシラン類を添加した培地など、濁度の変化を測定できない場合には、72時間培養したときの培養上清中の短鎖脂肪酸の産生、例えば、乳酸、酢酸及びギ酸の合計産生量が10mM以上であることを言う。短鎖脂肪酸産生量は、合計20mM以上が好ましく、40mM以上がより好ましい。

[0014] キシラン類資化能の試験に用いられる培養培地としては、糖源を除いた培地にキシラン類を添加したものをを用いればよく、糖源を除いた培地の組成は、M-I-L-S培地、Peptone-Yeast (PY) 培地等の組成とすることができる。

キシラン類の培地への添加量は、培地中に0.01～10質量%が好ましく、0.05～5質量%がより好ましく、0.1～1質量%が更に好ましい。なお、対照として糖源を除いた培地で対象となるビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を培養し、ODを確認しておくことが望ましい。

[0015] 「乳成分」とは、牛乳、山羊乳、羊乳などの獣乳の生乳、加熱乳、脱脂粉乳、全脂粉乳或いは生クリーム、ホエイ等の乳由来の成分を含有する物を意

味する。このうち、好ましくは脱脂粉乳が挙げられる。なお、「ホエイ」とは、乳から脂肪分及びカゼインを除いたものである。

[0016] 「乳成分含有培地」としては、乳成分を含有する培地であればよく、さらに糖、ビタミン類、タンパク分解物、アミノ酸類、ミネラル類、塩類、界面活性剤、脂肪酸、金属類等の他の成分を含有していてもよい。また、当該他の成分としては、特に限定されるものではないが、グルコース、ガラクトース、ラクトース、フルクトースなどの糖が好ましい。

[0017] 培地中の乳成分の含有量は、特に限定されないが、固形分換算で、1～50質量%（以下、単に「%」と表記した場合には質量%を意味する）が好ましく、2～10%がより好ましい。

[0018] 「乳成分含有培地での生残性」とは、乳成分含有培地で対象となるビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を24時間培養後、2週間低温保存した場合にどの程度生菌が存在しているかを示すものであり、生菌数は常法に従い求めることができる。例えば、乳成分含有培地での生菌数は、コロニーカウント法によって求めることができる。また、24時間培養直後の生菌数に対する低温保存2週間後の生菌数の割合によって、生残率を示すことができる。ここで低温とは、微生物を保存する際に通常用いられる温度帯を指すが、好ましくは10℃以下である。

「乳成分含有培地での生残性がビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057より高い」とは、より具体的には、乳成分含有培地で24時間培養後、低温で2週間保存した場合に生残率が好ましくは20%以上、より好ましくは40%以上、さらに好ましくは50%以上であることをいう。

[0019] 本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有し、キシラン類を分解資化する能力を有することから、キシラン類が分解されることにより産生される酢酸、乳酸、ギ酸等の短鎖脂肪酸の供給に寄与することができる。また、本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、乳成分含有培

地での生残性が高いことから、該細菌が有する生理効果を効果的に発揮させることができ、医薬品、飲食品等の製造において有用である。

[0020] 本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、キシラナーゼ遺伝子の存在や上述のキシラン類を資化する能力と、乳成分含有培地での生残性とを指標として、例えばヒト（例えば、成人、乳幼児）の腸内に存在するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌からスクリーニングすることにより取得することができる。或いは、本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、キシラナーゼ遺伝子の存在や上述のキシラン類を資化する能力と、乳成分含有培地での生残性とを指標として、例えばヒト（例えば、成人、乳幼児）の腸内に存在するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌などの任意のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を親株として公知の育種方法により作出した細菌からスクリーニングすること、該親株に紫外線照射やニトロソグアニジン（NTG）、エチルメタンスルホン酸（EMS）等突然変異誘導剤等による処理を施して作出した細菌からスクリーニングすること、又は該親株のゲノムを公知の部位特異的変異導入法等により改変して作出した細菌からスクリーニングすることにより取得することができる。或いは、本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、キシラナーゼ遺伝子の存在や上述のキシラン類を資化する能力と、乳成分含有培地での生残性とを指標として、例えばヒト（例えば、成人、乳幼児）の腸内に存在するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌などの任意のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌をレシピエント（親株）として、後記参考例1又は2で詳述するビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法により作出した細菌からスクリーニングすることにより取得することができる。ここで、親株としては、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌が好ましく、YIT 11057がより好ましい。

[0021] 後記実施例 1 に示すように、本発明者らは、YIT 11057を親株として、UV 照射及び長期継代による育種を行い、乳成分含有培地での生残性がYIT 11057 より高いY 51493を得た。また、後記実施例 2 に示すように、Y 51493の形質 転換により、乳成分含有培地での生残性がY 51493と同等であるYIT 13179を 得た。本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細 菌としては、キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有し、乳成分含有培地での生 残性がYIT 11057より高い限り、これらには限定はされず、生物学上、遺伝学 上これらに近縁な菌株が包含される。また、本発明のビフィドバクテリウム ・シュードカテヌラータムに属する細菌としては、キシラナーゼ遺伝子をゲ ノム上に有し、乳成分含有培地での生残性がYIT 11057より高い限り、自然界 に存在する天然株でもよく、天然株の変異株、又は遺伝子改変株であっても よい。

[0022] Y 51493、YIT 13179は、以下に示すように、2023年3月13日付で、 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（千葉県木更 津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託されている。

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム Y 51493 (NITE A BP-03852)、

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 13179 (NITE ABP-03853)。

[0023] このうち、キシラン類を資化する能力の点、乳成分含有培地での生残性の 点、更にグルコース資化能を併せ持つ点から、YIT 13179又はその近縁な菌株 が好ましい。グルコース資化能を持つことにより、グルコースを構成糖とす る多糖やオリゴ糖からの有機酸産生が期待される。

ここで、グルコース資化能とは、グルコースを炭素源として増殖できる能 力を有していることをいう。

[0024] また、近縁な菌株とは、複数のハウスキーピング遺伝子配列を評価するM ultilocus sequence analysis (MLSA) 法 により配列が一致する菌株を示す。

具体的には、ビフィズス菌のMLSA解析に適した遺伝子として報告 (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2006), 56, 2783-2792) されているDNA gyrase subunit B (gyrB)、50S ribosomal protein L2 (rplB)、Amidophosphoribosyltransferase (purF)、DNA-directed RNA polymerase subunit beta (rpoB)、ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC1 (clpC)、Elongation factor G (fusA)、Isoleucine-tRNA ligase (ileS) の全長配列を取得し、各菌株ごとに全遺伝子を連結後、VSEARCHやBLAST等のプログラムを用いて比較対象株間の配列の一致性を検証し、配列同一性が90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上である場合に近縁種であると判断できる。

YIT 11057におけるgyrB遺伝子、rplB遺伝子、purF遺伝子、rpoB遺伝子、clpC遺伝子、fusA遺伝子及びileS遺伝子の塩基配列を配列表に示す (gyrB: 配列番号2、rplB: 配列番号3、purF: 配列番号4、rpoB: 配列番号5、clpC: 配列番号6、fusA: 配列番号7、ileS: 配列番号8)。

[0025] 本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌の利用形態は特に制限されず、凍結乾燥したものであってもよく、あるいはこれら細菌を含む培養物として利用することもできるが、いずれの形態であっても、細菌が生菌の状態であることが好ましい。

[0026] 本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬品製剤の形態で利用することもできる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられる。これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することが

できる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤、賦形剤等の慣用の添加剤を適宜添加することもできる。

[0027] 本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌は、上記のような製剤とするだけでなく、飲食品に配合して使用することもできる。飲食品に配合する場合は、そのまま、又は種々の栄養成分と共に含有せしめればよい。具体的に本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を飲食品に配合する場合は、飲食品として使用可能な添加剤を適宜使用し、慣用の手段を用いて食用に適した形態、すなわち、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形してもよく、また種々の食品、例えば、ハム、ソーセージ等の食肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の水産加工食品、パン、菓子、バター、粉乳に添加して使用したり、水、果汁、牛乳、清涼飲料、茶飲料等の飲料に添加して使用してもよい。なお、飲食品には、動物の飼料も含まれる。

[0028] 更に飲食品としては、本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を生菌の状態で含有する発酵乳飲食品、発酵豆乳、発酵果汁、発酵野菜汁等の発酵飲食品が好適に用いられ、特に発酵乳飲食品の利用が好ましい。発酵乳飲食品の製造は常法に従えばよく、例えば発酵乳を製造する場合には、殺菌した乳培地に本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を単独又は他の微生物と同時に接種培養し、これを均質化処理して発酵乳ベースを得る。次に別途調製したシロップ溶液を添加混合し、ホモゲナイザー等で均質化し、更にフレーバーを添加して最終製品に仕上げればよい。このようにして得られる発酵乳飲食品は、シロップ（甘味料）を含有しないプレーンタイプ、ソフトタイプ、フルーツフレー

バータイプ、固形状、液状等のいずれの形態の製品とすることもできる。

[0029] 斯かる発酵乳飲食品にはシロップ等の甘味料、乳化剤、増粘（安定）剤、各種ビタミン等の任意成分を配合することができる。シロップとしては、グルコース、ショ糖、フルクトース、果糖ブドウ糖液糖、ブドウ糖果糖液糖、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロース、ガラクトオリゴ糖(GOS)、キシロオリゴ糖(XOS)、アラビノキシロオリゴ糖(AXOS)、キシラン、アラビノキシラン、アラビノオリゴ糖(AOS)、アラビナン、麦芽糖、蜂蜜、糖蜜等の糖類、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、パラチニット、還元水飴、還元麦芽糖水飴等の糖アルコール、アスパルテーム、ソーマチン、スクラロース、アセスルファムK、ステビア等の高甘味度甘味料、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、レシチン等の乳化剤、寒天、ゼラチン、カラギーナン、グァーガム、キサントガム、ペクチン、ローカストビーンガム、ジェランガム、カルボキシメチルセルロース、大豆多糖類、アルギン酸プロピレングリコール等の増粘（安定）剤を配合してもよい。この他にも、ビタミンA、ビタミンB類、ビタミンC、ビタミンE類等のビタミン類、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、鉄、マンガン等のミネラル分、クエン酸、乳酸、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、グルコン酸等の酸味料、クリーム、バター、サワークリーム等の乳脂肪、ヨーグルト系、ベリー系、オレンジ系、花梨系、シソ系、シトラス系、アップル系、ミント系、グレープ系、アプリコット系、ペア、カスタードクリーム、ピーチ、メロン、バナナ、トロピカル、ハーブ系、紅茶、コーヒー系等のフレーバー類、ハーブエキス、黒糖エキス等を配合することも可能である。

[0030] 発酵乳飲食品の製造には、本発明のビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータムに属する細菌以外の微生物を併用することも可能である。このような微生物としては例えば、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ (*Lactocaseibacillus paracasei*) 等のラクチカゼイバチルス属細菌、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus c*

asei)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*L. acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタラム (*L. plantarum*)、ラクトバチルス・ブヒネリ (*L. buchneri*)、ラクトバチルス・ガリナラム (*L. gallinarum*)、ラクトバチルス・アミロボラス (*L. amylovorus*)、ラクトバチルス・ブレビス (*L. brevis*)、ラクトバチルス・ラムノーザス (*L. rhamnosus*)、ラクトバチルス・ケフィア (*L. kefir*)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*L. paracasei*)、ラクトバチルス・クリスパタス (*L. crispatus*)、ラクトバチルス・ゼアエ (*L. zeae*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*L. helveticus*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*L. salivarius*)、ラクトバチルス・ガセリ (*L. gasseri*)、ラクトバチルス・ファーメントム (*L. fermentum*)、ラクトバチルス・ロイテリ (*L. reuteri*)、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、ブルガリカス (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*)、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、デルブルッキ (*L. delbrueckii subsp. delbrueckii*)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*L. johnsonii*) 等のラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、ラクチス (*Lactococcus lactis subsp. lactis*)、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、クレモリス (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*) 等のラクトコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*) 等のエンテロコッカス属細菌、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属細菌、サッカロマイセス・セルビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)

、トルラスポラ・デルブルッキ (*Torulaspora delbrueckii*)、カンジダ・ケフィア (*Candida kefir*) 等のサッカロマイセス属、トルラスポラ属、カンジダ属等に属する酵母が挙げられる。本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌と共にラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス属細菌から選ばれる１種以上を併用して発酵乳飲食品を製造すると高い嗜好性が得られ、飲食が容易となるため好ましい。

- [0031] 本発明のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌を使用する場合の投与量に厳格な制限はないが、その好適な投与量は生菌数として１日当たり 10^5 c f u ~ 10^{13} c f u であり、特に 10^8 c f u ~ 10^{12} c f u が好ましい。

実施例

- [0032] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

- [0033] 実施例１ キシラナーゼ遺伝子を有し且つ乳成分含有培地での生残性に優れたビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌の作出１

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057 を親株として下記の通り育種を行い、乳成分含有培地における生菌数（増殖性）、生残性を確認した。

- [0034] (１) 育種

YIT 11057 凍結菌液 １ % を変法 G A M (m G A M) 液体培地（日水製薬株式会社）に植菌して嫌気条件下 37℃ で 4 時間静置培養し、菌液を P B S で 10 倍希釈した。希釈した菌液をシャーレ中央に滴下し、事前検討において紫外線照射後の生残率が約 １ % 程度となった条件である紫外線照射（波長 254 n m、照度約 0.2 m W / c m²、60 秒）を行った。紫外線照射した菌液をマザー培地（脱脂粉乳 12 %、酵母エキス 0.1 %、L - システイン塩酸塩一水和物 0.03 %、炭酸カルシウム 0.2 %、殺菌条件：115℃、20 分）に継代し、37℃ で 24 時間静置培養した後、4℃ または 10℃ で 2

週間冷蔵保存する操作を18回(36週間)繰り返した。なお、冷蔵保存はアネロパック(三菱ガス化学)による嫌気条件下にて、上記マザー培地で行った。

- [0035] 冷蔵保存後の菌液を適当な濃度で、4 M塩酸でpH 4.4または4.6に調整した1%乳糖加mGAM寒天平板培地に塗布し嫌気条件下37℃で14日静置培養した後、コロニーをピックアップして、1%乳糖加mGAM液体培地に植菌した。嫌気条件下37℃で20時間静置培養し、TOSプロピオン寒天平板培地に塗布し嫌気条件下37℃で約48時間静置培養した後、コロニーをピックアップして、1%乳糖加mGAM液体培地に植菌する操作を2回繰り返してビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム Y 51493を得た。

- [0036] (2) 生菌数・生残率の確認

生残性の検討には、YIT 11057およびY 51493の各菌株の凍結菌液をマザー培地に植菌して37℃で24時間前培養後、マザー培地に5%植菌して37℃で24時間本培養を行い4℃で冷蔵保存(0、7、14日)した菌液を用いた。TOSプロピオン寒天平板培地に生理食塩水で段階希釈したYIT 11057およびY 51493の菌液を塗布して嫌気条件下37℃で48時間培養して生菌数測定を行った。また、測定した生菌数から生残率を算出した。生残率は、測定した生菌数を0日保存の生菌数で除した百分率で表す。その結果を図1、2に示す。その結果、育種によって得られたY 51493は、YIT 11057と比べて乳成分含有培地における生菌数(増殖性)、生残性がともに優れていることが確認できた。

- [0037] 参考例1 ビフィドバクテリウム属細菌におけるゲノムのモザイク化現象の発見

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する菌株を用いた難消化性多糖の資化性解析及びゲノム解析により、一部の菌株は長鎖キシラン類の資化性を示し、それは染色体中に存在するキシラナーゼ(BpXyn10A)遺伝子に規定されること、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラ

ータムに属する菌株のゲノム情報に基づき作成した系統樹にキシラナーゼ遺伝子保有株をプロットすると、特定のクラスターに集中するのではなく、系統樹全体に分散することが明らかになっている（非特許文献1）。よって、キシラナーゼ遺伝子は、菌株間で水平伝播することが示唆された。そこで、*in vitro*でキシラナーゼ遺伝子の水平伝播について検証した。

一般的に、細菌における遺伝子水平伝播は、細胞外DNAの取り込みによる自然形質転換、ファージ感染により生じる形質導入、プラスミド等の伝播を介した接合の3様式が知られている。そこで、どの現象も検出できるように、表現型の異なるビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム2株を個別に培養後、寒天培地上で一定時間共培養して、遺伝子水平伝播の検証を行った。

[0038] (1) 使用菌株

キシラナーゼ遺伝子を有しかつテトラサイクリン（Tc）感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株（YIT 11025、YIT 11027、YIT 12242、YIT 12820、YIT 12824、YIT 12986）をドナー、キシラナーゼ遺伝子を有さずかつTc耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株（YIT 4072^T、YIT 11955、YIT 11956、YIT 12228、YIT 12818、YIT 12822、YIT 12987）をレシピエントとして用いた。

[0039] (2) キシラナーゼ遺伝子の水平伝播の検証方法

ドナー及びレシピエントの各菌株を、0.5質量%グルコース・ラクトースを添加した変法GAM（mGAM）液体培地（日水製薬株式会社）に植菌して対数増殖期まで培養した。ドナー及びレシピエントの菌液を200μLずつ混合し（菌数として約10⁸⁻⁹個）、遠心分離後、200μLピペットを用いて上清を除去した。チューブ内に残存する微量の培地を用いてペレットを懸濁後、全量をmGAM寒天培地（日水製薬株式会社）上に静置した。37℃で16～24時間、嫌気培養した後に1μLループを用いて菌体をかき取り、ドナー単独又はレシピエント単独では増殖できないmPY-Ax-Tc（mPY培地：非特許文献1参照、アラビノキシラン（Ax）：終濃度0.

5質量%、Tc：終濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)液体培地に植菌した。Eon Microplate Spectrophotometers (バイオテック社)で濁度をモニタリングした。選択培地で濁度の上昇が認められた組み合わせの一部については、新鮮な同培地に継代を行い、濁度の上昇の再現性を確認した。この菌液をTc含有(終濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)mGAM寒天培地に塗抹後、 37°C で一晩嫌気培養し、生じたシングルコロニーを同寒天培地に継代した。翌日、菌体の一部をmPY-Ax-Tc液体培地に植菌するとともに、一部をTEバッファーに懸濁して 95°C で5分間加熱し、PCRの簡易鋳型とした。mPY-Ax-Tc培地での増殖の有無、レシピエントがYIT 11956の場合にはレシピエント(YIT 11956)特異的プライマー(BP28-f: GGGCAAGATCGGCATCATCTA(配列番号10)、BP28-r: CACATTGGTGGTGTTCACGTC(配列番号11))及びキシラナーゼ遺伝子特異的プライマー(pBpXyn10A-F: CGAGAATGCGAACACGTACTTC(配列番号12)、pBpXyn10A-R: CTGCTCGGTGTGTAATCGTTG(配列番号13))を用いたPCRにより、菌株識別及び同遺伝子の有無の確認を行った。キシラナーゼ遺伝子の存在が確認されたコロニーを凍結保存した。

[0040] (3) ゲノム解析方法

(2)で得られた菌体からDNAを抽出し、第2世代シーケンサーMiseq (イルミナ株式会社)及び第3世代シーケンサーMinION (オックスフォードナノポアテクノロジーズ社)を用いてショートリード配列とロングリード配列を取得した。ハイブリッドアセンブルを行い、完全長ゲノム配列を取得した。ドナー株、レシピエント株および遺伝子獲得株のゲノム配列をsnippy (<https://github.com/tseemann/snippy>)でアライメントし、アライメント結果をfastGEAR (Mostowy et al., Molecular Biology and Evolution 34(5), 1167-1182)に入力して相同組み換え領域を同定した。また、ゲノム配列から、MUMMER (Kurtz et al., Genome Biology 5, R12, 2004)パッケージのnucmer、delta-filter及びshow-snpsを用いて一塩基多型(SNPs)情報を抽出し、カスタ

ムスクリプトで出力ファイルの形式を調整後、A r t e m i s A C T (S a n g e r i n s t i t u t e) を用いて相同組み換え領域を可視化した。

[0041] (4) キシラナーゼ遺伝子水平伝播の検証結果

ドナー及びレシピエントを混合後、m G A M 寒天培地で一晚嫌気培養し、m P Y - A X - T c 液体選択培地に植菌して増殖性をモニタリングした結果、複数のドナーとレシピエントの組み合わせにおいて濁度の上昇が認められた。その中から、YIT 11956又はYIT 4072¹をレシピエント、YIT 11025、YIT 11027、YIT 12820又はYIT 12824をドナーとして得られた13株の遺伝子獲得株のゲノム解析の結果、いずれの遺伝子獲得株もキシラナーゼ遺伝子を有し、ドナーではなくレシピエントと極めて近縁であることが確認され、染色体上のキシラナーゼ遺伝子が、キシラナーゼ遺伝子保有株であるドナーから同遺伝子非保有株であるレシピエントに伝播していることが明らかとなった(図3、表1)。キシラナーゼ遺伝子が伝播した株は、m P Y - A X 培地で増殖できることを確認した(図4)。

[0042] ゲノム配列をS N P s レベルで詳細に比較した結果、遺伝子獲得株では、新たに獲得されたキシラナーゼ遺伝子に加えて、その上下流を含む16.5~247kbの領域でS N P s がドナーと一致した。すなわち、遺伝子獲得株では、広範囲でダブルクロスオーバーの相同組み換えが生じたことにより、キシラナーゼ遺伝子とその上下流を含むドナー由来のゲノム領域が置換され、キシラナーゼ遺伝子が水平伝播したことがわかった。更に、ゲノム領域の置換はゲノム全体でモザイク状に生じており、置換領域も菌株により異なっていた。具体的には、1株あたりで最大7箇所、0.5~247kbに及ぶ領域で、ドナー由来のゲノム領域が組み込まれていた(図3)。一方、置換領域にファージやプラスミドの痕跡は認められなかった。

[0043] この現象の一般性を検証するため、ビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータムが有する他の遺伝子の水平伝播の検証も試みた。まずはスターチの資化性を規定するアミラーゼ遺伝子に注目した。アミラーゼ遺伝子を有し

かつ T c 感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株 (YIT 11027) をドナー、アミラーゼ遺伝子を有さずかつ T c 耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株 (YIT 11956) をレシピエントとして用いた。(2)と同様の手法で、各株混合後の菌体を m P Y - S t - T c (スターチ (S t) : 終濃度 0.5 質量%、T c : 終濃度 10 μ g / mL) 液体培地に植菌すると、ゲノムがモザイク化してアミラーゼ遺伝子が水平伝播した株が出現することを確認した(表 1)。アミラーゼ遺伝子が伝播した株は、m P Y - S t a r c h 培地で増殖できることを確認した(図 5)。さらに、T c 耐性遺伝子にも着目した。T c 耐性遺伝子を有しかつエリスロマイシン (E m) 感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株 (YIT 4072¹、YIT 11955、YIT 12987) をドナー、T c 耐性遺伝子を有さず E m 耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株 (YIT 12824) をレシピエントとして用いた。(2)と同様の手法で、各株混合後の菌体を E m (終濃度 1 μ g / mL) - T c (終濃度 10 μ g / mL) を添加した 0.5 質量%ラクトース添加変法 G A M (m G A M L) (E m T c - m G A M L) 寒天培地に塗抹すると、ゲノムがモザイク化して T c 耐性遺伝子が水平伝播した株が出現することを確認した(表 1)。T c 耐性遺伝子が伝播した株は、T c - m G A M L 培地で増殖できることを確認した(図 6)。

[0044]

[表1]

ドナー株	レシピエント株	獲得表現型
LCX ⁺ Tc ^S	LCX ⁺ Tc ^R	
YIT 11025	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 11027	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 12820	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 12824	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 12824	YIT 4072 ^T	LCX ⁺ Tc ^R
ST ⁺ Tc ^S	ST ⁺ Tc ^R	
YIT 11027	YIT 11956	ST ⁺ Tc ^R
Em ^S Tc ^R	Em ^R Tc ^S	
YIT 11955	YIT 12824	Em ^R Tc ^R
YIT 12987	YIT 12824	Em ^R Tc ^R
YIT 4072 ^T	YIT 12824	Em ^R Tc ^R

* LCX⁺/−: BpXyn10A遺伝子を持ち長鎖キシラン類(LCX)の資化性あり/なし

* Tc^{S/R}: テトラサイクリン感受性/耐性

* ST⁺/−: スターチ資化性あり/なし

* Em^{S/R}: エリスロマイシン感受性/耐性

- [0045] 参考例2 ビフィドバクテリウム属細菌における自然形質転換の検証
- ビフィドバクテリウム属細菌のゲノムのモザイク化では、ファージやプラスミドの水平伝播の痕跡が認められなかったことから、自然形質転換によるものかを検証した。
- [0046] (1) 使用菌株
- T c 耐性かつ E m 感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの基準株であるYIT 4072^Tをドナーとして、 T c 感受性かつ E m 耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 12824をレシピエントとして用いた。
- [0047] (2) ドナーとして用いるゲノムDNAの抽出及びPCR産物の調製方法
- YIT 4072^TをmGAML液体培地で一晚培養し、NucleoBond Buffer Set III及びNucleoBond AXG20カラム(タカラバイオ株式会社)を用いて高分子ゲノムDNAを精製した。Picogreen kitを用いて二本鎖DNA量を定量し、30ng／μLと

なるようにTE bufferで希釈した。また、このゲノムDNAを鋳型として、Tc耐性遺伝子（tetW）を含む約20kbの領域をPCRで増幅した。PCR酵素には高正確性酵素PrimeSTAR GXL DNA polymerase（タカラバイオ株式会社）を用いた。酵素を0.2μL、50μMプライマー（配列番号14及び15）をそれぞれ0.04μL、鋳型DNA（0.02ng/μL）を1μL、dNTP溶液を1.6μL、5×bufferを4μL混合し、PCRチューブ1本あたりの反応液量を20μLとした。得られたPCR産物はエタノール沈殿後、TE bufferに溶解した。Picogreenを用いて二本鎖DNAを定量後、1ng/μLとなるようにTE bufferで希釈し、小分けにして凍結保存した。

本実施例で使用したプライマー及びPCR条件を表2に示す。

[0048] [表2]

プライマー名	配列 (5'-3')	配列 番号	増幅産物長 (bp)	PCR 条件
BpTy20k-F	TCCTGTGGATTTCGACGGTGACGAGCAG	14	19645	1
BpTy20k-R	GAGTGCGGTT GATGGTGCATACGGCAAG	15		
PCR 条件 1. 98°C 20sec, (98°C 10sec, 68°C 10min)×30, 4°C ∞				

[0049] （3）死菌体の調製方法

YIT 4072^Tを2mLのmGAML液体培地にて対数増殖期後期まで培養し、mPY液体培地で洗浄後、ペレットを180μLの同培地に懸濁した。20μLを1.5mLスクリーキャップチューブに分取し、ヒートブロックを用いて80℃で10分間加熱し、死菌体を調製した。この処理により菌体が完全に死滅することを別途確認した。

[0050] （4）生菌体、加熱死菌体及び精製DNAをドナーとした抗生物質耐性遺伝子の水平伝播の検証

YIT 4072^T及びYIT 12824の各菌株の凍結菌体をmGAML寒天培地に植菌して37℃で嫌気培養後、得られた菌体を同液体培地400μLに継代した。

3～4時間培養後、同液体培地を1600 μ L追加して対数増殖期後期から定常期に到達するまで4～5時間培養した。各菌液を集菌し、mPY液体培地で洗浄後、再度集菌して同培地180 μ Lに懸濁した。レシピエント (YIT 12824) の菌液5 μ Lと、ドナー (YIT 4072^T) の生菌液、(3)で調製した死菌液又は(2)で調製した精製DNAを5 μ L混合し(菌数としてそれぞれ約 10^{7-8} 個)、全量をmGAM寒天培地に静置した。37℃で16～24時間嫌気培養後に菌体を1 μ Lループを用いて全量掻き取り、mPY液体培地60 μ Lに懸濁後、段階希釈してEmTc-mGAML寒天培地に塗抹し、37℃で2～3日間、嫌気培養してコロニー数をカウントした。一部のコロニーについては、実施例1(3)と同様にしてゲノム解析を行い、相同組み換えが生じたことを確認した。

[0051] (5) DNA分解酵素(DNase I)の添加による影響の検証

(4)と同様にYIT 4072^T及びYIT 12824の洗浄済み生菌液を調製した。洗浄済み菌液を各株20 μ Lずつ1.5 mLチューブに分取して混合し、遠心後、ペレットを40 μ Lの1×DNase I buffer (タカラバイオ株式会社)に懸濁した。そこに原液(5 U/ μ L)、又は1×DNase I bufferで1/10(0.5 U/ μ L)もしくは3/10(1.5 U/ μ L)に希釈したRecombinant DNase I (タカラバイオ株式会社)を8 μ Lずつ添加した。mGAM寒天培地に12 μ Lずつ、1条件あたり3点静置した。菌体を静置した寒天培地を37℃で16時間嫌気培養後、菌体を1 μ Lループで全量掻き取り、mPY液体培地60 μ Lに懸濁後、同培地を用いて適宜希釈した。Tc耐性遺伝子が水平伝播した菌数を測定するためEmTc-mGAML寒天培地に菌液を塗抹した。また、Em耐性株の総生菌数を検出するため、Em-mGAML寒天培地にも菌液を塗抹した。各寒天培地を37℃で2～3日間、嫌気培養し、Em耐性株の総生菌数に占めるモザイク化菌数の比率をモザイク化の頻度(Frequency)とした。

[0052] (6) 結果

ドナーのYIT 4072^T (T c 耐性株) の生菌体及びレシピエントのYIT 12824 (E m 耐性株) を混合後、m G A M 寒天培地で一晚嫌気培養し、ドナー単独又はレシピエント単独では増殖できない選択培地で両耐性株が出現するか検討したところ、両抗生物質に耐性を示すコロニーが出現した。得られた6株のゲノム解析の結果、T c 耐性遺伝子及びその近傍領域を含む複数領域でモザイク状の相同組み換えが生じていることを確認した。組み換え領域数は1～4であり、最大組み換え領域長は22～112 kbであった。

ドナーとして死菌体を用いた場合、ドナーとして生菌体を用いるよりは頻度が下がるものの、T c 耐性遺伝子が水平伝播することを確認した(図7A)。同様に、ドナーをゲノムDNA又はPCR産物に置き換えても水平伝播は生じた(図7B)。ドナーとして死菌体を用いた場合、ゲノム解析した2株において、組み換え領域数は1～2、最大組み換え領域長は16～45 kbであり、ドナーとしてゲノムDNAを用いた場合、ゲノム解析した2株において、組み換え領域数は1、最大組み換え領域長は12～16 kbであり、ドナーとしてYIT 4072^TのゲノムDNAを鋳型として調製したPCR産物を用いた場合、ゲノム解析した1株において、組み換え領域数は1、最大組み換え領域長は12 kbであった。更に、ドナーとして生菌体を用いた試験系にDNA分解酵素を添加した結果、遺伝子水平伝播は阻害された(図7C)。したがって、ビフィドバクテリウム属細菌における遺伝子水平伝播を伴うゲノムのモザイク化の経路は、細胞外DNAの取り込み及び相同組み換えによる自然形質転換であることが明らかとなった。よって、上記のモザイク化の頻度(Frequency)とは、形質転換頻度を意味する。

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムにおける自然形質転換の普遍性を確認した結果、YIT 4072^TのゲノムDNAを鋳型として調製したPCR産物をドナーとして、あらたに11株でT c 耐性遺伝子が水平伝播することを確認した(表3)。

[0053]

[表3]

ドナー株	レシピエント株	獲得表現型
Tc ^R	Tc ^S	
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12989	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 11952	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 11953	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12145	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12203	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12232	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12817	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12819	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12820	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12821	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12985	Tc ^R

* Tc^{S/R}: テトラサイクリン感受性/耐性

[0054] 実施例2 キシラナーゼ遺伝子を持し且つ乳成分含有培地での生残性に優れたビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌の作出2

実施例1で得られたY 51493は、育種の過程でグルコース資化能を失っていた（下記表4参照）。ゲノム解析の結果、Y 51493ではグルコース輸送体（`beta-glucoside PTS system EIICBA component`）をコードする遺伝子（配列番号9）の369位のC塩基が1塩基欠失していたことから、フレームシフトが生じてアミノ酸配列が大きく変化し、その結果、細胞内へのグルコースの輸送ができなくなったと考えられた。腸内における糖代謝の点から、グルコース資化能は維持しておいたほうが望ましい。一方で、塩基の欠失を従来のUV照射や長期継代で復元するのは非現実的である。そこで、グルコース輸送体遺伝子の1塩基欠失を復元すべく、Y 51493を親株、すなわちレシピエントとし、YIT 11057のゲノムDNAをドナーDNAとして、参考例2の形質転換方法に供した。

[0055] (1) 使用菌株

実施例1で作出したY 51493をレシピエントとして用いた。

[0056] (2) ドナーDNA

YIT 11057をm G A M L 液体培地で一晚培養した菌液 1 m L から、ビーズフェノール法で抽出したゲノムDNAを用いた。

[0057] (3) 形質転換及びグルコース資化能復元菌体の選抜

全ての操作は嫌気グローブボックス内で行った。Y 51493の凍結菌体をm G A M L 寒天培地に植菌して一晚嫌気培養した。翌朝、複数のコロニーを同時に掻き取り同液体培地 4 0 0 μ L に継代した。3～4 時間培養後、同液体培地を 1 6 0 0 μ L 追加して4～5 時間培養した。遠心分離後、菌体ペレットを 5 0 0 μ L のm P Y 液体培地で1 回洗浄し、ペレットを同液体培地 1 8 0 μ L に懸濁した。菌液と等量のDNA 溶液（エタノール沈殿後にT E バッファーに溶解したYIT 11057のゲノムDNA）を混合後、1 0 μ L を 5 0 m M 塩化マグネシウム添加m G A M 寒天培地上にスポットして、液体が乾燥するまで数分間静置後、3 7 $^{\circ}$ C で嫌気培養した。同寒天培地は使用当日にオートクレーブ滅菌したものを用いた。1 6 時間後、菌体ペレットを 1 μ L ループで全量掻き取り、5 0 0 μ L のm P Y 液体培地に懸濁した。このうち 5 0 μ L を分取し、0. 5 % グルコース添加m P Y 液体培地 6 4 0 μ L に懸濁した。このうち 2 0 0 μ L を 9 6 穴プレートに分取し、5 0 μ L のミネラルオイルを重層後、マイクロプレートリーダー P o w e r W a v e 3 4 0 （バイオテック社）を用いて増殖曲線を取得した。残りの菌液は、1. 5 m L チューブで 3 7 $^{\circ}$ C で嫌気培養を行った。P C 画面上で濁度の上昇が確認された場合、1. 5 m L チューブ中の菌液 1 0 μ L を新鮮な同液体培地 5 0 0 μ L に継代し、9 6 穴プレートと 1. 5 m L チューブに分けて再び増殖をモニタリングした。その後に増殖が確認された場合、1. 5 m L チューブ中の菌液をm G A M L 寒天培地に画線塗抹し、シングルコロニーを単離後、グリセロールに懸濁して－8 0 $^{\circ}$ C で保存した。単離株の菌体を 0. 5 % グルコース添加m P Y 液体培地に懸濁し、増殖性を確認した。単離株の完全長ゲノムを参考例 1 (3) に記載の手順で決定した。

[0058] (4) 糖の資化性試験

(3) で得られた単離株の凍結菌体、Y 51493およびYIT 11057をそれぞれ 1

%乳糖添加変法GAM寒天培地に植菌後、嫌気グローブボックス内で2～3日培養した。得られた複数個のコロニーを掻き取り、同液体培地に継代した。37℃で一晩培養し、新鮮な同培地に培養液を5%継代、対数増殖期中後期に到達するまで6～9時間培養した。OD₆₀₀が0.2となるようにPIPES-ILS培地を添加した培養液2μLを96wellプレートに分注した。各糖0.5%添加PIPES-ILS培地198μLに加え、ミネラルオイル50μLを重ねし、嫌気条件下37℃で培養した。72時間後のOD₆₀₀増加量が0.1以上で資化性ありと判定した。

[0059] (5) 生菌数・生残性の確認

冷蔵保存を0、14、21、28日とした以外は、実施例1(2)と同様の方法で、(3)で得られた単離株およびY 51493の生菌数・生残率を算出した。

[0060] (6) 変異部位の解析

YIT 11057の完全長ゲノムをリファレンスとして、(3)で得られた菌株に生じた変異を探索した。まずsnippyを用いて一塩基置換(SNPs)を同定した。また、mauve (Darling et al., Genome Research 14, 1394-1403)を用いて大規模なゲノム変化及びsnippyでは検出されなかったSNPsを目視で確認した。

[0061] (7) 結果

YIT 11057から抽出したDNAをドナー、Y 51493の生菌体をレシピエントとして形質転換を行った結果、グルコースを唯一の糖源とする液体培地で増殖する形質転換体ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 13179が得られた。YIT 13179のグルコース資化性を確認した結果、グルコースを資化することが確認された(表4)。また、YIT 13179とY 51493はどちらも2週間保存した場合には生残率が40%以上であり、YIT 13179はY 51493と比較して生残率が向上していることが確認された(図8)。

YIT 13179の完全長ゲノムを決定し、グルコース輸送体遺伝子の塩基配列を確認したところ、YIT 13179では、Y 51493で生じていた1塩基の欠失が回復

しており、遺伝子の全長がYIT 11057と同一配列であった。

[0062] [表4]

day3(72h)		溶性 デンプン	コムギ アラビノキシラン	ラクトース	グルコース
<i>B.pseudocatenulatum</i>	YIT 11057	0.78	0.38	0.93	1.04
	Y 51493	0.71	0.37	0.88	0.01
	YIT 13179	0.86	0.58	1.05	0.92

[0063] Y 51493、YIT 11057及びYIT 13179のアラビノキシラン、スターチ、及びラクトースの資化性はほぼ同等であった（表4）。

[0064] YIT 11057からY 51493への育種の過程で、ゲノム15箇所に変異が入っており、これらは乳培地での生残性の改善に寄与すると予想される。このうち、YIT 13179では1箇所のみがYIT 11057の配列に復元していた。復元した変異は、グルコース輸送体遺伝子の欠失であった。

YIT 11057と比べて、Y 51493では変異しておらずYIT 13179で新たに生じた変異は4箇所あったが、安全性と関係することが予想される遺伝子は含まれていなかった。更に、MiFuP Safetyを用いて有害遺伝子を探索したが、YIT 13179から安全性に懸念をもたらす遺伝子は検出されなかった。

請求の範囲

- [請求項1] キシラナーゼ遺伝子をゲノム上に有し、乳成分含有培地での生残性がビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057 (N I T E B P - 0 2 9 3 0) より高いビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する細菌。
- [請求項2] キシラナーゼ遺伝子が配列番号 1 で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド又は当該塩基配列と 7 0 % 以上の同一性を有し、且つキシラナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである、請求項 1 記載の細菌。
- [請求項3] 乳成分含有培地で 2 4 時間培養後、低温で 2 週間保存した場合に生残率が 2 0 % 以上である、請求項 1 記載の細菌。
- [請求項4] ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム Y 51493 (N I T E A B P - 0 3 8 5 2)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 13179 (N I T E A B P - 0 3 8 5 3)、又はこれらと近縁な菌株。
- [請求項5] 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の細菌を含有する飲食品。
- [請求項6] 発酵乳飲食品である請求項 5 記載の飲食品。