

氏名	宮下美香
学位(専攻分野の名称)	博士(環境共生学)
学位記番号	甲第731号
学位授与の日付	平成28年9月30日
学位論文題目	タイ産発酵食品由来乳酸菌および <i>Staphylococcus</i> 属の多様性評価と特性
論文審査委員	主査 教授・博士(農芸化学) 田中尚人 教授・博士(農芸化学) 古庄律 教授・博士(学術) 亀山慶晃 教授・博士(農芸化学) 内野昌孝 名誉教授・農学博士 岡田早苗

論文内容の要旨

研究の背景と目的

近年日本では各地域に由来する乳酸菌を始めとした微生物を用いた商品開発など、地場産業の活性化に向けた取り組みが各都道府県の公設試験場を中心に行われている。そこでは多様な微生物を収集し、微生物資源としてその特性を活かし新たな応用利用に繋げることが期待されている。

発酵に関わる代表的な微生物のひとつとして知られている乳酸菌は、食品の製造や保存に利用され、ヒトの免疫賦活機能を有するなど産業的にも有用であり、大きな需要がある。乳酸菌の中には、ヨーグルトなどの乳を原料とする発酵乳製品に関わる乳酸菌のほかに、魚や肉の発酵食品、野菜などの漬物に関わる乳酸菌がある。これらの間には生育に利用できる栄養源(糖の種類など)や様々なストレスに対する耐性の強さなどの性質に違いがある。特に日本をはじめとするアジア各国では、多様な性質を持つ乳酸菌として注目されている後者の乳酸菌による独特の伝統的な魚や野菜の発酵食品が数多くある。

筆者はこれまで、生物多様性条約の精神に則り、タイの伝統的な発酵食品に存在する微生物資源の保全と、食品製造などへの産業的な活用を期待して、タイと日本の間で包括的覚書(MOU)を締結して共同研究を行い、タイ国各地の発酵食品から乳酸菌と *Staphylococcus* 属細菌を分離・収集し、その多様性を評価してきた。農作物や水産物の種類が豊富なタイには、それらを発酵させた多様な発酵食品が存在し、その独特の味には発酵食品に生息する微生物による発酵が大きく関わっていると考えられる。筆者がこれまでに行ってきたタイ産発酵食品に由来する微生物の分類学的な多様性研究の結果、タイ産発酵食品には多様な乳酸菌と *Staphylococcus* 属細菌

が存在し、それらは分離源であるタイ産発酵食品の高い塩濃度に応じて高い塩耐性を持つという特徴と、乳酸菌においては糖の発酵性においても近縁な種とは異なる特徴を示す幾つかの新しい種が見つかっている。このように、未だ知られていない特徴を持つ乳酸菌がタイ産発酵食品には存在し、多様な種が分離された *Staphylococcus* 属も含めて、これらは新たな応用が期待できる重要な微生物資源になると考えられる。これらタイとの共同研究により得られたタイ産発酵食品由来微生物はタイと日本の両国で保存していて、海外資源であるタイ産発酵食品由来微生物へのアクセスが日本国内でも可能となっている。生物多様性条約では特に生物資源の利用から生じる利益の配分が求められており、日本でのタイ産発酵食品由来微生物の産業利用は資源提供国であるタイへの利益の還元に繋がる。しかし、現在までにタイ産発酵食品由来の微生物について、その性質を微生物資源としての観点から網羅的に研究した報告はなく、利用には繋がっていない。

そこで本研究では、タイの発酵食品に由来する乳酸菌と *Staphylococcus* 属の多様性および特性を日本産発酵食品に由来する微生物との比較から明らかにすることで、海外資源の利用へ繋げるひとつの流れを示すと共に、本国の微生物資源の新たな応用利用のための基盤を構築することを目的とした。

論文の構成及び研究方法

第1章では、保存していたタイ産発酵食品由来乳酸菌および *Staphylococcus* 属株から本研究で調査する供試菌株を選抜し、一部の株について再同定を行った。また比較対象とする日本産分離株を得るために日本産発酵食

品から微生物を分離・同定した。分類学的な種の多様性に違いがあるか調べるために、タイ分離株と得られた日本産分離株の構成種を比較した。

第2章では、菌株利用の基礎的な情報となるタイ分離株の環境ストレスに対する耐性とその特徴を調べるため、生育可能なpH、温度、およびNaCl濃度を調査し、日本産分離株と比較した。

第3章では、菌株利用の基礎的な情報となるタイ分離株の糖の発酵性における性質と特徴を調べるため、糖発酵性試験を行い、基準株および日本産分離株と比較した。

第4章では、タイ分離株の付加価値を生み出す能力を探るため、旨味や香気成分の生成に関与するプロテアーゼ活性とアミラーゼ活性、および機能性物質として注目されているγ-アミノ酪酸（Gamma Amino Butyric Acid, 以下GABAという）生産能を調べた。

研究の成果

第1章：発酵食品微生物の収集と種の多様性

9種類のタイ産発酵食品を選択し、それに由来する63株を供試菌株とした。比較対象とする日本の発酵食品由来微生物は、冬季に仕込まれる発酵食品として富山県から冬季に、季節を問わず仕込まれる発酵食品としてタイと比較的類似した環境である沖縄県から夏季に、それぞれ15または9の発酵食品を収集し、94株と32株を分離した。分離株の種を比較すると、分離株の乳酸菌と*Staphylococcus*属細菌のどちらにおいても、他の地域の分離種と重複しなかった種の割合が高く、それぞれの地域で異なる菌種が主に分離されたことが分かった。また他の地域と重複しなかった種数はタイ分離株で最も多く、日本の分離株とは種の分布が異なっていることが分かった。加えて、タイ分離株には既知種とは異なる遺伝子型や表現性状を示した株が見つかり、2新種として学術誌に報告した。

第2章：タイ産発酵食品由来微生物の環境ストレスに対する耐性

タイ分離株の環境ストレス耐性を調べた結果、タイ分離株には酸耐性や高温耐性を有する乳酸菌株が数多く存在し、両耐性を同時に有する株はタイ分離株の乳酸菌の一部にしか存在しなかった。また酸性域からアルカリ域までの広いpH範囲に適応した株も複数みられ、10% NaClに対する耐性を示す乳酸菌株は少ないものの6~9%の中程度の塩耐性を示す株も多く、タイ分離株の乳酸菌は日本産の株とは異なる特徴を有していた。アルカリ耐性や10%の高塩濃度耐性をもつ株はタイ、富

山、沖縄の分離株全てから見つかり、タイ分離株では*Staphylococcus*属株がその特徴を示し、ほとんどの*Staphylococcus*属株が両方の耐性を示した。富山分離株と沖縄分離株の*Staphylococcus*属株も、その半数以上がアルカリ耐性や高塩濃度耐性の両耐性を示し、分離株に存在した*Staphylococcus*属細菌の10種全てでアルカリ性または高塩濃度に耐性のある株が見つかったことから、*Staphylococcus*属細菌にはこれらの耐性をもつ株が広く分布していると考えられる。タイ分離株の*Staphylococcus*属株では有する耐性がアルカリ耐性と高塩濃度耐性であるのに対し、タイ分離株の乳酸菌では酸耐性と高温耐性と異なる特徴を示すことから、それぞれ違う発酵段階に役割を持つと推測できる。

分離株が示したそれぞれの耐性は原産地との相関性はみられず、3地域の分離種は重複する種自体が少なかったことから、分離株の性質の違いは種の違いに現れていると考えられる。タイ分離株に特徴的であった酸耐性と高温耐性を示した*P. acidilactici*およびpH 8.5までのアルカリ耐性と酸耐性を示した*L. farciminis*は、本研究で供した富山と沖縄の発酵食品からは分離されていないことから、タイ産発酵食品の環境に適応した種が発酵に関わっていると考えられる。一方で、タイ分離株の*P. acidilactici*ではpH 3.5に耐性を示す株と示さない株が混在し、*S. condimentii*ではpH 9.0に対して耐性を示す株と示さない株が混在するなど、同種の株でも耐性に多様性がみられる場合もあり、株レベルでの性質の違いが確認された。

第3章：タイ産発酵食品由来微生物の糖の発酵性

調査した49種類の糖における分離株の発酵性は、分離源別に比較すると、野菜の発酵食品に由来する分離株では魚の発酵食品に由来する分離株に比べて発酵可能な糖の種類が多い傾向が見られた。分離種をみると、野菜や大豆の発酵食品から分離した株には乳酸菌の割合が高く、魚の発酵食品に由来する株には*Staphylococcus*属の割合が高かった。乳酸菌と*Staphylococcus*属株では発酵可能な糖の種類に顕著な違いがあり、*Staphylococcus*属株に比べて乳酸菌は多様な糖の発酵が可能で、同種内の株における糖発酵パターンの多様性も大きかった。タイ分離株の乳酸菌が発酵可能な糖にはキシロースなどの五炭糖やマンニトールなどの糖アルコール、その他オリゴ糖やグリコシドなどが含まれ、これら多様な糖源が含まれる植物基質を資化して発酵を進めるのに適応した結果、タイ分離株の乳酸菌は多様な糖を発酵し、同種内の株における糖発酵パターンの多様性も大きくなったと推測される。これらの発酵能に優れた菌株は、植物

基質を原料とする発酵への利用が期待できる。一方で、生育に糖が必須ではない *Staphylococcus* 属株は、乳酸菌と比べて種内の発酵性の違いも小さく、糖が少なくタンパク質が豊富な魚の発酵食品の環境に適応していると考えられた。

基準株との比較から、分離株の発酵性は基本的に種の特徴を反映していたが、同種内でも数種類の糖の発酵性に違いがあるなど株による多様性があることが分かった。しかしその多様性は原産地や分離源による明確な相関性は見られなかった。

クラスター解析により、同種内に糖発酵性の多様性があった種の多くは分離地も複数に渡り、適応力の高さが推測された。タイ分離株では9種の乳酸菌に種内での多様性が認められ、このうち6種が富山や沖縄分離株にも含まれた種だった。残りの3種である *L. farciminis* と *L. fermentum*, *L. futsaii* は種内に多様性があったが本研究で得られた富山と沖縄の分離株には含まれなかった種で、*L. fermentum* は分離源の原材料と発酵パターンに相関性がある傾向が見られ、*L. farciminis* と *L. futsaii* は系統的にも近縁で分離株数も多かった。一方、同種でまとまったクラスターを形成した種はそれぞれの地域でのみ分離された種が多数を占め、その種数はタイ分離株で最も多かった。糖の発酵性は種によって違いがあることから、日本産分離株とは異なる発酵性を示す分離株が多数含まれることが示され、タイ産発酵食品の環境に適応した日本産の株とは異なった発酵性を持つ分離株が多数存在することが分かった。

第4章：タイ産発酵食品由来微生物の酵素生産能およびGABA生産能

タイ分離株でカゼイン分解能を示しプロテアーゼ活性を有する株は全て *Staphylococcus* 属株だった。活性を示した7株のうち5株が魚の発酵食品由来であり、タンパク質が豊富な環境に適応し風味形成に関わっていることが推測できる。*Staphylococcus* 属は通性好気性菌で、多くの場合、嫌気条件下よりも好気条件下での生育が良好であることが知られている。これら分離株も嫌気と好気のどちらの条件下でも生育が可能だが、好気条件下での生育はより良好で、プロテアーゼ活性においても好気条件下では7株全てが活性を示した。一方で嫌気条件下

での生育も可能であり、2株は嫌気条件下でも活性を示し、発酵過程における嫌気的な条件下での利用が期待できる。

GABA生産能は、富山や沖縄の分離株では見つからなかったのに対して、タイ分離株の乳酸菌から3株が見つかった。野菜や大豆の発酵食品に由来する株であり、これらの株を用いて機能性を付与した発酵食品への活用が期待できる。

以上から、タイ分離株には特色ある製品開発に活用可能な、旨味や香気成分、機能性物質の生産能といった付加的な価値を生み出す菌株が存在することが明らかとなった。

まとめ

環境ストレス耐性と糖発酵性のどちらにおいても、タイ分離株は基本的に種の特徴を反映しており、分離株の種の構成自体に重複が少なかったことから、それぞれ地域によって異なる性質を有する株で構成されていると考えられる。原産地や分離源である発酵食品の原材料との明確な相関性はみられなかったが、種内の性質は一定では無く幅があり、その多様性には、分離源である発酵食品やその製造環境の影響を受けていると考えられる性質もみられた。また糖の発酵性においては、種内に多様性が生じやすく、そのため幅広い適応力をもつと考えられる種と、それぞれの地域や発酵食品に適した種が存在すると考えられ、タイ分離株は日本の株とは異なる性質を持つことが示された。またタイ分離株にはGABA生産能を有する乳酸菌やプロテアーゼ活性を示す *Staphylococcus* 属株も見つかっており、これらの株を用いて機能性を付与した発酵食品への活用が期待できる。

以上より、本研究はタイ産発酵食品に由来する乳酸菌および *Staphylococcus* 属細菌の、日本産分離株とは異なる特徴を明らかにし、タイ分離株の応用利用へ繋げる新たな価値を見いだした。本研究の成果により海外微生物資源の多様性とその国内外における利用可能性が示された。生物多様性の保全とその構成要素である遺伝資源の持続可能な利用の重要性を改めて認識すると共に、未だ埋もれている、またはこれから分離される微生物資源の活用に繋がることを期待する。

審査報告概要

本研究は、タイの発酵食品から分離した乳酸菌および *Staphylococcus* 属細菌それぞれの菌株の表現性状およ

び系統的多様性を調べ日本の分離株と比較した。その結果、乳酸菌の新種を提唱するとともにタイ分離株の微生物

物資源としての有用性を明らかにした。特に発酵食品への応用を想定し、製造過程で微生物の生育に影響するストレス因子である温度や pH、塩濃度への耐性、また、各種糖類の発酵能についてタイ分離株を特徴付けた。タイ分離株のうち、乳酸菌株においては日本の分離株にはない低 pH や高温環境での生育、また、糖アルコール類などの発酵能が特徴的であることを明らかにした。さらにこれらの特性を利用したタイ分離株の新たな応用手法の提案に至った。また、*Staphylococcus* 属分離株にお

いても種レベルで菌叢が特徴的であることを明らかとし、プロテアーゼ活性などが有用である可能性を示した。

これらの成果は、新たな日本でのタイ分離株の活用への道標となり、そしてタイのみならず途上国の微生物資源にアクセスする価値を示し、生物多様性条約に則った環境保全にもつながるものである。よって、審査員一同は博士（環境共生学）の学位を授与する価値があると判断した。