

乳酸菌 *Lactobacillus fermentum* 403菌が生成する オーキシシン・サイトカイニンの分析方法の開発 —プロバイオティク環境農業への応用原理

An Analytical Method of Auxin and Cytokinin Produced by *Lactobacillus fermentum* 403
— a Principle of Probiotic Environmental Agriculture

松井三郎¹、松田知成²、汐見修一³、松下 潤⁴、稲森悠平⁵、杉浦則夫⁶

¹京都大学名誉教授 / 〒616-8045 京都市右京区花園内畑町10-45

²京都大学工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター / 〒520-0811 大津市由美浜1-2

³株式会社 Skylife / 〒529-1835 滋賀県甲賀市信楽町中野641-191

⁴芝浦工業大学システム工学部環境システム学科 / 〒337-8570 埼玉県さいたま市見沼区深作307

⁵福島大学共生システム理工学類環境システムマネジメント専攻 / 〒9601248 福島県福島市金谷川1

⁶筑波大学大学院生命環境科学研究科生命産業科学専攻 / 〒305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1.

SABURO MATSUI¹, TOMONARI MATSUDA², SHUICHI SHIOMI³, JUN MATSUSHITA⁴,
YOUHEI INAMORI⁵, and NORIO SUGIURA⁶

¹Kyoto University, Emeritus Professor/10-45 Uchihatacho Hanazono Ukyoku Kyoto City, 616-8045

²Research Center for Environmental Quality Management, Graduate School of Engineering,
Kyoto University/1-2 Yumihama, Otsu City, 520-0811, Japan

³Skylife Ltd./641-191 Nakano, Shigaraki-cho, Koga City, Shiga Prefecture, 529-1835, Japan

⁴Department of Architecture and Environmental Systems, College of Systems Engineering and Science,
Shibaura Institute of Engineering/307 Fukasaku, Minumaku, Saitama City, 337-8570, Japan

⁵Department of Environmental System Management, Faculty of Symbiotic Systems Science,
Fukushima University/Kanayagawa, Fukushima City, 960-1248, Japan

⁶Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
/1-1-1 Tennodai, Tsukuba City, 305-8577, Ibaraki, Japan

Abstract

Lactic acid producing bacteria are widely used for human health care known to be probiotics in Japan as well as other countries. We have developed an economic cultivation method of *Lactobacillus fermentum* 403 (LBF) that is commercially applied to raising chicken, pig and prawn without the application of antibiotics, which is called animal probiotics. We have further developed the application of the LBF to cultivation of crops in which we observed the bacteria as a good endophyte helping growth of crops minimizing the application of pesticide. We defined this approach as probiotic environmental agriculture that is a type of scientific organic farming. Our cropping of vegetable, fruit and rice showed good effect in terms of harvest and taste, which hypothesized that the LBF produced plant hormones such as auxin and cytokinin as endophyte, and stimulated growth as well as increase in sugar content. We successfully analyzed the production of auxin and cytokinin by the LBF using the LC/MS/MS method. The production of auxin and cytokinin depended on temperature of cultivation of the LBF.

Key Words: *Lactobacillus fermentum* 403, Auxin, Cytokinin, Crops, Probiotic environmental agriculture

1. はじめに

乳酸菌 *Lactobacillus fermentum* 403 (LBF403) は、植物性培地で大量培養が可能となったことから、多様な経済的利用法への開発がなされ、発展してきているところである。その一つが動物飼料に混ぜて発酵させ毎日摂取させることであり、これにより動物（豚、鶏）の腸内細菌叢を安定化させることが可能となり、飼育期間中に抗生物質不使用で生育させることに成功した¹⁾。乳酸菌を人の健康に利用することは、プロバイオティクスという概念で、日本や欧米で盛んになってきている²⁾が、この方法は動物飼育に有効であり、その適用に対して成功した。この方法は動物飼育の画期的な技術といえ、日本、シンガポール、マレーシアで商用的に実施されるに至っている³⁾。さらに、植物栽培においても乳酸菌使用効果が確認され、エンドファイト（植物内生菌）となっていることが分ってきた。このエンドファイト効果は、1930年代アメリカ・ケンタッキーの牧草（イネ科ウシノケグサ）を食べた牛、羊で歩行障害病、馬で流産が発生し、原因としてある種のカビ菌が植物内生菌となってアルカロイド毒を分泌していることが分ったことに由来している^{4,5)}。すなわち、植物にとって問題がなくても動物に問題を起したことがこの発見のきっかけであったが、更に、その後ニュージーランドでエンドファイトの研究が進展して、さまざまな細菌が植物に共生し植物病原菌（連作障害菌）に対抗する免疫効果を植物に持たせる効果、植物を攻撃する昆虫に毒を分泌して植物を守る効果など、興味深いエンドファイト効果が理解されるようになった。近年この分野の研究が急速に進展している。エンドファイト効果は、植物とそれを摂取する動物や人間に悪影響を起ささないことが条件である。その点、乳酸菌（LBF403）は、人が摂取して健康に良い効果があるためプロバイオティクスとしての長い実績を有しているといえる。また、同じ乳酸菌で、鶏、豚、車えびの飼育で問題ないことを我々は実証してきている³⁾。

これまでの研究から、長年化学肥料と農薬で栽培された水田や畑地土壌は、硬くなっていて植物の根の成長を困難にしていることが知られている。このような土壌を改善する方法として、乳酸菌（LBF403）を主体とした粉末を撒布し、土壌構造を柔らかくする方法が挙げられる。

また、適当な有機肥料を加えると土壌環境の改善の進むことが知られている。この土壌構造が柔らかくなる仕組みは解明できていないものの、多くの農家で実証されてきている。更に、栽培中に、乳酸菌（LBF403）を水で希釈して葉面撒布することにより、葉面から葉脈に乳酸菌が侵入して、後から感染する病原菌、カビ菌と対抗するエンドファイト効果が生み出される。これまでの事例として、カボチャ栽培のウドンコ病（石垣島協力農家）、トマト栽培（滋賀県高島市農家、マレーシア農業公社）、キュウリ栽培（滋賀県高島市農家、マレーシア農業公社）、ナス栽培（滋賀県高島市農家、マレーシア農業公社）でのウドンコ病やべと病障害防止が認められている。また、乳酸菌がなんらかの働きを発揮したことによる、ブルーベリー栽培での昆虫の忌避も見られている（和歌山市農家）。なお、これらの予防効果に加えて宿主植物の成長、開花、結実を促進する効果が、認められている。興味深い点は、収穫量の改善、カボチャ、小松菜、キュウリ、ナスビ等野菜の旨み効果、パイナップル（沖縄本島農家、台湾農家）、メロン（マレーシア農業公社）、ブドウ（滋賀県高島市農家）等果物の糖度を上げる効果、米では食味の甘味を増進する効果（滋賀県高島市農家、和歌山市農家、広島市農家、大分県日田市農家、新潟県南魚沼郡農家）が認められた点にある。これらの効果から、乳酸菌を活用する農業はプロバイオティクス環境農業と称されている。

そこで、これらの成長、開花、結実効果を説明する仮説として、乳酸菌（LBF403）が、植物成長ホルモンであるオーキシン、サイトカイニンを増殖過程で分泌するという考えを提案しているところである。本研究では、上記の点を踏まえ、これらの植物ホルモンが乳酸菌（LBF403）により生産されていることを検証するために、LC/MS/MS分析方法による解析評価を行った。

2. 実験方法

2.1 実験供試試葉

図1に植物ホルモンのサイトカイニン 1: *trans*-zeatin, 2: *cis*-zeatin, 3: *N*⁶-(Δ 2-isopentenyl)-adenine、及びオーキシン 4: indole-3-acetic acidの構造を示す。

これらの標準試葉、*cis*-zeatin、*trans*-zeatin、*N*⁶-(Δ ²

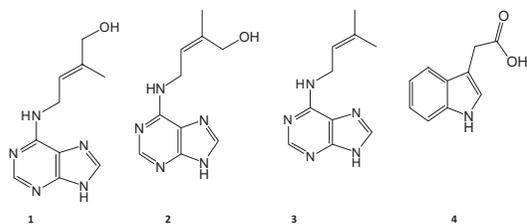


Fig. 1 Plant hormone Cytokinin (1, 2, 3) and Auxin (4)
1: trans-zeatin, 2: cis-zeatin, 3: N⁶-(Δ²-isopentenyl)-adenine, 4: indole-3-acetic acid.

Table 1 Condition of HPLC operation

Time (min.)	A %	B %
0	95	5
20	20	80
21	95	5
31	95	5

Table 2 Analytical condition of MS/MS

Substances	Precursor ion	Product ion	Cone voltage (V)	Collision
Indole-3-acetic acid	176.1	130	35	17
[¹³ C ₆] Indole-3-acetic acid	182.1	136	35	17
N ⁶ -(Δ ² -isopentenyl)-adenine	204.1	136	35	15
zeatin	220.1	136	35	15

-isopentenyl)-adenine、indole-3-acetic acidは和光純薬のものを実験に供した。また、LC/MS/MS分析の内部標準物質としては、[¹³C₆] indole-3-acetic acidを、Cambridge Isotope Laboratoriesを実験に供した。

2.2 乳酸菌の培養

ラクトパウダー糖白(株式会社Sky Lifeが、製造販売しているLBF403の製品名)の粉末 500mgを500mlの精製水に懸濁し、40mlずつコニカルチューブに分注し、20℃と35℃で3週間静置培養した。ラクトパウダー糖白は乳酸菌を長期乾燥保存するために、炭水化物が添加されていることから、培養中に栄養成分は添加しなくても増殖分裂が可能なものである。

2.3 植物ホルモンの分析

乳酸菌の培養液を遠心分離し、その上澄み液を、Sep-Pak Plus C18 Environmental カートリッジ (Waters社)に通水した。カートリッジを5mlの精製水を通して洗浄し、その後メタノール4mlで溶出した。このメタノール分画を、遠心濃縮器を用いて蒸発乾燥後、50μlの30% DMSOに溶解して、そのうち20μlをLC/MS/MS分析に供した。

2.4 LC/MS/MS分析

HPLCはWaters Alliance 2695を用いた。HPLCカラムは、Shim-pack XR-ODS φ3×75mmを用い、溶離液はA

液：水、B液：メタノール、として、表1の条件で溶出した。MS/MSはWaters Quattro Ultima Ptを用いた。イオンモードはES+、キャピラリー電圧3.5kV、コーン電圧35V、ソース温度130℃、デソルベーション温度380℃、コーンガス35 l/h、デソルベーションガス700 l/hと設定した。なお、分析はMRMモードで行い、各植物ホルモンの分析条件は表2に示す条件で行うこととした。

3. 結果

LC/MS/MSによるオーキシン・サイトカイニンの分析結果は図2、3、4に示す通りである。図2で、N⁶-(Δ²-isopentenyl)-adenineが、摂氏20度で順調に生産される一方、35度では生産されなかった。図3で、Cis-とTrans-zeatinも、摂氏20度で順調に生産される一方、35度では生産されなかった。サイトカイニンの生成が温度と関係した。図4で、indole-3-acetic acidが摂氏20度で順調に生産される一方、35度では生産されなかった。

4. 考察

本結果より、成長、開花、結実効果を説明する仮設として、乳酸菌(LBF403)が、植物成長ホルモンであるオーキシン、indole-3-acetic acidおよびサイトカイニンであるtrans-zeatin、cis-zeatin、とN⁶-(Δ²-isopentenyl)-adenineを増殖過程で生産することが、わかった。また、

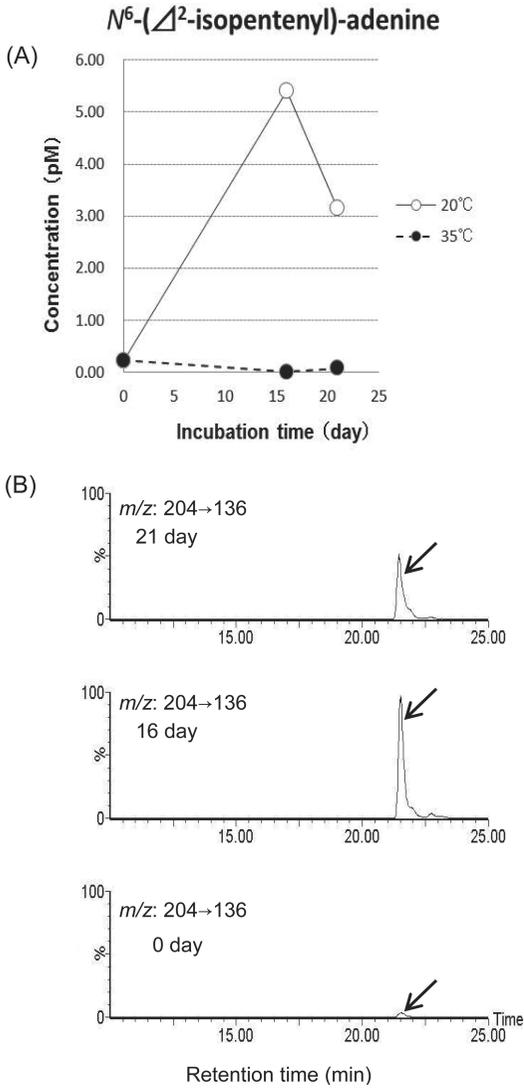


Fig. 2 Production of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenine by LBF403

(A): Changes of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenine over time at cultivation temperatures 20°C and 35°C.
 (B): LC/MS/MS Chromatograms of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenine cultivation temperature at 20°C.

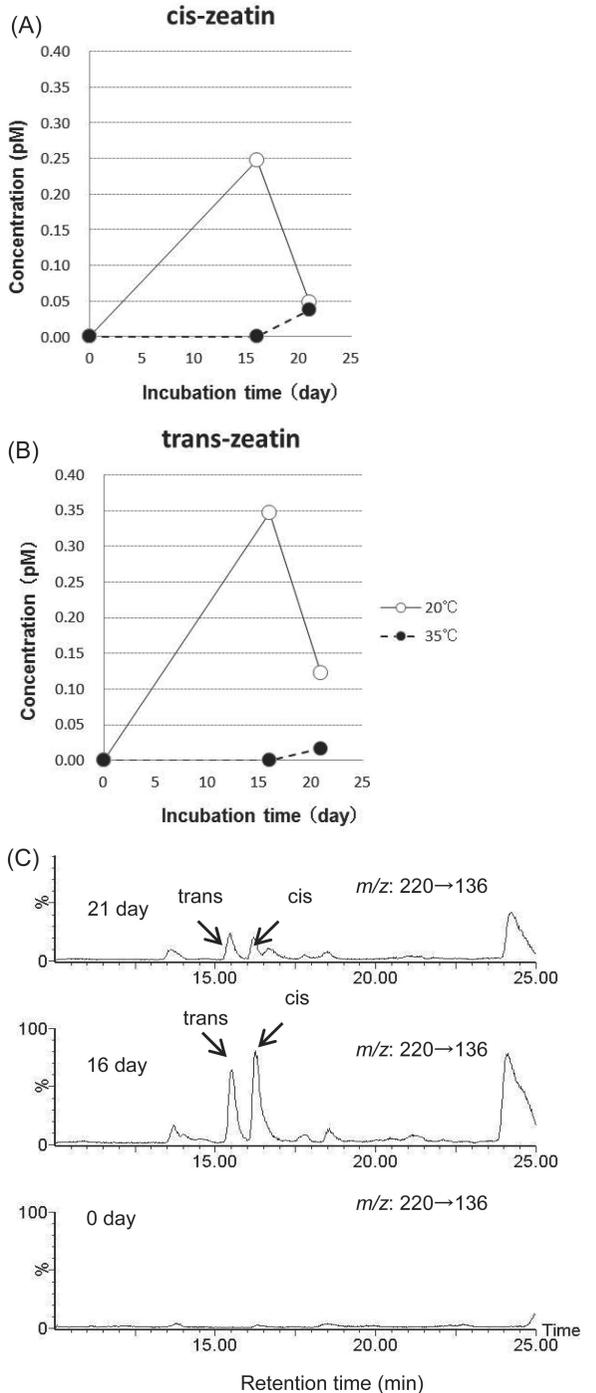


Fig. 3 Production of Cis- and Trans- zeatin by LBF403
 (A)(B): Changes of zeatins over time cultivation temperatures at 20°C and 35°C.
 (C): LC/MS/MS Chromatograms of Cis- and Trans- zeatin cultivation temperature at 20°C.

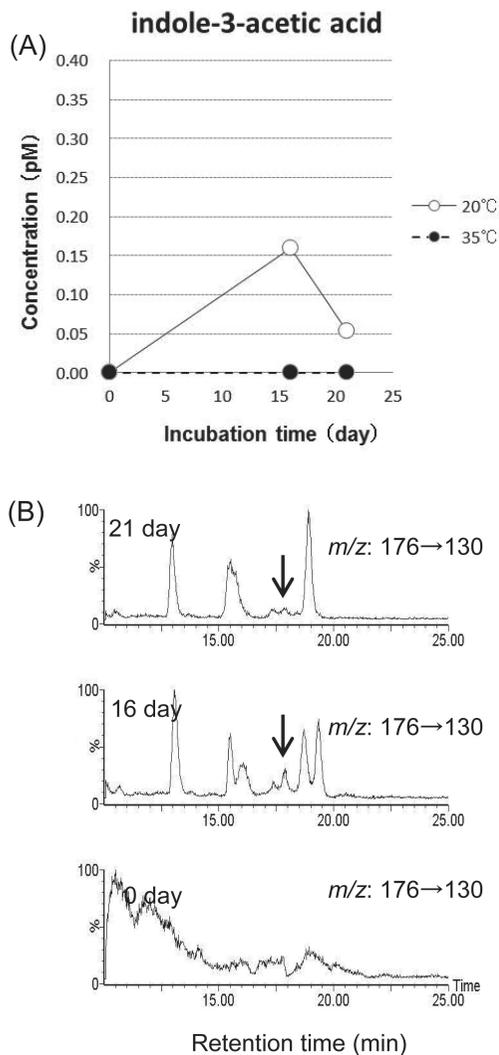


Fig. 4 Production of indole-3-acetic acid by LBF403 (A): Changes of indole-3-acetic acid over time at cultivation temperatures 20°C and 35°C. (B): LC/MS/MS Chromatogram of indole-3-acetic acid at cultivation temperature at 20°C.

興味深いことに温度20°Cで、順調にオーキシシン・サイトカイニンの生産が認められる一方、35°Cでは生産能の低下が認められた。このことは、栽培植物の最適温度（中温度）と乳酸菌（LBF403）のオーキシシン、サイトカイニン生産温度との間に相関関係の存在することを示唆するものである。なお、乳酸菌（LBF403）を動物飼料に加えて使用する場合、哺乳動物の体温が高いために、これらの植物ホルモンの生産能は低下するものと推定される。

放線菌が植物生育に様々な重要な働きをすることは、

西村を始め多くの報告がされているが、その働きの中心にサイトカイニンの生産がある⁶⁾。また、経塚は稲の生育で稲自身がサイトカイニンを生産活性化する重要遺伝子を発見している⁷⁾。サイトカイニンがエンドファイトから供給され宿主植物と共生関係を成立させることは興味深いことである。

これらのことから、乳酸菌（LBF403）もエンドファイト効果を有していることが理解できる。このエンドファイト効果は、水耕栽培でも確認できている³⁾。小松菜の水耕栽培で病原菌による障害を防止する方法として、乳酸菌（LBF403）を寒天に封入して水中設置するとゆっくり寒天が溶解するとともに乳酸菌が水中に溶出して水耕栽培溶液に拡散し、小松菜の根から侵入してエンドファイト効果が発揮されると考えられる。このことにより、水耕栽培で頻繁に発生する病原菌障害が防止でき、全く無農薬の水耕栽培が可能になるといえる。

また、水耕栽培で乳酸菌（LBF403）を使う方法は、寒天を水田の取水口に設置するのが適当である。寒天は1ヶ月で溶解するように設計してあるため、栽培期間4ヶ月間で4回新しい寒天を入れ交換することになる。そうすると、乳酸菌（LBF403）は、エンドファイト効果として水稲の根、茎、葉に共生化できるようになる。なお、水稲は連作障害を起こさないが、毎年のイモチ病（カビ菌感染）が、最大の障害とされている。そのため抗菌剤農薬を使用することになるが、乳酸菌（LBF403）は、エンドファイト効果として、イモチ病の発生抑制に効果が認められている。また、水耕栽培では殺虫剤、除草剤も使用されるが、それらが水田に残留し水田の生態系健全性を損なうことが指摘されている。滋賀県は、琵琶湖水質と生態系保全のために「環境こだわり農業」政策を導入し、従来の農薬、化学肥料使用量50%削減を進めている。滋賀県高島市の試験協力農家は、「環境こだわり農業」に従って水稲栽培をしているが、さらに乳酸菌（LBF403）使用を試みた結果、イモチ病対策に効果があったことに加えて、残留農薬の分解を促進し、水田に昆虫類、両生類が出現する時期を早める効果が観察されている。更に、収穫した米粒の残留農薬検査でも効果が認められている。表3は、殺虫剤：ジノテフラン、エトフェンブロックス、殺菌剤：フェリムゾン、フサライド、除草剤：ベンスルフロメチル、ダイムロン、フェントラザミドの米粒残留性を解析したものである。「環境こだわり農業」の水田で収穫された「こしひかり」には、殺虫剤：ジノテフランが検出限界に近い値で検出されたが、他の農薬は不検出であった。一方、乳酸菌（LBF403）を使用すると、表

Table 3 Agrochemical residues in Koshihikari rice grain cultivated with agrochemicals

	Herbicide	Result mg/kg	lowest limit	Residue Std.
Insecticide	Dinotefuran	0.01	0.01	2
Insecticide	Ethofenprox	ND	0.01	0.5
Fungicide	Ferimzone	ND	0.01	1
Fungicide	Fthalide	ND	0.01	1
Hebicide	Bensulfuron-methyl	ND	0.01	0.1
Hebicide	Daimuron	ND	0.01	0.1
Hebicide	Fentrazamide	ND	0.01	0.02

Table 4 Agrochemical residues in Koshihikari rice grain cultivatwed with agrochemicals and LBF application

	Herbicide	Result mg/kg	lowest limit	Residue Std.
Insecticide	Dinotefuran	ND	0.01	2
Insecticide	Ethofenprox、	ND	0.01	0.5
Fungicide	Ferimzone	ND	0.01	1
Fungicide	Fthalide	ND	0.01	1
Hebicide	Bensulfuron-methyl	ND	0.01	0.1
Hebicide	Daimuron	ND	0.01	0.1
Hebicide	Fentrazamide	ND	0.01	0.02

4に示すように、殺虫剤：ジノテフランも検出されなくなるのがわかった。このように、乳酸菌（LBF403）が植物にエンドファイト効果として機能することは極めて重要であり、日本の農業の安全安心に貢献する可能性が大きいといえ、乳酸菌（LBF403）の働きが動物、植物に共通する点は、まだ未解明な点が多いものの、我が国の水環境、農業、畜産、養殖改善に対し大きく貢献するものと考えられる。

5. まとめ

1) 乳酸菌（LBF403）を家畜の餌と一緒に与えて、プロバイオティクスとして抗生物質を使用しない健康な飼育に成功している。2) これを野菜・果物・稲栽培にも利用したところ、抗菌剤を減薬する農業方法が確認できた。これは乳酸菌がエンドファイトとして宿主植物と共生関係にあることで、説明ができる。3) さらに栽培における増産や、味が美味しくなる原因について、植物ホルモンのオーキシシン・サイトカイニンが関与し、乳酸菌（LBF403）によって生成供給されている仮説をたてたところ、4) 摂氏20度の培養条件で、オーキシシン・サイトカイニンを生成していることがLC/MS/MS分析で証明された。

謝辞

乳酸菌（LBF403）の植物栽培試験に協力して頂いた滋賀県高島市の中村栄次郎氏、また、栽培経過、結果、消費者の反応などの貴重な情報提供と試験栽培を行って頂いた足立吉次氏、山本宗一氏に対し、ここに感謝する次第である。

参考文献

- 1) 松井三郎、汐見修一、加納親一：乳酸菌発酵飼料による無抗生物質・無抗菌剤使用の養豚法の開発、腸内細菌学会誌、25(2)、p.6、(2011)
- 2) 梅崎良則：プロバイオティクス製品登場の歴史的背景と期待される今後の展開、腸内細菌学会誌、25(3)、p.157-164 (2011)
- 3) Matsu, Saburo and Shuichi Shiomi: Successful applications of *Lactobacillus fermentum* probiotics to pig farming, chicken raising, shrimp aquaculture and hydroponics, Proceedings of 5th Asian Conference of Lactic Acid Bacteria; Microbes in Disease Prevention and Treatment, Singapore (2009)
- 4) <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/fesalk.html>
- 5) <http://grasslands.clemson.edu/Forage%20Species/Tall%20Fescue/Tall%20Fescue.htm>
- 6) 西村富生：放線菌を利用した高付加価値カルミア組織培養菌からの小型鉢物の作出技術に関する研究、

三重大学大学院生物資源学研究科、博士学位と修士
学位の提出論文2004年3月-2004年12月、(2005)

- 7) 経塚淳子：ホルモン活性を利用した作物の生産性向上に期待：東京大学大学院農学研究科生産・環境生

物学専攻プレスリリース2007年2月5日、<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/kyozuka.html>

(受付 2012. 4.20)
(受理 2012. 6.29)

