

食品成分の分解に関わる難培養微生物の検出と機能解析

五十嵐 泰夫

(東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻)

1. はじめに

近年、自然界において通常の培養方法では生育が観察されない、いわゆる「難培養微生物」の存在が重要視されつつある。例えば、通常の土壌中に於いて、容易にコロニーの形成が認められる微生物は、そこに生きている微生物数(生菌数)の約百分の一程度であると考えることが常識化している。栄養源の少ない土壌環境を含むいわゆる特殊環境では、恐らくその通りであろう。それでは、発酵食品の製造プロセスや、食品廃棄物の分解プロセスのような、微生物にとっての栄養が豊富に存在すると考えられる環境における存在はどうであろうか。また、そのような栄養豊富な環境において「難培養」とはどういった意味を持つのであろうか。

幸いなことに現在では、DGGE 法や FISH 法といった培養に頼らない方法で、環境中の微生物叢を観察することができるようになりつつある。本研究は、従来の微生物解析法に加えて上記のような分子生態学的手法を用いることにより、食品加工および食品廃棄物処理の過程における難培養微生物の存在の確認とその生理的意味を明らかにすることを目的としている。

2. 生ゴミ分解過程中に存在する難培養微生物について

本研究では、生ゴミ分解過程に働く微生物を解析する過程において、核酸染色における菌数測定値と各種固体培地によるコロニー形成数との間に、時として50倍から1000倍の差、すなわちコロニーを形成しない微生物が存在することを確認した。DGGE 法による確認の結果、確かにコロニー形成法に取得される微生物は、微生物叢を形成する主要微生物では無いことが確認された。DGGE 法で主要微生物と確認された微生物(BLx)は、16S-rDNA のシーケンスから *Bacillus* 属に類縁の微生物であることが確認され、また他の研究者によってコンポスト中および活性汚泥中に、培養できない微生物としてその部分 16S-rDNA のシーケンスのみが発表されている微生物と類縁種と考えられた。

多大な努力の結果、この微生物を単離することができた。同定の結果、*Cerasibacillus quisquilarum* gen. nov., sp. nov.と命名されたこの菌は、定量 PCR および FISH 法によって、全微生物数の30~50%を占める優占種であることが確認された。食品廃棄物分解過程に優占的に存在すると考えられるこの微生物の各種有機物分解活性に興味を持たれたが、ゼラチン分解活性以外に目立った分解活性は見られず、グルコースをはじめとする食品の主要成分に対する資化性も認められなかった。

むしろ本菌は、(1) pH 10 程度までのアルカリ性で生育できること、(2) 55 程度までの高温に耐えられること、(3) 5% NaCl 濃度の培地に生育できることなど、いずれも中程度の耐アルカリ性、耐高温性、耐塩性を示すことが明らかになった。これらの性質は、いずれも本研究における食品廃棄物分解実験において、微生物が生育する必要条件となっており、これらの耐性を併せ持つことが、本菌が優占種となる一因と考えられる。

当初、難培養微生物と考えられた BLx は、確かにコロニーを形成させることは困難であったが、半連続プロセスである食品分解過程で増殖していることは明らかであり、また最終的にはコロニーを形成させることができた。他の微生物においても培養条件の変化によって特定培地上でのコロニー形成能が見かけ上観察されなくなる事例もあり、現在では少なくとも栄養源のある程度存在する条件に於ける「難培養」または「コロニー形成能の欠如」は、基本的には微生物の生理的状态がそのような状態にある、と考えるのが合理的であろう。それをもし微生物自体の持つ特性と考えようとするのであれば、「難培養状態に陥りやすい微生物」または「他の微生物との競合の中でコロニーを形成するのが不得意な微生物」と考えるべきであろう。

一方、このような微生物が優占種となる要因として、生育に必要な各種の耐性を併せ持っている事を挙げたが、一方で、少なくとも単独ではそのような環境に生育可能と考えられる外来の微生物を加えても、既存の集団から追い出される現象も観察されており、安定化または完成された微生物集団においては、何らかの相互(依存)作用または排他作用が働いている可能性がある。このような微生物集団の構造に関する研究には新たな研究手法が必要とされ、今後の集団微生物学の大きな課題である。

3. 伝統的発酵食品製造に関わる微生物叢の解析

伝統的発酵食品製造プロセスにおける微生物菌叢の解析は、応用微生物学・発酵学の重要課題である。現在まで主として微生物単離法を用いて解析され、大きな成果が得られてきた。一方、近年の分子生態学的手法の発達、特に DGGE 法の開発により、微生物叢の変遷をより網羅的に観察することが可能になってきた。この方法によれば、いわゆる「難培養」微生物の問題もかなり回避することができる。

以上のような観点から本研究者らは、分子生態学的手法による伝統的発酵食品製造プロセスにおける微生物叢の解析を行うこととした。伝統的発酵食品としては鹿児島黒酢を選択した。その理由は、(1) この研究に全面的に協力してくれるメーカーと巡り会ったこと、(2) 黒酢の製造過程では糖化、アルコール発酵、酢酸発酵が一つの瓶の中でシーケンシャルに行われることから微生物叢の変遷がダイナミックに観察されると期待したこと、等による。

黒酢に関しては、既に東京農業大学の小泉幸道教授の膨大な研究成果があり、筆者らの研究は基本的にはまだその成果を確認している段階にある。しかし、(1) ある条件になるとそれまで DGGE 法等で検出限界以下にしか存在しなかった微生物種が急激に増殖を開始して 1-2 日間で主要微生物種になること、(2) 長い時間を経過した後に、

瓶の中の微生物叢が2種類程度の酢酸菌に集約すること、など伝統的発酵技術がもたらす微生物集団の営みをじかに観察することができた。また黒酢に限らないが、伝統的発酵食品の製造に関わる微生物の中にも状況によってはいわゆる「培養困難微生物」が存在するようである。今後は、最新の分子生物学的手法に加えて伝統的な微生物学的手法も加えて、伝統的発酵食品製造に関わる微生物集団とそれを構成する個々の微生物の働きを追究していきたいと考えている。