

2020年度 研究活動報告書

「沖縄県産モズクを海藻消化菌により発酵させそこから得られる栄養分を取り入れた食品の開発」

沖縄工業高等専門学校 上地彩斗 笹木和花 浅野光咲 我那覇綸 北島万納 前野愛理

1. 研究の背景と目的

平均寿命1位を誇る日本。その国民の健康を支えているのは、「海藻」の存在であった。

日本人特有の腸内細菌、海藻消化菌の働きにより得る栄養分がその理由の一つである。

だが今、海藻類の消費量は年々減少しつつある。現に、海藻の中で鉄分を最も含有するモズクの供給準食糧はピーク時の40%も減少してしまい、余剰分は産業廃棄物となっている。このモズクを海藻消化菌と組み合わせることで、モズクの供給を世界に広げていこうと考えた。モズクの認知度は日本に比べ海外では低く、そのため私たちは、その認知度を高めることを念頭にモズクの栄養の吸収を助ける日本人特有の海藻消化菌を含む発酵食品「モーグルト」の商品開発に取り組む。

2. 活動の内容

2.1 出前講義

日時：2020年10月26日

場所：オンデマンドで行われた、本校教員の田中博による薬物管理講習会に各自参加。TULIP及び劇物の利用方法について受講した。

3. 研究の成果

前回、DNAの抽出と海藻消化菌の選択、糞便からプレVIOUS菌を単離するための培地作製を行い、ムチンなし、ムチン入り培地のそれぞれから菌が生えたことを確認した。

今回は、前回の報告書の「今後の予定」に記した通りコスト削減を目的とする培地の試作とPCRを用いて海藻消化菌なのかどうかを調べる検証実験を行った。

【コスト削減を目的とする培地の試作】

コスト削減のためクラゲムチンの代用品としてオクラ、山芋、もずくに含まれるムチンを利用した。この三種類のムチン代用培地にヒト糞便を塗

布し、コロニーを確認することができた。採取したコロニーをそれぞれのムチン代用培地に塗布し、代用培地でもコロニーが形成されることを確認した。



図1：培地の試作

【PCRによる海藻消化菌遺伝子の増幅】

理研微生物バンクより届いた *Bacteroides plebeius* (海藻消化菌) の標準株の塩基配列をもとにプライマーを設計し、同プライマーによって実際にDNAが増幅されるのかPCRによって検証したところ、DNAの増幅が確認できた。そのため、同プライマーを用いたPCRによる海藻消化菌の検証が可能となった。電気泳動の結果、今回糞便から採取した菌は500bpあたりで強いバンド反応を示した。これは海藻消化菌の標準株と同様の結果であるため、*Bacteroides plebeius* の存在が確認できた。

4. 研究成果の発表

日時：2020年12月14日(金)

発表の場：第43回日本分子生物学会(MBSJ2020)
発表題目：「沖縄県産モズクを海藻消化菌により発酵させそこから得られる栄養分を取り入れた食品の開発」

口頭発表及びポスター発表にて、その時点までの研究成果を発表した。

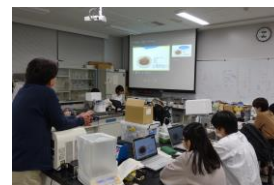


図2：学会発表の様子

4.1 その他の活動

日時：2021年2月

発表の場：やんばるの食×文化フェスティバル
REHSEでの研究内容についての発表を行う。

5.【実験1】糞便からの菌の単離及び糞便の培養 に使用するEG培地の作成

5.1 目的

ヒト糞便からのプレビウス菌の単離、培養が可能かどうかを実験する。

5.2.1 方法

・クラゲムチン入りの培地を3枚、クラゲムチンなしの培地を7枚作成し、対照実験を行った。



図3：培地作成の様子

・作成したEG培地の組成を、以下に示す。

表1：EG培地の組成

薬品名	200ml 当たりの分量
ペプトン	2g
リン酸水素二ナトリウム	0.638g
クラゲムチン	0.4g → 0.1g
羊の血	10ml
寒天	3g
純水	190ml

・作成したEG培地に、糞便の塗布を行った。



図4：糞便の塗布

5.2.2 方法

- ・EG培地に発生したコロニーからDNAを取り出し、*Bacteroides plebeius*の塩基配列を参考に設計したプライマーを用い、PCRを行った。
- ・その後、増幅させたDNAを電気泳動にかけ、バンドの反応を確認した。

5.3.1 結果

一週間インキュベータによる培養を行った結果、図5、図6に示すようにムチン入り・無し
の培地両方にコロニーが確認できた。



図5：ムチン入り

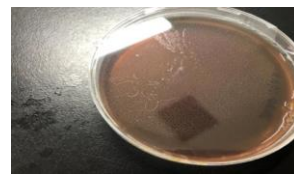
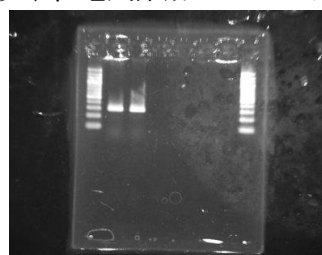


図6：ムチン無し

5.3.2 結果

以下、電気泳動でのバンド反応の結果である。



1 2 3 4 5 6 7 8

図7：電気泳動の結果

- 1 番目：200bp メーカー
- 2 番目：プレビウス菌標準株
- 3 番目：プレビウス菌標準株
- 4 番目：ムチン入り培地の菌 1
- 5 番目：ムチン入り培地の菌 2
- 6 番目：ムチン無し培地の菌 1
- 7 番目：ムチン無し培地の菌 2
- 8 番目：200bp メーカー

今回ヒト糞便から培養した菌のバンドは、見当たらなかった。

6.【実験2】ムチンを代用した培地の作成

6.1 目的

ムチンの種類を変化させ、それによるプレビウス菌の発生の仕方を観察する。
また、野菜によるムチンの代用が可能かどうかを試し、低コスト化をはかる。

6.2 方法

・モズク、オクラ、ヤマイモ中に含まれるムチンと思わしき成分よりクラゲムチンを代用し培地を作成した。



図8：モズク



図9：オクラ



図10：ヤマイモ

- ・作成した培地に糞便を塗布した。
- ・3日後に培地の様子を確認したところ全ての培地でコロニーの発生が確認できたため、前項目と同様の組成で作成したムチン代用培地に塗布、培養した。

6.3 結果

直接糞便を塗布したモズク、オクラ、ヤマイモそれぞれの培地に現れた結果は、以下の通りとなった。



図 11：モズク



図 12：オクラ全て



図 13：オクラ中身



図 14：オクラ皮



図 15：ヤマイモ



図 16：ヤマイモ皮なし

6.3.1 結果

ムチン代用培地での培養が可能かどうかについて、現在は、現在経過観察中。

7. 考察

理研微生物バンクより取得したプレビウス菌の標準株を PCR にかけたところ、500bp にて強い反応が確認できていた。その数値は、今回使用したヒト糞便から単離した DNA と同様の結果を示している。よって、ヒト糞便からのプレビウス菌の単離は可能であったことが示された。

しかし、糞便から単離できた海藻消化菌を EG 培地にて培養し発生したコロニーを電気泳動にかけたところ、500bp でのバンドの反応は一切見られなかった。その原因は、DNA 抽出から PCR までに時間が空いてしまった、または単離した菌量が足りなかったのではないかと考えている。これらの問題点を改善し、同組成培地での海藻消化菌の

培養が可能になれば、【実験 2】で行った「野菜によるクラゲムチンの代用」の成功がより大きな目標となる。クラゲムチンの代用が可能であれば、大幅なコスト削減が期待できるのだ。

現時点ではモズク・オクラ・ヤマイモの全ての培地にコロニーが確認できているため、それらのコロニーの菌株の PCR 後の電気泳動の結果に注目したい。

また、ムチン代用培地では先述した 3 種の野菜を使用した培地の作成も視野に入れていく。プレビウス菌の生育に最も適した素材を研究し、さらなるコスト低減を目指す。

8. 今後の展望と課題

【展望】

- ・プレビウス菌は腸に存在する菌であるが、それを持つ動物は人間のみでなく、野生の動物の腸内にも存在していることが分かっている。今後プレビウス菌の培養方法が確立できれば、ヒト糞便に限らず、野生の動物から取り出したプレビウス菌の培養も可能になるのではないかと。

- ・プレビウス菌を多く保有する人間の腸内にある特徴についてもまた、研究していきたい。特徴が判明出来れば、プレビウス菌を持たない人物の腸にも疑似的な環境を作り出すことが可能になる可能性がある。

- ・当初の予定ではヨーグルト等発酵食品と掛け合わせた商品の開発を試みていたが、酸性の特徴を持つヨーグルトでは、プレビウス菌の活動をやや低下させてしまうことも予想される。そのため、プレビウス菌が持つ長所を存分に生かせるような組み合わせを探していく。

- ・プレビウス菌が消化する海藻の種類や量からその消化時間を割り出し、実験の際のプレビウス菌の消化が正確に行われているかを示す指標とする。

加えて、研究を通して得られた疑問についても、下記に記しておく。

- ・野生の動物が持つプレビウス菌と人間が持つプレビウス菌の特性や特徴には何か相違点が存在するのか。

実験中に得た疑問についても、今後の研究の中で詳しく掘り下げていきたい。

【課題】

培地の培養を行っている時間、また PCR や電気泳動の結果を待っているような状況の間を有効活用し、実験の予定の見直し等、作業効率の上昇を目指していく。また、実験の結果をより正確にしていいため、初めの工程から次の工程までにかかる時間の短縮に加え、材料配分の際の誤差を減らしていくことなどが当分の課題となる。本研究は6人で分担して作業を行っているため、個人個人の作業の仕方により少しずつ誤差が生まれる可能性も十分に考えられる。そのため空き時間にはメンバー一人ひとりが同じ実験を実施し、その再現性を高めていかなければならない。

また、長期の研究になればなるほど、莫大な費用を必要としていくことは明らかである。可能な限り削減できる部分は削減し、低コストで品質を保った実験を行うことを目標に掲げる。

実験内容に関しては、プライマーを今回の実験よりも長くし再度 DNA 抽出をし直すこと、また電気泳動の時間を延長すること、の二つを主に改善点としたい。

9. 活動状況と創意工夫した点

今年度は新型コロナウイルスの影響で研究当初から teams を用いたリモート会議やパソコンを使用し研究資料の共有などを行った。また普段からマスクを着用し、実験の際は検温、アルコール消毒を行い、細心の注意を払いながら三密を避けるため2人一組になり実験の分担を行った。実験結果は各自で確認を行い、SNS を使った情報交換や写真などで実験結果の共有をした。

出前講義ではオンデマンド型で講義を受講し日本分子生物学会の研究成果の発表ではオンライン発表により、不要不急の外出を避けた。

10. 「環境安全とリスク」に関する意見と感想

本研究は、消費量が年々減少しているモズクを活用することにより、食品廃棄を抑えることができた環境に悪影響が少ない研究である。

実験の際には、可能な限りガラス製のものを使用し、できるだけ廃棄物を発生させないように務めた。また、食品で代用ムチンを試作する際は食品の皮などもすべて使用し食品の廃棄を最小限に抑えることができた。実験の後始末として使用した器

具や薬品は所定の保管場所に戻し、廃棄する薬品は「薬品管理支援システム TULIP」に基づき処理を行う。

リスクについてはプレビウス菌で作られた栄養素は人によってはアレルギー反応が起こる可能性があるため摂取する際にはパッチテスト、血液検査など十分な準備が必要となる。

実験の際にはその実験の趣旨を把握し、起こりうる危険について知り、適切な対応を行うことができるようにする。使用する実験器具はその仕組みや使用方法、事故が起こった場合の対処の仕方などを共通で認識し、どのような状況になっても冷静な判断ができるようにすることが事故のリスク低下につながる。化学薬品も実験器具と同様にどのような性質を持つ薬品なのか、どのような危険があるのかを調べ、その危険性や併用が危険な薬品など事前に知り、実験を行うことが重要である。

実験室には必要なものだけを持ち込み、かばんや飲食等は持ち込まないように注意し、服装も白衣に靴などの露出の少ない服装にする。

実験で糞便を扱う際には、感染症のリスクが伴うため細心の注意を払いながら行う。また新規に実験を行う場合には、実験の指導者と相談しながら必要な薬品、機器を整理し十分な準備とその実験に必要な知識を事前に得る必要がある。また、実験を行う際には指導者の目の行き届く範囲で事故が発生しても十分対応可能な状態で実験を行う。

11. 本研究で学んだこと

本活動では、PCR という方法について詳しく知り、その方法と原理を学んだ。実験が想定通りに進まずあらかじめ予想していた結果と実際の結果との相違に頭を抱えることも多々あったが、その原因に加え、原因から得られる新たな事実を私達自らが発見できた。

また、同様の実験を何度も繰り返したことにより、条件を変えての実験、また判断基準となる材料の確認などがどういった重要性を持つのかについても身をもって学ぶことができた。

今回の経験は、今後の学生生活においてなくてはならない体験となった。日々新しい視点を持ち、その一つ一つの発見を好奇心へと繋げていく。それが、今、私達が掲げる目標である。