

モンゴル国家畜乳および乳製品中の細菌の クローンライブラリー法による解析

麻植 優人¹・阿部 桃子¹・遠藤 陽介²・坂田 真宏²・Ichinkhorloo Zesem³・
Munkhtsetseg Janlav³・大橋 眞⁴・佐藤 高則^{4,*}

¹徳島大学総合科学部社会創生学科、²徳島大学大学院総合科学教育部地域科学専攻、³School of
Biomedicine, Health Science University of Mongolia、

⁴徳島大学大学院ソシオ・アート・アンド・サイエンス研究部
770-8502 徳島市南常三島町 1-1

Phylogenetic analysis of bacteria from Mongolian animal milks and their dairy products by clone library method

Yuto OE¹, Momoko ABE¹, Yousuke ENDOH², Masahiro SAKATA², Ichinkhorloo
ZESEM³, Munkhtsetseg JANLAV³, Makoto OHASHI⁴, and Takanori SATOH^{4,*}

¹Laboratory of Biochemistry, Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima,

²Laboratory of Biochemistry, Graduate school of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima, ³
School of Biomedicine, Health Science University of Mongolia, Ulan Bator, Mongolia, ⁴Institute of Socio-Arts
and Sciences, The University of Tokushima, Tokushima city, Tokushima 770-8502, Japan

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: tsatoh@ias.tokushima-u.ac.jp

ABSTRACT

Various animal milks and their dairy products like AIRAG (fermented horse milk) and yogurt are very popular among Mongolian people. The climate of Mongolia is very severe, and they preserve their health by the intake of above animal milks and dairy products. In this study, we explored the diversity of bacteria in Mongolian animal milks (Cow, Horse, Goat, and Camel), AIRAG, and Camel milk yogurt by the clone library method of their 16S rRNA genes.

Firstly, we prepared the whole genomic DNA from four animal milks and two dairy products, and amplified each 16S rRNA genes by PCR. PCR products (about 1.4kbp) were cloned into pGEM-T vector, and analyzed DNA sequences of totally 79 clones from AIRAG, Camel milk yogurt, and four animal milks. It was revealed that homologous clones to *Lactobacillus helveticus* are dominant in the clone libraries of both dairy products, whereas the other clones to *Lactococcus* from AIRAG, and *Acetobacter* from camel milk yogurt. Furthermore, We found that homologous clones to *Lactococcus* are dominant in Mongolian cow and horse milks, whereas *Leuconostoc* in camel milk. Therefore, it might be useful information for screening the bioactive strains from milk products in Mongolia.

Keywords: Animal milk, Dairy product, Clone library, 16S rRNA gene, Mongolia

1. 緒言

モンゴル国ではウシやヒツジなどの肉食中心の食生活であり、厳しい気候条件から野菜などが

らの栄養素の摂取が不足がちになるため、モンゴル国民は主に家畜乳や乳製品から必要な栄養素を補っている。モンゴル国では、搾乳した家畜乳(ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ラクダ)やAIRAG(発酵させた馬乳酒)やTarag(ヤギ、ヒツジ、ウシの

混合乳を発酵させたヨーグルト様飲料)などの発酵乳が飲用されており⁽¹⁾、多くの種類の乳製品が存在する。これらの家畜乳や発酵乳には乳酸菌など多様な微生物の存在が示唆されており⁽²⁾⁻⁽⁵⁾、含有される微生物自身の抗菌作用などに加え^{(6),(7)}、微生物の産生するバクテリオシン^{(8),(9)}やタンパク質分解酵素⁽¹⁰⁾、アンジオテンシン阻害ペプチド⁽¹¹⁾、多糖類⁽¹²⁾などの有用な物質についても報告されている。これらモンゴル国で飲用される家畜乳や発酵乳中の微生物叢については、個々の乳中の微生物解析に関する報告はなされているが、発酵乳とその原料の家畜乳中の微生物相を比較・解析した報告は少ない。

そこで本研究では、これらモンゴル国家畜乳やその乳製品中の細菌叢に関する知見を得るために、4種のモンゴル国家畜乳(ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ)と2種の乳製品(馬乳酒(AIRAG)、ラクダ乳ヨーグルト)中の細菌について、クローンライブラリー法による16S rRNA 遺伝子解析を行い、含有される細菌叢の相違について比較検討を行った。クローンライブラリー法⁽¹³⁾は、試料中の全ゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として16SrRNA 遺伝子を増幅したのち、クローン化することで個々の遺伝子を分離・同定するものであり、試料に含有される微生物の単離・培養が困難な場合でも、微生物の存在を分析できる利点がある。

2. 実験方法

モンゴル国家畜乳および乳製品試料

本実験で使用した4種の家畜乳(ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ)および2種の発酵乳(AIRAG、ラクダ乳ヨーグルト)は、2011~2012年に、モンゴル国ウランバートル市で搾乳・製造されたものを使用した。日本に輸送後、無菌的に試料を分注し、使用時まで -20°C で保存した。用いた試料の特徴を

Table I に示す。

家畜乳および乳製品試料からのゲノム DNA の調製

まず、4種の家畜乳(ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ)および2種の発酵乳(AIRAG、ラクダ乳ヨーグルト)試料から、Wizard Genomic DNA purification kit (Promega)を用いて、各ゲノム DNA を調製した。試料各 2ml を 4,000rpm、5 分間、 4°C にて遠心分離を行ない不溶性成分を除去したのち、その上清をさらに 12,000rpm、2 分間、 20°C にて遠心分離を行ない沈殿を回収した。これに終濃度 40mM EDTA(pH8.0)と終濃度 2mg/ml のリゾチームを添加し、 37°C 、1 時間作用させ、細胞壁を溶解した。遠心分離で集菌後、600ul の nuclei lysis solution を添加し、pipeting で懸濁後、 80°C 、5 分間加熱することで溶菌させた。室温まで冷却後、3ul の RNase 溶液を加え、 37°C 、30 分間作用させた。その後、200ul の protein precipitation solution を加え、ミキサーで 20 秒攪拌、氷上で 5 分放置し、タンパク質を沈澱させた。遠心分離後の上清に、600ul の イソプロパノールを添加し、ゲノム DNA が見えるまで穏やかに混合した。その後、遠心分離によりゲノム DNA を回収し、70%エタノールでリンスし、風乾後、100ul の DNA rehydration solution を添加した。これを、 65°C 、1 時間加熱処理後、 4°C でゲノム DNA を溶解させた。

家畜乳および乳製品試料の 16S rRNA 遺伝子の PCR による増幅と遺伝子解析

上記で調製したゲノム DNA を鋳型として、Beffa の方法⁽¹⁴⁾を参考に、*E.coli* 16SrRNA 遺伝子の 11-26 位に相当する Upper primer: 5'-ATTCTAGAGTTTGATCAT GGCTCA -3' (24mer, $T_m=53^{\circ}\text{C}$)および *E.coli* 16SrRNA 遺伝子の 1393-1411 位に相当する Lower primer: 5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3' (27mer, $T_m=67^{\circ}\text{C}$)を用いて、Takara *ExTaq*

Table I Features of Mongolian animal milks and dairy products in this study

Samples	Origin	Collected place	Collected Year	pH	Analyzed clones
Cow milk	Mongolian cow	Ulan Bator, Mongolia	2011	4.6	11
Mare milk	Mongolian mare	Ulan Bator, Mongolia	2011 and 2012	4.6	17
Goat milk	Mongolian goat	Ulan Bator, Mongolia	2011	4.7	13
Camel milk	Commercial product (Mongolian camel)	Ulan Bator, Mongolia	2011	4.7	16
AIRAG	Fermented Mongolian mare milk	Ulan Bator, Mongolia	2011	3.9	12
Camel milk yogurt	Commercial product (Mongolian camel milk)	Ulan Bator, Mongolia	2011	3.5	10

DNA polymerase および ASTEC PC707 サーマルサイクラーにより PCR を行った。PCR プログラムは、98°C, 10 秒で変性後、98°C, 10 秒→60°C, 60 秒→72°C, 90 秒のサイクルを 30 サイクル繰り返す、最後に 72°C, 90 秒伸長反応を行った。得られた PCR 産物を切り出し後、pGEM-T ベクター (Promega) に挿入し、構築したプラスミドを ABI 310 Genetic analyzer で DNA 塩基配列決定を行った。解析可能であった約 1400bp について塩基配列を NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) の blastn プログラム⁽¹⁵⁾で DNA 塩基配列データベースと照合し、4 種の家畜乳(ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ)および 2 種の発酵乳(AIRAG、ラクダ乳ヨーグルト)に含まれる細菌の推定を行なった。一方、塩基配列のアライメントは DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の Clustal W ver.2.1 プログラム(<http://clustalw.dbj.nig.ac.jp/>)を用い⁽¹⁶⁾、系統樹の作成・解析は TreeView プログラムにより NJ (Neighbour joining method)法⁽¹⁷⁾により行なった。Outgroup には *Bacillus subtilis* の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用い、Bootstrap 値の計算は 1000 回行ない、結果を進化距離として表わした。

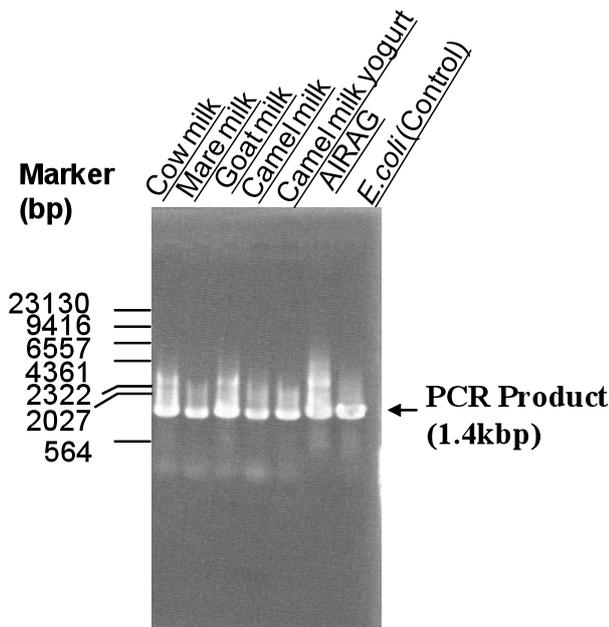


Fig.1 Agarose electrophoresis of 16S rRNA genes amplified by PCR, from Animal milks and dairy products

We prepared the genomic DNAs from animal milks and dairy products, and then amplified 16SrRNA genes by PCR using PCR primers as described in the text.

3. 実験結果

家畜乳および乳製品試料の 16S rRNA 遺伝子の PCR による増幅

まず、4 種の家畜乳(ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ)および 2 種の発酵乳(AIRAG、ラクダ乳ヨーグルト)試料から、上記の方法に従って各ゲノム DNA を調製した。これを鋳型として、実験方法に述べた条件に従い、16SrRNA 遺伝子の PCR による増幅を行なったところ、検討した 6 種の試料すべてにおいて、約 1.4kbp の増幅産物が観察された(Fig. 1)。アガロースゲル電気泳動に分離後、この PCR 産物を切り出し、pGEM-T ベクターと ligation を行なった。これを用いて *E. coli* JM109 株を形質転換し、得られたコロニーから遺伝子の挿入されたクローンを選別し、プラスミド DNA を調製した。その後、16S RNA 遺伝子(約 1.4kbp)の全塩基配列決定を行なった。その結果、ウシ乳は 11 クローン、ウマ乳は 17 クローン、ヤギ乳は 13 クローン、ラクダ乳は 16 クローン、AIRAG は 12 クローン、ラクダ乳ヨーグルトは 10 クローンの合計 79 クローンの 16S RNA 遺伝子の全塩基配列を決定した (Table I)。

家畜乳および乳製品中細菌の 16S rRNA 遺伝子の blastn による相同性解析

次に、決定した家畜乳および乳製品試料由来の各クローンの 16S RNA 遺伝子の塩基配列を、NCBI BLAST の blastn プログラムで DNA 塩基配列データベースと照合した。まずウシ乳では、解析した 11 クローンすべてが *Lactococcus* 属細菌であり、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が 6 クローン、*Lactococcus raffinolactis* が 4 クローン、*Lactococcus* 属細菌が 1 クローンであった (Table II)。得られたクローンは、Co1-12 を除き、データベース上の *Lactococcus* 属細菌の 16S RNA 遺伝子の塩基配列と 99% 以上一致した。次にウマ乳では、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が 9 クローン、*Leuconostoc mesenteroides* が 5 クローン、*Streptococcus parauberis* が 2 クローン、*Staphylococcus* 属細菌が 1 クローンであった (Table III)。またヤギ乳の場合では、*Leuconostoc* 属細菌が 5 クローン、*Lactococcus* 属細菌が 7 クローン、不明が 1 クローンであった (Table IV)。*Leuconostoc* 属細菌では、*Leuconostoc mesenteroides* が 3 クローン、*Leuconostoc pseudomesenteroides* が 1 クローン、*Leuconostoc lactis* が 1 クローンとクローン間の配列に差異が見られた。一方 *Lactococcus* 属細菌ではほとんどが *Lactococcus raffinolactis* (6 クローン)であったが、1 クローン (G1-20)のみ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* が検出された。さらにラクダ乳の場合には、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* が

Table II Identification of bacteria from Mongolian cow milk by clone library method of 16S rRNA gene

Clones	Samples		Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ Accession number	The most matching species on DNA database	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
Co1-26	1372	AB749376	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.9
Co1-21	1371	AB749374	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.7
Co1-11	1368	AB749369	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.7
Co2-6	1373	AB749377	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.6
Co1-22	1370	AB749375	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.3
Co1-17	1372	AB749372	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973609	99.2
Co1-12	1381	AB749370	<i>Lactococcus sp.</i>	1402	EF204369	97.2
Co2-9	1381	AB749378	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.9
Co1-2	1382	AB749368	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.9
Co1-16	1381	AB749371	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.6
Co1-19	1383	AB749373	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.2

Table III Identification of bacteria from Mongolian mare milk by clone library method of 16S rRNA gene

Clones	Samples		Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ Accession number	The most matching species on DNA database	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
H2-8	1371	AB750707	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.9
H1-20	1370	AB750699	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.9
H12-2	1372	AB828423	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1536	JQ364952	99.9
H12-6	1373	AB828425	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1536	JQ364952	99.8
H12-3	1372	AB828424	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1536	JQ364952	99.7
H1-22	1374	AB750701	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.6
H2-21	1372	AB750711	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.6
H1-21	1372	AB750700	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.6
H12-9	1371	AB797146	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1470	CP002365	99.6
H2-2	1374	AB750704	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.9
H2-10	1374	AB750708	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.9
H2-12	1372	AB750709	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.8
H1-30	1375	AB750703	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.7
H2-3	1376	AB750705	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.6
H2-18	1372	AB750710	<i>Streptococcus parauberis</i>	1471	AY584477	100
H1-29	1371	AB750702	<i>Streptococcus parauberis</i>	1471	AY584477	99.6
H2-5	1375	AB750706	<i>Staphylococcus sp.</i>	1504	JF734318	99.9

Table IV Identification of bacteria from Mongolian goat milk by clone library method of 16S rRNA gene

Clones	Samples		Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ Accession number	The most matching species on DNA database	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
G1-1	1375	AB750712	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.8
G2-2	1376	AB750717	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.6
G1-28	1371	AB750716	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1500	JQ712019	99.4
G2-3	1375	AB750718	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	1478	HM218655	99.8
G2-21	1373	AB750723	<i>Leuconostoc lactis</i>	1473	HM058633	99.8
G1-20	1371	AB750714	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	1472	FJ749848	98.7
G2-32	1380	AB750724	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.9
G2-14	1381	AB750720	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.6
G2-15	1379	AB750721	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.6
G1-22	1378	AB750715	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.6
G1-6	1382	AB750713	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.6
G2-12	1379	AB750719	<i>Lactococcus raf f inolactis</i>	1482	AB681294	99.5
G2-18	1352	AB750722	<i>Uncultured bacterium</i>	1389	JX096352	96.8

Table V Identification of bacteria from Mongolian camel milk by clone library method of 16S rRNA gene

Samples			Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
Clones	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ Accession Number	The most matching species on DNA database	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
Ca2-16	1374	AB858505	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.9
Ca2-10	1373	AB858504	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.9
Ca1-21	1375	AB749361	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.9
Ca2-4	1375	AB749363	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.9
Ca2-21	1375	AB858506	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.9
Ca2-22	1374	AB858507	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.9
Ca2-24	1374	AB858508	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.9
Ca1-28	1373	AB858502	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.8
Ca2-6	1374	AB858503	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	99.5
Ca1-16	1375	AB858501	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	1549	NR_074957	98.8
Ca2-14	1367	AB749366	<i>Serratia sp.</i>	1532	JF312984	99.9
Ca2-5	1367	AB749364	<i>Serratia sp.</i>	1532	JF312984	99.9
Ca2-17	1367	AB749367	<i>Serratia proteamaculans</i>	1502	NR_025341	99.8
Ca2-8	1383	AB749365	<i>Trichococcus sp.</i>	1481	AM933652	99.9
Ca1-11	1383	AB749360	<i>Trichococcus collinsii</i>	1520	NR_042061	99.5
Ca1-23	1356	AB749362	<i>Janthinobacterium sp.</i>	1471	EF672646	99.4

Table VI Identification of bacteria from Mongolian AIRAG by clone library method of 16S rRNA gene

Samples			Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
Clones	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ Accession number	The most matching species on DNA database	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
A1-21	1388	AB750690	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749690	100
A2-11	1388	AB750692	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1530	AB446394	99.9
A2-18	1389	AB750695	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1530	AB446394	99.9
A1-18	1388	AB750689	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1530	AB446394	99.9
A1-17	1388	AB750688	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1482	FJ749645	99.9
A1-14	1389	AB750687	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1530	AB446394	99.8
A2-25	1388	AB750697	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749690	99.8
A2-13	1388	AB750694	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749694	99.8
A2-21	1388	AB750696	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749690	99.7
A2-27	1388	AB750698	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749694	99.7
A2-12	1372	AB750693	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.9
A2-5	1372	AB750691	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	1466	JQ973599	99.7

Table VII Identification of bacteria from Mongolian camel milk yogurt by clone library method of 16S rRNA gene

Samples			Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
Clones	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ Accession number	The most matching species on DNA database	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
C1-57	1388	AB749379	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1599	JQ805658	99.9
C3-8	1388	AB749386	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1599	JQ805658	99.9
C3-35	1389	AB749388	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749694	99.9
C3-20	1388	AB749387	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749690	99.8
C2-18	1388	AB749383	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1489	FJ749694	99.7
C2-13	1388	AB749381	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1599	JQ805658	99.5
C2-24	1388	AB749384	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1599	JQ805658	99.4
C2-15	1389	AB749382	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1599	JQ805658	98.9
C2-26	1221	AB749385	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1347	JQ513826	99.6
C2-9	1360	AB749380	<i>Vogesella sp.</i>	1430	FJ821602	99.5

10 クローン、*Serratia* 属細菌が 3 クローン、*Trichococcus* 属細菌が 2 クローン、*Janthinobacterium* 属細菌が 1 クローンであり、ラクダ乳では乳酸菌(*Leuconostoc* 属細菌)以外の 3 属の細菌が検出された(Table V)。以上 4 種の家畜乳中にはいずれも乳酸菌の存在が示唆されたが、その種類は家畜乳の種類により異なることが明らかとなった。

一方発酵乳では、AIRAG の解析した 12 クローンのうち、10 クローンが *Lactobacillus helveticus*、残り 2 クローンは *Lactococcus lactis subsp. lactis* であった(Table VI)。原材料のウマ乳とは *Lactococcus lactis subsp. lactis* が共通しているものの(Table III)、多くは *Lactobacillus helveticus* であったため、AIRAG の発酵の過程でこの細菌が関与している可能性がある。最後にラクダ乳ヨーグルトでは、8 クローンが *Lactobacillus helveticus* であり、*Acetobacter pasteurianus* が 1 クローン、*Vogesella* 属細菌が 1 クローンであった(Table VII)。ラクダ乳ヨーグルトの場合には、原材料のラクダ乳では *Leuconostoc* 属細菌が多く検出されたが(Table V)、ヨーグルトでは検出されなかった。先の AIRAG の場合と同様に、ヨーグルト中でも *Lactobacillus helveticus* が検出されており、さらに酢酸菌である *Acetobacter* 属細菌も検出された。ラクダ乳ヨーグルトの pH は 3.9 と低く、これらの細菌は発酵乳の酸性化に関与していると考えられるが、詳細についてはこれらの細菌の特性を今後検討する必要がある。

家畜乳および乳製品中細菌の 16S rRNA 遺伝子の系統分類学的解析

さらに、家畜乳および発酵乳中細菌の 16SrRNA 遺伝子のアライメントを元に、各 Type strain の同遺伝子の配列と比較し、系統樹により解析し、このうち乳酸菌の属に基づきグループ分類を行なった。その結果、ウシ乳から得られたクローンはいずれも *Lactococcus* 属細菌に由来しており、*Lactococcus raffinolactis* グループ(Group Ia)と *Lactococcus lactis* グループ(Group Ib)に分類されることが明らかとなった(Fig.2)。Group Ia には Co1-2 など 4 クローンが該当し、Group Ib では Co1-11 など 6 クローンが分類される。Group Ib での Blast による検索では *Lactococcus lactis subsp. lactis* が最も相同であったが、系統解析より Group Ib のクローンは *Lactococcus lactis subsp. cremoris* や *Lactococcus lactis subsp. hordniae* とも近縁であることが示唆された。

次にヤギ乳由来クローンの系統解析(Fig.3)では、*Lactococcus* 属細菌グループ(Group I, 7 クローン)と *Leuconostoc* 属細菌グループ(Group II, 6 クローン)に大きく分けられ、Group I はさらに、*Lactococcus raffinolactis* グループ(Group Ia)と

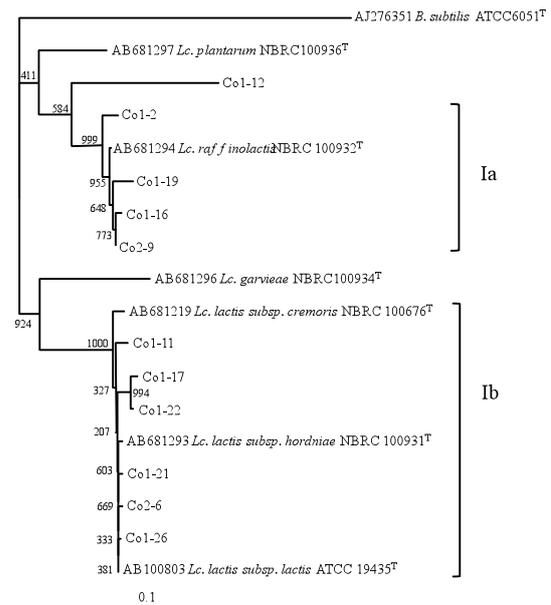


Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence analysis from Mongolian cow milk.

The tree was constructed by the neighbor-joining method, and *Bacillus subtilis* was used as the outgroup. Bootstrap values based on 1000 replications are given at the nodes, and scale bar represents 10% sequence divergence. Abbreviations: *Lc.*: *Lactococcus*.

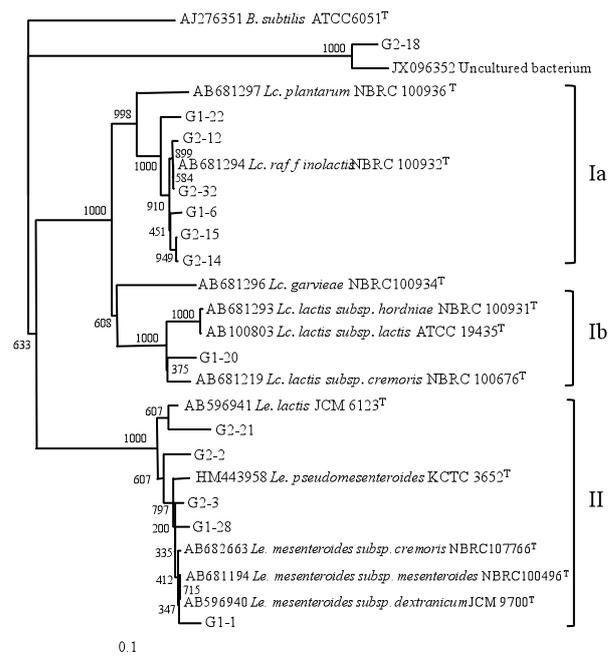


Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence analysis from Mongolian goat milk.

The descriptions are same as Fig.3. Abbreviations: *Lc.*: *Lactococcus*; *Le.*: *Leuconostoc*;

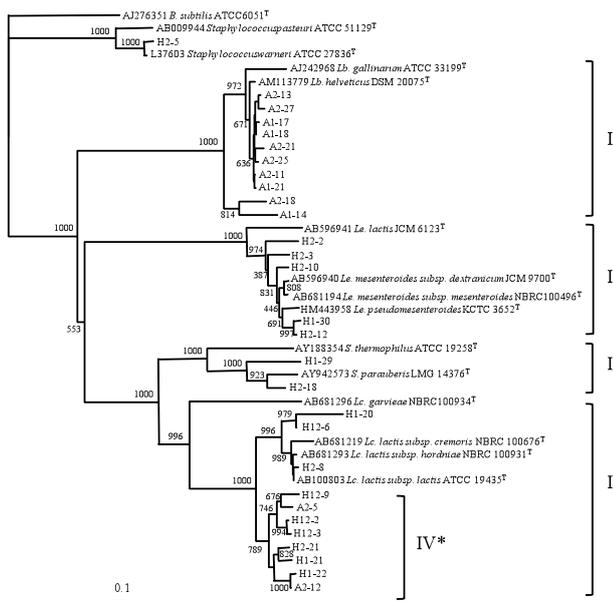


Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence analysis from Mongolian mare milk and AIRAG.

The descriptions are same as Fig.3. Abbreviations: *Lc.*: *Lactococcus* ; *Le.*: *Leuconostoc*; *Lb.* : *Lactobacillus* ; *S.* : *Streptococcus*
Clone name : H; Mare milk, A; AIRAG

Lactococcus lactis グループ(Group Ib)に分類されることが示唆された。上記のウシ乳の分類と類似しているが、さらに Group II として *Leuconostoc* 属細菌群が分類され、多くは *Leuconostoc mesenteroides* と相同であった。Group II の中で G2-21 クローンのみは、*Leuconostoc mesenteroides* よりも *Leuconostoc lactis* に近縁であると考えられる。

また、ウマ乳および AIRAG の系統解析(Fig.4)から、Group I (*Lactobacillus* 属細菌)、Group II (*Leuconostoc* 属細菌)、Group III (*Streptococcus* 属細菌)、Group IV(*Lactococcus* 属細菌)の4グループの乳酸菌の存在が示唆された。このうち Group I は AIRAG 由来の 10 クローンのみであり、*Lactobacillus helveticus* に近縁であった。一方 Group II および Group III は、ウマ乳由来のクローンのみが分類され(Group II : 5 クローン、Group III : 2 クローン)、Group II は *Leuconostoc mesenteroides* もしくは *Leuconostoc pseudomesenteroides* に、Group III は *Streptococcus parauberis* にそれぞれ近縁であり、先の Blast による解析(Table III)とも同様であった。これらのグループと異なり Group IV では、ウマ乳および AIRAG の両方に由来するクローンが含まれてい

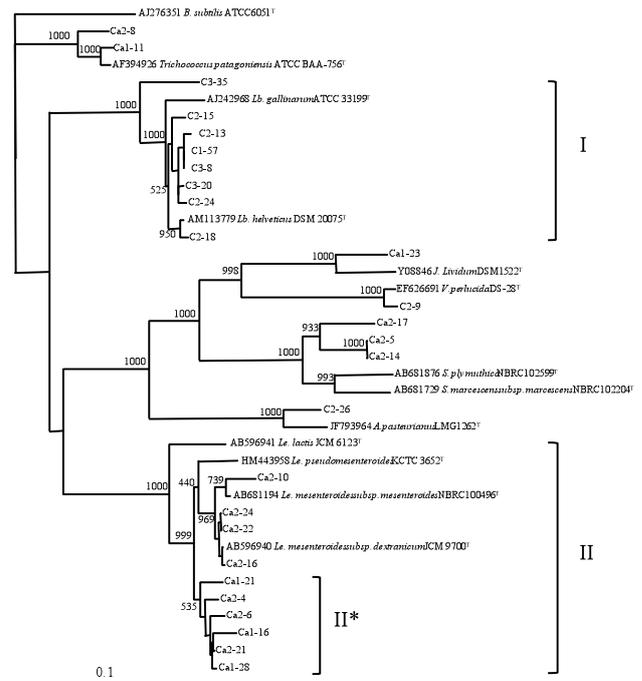


Fig.5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence analysis from Mongolian camel milk and its yogurt.

The descriptions are same as Fig.3. Abbreviations: *Le.*: *Leuconostoc*; *Lb.* : *Lactobacillus*; *S.* : *Serratia* ; *J.* : *Janthinobacterium* ; *V.* : *Vogesella* ; *A.* : *Acetobacter*
Clone name: Ca Camel milk, C, Camel milk yogurt

た (ウマ乳 : 9 クローン、AIRAG : 2 クローン)。これらの多くは *Lactococcus* 属細菌群と類似しているが、系統的には *Lactococcus lactis* とは距離があり、H12-9 ほか 8 クローンが属する別のサブグループ(Fig.4, サブグループ IV*)を形成している可能性があることが示唆された。このサブグループ IV*は互いに相同性が高く、ウマ乳と AIRAG の両方に共通して存在する *Lactococcus* 属細菌群であると考えられる。

最後にラクダ乳とラクダ乳ヨーグルトの場合では(Fig.5)、*Lactobacillus* 属細菌の Group I と、*Leuconostoc* 属細菌の Group II に大きく分類される。Group I はラクダ乳ヨーグルトに、Group II はラクダ乳にそれぞれ由来しており、両者を含むグループは見られなかった。Group I の *Lactobacillus* 属細菌は、上記の AIRAG でも含まれており、原乳には見られないことから、発酵乳の生成には *Lactobacillus* 属細菌の関与が推定される。また Group II の *Leuconostoc* 属細菌群においては、*Leuconostoc mesenteroides* に近縁なサブグループと、Ca1-21 ほか 6 クローンが含まれる別のサブグループ(Fig.5, サブグループ II*)の存在の

可能性があることが示唆された。

4. 考察

本研究ではモンゴル国家畜乳やその乳製品中の細菌叢に関する知見を得るために、4種のモンゴル国家畜乳(ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ)と2種の乳製品(馬乳酒(AIRAG)、ラクダ乳ヨーグルト)中の細菌のクローンライブラリー法⁽¹³⁾による16SrRNA 遺伝子解析とデータベースの検索、系統分類による比較検討を行った。その結果、ウシ乳では *Lactococcus* 属細菌が、ウマ乳とヤギ乳では *Lactococcus* 属および *Leuconostoc* 属細菌が、ラクダ乳では *Leuconostoc* 属細菌がそれぞれ優先種であることが示唆され、家畜乳により差異が見られた(Table II-V)。一方、AIRAG およびラクダ乳ヨーグルトでは、*Lactobacillus* 属細菌が優先種であり、それぞれの原乳中で見られる細菌群と相違が見られた。また、ラクダ乳ヨーグルトでは酢酸菌である *Acetobacter* 属細菌の存在も示唆された(Table VI, VII)。

まず家畜乳に含まれる乳酸菌について検討すると、本研究ではウシ乳、ウマ乳、ヤギ乳において検出された *Lactococcus* 属細菌はホモ型乳酸発酵を行う球菌で、このうち *Lactococcus lactis subsp. lactis* はウシ乳とウマ乳に、*Lactococcus raffinolactis* はウマ乳とヤギ乳中に含まれることが示唆された(Table II, III, IV)。本研究ではPCR産物の挿入されたクローンを各試料につき16クローンずつ初期解析(約800bp)を行っており、その結果ではウシ乳由来16クローン中8クローンが *Lactococcus lactis*、同7クローンが *Lactococcus raffinolactis* であった。この *Lactococcus lactis* は、ウマ乳では16クローン中7クローンが検出されたが、ヤギ乳では16クローン中1クローンであり、ラクダ乳では検出されなかった。一方の *Lactococcus raffinolactis* はヤギ乳で16クローン中9クローンが検出されたが、ウマ乳とラクダ乳では検出されなかった。

一方、ウマ乳、ヤギ乳、ラクダ乳で検出された *Leuconostoc* 属細菌はヘテロ型乳酸発酵をする球菌で、初期解析ではウマ乳が16クローン中6クローン、ヤギ乳が16クローン中5クローン、ラクダ乳では16クローン中10クローンが該当し、ウシ乳では検出されなかった。このような異なる家畜乳での細菌の共通性に関しては、モンゴル国ではこれらの家畜は混在して放牧されており、飼育土壌や共通の餌の摂取などが要因として考えられる。一方で家畜乳ごとの乳酸菌の相違については、各乳成分(タンパク質、乳糖、乳脂肪など)の組成や性質の相違⁽¹⁸⁾が細菌の生育環境に関与すると考えられるが、詳細は不明である。

一方発酵乳に関しては、一部ウマ乳とAIRAGで共通な *Lactococcus* 属細菌が検出されたが

(Table III, VI, Fig.4)、AIRAG では *Lactobacillus helveticus* が優勢であった(Table VI)。モンゴル国や中国の内モンゴル自治区でのAIRAGから単離した細菌相調査によると *Lactobacillus helveticus* が優先種との報告があり^{(1),(3),(4),(5)}、本研究でウマ乳とAIRAGで見られた *Lactococcus lactis subsp. lactis* も(Table III, VI, Fig.4)、内モンゴル自治区のウマ乳⁽¹⁹⁾やモンゴル国および内モンゴル自治区のAIRAGでも単離されていると報告されている^{(4),(5)}。本研究では単離した乳酸菌ではなく、クローンライブラリー法により各乳試料に含有される細菌相の解析を行なったが、そのAIRAGの初期解析でも16クローン中14クローンが *Lactobacillus helveticus* であったことから、本研究で解析したAIRAG中でも *Lactobacillus helveticus* が優先種として存在していると考えられる。さらに、この *Lactobacillus helveticus* はラクダ乳ヨーグルト中でも多く検出され(Table VII)、初期解析では16クローン中14クローンが *Lactobacillus helveticus* であった。しかし、原乳のラクダ乳においては検出されず、代わりに *Leuconostoc mesenteroides* が優先種であり、他の乳酸菌もラクダ乳とラクダ乳ヨーグルトで共通する細菌は見られなかった(Table V, VII, Fig.5)。ラクダ乳ヨーグルトに関する文献は少なく、内モンゴル自治区で飲用されるラクダ発酵乳⁽¹¹⁾やモロッコのラクダ乳⁽²⁰⁾に *Lactobacillus helveticus* が含まれているとの報告がある。ラクダ乳ヨーグルトや上記のAIRAGの発酵にこの細菌の関与が推定されるが、この細菌の起源は不明であり、1つの可能性として発酵乳の製造に用いられるウシなどの皮袋等⁽²¹⁾の可能性が考えられる。

本研究では、モンゴル国家畜乳および乳製品中の細菌叢を、クローンライブラリー法⁽¹³⁾により検討した。緒言で述べたように、クローンライブラリー法は試料に含有される微生物の単離や培養が困難な場合でも、微生物の存在を分析できる利点がある。今回は一般細菌用のPCRプライマーを使用したが、クローンライブラリー法の利点を生かすためには、様々な細菌に対応したPCRプライマーを使用することや多数のクローンの解析により、難培養性や存在比の少ない細菌を検出できる可能性がある。この点で、モンゴル国の家畜乳や乳製品の細菌叢のさらなる検討が必要である。またこれら乳酸菌の作用の一つに、有用ペプチドの生産があり、上記の内モンゴル自治区で飲用されるラクダ発酵乳中でも血圧低下作用を示すペプチドが見つかっている。我々は今回検討した家畜乳や発酵乳に多くのペプチド・低分子タンパク質が含有されることを見出しており(未発表)、それらペプチドの機能や生成に関与する細菌種の候補として、本研究の結果は非常に意義深いと考えられる。

謝辞

本研究は、平成24年度徳島大学総合科学部学部長裁量経費（創生研究プロジェクト）の支援により実施された。

また、本研究の家畜乳および発酵乳試料を供与していただき、本研究を遂行中にご逝去されたモンゴル健康科学大学のIchinkhorloo Zesem先生に深く感謝致します。

参考文献

1. Uchida, K., Hirata, M., Motoshima, H., Urashima, T., Arai, I. (2007) Microbiota of 'airag', 'tarag' and other kinds of fermented dairy products from nomad in Mongolia. *Animal Sci. J.*, **78**, 650-658.
2. Yu, J., Wang, W. H., Menghe, B. L. G., Jiri, M. T., Wang, H. M., Liu, W. J., Bao, Q. H., Lu, Q., Zhang, J. C., Wang, F., Xu, H. Y., Sun, T. S., Zhang, H. P. (2011) Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *J. Dairy Sci.*, **94**, 3229-3241.
3. Sun, Z.H., Liu, W.J., Zhang, J.C., Yu, J., Gao, W., Jiri, M., Menghe, B., Sun, T.S., Zhang, H.P. (2010) Identification and Characterization of the Dominant Lactic acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Milk in Mongolia. *Folia Microbiol.* **55**, 270-276.
4. Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T., Demberel, S. (2008) Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 1313-1325.
5. Takeda, S., Yamasaki, K., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Tsend-Ayush, C., Dashnyam, B., Ahmed, A.M., Kawahara, S., Muguruma, M. (2011) The investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products. *Animal Sci. J.*, **82**, 571-579.
6. Hadji-Sfaxi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay-Laliberté, G., Barbier, G., Haertlé, T., Chobert, J. M. (2011) Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control*, **22**, 2020-2027.
7. Sudun, W., Miyamoto, T. (2011) Screening and identification of lactic acid bacteria from Airag for antifungal activity. *J. Animal Veterinary Advances*, **10**, 21, 2751-2757.
8. Batdorj, B., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Me'tro, F., Pre'vost, H., Chobert, J. M., Haertle, T. (2006) Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J Appl. Microbiol.*, **101**, 837-848.
9. Wulijdeligen, Asahina, T., Hara, K., Arakawa, K., Nakano, H., Miyamoto, T. (2012) Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag. *Animal Sci. J.*, **83**, 704-711.
10. Abu-Taraboush, H. M., Al-Dagal, M. M., and Al-Royli, M. A. (1998) Growth, Viability, and Proteolytic Activity of Bifidobacteria in Whole Camel Milk. *J. Dairy Sci.*, **81**, 354-361.
11. Shuangquan, Tsuda, H., Miyamoto, T. (2008) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in Inner Mongolia, China. *J.Sci. Food Agric.*, **88**, 2688-2692.
12. Fukuda, K., Yamamoto, A., Ganzorig, K., Khuukhenbaatar, J., Senda, A., Saito, T., Urashima, T. (2010) Chemical characterization of the oligosaccharides in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) milk and colostrums. *J. Dairy Sci.*, **93**, 5572-5587.
13. 藤本淳治、福井学 (2005) 腸内フローラの構造解析：16S rDNA-クローンライブラリー法，腸内細菌学雑誌，**19**，47-52.
14. Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L., Aragno, M. (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 5, 1723-1727.
15. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 17, 3389-3402
16. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 22, 4673-4680.
17. Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, **4**, 406-425.
18. 細野明義 (2004) ヨーグルトの科学—乳酸菌の贈り物—，ISBN4-89694-846-7，八坂書房，pp.73.
19. An, Y., Adachi, Y., Ogawa, Y. (2004) Classification of lactic acid bacteria isolated from

- chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. *Animal Sci. J.*, **75**, 245-252.
20. Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. (2009) Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.*, **164**, 81-91.
21. 石井智美(2003) 内陸アジア遊牧民の製造する乳酒に関する微生物学的研究, JCAS 連携研究成果報告, **4**, 103-123.

原稿受付 2014年9月24日
原稿受理 2014年10月6日