

〈短報〉

## 乳酸桿菌 (*Lactobacillus casei*) の 好気・微好気・嫌気培養に伴う形態変化

西矢 芳昭<sup>1)</sup>、中道 朱音<sup>1)</sup>、清水 太一<sup>1)</sup>、大西 純平<sup>1)</sup>、青木 駿介<sup>1)</sup>、尾賀 裕一<sup>1)</sup>

### Effect of aerobic, microaerobic, and anaerobic culture conditions on the morphology of *Lactobacillus casei*

Yoshiaki Nishiyama<sup>1)</sup>, Akane Nakamichi<sup>1)</sup>, Taichi Shimizu<sup>1)</sup>,  
Junpei Ohnishi<sup>1)</sup>, Shunsuke Aoki<sup>1)</sup> and Yuichi Oga<sup>1)</sup>

**Summary** Filamentous morphologies of bacilli under stressful growth conditions, such as heat and salt stress, are well known. In this study, morphological changes in the cells of *Lactobacillus casei* under aerobic, microaerobic, and anaerobic culture conditions were investigated. On solid cultures, only the microaerobic condition optimal for *L. casei* resulted in long rod-shaped cells. Moreover, the cells became longer after each subculture probably because they were being acclimatized to the growth conditions. In contrast, in the liquid cultures, *L. casei* cells became filamentous, regardless of oxygen concentration.

**Key words:** Morphology, *Lactobacillus*, Microaerobic culture, Rod-shaped bacteria, Cell elongation

#### I. 緒言

細菌は単細胞生物なので、多細胞生物のように多様な形態をとれない。一般に細菌の細胞は、比較的小さな分布で形態や大きさを一定に保っている。しかし、ストレスなど環境の一時的な変動に伴う形態変化も珍しくない。つまり、周囲の環境に応じて細胞の大きさ、長さ（縦横比）や形、鞭毛や繊毛の有無などの変化を見せることが知られている。著名な研究例として、

*Pseudomonas*属細菌の培養により浮遊と沈澱、液面膜形成という3種の明確に異なる細胞形態の出現が報告されている<sup>1)</sup>。そして、それらは遺伝的に区別されず、1種を単離培養しても3種の形態が再度見られる。本分野でもっとも精力的な研究は、*Bacillus*属桿菌細胞の長さの変化を対象としており、特に*B. subtilis*のストレス条件下における細胞伸長機構が分子レベルで解明されている<sup>2,4)</sup>。

細菌細胞の形態変化は、医療分野においても

<sup>1)</sup> 摂南大学理工学部生命科学科  
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8

連絡先: 西矢芳昭  
摂南大学理工学部生命科学科  
Tel: +81-72-800-1151 Fax: +81-72-838-6599  
E-mail: nishiyama@lif.setsunan.ac.jp

<sup>1)</sup> Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University, 17-8 Ikedanaka-machi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

受付日: 2020年4月6日  
採択日: 2020年5月12日

重要である。すでに、病原性細菌の宿主への感染や定着、種々の薬剤暴露など外的要因と形態変化との関係が示唆されている。例えば、*Lactobacillus*属乳酸桿菌の多剤耐性変異株が人工腸液にて連鎖状の形態をとる例が示されている<sup>5)</sup>。細菌の形態変化に対する理解は、病原性を知る手がかりとなり、薬剤感受性との関連も予想される。つまり、細菌の形態変化に関する構成要因は、医療検査や治療の標的となり得る。

本報では、プロバイオティクスとして有名な乳酸菌飲料中の乳酸桿菌*L. casei*<sup>6-7)</sup>を対象に、酸素濃度の異なる培養条件での細胞伸長(縦横比の変化)を調査した。*L. casei*はグラム陽性、微好気性(通性嫌気性)で、運動性がなく孢子を形成しない。結果として固体培養では、乳酸桿菌にとって好適な微好気条件で細胞伸長が見られ、ストレスが大きいと考えられる好気条件では短桿型となった。また、耐酸耐塩性カルボキシメチルセルロースを寒天の代替とする長期保存可能な酸性固体培地を新たに開発し、長期継代培養による馴化での細胞伸長を確認した。さらに、液体培養による予備的検討でも興味深い形態変化が観察できたので報告する。

## II. 材料及び方法

### 1. 使用菌株

使用した乳酸桿菌株は、乳酸菌飲料(ヤクルト, 東京)をそのままMRS寒天培地(関東化学, 東京)に植菌し、コロニー単離した。単離菌が*L. casei* (strain Shirota)<sup>8)</sup>であることは、コロニーダイレクトPCR<sup>9)</sup>により確認した。PCRプライマーは、5'-GTTTGATCCTGGCTCA (16 mer)と、5'-TACCAGGGTATCTAATCC (18 mer)とを使用した。PCR産物のDNAシーケンシングにより、*L. casei*の16 S-rDNA配列との100%一致を確認した。

### 2. 培養および形態観察

好気培養は、一般的な恒温槽による方法で行った。微好気培養および嫌気培養は、アネロパック・微好気およびアネロパック・ケンキ(スギヤマゲン, 東京)をそれぞれ用いて簡易的に行った。

固体培養は、MRS寒天培地(pH 6.2, 関東化学, 東京)に植え継ぎ、30℃で静置した。液体培養は、

固体培地上のコロニーをシャーレ(アズノールシャーレφ40×13.5 mm, アズワン, 大阪)内にて4 mLのMRSブイヨン培地(pH 6.2, 関東化学)に植菌し、30℃で静置した。培養時間は、成長の差を考慮して固体培養で約1週間、液体培養で約1日間とした。

長期継代培養(約1週間毎の植え継ぎ)の検討において、寒天培地は酸性条件でアガロースが徐々に分解するため培養状態での保存が困難であった。そこでわれわれは、耐酸耐塩性カルボキシメチルセルロース(No.1390, ダイセルファインケム, 東京)を寒天の代替とする酸性固体培地(pH 4.0)を新たに開発した。本培地の栄養成分はMRSブイヨン培地を用い、さらに11%カルボキシメチルセルロースおよび0.28%塩化カルシウムを添加することで固化させた。

*L. casei*の形態観察は、コロニーまたは培養液を滅菌イエローチップの先端で採取し、位相差顕微鏡(ECLIPSE E100LED, ニコン, 東京)を使用して倍率×1,000にて行った。各*L. casei*の縦横比率(アスペクト比)は、細胞を50ずつ顕微鏡画像より無作為に選抜き計測した。

## III. 結果及び考察

### 1. 固体培養における細胞伸長

好気、微好気、および嫌気条件による細胞伸長の違いを観察するため、好気固体培養後の乳酸桿菌をMRS寒天培地に植え継ぎ、それぞれの条件で培養した。結果をFig. 1に示す。培養後の桿菌細胞は好気培養(Fig. 1A)や嫌気培養(Fig. 1C)と比較して、微好気培養で明らかに成長傾向が見られ、細胞がより伸長した(Fig. 1B)。そこで、それぞれの酸素濃度条件で生育した細胞のアスペクト比を計測し分布を比較した(Fig. 2)。植え継ぎ時の桿菌細胞のアスペクト比は平均5.5(標準偏差1.7, 中央値5.6)で、この値は*L. casei*の細胞サイズに関する情報(0.7-1.1×2.0-4.0 μm<sup>10)</sup>)と矛盾しなかった。好気、微好気、嫌気培養で生育した乳酸桿菌のアスペクト比の平均値はそれぞれ6.1、13、8.0(標準偏差;それぞれ2.4、4.8、3.4;中央値;それぞれ5.1、12、6.9)で、微好気条件では他の条件と比べて細胞の伸長が見られた。分散分析より、それぞれのアスペクト比の平均差は有意水準5%で有意であった。

さらに、それぞれの条件にて植え継ぎを行い、生育した桿菌細胞のアスペクト比を再度計測したところ、好気、微好気、嫌気培養乳酸桿菌の平均値はそれぞれ7.3、14、10となった (Fig. 2)。標準偏差はそれぞれ3.0、8.0、3.8、中央値はそれぞれ7.3、12、10であった。各培養で植え継ぎにより細胞伸長が若干進む傾向が見られたが、

継代前後の分散分析より、微好気培養のみアスペクト比の平均差が有意とはいえず、明確な変化は観察できなかった。

桿菌の細胞伸長は、3つのケースが考えられる。ひとつは桿菌の連鎖で、細胞分裂後も複数の桿菌が離れない状態であり、正確には細胞伸長ではない。多剤耐性乳酸桿菌の例<sup>5)</sup>が、これに当

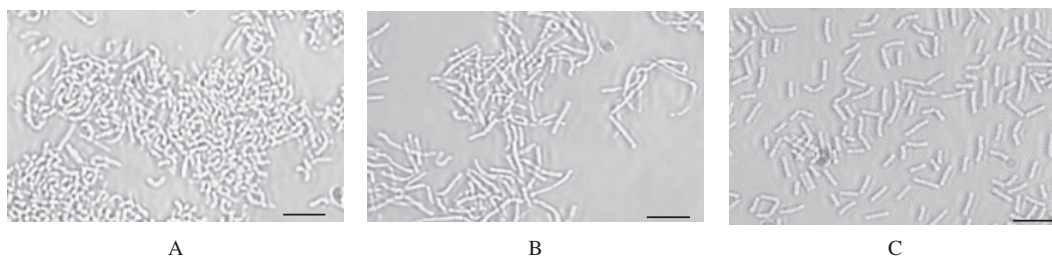


Fig. 1 Solid cultures of *Lactobacillus casei*. A: aerobic condition, B: microaerobic condition, and C: anaerobic condition. Scale bar: 10  $\mu$  m.

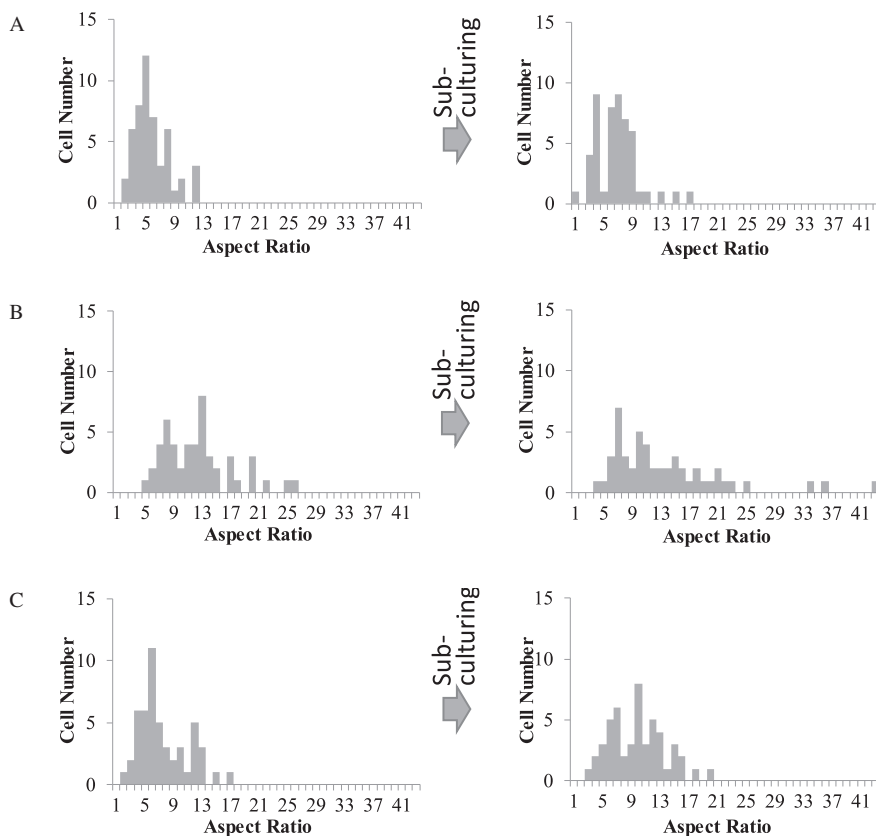


Fig. 2 Histograms of the distributions of cell lengths. Aspect ratios of *Lactobacillus casei* cells ( $n = 50$ ) were measured under each condition. A: aerobic condition, B: microaerobic condition, and C: anaerobic condition.

たる。次は細胞分裂阻害で、Zリングの形成やその後の細胞分裂が阻害され伸長する。典型的な例として、桿菌の伸長がストレスや薬剤添加によって誘発される。もうひとつは真の細胞伸長で、細胞分裂が起こらず伸びていく。酸化ストレスに弱い乳酸菌にとって、微好気条件は好適な生育環境である。したがって本研究結果は、好適環境では細胞分裂のスイッチが入りにくい可能性を示唆している。好適な微好気培養での細胞形態が通常と考えるのであれば、酸化的ストレスの大きい好気培養では短桿化が生じるといえる。また、本来*L. casei*は運動性がないが<sup>s10)</sup>、好気培養では微細振動による運動性も観察されており（データ示さず）、ストレス対応の一環かもしれない。

## 2. 継代培養における細胞伸長

微好気固体培養では、植え継ぎによる乳酸桿菌の細胞伸長傾向が明確ではなかった。われわれは耐酸耐塩性カルボキシメチルセルロースを基材とした酸性固体培地を新たに開発したので、これを用いた微好気条件における長期継代培養を行い、アスペクト比の平均を比較した (Fig. 3)。

本検討では固体培地の成分やpHの違いから、最初の培養でのアスペクト比がMRS寒天培地での検討結果より小さくなった。しかしながら、アスペクト比は継代培養の回数と共に増加し、植え継ぎ5回で約2倍となった。それ以降、植え継ぎ13回まで行ったが顕著なアスペクト比の増加は認められなかった。植え継ぎ菌株が汚染菌ではなく元々の*L. casei*であることは、コロニーダイレクトPCRとDNAシーケンシングにより確認した。この継代培養による段階的な細胞

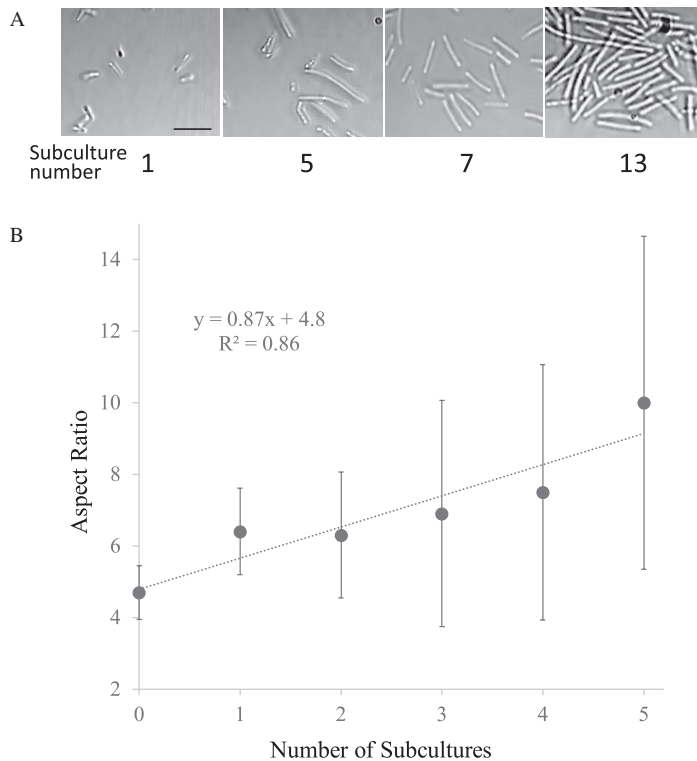


Fig. 3 Subcultures of *Lactobacillus casei* using carboxymethylcellulose solid media under microaerobic conditions. A: Cells of subculture numbers 1, 5, 7, and 13 are presented in the micrographs. The Scale bar is 10  $\mu$  m. B: The relationship between the number of subcultures and the average aspect ratios of *L. casei* cells (n = 50, with standard deviation) is shown in the graph.

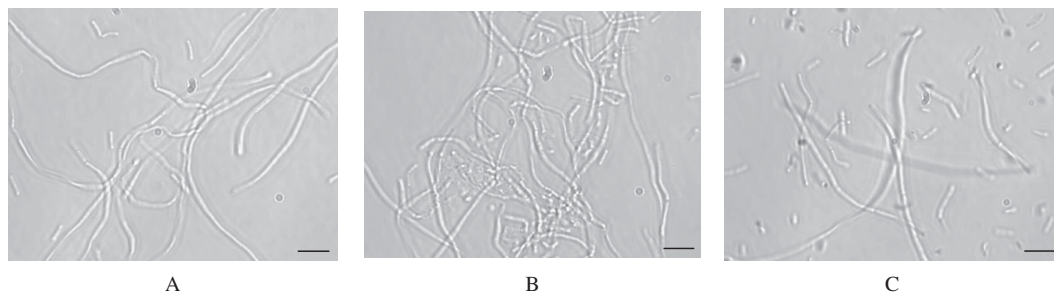


Fig. 4 Liquid static cultures of *Lactobacillus casei*. A: aerobic condition, B: microaerobic condition, and C: anaerobic condition. Scale bar: 10  $\mu$  m.

伸長は、乳酸桿菌の環境順応ではないかと予測される。

### 3. 液体静置培養における形態変化

固体培養と同様の環境で、好気、微好気、および嫌気条件による細胞伸長の違いを液体静置培養でも観察した (Fig. 4)。結果は固体培養の場合と全く異なっており、どの酸素濃度条件においても1日間の培養にてフィラメント状の形態異常菌が認められた。ただし、定性的な事象であり、アスペクト比測定は非常にバラツキが大きく統計的に意味をなさなかった (データ示さず)。好気、微好気、嫌気培養前後でpHは、6.2→5.0、6.2→4.2、6.2→4.2とそれぞれ変化した。

液体静置培養では、細胞のフィラメント化という急進的な形態変化が起こると分かり、原因については菌濃度やpH変化などの影響が考えられるが、現時点では不明である。他の桿菌でも、細胞分裂阻害の形態としてフィラメント状細胞が認められる。液体培養は固体培養に対し、培養期間だけでなく物質拡散のし易さから増殖速度やpH低下速度が全く異なる。*L. casei*の最適生育pHは5.5と報告されており<sup>11)</sup>、急激なpH変化が大きなストレスとなって細胞分裂阻害を生じた可能性が予想される。

## IV. 結語

乳酸桿菌を好気、微好気、および嫌気条件で簡易培養し、細胞伸長の生育酸素条件による差異を観察した。結果として、固体培養では乳酸菌にとって好適な微好気環境で最も細胞伸長し、より高ストレスの好気環境や嫌気環境では短桿

菌が優勢であった。さらに、微好気条件での長期継代培養により、段階的に細胞が伸長し、長桿化の傾向を示した。すなわち、好適あるいは順応環境では本来長く伸長する細菌細胞が、ストレス環境では分裂を早めて個体数を増やす可能性を示唆している。

最近、ビール汚染菌として知られる乳酸桿菌属種はビールに数回植え継ぐと短桿化することが報告された<sup>12)</sup>。短桿化の原因は、エタノールやホップ、低pH、飢餓などのストレスと予想されている。ストレスによる形態への影響は、その度合いにより直ぐに現れるケースもあれば、継代により現れるケースもあると思われる。ストレスで桿菌が短桿化する例はほとんど知られておらず、その点でビール汚染菌の例は本研究との共通性がある。すなわち、短桿化はビール中のような特殊環境での現象だけでは無く、より一般的であることが本研究により示された。

一方、液体静置培養では、酸素濃度に関わらず、急進的な形態変化にて細胞のフィラメント化が見られた。現時点では定性的な事象にとどまるが、今後、液体静置培養でのフィラメント化と細胞分裂阻害との関係について遺伝子発現解析を行いたい。

微生物観察は、さまざまな要因を加味して行う必要がある。本研究が桿菌の形態変化に関する情報の一助となり、臨床微生物検査や食品微生物検査の参考となれば幸いである。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反：なし

文献

- 1) Rainey PB and Travisano M: Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, 394: 69-72, 1998.
- 2) Errington J and Wu J: Cell Cycle Machinery in *Bacillus subtilis*. *Prokaryotic Cytoskeletons*, 67-101, 2017.
- 3) Shin SM, Song SH, Lee JW, Kwak MK, and Kang SO: Methylglyoxal synthase regulates cell elongation via alterations of cellular methylglyoxal and spermidine content in *Bacillus subtilis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 91: 14-28, 2017.
- 4) Zhao L, Ye J, Fu J, and Chen GQ: Engineering peptidoglycan degradation related genes of *Bacillus subtilis* for better fermentation processes. *Bioresource Technol*, 248: 238-247, 2018.
- 5) 小林洋一, 遠山 清, 寺島経男: 乳酸桿菌の生物学的特性について II. 多剤耐性乳酸桿菌 *Lactobacillus casei* PSR3002 の人工消化液耐性. *日本細菌学雑誌*, 29: 691-697, 1974.
- 6) Lai HH, Chiu CH, Kong MS, Chang CJ, and Chen CC: Probiotic *Lactobacillus casei*: effective for managing childhood diarrhea by altering gut microbiota and attenuating fecal inflammatory markers. *Nutrients*, 11: 1150, 2019.
- 7) Ricciardi A, Zotta T, Ianniello RG, Boscaino F, Matera A, and Parente E: Effect of respiratory growth on the metabolite production and stress robustness of *Lactobacillus casei* N87 cultivated in cheese whey permeate medium. *Front Microbiol*, 10: 851, 2019.
- 8) Yukitoshi Aoyagi Y, Amamoto R, Park S, Honda Y, Shimamoto K, Kushiro A, Tsuji H, Matsumoto H, Shimizu K, Miyazaki K, Matsubara S, and Shephard RJ: Independent and interactive effects of habitually ingesting fermented milk products containing *Lactobacillus casei* strain Shirota and of engaging in moderate habitual daily physical activity on the intestinal health of older people. *Front Microbiol*, 10: 1477, 2019.
- 9) Tsuchizaki N, Hamada M, and Hotta K: Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity in *Streptomyces* of *kan* gene encoding a specific aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Actinomycetol*, 15: 23-29, 2001.
- 10) <https://genome.jgi.doe.gov/portal/lacca/lacca.home.html>
- 11) Cai H, Rodriguez BT, Zhang W, Broadbent JR, and Steele JL: Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 153: 2655-2665, 2007.
- 12) 浅野 静: ビール醸造における微生物検査法の迅速化に関する研究. *生物工学会誌*, 97: 108-114, 2019.