

カルチャーコレクションリソースを活用した 畜産分野における乳酸菌研究

遠野雅徳

国立研究開発法人農研機構畜産研究部門 〒329-2793 栃木県那須塩原市千本松 768

Study of lactic acid bacteria in the field of livestock industry utilizing culture collection resources

Masanori Tohno

Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization
768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi, 329-2793, Japan

1. はじめに

「発酵」や「共生」をキーワードとして、畜産分野と乳酸菌の関わりはきわめて深い。家畜に給与される発酵飼料（サイレージ）、家畜消化管、ヨーグルトに代表される発酵乳製品などさまざまな局面において乳酸菌の存在が認められ、乳酸菌を活用した基礎研究や社会実装が盛んに行われている。生乳の生産性にもかかわるサイレージ調製から発酵乳製品の高付加価値化にいたるまで、乳酸菌の存在なくしては成り立たないことが多い。わが国の食と農を支える畜産分野において、乳酸菌は重要な役割を果たしている。

近年の健康・美容ブームに加えて、具体的な機能性を表示した食品への高い関心も追い風となり、国内の健康・美容関連の食品市場は2兆2,000億円（2016年）を超える規模にまで急成長している（富士経済調べ）。この市場拡大の牽引役の一つが機能性表示ヨーグルトなどの発酵乳製品である。3,000億円超（2015年）のヨーグルト類市場のなかでも、健康や美容を訴求した機能性表示ヨーグルト類の市場規模は1,500億円以上を占めており、今後も高い機能性を示す乳酸菌の活用により市場規模の拡大が見込まれている。同じく乳酸菌と関わりが深いチーズの国内消費量は32万トンを超えており（2016年）、2年連続で過去最高を更新している（農水省調べ）。今後は、国内ナチュラルチーズ製造の一層の活性化が重要であると考えられることから、生産性向上や特色ある風味醸成に寄与する乳酸菌の活用も期待される。まさに、乳酸菌は健康・

美容ブームの主役であり、わが国の関連業界の維持・発展を担うキープレイヤーである。

一方、残念ながら明るい話題だけではない。わが国の生乳生産量は減少傾向であり、ヨーグルト製造に多く利用される脱脂粉乳の生産量にも負の影響が見られる。これは、わが国の酪農の危機的状況を示しており、高齢化、担い手不足、生産性悪化等による生産基盤の弱体化に起因するものである。需要と供給のバランス崩壊の恐れのある脱脂粉乳については、応急的な対応として海外からの輸入に頼らざるをえない状況となっており、根本的な酪農生産基盤の立て直しが喫緊の課題である。

酪農家において、乳牛に給与する飼料代が経営コストの大半を占めている現実を考えると、サイレージの高品質・低コスト化に加えて、変敗などによる廃棄ロスの低減は重要なミッションである。良質なサイレージを調製する際にも乳酸菌のスターター添加が行われることがあり、乳酸菌がサイレージ発酵の促進や変敗防止において重要な役割を果たしている。「美味しく健康に良いヨーグルトに加えて、牛の餌にも乳酸菌の発酵パワーが働いている」といった具合に、店頭に並ぶ多数の華やかな機能性ヨーグルトを手にとるとき、生産基盤の要である酪農家の努力やサイレージにおける乳酸菌の活躍まで想像していただければ幸いである。

われわれの研究チームでは、家畜の生産性向上に密接に関連するサイレージの高品質化に貢献する乳酸菌の探索研究のなかで、*Lactobacillus*属などの複数の新種乳酸菌を提唱してきた。これらの新種を含めた乳

酸菌の有益効果を追究することによって、高品質で安定的な飼料生産の観点から酪農生産基盤の強化を目指している。本過程において、カルチャーコレクションの利用者として、カルチャーコレクションリソースの活用や乳酸菌分離株の寄託などを行ってきた。本稿では、カルチャーコレクションの役割である菌株の分譲・寄託・品質維持の重要性や、カルチャーコレクション充実の有用性について、利用者側の視点から考えてみたい。

2. カルチャーコレクションの有用性と重要性

1) 分譲依頼者の観点から

さまざまな環境中から細菌を分離し、基礎・応用研究に活用するアプローチにおいて、分離した細菌の同定は必要不可欠である。これは乳酸菌に限ったことではない。近年、16S rRNA 遺伝子などのハウスキーピング遺伝子配列を用いた系統分類が主流となっている。通常、分離株の16S rRNA 遺伝子配列を解読後、公共の GenBank/EMBL/DDBJ や EzTaxon などのデータベースを活用することにより、分離株と他株の16S rRNA 遺伝子配列を比較して菌種を推定する。本比較作業の段階においては、近縁種基準株を含む他株を手元に用意して詳細な追究を実施することは必須ではない。

分離株のハウスキーピング遺伝子配列が近縁種基準株を含めた他株の同配列と類似していない場合、分離株が新種である可能性が浮上する。ここで新種提唱を目指す場合、近縁種基準株の「分譲」を依頼してみずからの実験室で培養し、同一条件下で生理・生化学的性状などを比較追究することが強く推奨される (Tindall *et al.*, 2010)。通常、多くの基準株を保有している研究者は少ないと思われることから、近縁種基準株を手元に揃えることが新種提唱を目指す場合の重要なステップとなる。われわれの研究チームでは、これまでに乳酸菌を含むいくつかの新種細菌を提唱してきたが (Tohno *et al.*, 2013, 2014, 2017)、いずれの研究においても、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室が提供する JCM 株などを活用して研究を展開してきた。国内のカルチャーコレクションに近縁種基準株を分譲依頼することが困難な場合には、植物防疫法などの関連法令遵守のために関係当局への問い合わせや手続きを実施し、審査結果を待って国外のカルチャーコレクションからの入手を行ったケースもある (Kobayashi *et al.*, 2017)。

新種候補株と既知の近縁種基準株との比較研究にお

いて、カルチャーコレクションリソースの活用は必要不可欠であり、コンタクトの取りやすさや輸入作業が不要となる観点からも、身近な日本国内のカルチャーコレクションリソースが充実していることは、研究推進上の大きなアドバンテージとなると考えられる。

2) 寄託依頼者の観点から

新種の特徴には、その基準株の生理・生化学的性状やゲノム情報が大きく反映されることから、以後比較対照として絶対的存在に近い位置付けとなる基準株の重要性はきわめて高く、新種提唱において基準株の「寄託」は必須のプロセスとなる。新種候補株の近縁種となる基準株を入手し、多角的に比較追究した末に新種であることが明確となった場合には、論文投稿に先立って異なる国の最低2箇所のカルチャーコレクションに新種候補株を寄託しなくてはならない (Tindall *et al.*, 2010)。この観点からも、身近な日本国内のカルチャーコレクションの存在はきわめて有意義である。

われわれが新種提唱にかかわった *Lactobacillus backii* (Tohno *et al.*, 2015) は、ビール製造過程における汚染菌であることが報告されている。ビール製造の本場であるドイツにおいて、ビール腐敗トラブルの全報告例のうち、*L. backii* が原因となるケースは48-10%を占めており、深刻な経済的損失となっている (Suzuki, 2015; Geissler *et al.*, 2016)。*L. backii* を検出するための試薬キットも市販されており、産業上コントロールすべききわめて重要な菌種であると考えられる。本問題の深刻さから、*L. backii* 基準株リソースを用いた問題解決のための基礎・応用研究が行われていることもあり、新種提唱論文を執筆したわれわれの研究チームに分譲依頼が寄せられるケースがある。ところが、研究者個人が多数の分譲依頼に対応して品質保証の伴ったリソースを提供することは事実上不可能であり、カルチャーコレクションにおける寄託株を活用してもらうことが現実的である。これは、結果として各寄託依頼者の負担低減に繋がっていると考えられる。本事例からも、分譲依頼株の提供に加えて、カルチャーコレクションが担っている寄託依頼株の受入と品質維持業務の重要性を再認識することができる。

3) *Lactobacillus parakefiri* の系統分類学的位置付けの再検証

微生物の系統学的分類における基準株の寄託・維持・管理・分譲の重要性を再認識した事例として、他の研究チームによって公開されていた *Lactobacillus*

parakefiri DSM 10551^T 株のゲノム情報に異種ゲノムの混入を見出し、別のカルチャーコレクションに保存されていた *L. parakefiri* JCM 8573^T 株のゲノム解析を通して、本菌種の分類学上の位置付けを再検証した報告を紹介する (Tanizawa *et al.*, 2017).

L. parakefiri は主にロシアのコーカサス地方を起源として製造されてきた伝統的発酵乳であるケフィール (ケフィア) より分離され、新種として報告された乳酸菌種であり (Takizawa *et al.*, 1994), サイレージより分離されることもある (データ未公表). 本菌種の近縁種には、サイレージ発酵の分野で産業応用されているものも存在しており、系統グループ全体としても興味深い. *L. parakefiri* の基準株となった分離株名は GCL 1731^T であり、JCM に寄託されることにより JCM 8573^T の菌株番号が付与されている. その後、JCM 以外の他のカルチャーコレクションへも移管が展開されており、たとえばドイツの DSMZ で保管されている *L. parakefiri* DSM 10551^T 株の来歴を DSMZ のホームページ上で確認すると、JCM からの移管であることが明記されている.

2015 年に異なる 2 つの研究チームにより、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノム解析に基づいた興味深い報告がなされた. *L. parakefiri* DSM 10551^T 株と *L. kefir* DSM 20587^T 株のゲノム比較解析から、*L. parakefiri* は *L. kefir* の後続異名であり、*L. kefir* と同種である可能性が指摘された (Zheng *et al.*, 2015). これは、*L. parakefiri* が系統分類学的に独立した菌種として位置づけられていることへの疑問提起にほかならない. 一方、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノムサイズは、これまで報告されてきた全 *Lactobacillus* 属乳酸菌のゲノムサイズのなかで最も大きく、実に 4.91

Mb であることが報告された (Sun *et al.*, 2015). 本知見に基づけば、ゲノムサイズの観点において、*L. parakefiri* のゲノムは既知の *Lactobacillus* 属乳酸菌ゲノムのなかできわめて特徴的であることになる.

われわれの研究チームでは、菌種としての *L. parakefiri* の系統分類学的位置付けを検証するために、先の 2 報の論文で用いられた *L. parakefiri* DSM 10551^T 株のシークエンスデータの再解析に加えて、異なるカルチャーコレクションで保管されている同種基準株である *L. parakefiri* JCM 8573^T 株の新規ゲノム解析を行った (表 1) (Tanizawa *et al.*, 2017). まず、公共配列データベースに登録されている Zheng らの報告で使用されたデータ (アクセッションナンバー: SRR1151226) を独自に再解析した結果、*L. kefir* DSM 20587^T 株のゲノムに対する Average Nucleotide Identity (ANI) 値は 97.9% であった. ANI 解析における新種の閾値は 95~96% とされていることを考慮すると (Goris *et al.*, 2007), *L. parakefiri* は *L. kefir* と同種であるとする Zheng らの主張を裏づける結果となった. 次に、Sun らの報告で使用されたアクセッションナンバー ERR433484 のデータを再解析した結果、*L. kefir* DSM 20587^T 株のゲノムに対する ANI 値は 91.7% であり、*L. parakefiri* と *L. kefir* は別種であることを示した. このことは両菌種が同種であるとする Zheng らの結果とは相異なるが、ゲノムサイズが 4.9 Mb を超えるとする点については再確認された. このように、各グループが用いたデータはそれぞれの主張を支持しているが、われわれの検証により新たな事実も明らかになった. それは両データともに異種ゲノムの混入が高い割合 (SRR1151226 では 14.20%, ERR433484 では 99.35%) で認められたこと、さらに

表 1 異なるシークエンスデータから得られた *Lactobacillus parakefiri* のゲノム統計

Data source/ Strain	Total size/ bp	Contigs	GC %	Completeness %	Contamination %	ANI against <i>L.</i> <i>kefir</i> DSM 20587 ^T	
BDGB01/ JCM 8573 ^T	2,493,412	161	43.6	98.71	0.81	79.7%	Assembled by Tanizawa <i>et al.</i> (2017)
SRR1151226/ DSM 10551 ^T	2,928,489	456	41.9	98.06	14.20	97.9%	Originally assembled by Zheng <i>et al.</i> (2015) Re-assembled by Tanizawa <i>et al.</i> (2017)
ERR433484/ DSM 10551 ^T	4,903,546	318	42.6	99.03	99.35	91.7%	Originally assembled by Sun <i>et al.</i> (2015) Re-assembled by Tanizawa <i>et al.</i> (2017)

(Tanizawa *et al.*, 2017 の表 1 を一部改変し転載)

は *L. parakefiri* および *L. kefiri* 両者のハウスキーピング遺伝子の混在も認められたことである。おそらくは *L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノムに *L. kefiri* ゲノムが混入したことにより、異なる解釈結果が生じたと考えられる。ANI などのゲノムデータを基礎とした系統分類学が発展し、実際にゲノムデータを根拠として新種提唱がなされている現実を考慮すると、公共配列データベースに登録されている基準株ゲノムデータの信頼性に疑義がある状況はきわめて憂慮すべきであると考えられる。

そこでわれわれの研究チームでは、異なるカルチャーコレクションで保管されている同種基準株である *L. parakefiri* JCM 8573^T 株 (DSM 10551^T 株の寄託元) を「菌株」として JCM に分譲依頼し、みずからゲノム DNA を調製後にゲノム解読を実施し、異種ゲノム混入率の低いゲノム塩基配列 (アクセッションナンバー: BDGB01) を構築した。本新規ゲノム塩基配列による解析の結果、*L. kefiri* DSM 20587^T 株のゲノムに対する ANI 値は 79.7% となり、*L. parakefiri* と *L. kefiri* は別種であると結論づけられた。ゲノムサイズについては、一般的な *Lactobacillus* 属のゲノムサイズ範囲に収まる 2.49 Mb であることが明らかとなった。以上のことから、*L. parakefiri* JCM 8573^T 株のゲノム解析により、1) 当初の新種提唱時の研究報告をサポートし、*L. parakefiri* は系統分類学的に独立した菌種として位置づけられること、2) *L. parakefiri* のゲノムサイズは、既知の *Lactobacillus* 属乳酸菌のゲノムサイズのなかで最も大きいものではないとの結論を得た。

異なる研究チームの提示したそれぞれ別の *L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノムデータにおいて、同じように高い異種ゲノム混入率が認められた原因を断定することはきわめて困難である。われわれは、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株を「菌体」として DSMZ に分譲依頼し、遺伝型や表現型の観点から培養物の検証を行ったが、結論として、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株自体に異種細菌の汚染・混入は認められなかった (Tanizawa *et al.*, 2017)。検証結果の 1 例として、*L. parakefiri* と *L. kefiri* の種特異的プライマーを構築し、各基準株から抽出したゲノム DNA を鋳型として種特異的 PCR を実施した結果を図 1 に示す。先の 2 例において、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノムには、*L. kefiri* のハウスキーピング遺伝子の混入が認められたことを述べたが、種特異的 PCR の結果、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノム抽出物中に *L. kefi-*

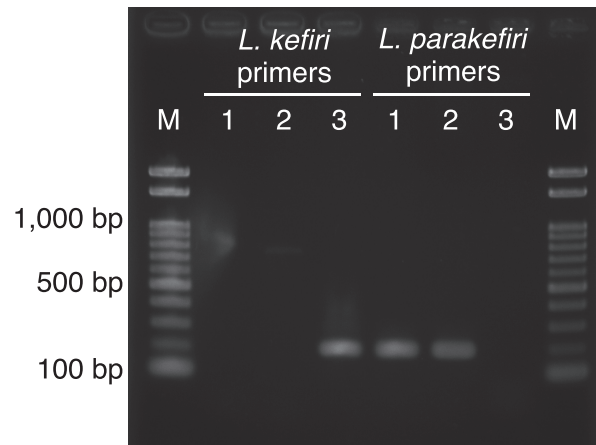


図 1 *L. kefiri* および *L. parakefiri* 種特異的プライマーを用いた *pheS* PCR 解析 (Tanizawa *et al.*, 2017 の図 2 を転載)。レーン表示: M, 泳動マーカー; 1, *L. parakefiri* DSM 10551^T; 2, *L. parakefiri* JCM 8573^T; 3, *L. kefiri* JCM 5818^T

ri のゲノムの存在は認められなかった。

一方、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株の「ゲノム DNA」を DSMZ に分譲依頼し、同様の種特異的 PCR を実施した結果、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノム抽出物中に *L. kefiri* のゲノムの存在を認めた (データ未公表)。しかしながら、本結果は複数ロットのゲノムサンプルを多数の検証事例で追跡したことにより得られたものではないことや、ゲノムサンプルを開封した時点から異種ゲノム混入リスクが発生することを考慮すると、DSMZ で調製されたゲノムサンプル自体に汚染があったかどうかの断定はできない。先行の多数のゲノムを扱った研究報告 (Sun *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015) において、*L. parakefiri* DSM 10551^T 株のゲノムデータが「菌体」あるいは「ゲノム DNA」分譲サンプルのどちらを起点として解析されたものかも不明である。

いずれにせよわれわれの研究により、正確で高品質な *L. parakefiri* JCM 8573^T 株のゲノム情報が明らかとなったことから、今後、*L. parakefiri* のゲノム情報を活用した系統分類学やゲノム微生物学における研究が円滑に展開されるものと期待できる。ゲノム情報を基盤とした研究アプローチが主流となりつつある現在において、カルチャーコレクションが担っている基準株の「菌体」と「ゲノム DNA」の維持・管理・分譲業務の重要性を再認識し、異なるカルチャーコレクションで基準株が保管されている大切さをも感じる事例であった。

3. おわりに

今後、畜産分野と乳酸菌の関係がより一層深まる未来が大いに想像できる。発酵乳製品やチーズ市場のますますの拡大が期待されており、酪農生産基盤の強化の観点から国産自給飼料としての良質なサイレージへのニーズも高まるだろう。畜産分野発の乳酸菌の分離や寄託のみならず、カルチャーコレクションにおける既存の乳酸菌リソースの基礎・応用研究への活用事例が増加することも期待できる。畜産分野における乳酸菌への注目が集まれば集まるほど、カルチャーコレクションと乳酸菌との関係も密接になると思われる。本稿では、身近な国内のカルチャーコレクションの発展と充実により、迅速な研究推進に大きなアドバンテージがあることや、カルチャーコレクションによる研究者個人では対応困難な基準株リソースの分譲業務により、基礎・応用研究のますますの発展が期待されることを述べた。また本稿を通して、複数のカルチャーコレクションで乳酸菌を含む微生物株や微生物由来ゲノム DNA リソースが高品質で保管されることの必要性や、科学的知見における基準株やそのゲノム情報の重要性をご理解いただければ幸いである。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、科研費若手研究 (B) (助成番号 23780274, 日本学術振興会, 平成 23~24 年度), 科研費若手研究 (A) (助成番号 25712032, 日本学術振興会, 平成 25~27 年度), 科研費新学術領域研究 (研究領域提案型) (助成番号 221S0002, 文部科学省, 平成 22~28 年度), 農業生物資源ジーンバンク事業 (農研機構), 国立遺伝学研究所共同研究 (助成番号 2016-54, 国立遺伝学研究所, 平成 28 年度) などによって遂行されたものである。バイオインフォマティクス解析は、大学共同利用機関法人情報・システム研究機構の保有する国立遺伝学研究所スーパーコンピュータで実施された。上記プロジェクトなどでお世話になった大熊盛也先生 (理化学研究所), 坂本光央先生 (理化学研究所), 北原真樹先生 (理化学研究所), 中村保一先生 (国立遺伝学研究所), 有田正規先生 (国立遺伝学研究所), 神沼英里先生 (国立遺伝学研究所), 谷澤靖洋先生 (国立遺伝学研究所), 入澤友啓先生 (東京農業大学), 増田隆晴先生 (岩手県農業研究センター) をはじめ、農研機構畜産研究部門の諸氏に御協力と御指導をいただいたことに深く感謝を申し上げます。

文 献

- Geissler, A.J., Behr, J., von Kamp, K. & Vogel, R.F. 2016. Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. *Int. J. Food Microbiol.* **216**: 60-68.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J.M. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 81-91.
- Kobayashi, H., Nakasato, T., Sakamoto, T., Ohtani, Y., Terada, F., Sakai, K., Ohkuma, M. & Tohno, M. 2017. *Clostridium pabulibutyricum* sp. nov., a butyric acid producing organism isolated from high-moisture grass silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi: 10.1099/ijsem.0.002387.
- Sun, Z., Harris, H.M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M.C., O'Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F.P., Paul Ross, R., Yang, R., Briner, A.E., Felis, G.E., de Vos, W.M., Barrangou, R., Klaenhammer, T.R., Caufield, P.W., Cui, Y., Zhang, H. & O'Toole, P.W. 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* **29**: 8322.
- Suzuki, K. 2015. Gram-positive spoilage bacteria in brewing. *In* Hill, A.E. (ed.), *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), p. 141-174, Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom.
- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y. & Nakase, T. 1994. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **44**: 435-439.
- Tanizawa, Y., Kobayashi, H., Kaminuma, E., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Nakamura, Y., Arita, M. & Tohno, M. 2017. Genomic characterization reconfirms the taxonomic status of *Lactobacillus parakefiri*. *Biosci. Microbiota Food Health* **36**: 129-134.
- Tindall, B.J., Rossello-Mora, R., Busse, H.J., Ludwig, W.

- & Kampfer, P. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 249–266.
- Tohno, M., Kitahara, M., Inoue, H., Uegaki, R., Irisawa, T., Ohkuma, M. & Tajima, K. 2013. *Weissella oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 1417–1420.
- Tohno, M., Kitahara, M., Matsuyama, S., Kimura, K., Ohkuma, M. & Tajima, K. 2014. *Aerococcus vaginalis* sp. nov., isolated from the vaginal mucosa of a beef cow, and emended descriptions of *Aerococcus suis*, *Aerococcus viridans*, *Aerococcus urinaeequi*, *Aerococcus urinaehominis*, *Aerococcus urinae*, *Aerococcus christensenii* and *Aerococcus sanguinicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 1229–1236.
- Tohno, M., Kitahara, M., Irisawa, T., Ohmori, H., Masuda, T., Ohkuma, M. & Tajima, K. 2015. *Lactobacillus mixtipabuli* sp. nov. isolated from total mixed ration silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 1981–1985.
- Tohno, M., Tanizawa, Y., Irisawa, T., Masuda, T., Sakamoto, M., Arita, M., Ohkuma, M. & Kobayashi, H. 2017. *Lactobacillus silagicola* sp. nov. and *Lactobacillus pentosiphilus* sp. nov., isolated from silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**: 3639–3644.
- Zheng, J., Ruan, L., Sun, M. & Gänzle, M. 2015. A genomic view of *Lactobacilli* and *Pediococci* demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 7233–7243.