

フード ケミカル

月刊

食品のおいしさと安心を科学する技術情報誌
A Technical Journal on Food Chemistry & Chemicals.

2017

12

392

特集1 野菜の力

特集2 注目の地域ブランド
—北海道編—



最新技術情報

食品に由来する有害微生物の疫学一覽

ifia
JAPAN
International
Food Ingredients
& Additives
Exhibition
and Conference

くさや汁の微生物叢に関する研究の変遷



高橋 肇 Hajime Takahashi
東京海洋大学 学術研究院 准教授

たかはし・はじめ
●略歴 東京水産大学大学院 博士後期課程修了。国立医薬品食品衛生研究所、山脇学園短大、東京海洋大学助教を経て2017年より現職
●専門分野 食品微生物学、食品衛生学



藤井建夫 Tateo Fujii
東京家政大学大学院 客員教授

ふじい・たてお
●略歴 京都大学大学院農学研究科博士課程修了。東京水産大学・東京海洋大学教授、東京家政大学特任教授等を経て、2014年から現職
●専門分野 食品微生物学、食品衛生学

1. はじめに

くさは主に伊豆諸島で作られている魚の塩干品の一種で、独特のにおいと風味を持っている。アオムロヤトビウオ、ムロアジなどの魚を開き、血抜きを行った後、くさや汁と呼ばれる塩水に漬け込み、天日乾燥または通風乾燥して作られる。漬け込みに用いられているくさや汁は、江戸時代より伝統的に用いられてきた塩水で、繰り返し使用するうちに微生物の作用などにより、茶色味を帯びた独特の臭気を放つ粘性のある液体へと変化したものであり、くさに独特の風味は、このくさや汁に由来していると考えられている。

これまで、くさや汁の性状やその役割を明らかにするために、化学成分、細菌叢などについて多くの研究が行われてきた¹⁾。これらの研究によると、くさや汁中の(培地上で計数可能な)細菌数は 10^8 cfu/mL程度であると報告されている。その内訳であるが、

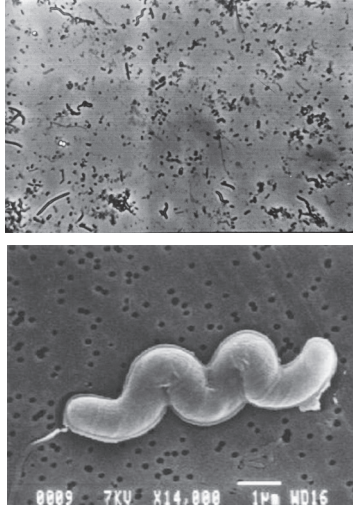
Simiduら²⁾は、くさや汁の優勢菌として寒天培地上での増殖能力の弱い菌群を分離し、これらを“*Corynebacterium*”様菌群と位置づけ、また、藤井ら^{3~5)}もくさや汁中の優勢菌群のうち、好気性菌群として“*Corynebacterium*”, *Pseudomonas*, *Moraxella*など(表1)、嫌気性菌群として*Peptostreptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*などを報告している。また、他にも数種の螺旋菌(写真1)も見つかり、これらは新しく*Marinosprillum*属として提唱されている⁶⁾。

くさや汁中の微生物は、嫌気~微好気、3~10%程度の塩分、高粘調性で、成分的にも特殊な環境にさらされているため、通常の培地では生育が不可能または困難な菌群も多いと考えられている。実際、顕微鏡観察において、くさや汁中には培養法で分離される微生物とは形態的に異なるものも観察され、菌数にもかなりの開きがあることが指摘されている。Satomiら⁷⁾は、遺伝子学

表1 伊豆諸島のくさや汁の微生物叢¹⁾

細菌群	新島	大島	八丈島		三宅島	式根島
	M (144)*	O (107)	A (20)	I (40)	G (30)	L (26)
<i>Corynebacterium</i>	0.0	0.0	5.0	1.7	0.0	0.0
“ <i>Corynebacterium</i> ” **	56.8	56.4	15.0	3.3	80.0	57.7
<i>Pseudomonas</i>	36.7	21.8	15.0	56.6	6.7	19.2
<i>Moraxella</i>	2.2	7.9	65.0	38.3	13.3	23.1
<i>Acinetobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Flavobacterium</i>	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Micrococcus</i>	1.4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Staphylococcus</i>	0.7	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Streptococcus</i>	0.0	5.9	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Oceanosprillum</i>	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

* ()内は分離株数。** 寒天平板上でのコロニーが微小な菌群で暫定分類



バーは 1 μm を示す

写真1 くさや汁の顕微鏡写真(上)と新属のらせん菌 *Marinospirillum megaterium* (下)⁶⁾

的手法を取り入れ、培養に頼らない菌叢解析を試みている。彼らはくさや汁中より、菌由来の DNA を直接抽出し、PCR によって 16S rDNA を増幅した後、プラスミドに組み込み、得られた形質転換体をランダムに選び、クローニングされた 16S rDNA の配列を決定することで、優勢菌を同定している。その研究では、*Bacteroides-Cytophaga* 様の微生物や spirochaeta の仲間など、培養法では分離されない微生物群 (viable but non-culturable bacteria) が存在することを確認している。また蛍光染色による顕微鏡観察で総菌数 ($7.6 \times 10^{11}/\text{mL}$) と培養法による生菌数 ($10^8/\text{mL}$) の間に大きな開きがあることから、くさや汁中には培養が困難な菌群の存在を示唆している。

では一体、どのような微生物がくさや汁の中で優勢で、それはどのような役割を果たしているのだろうか? 筆者らは、くさや汁中の微生物叢を明らかにするため、培養法により分離された微生物については、DNA シーク

エンスによる種レベルで、培養法では分離不可能な菌群については、DNA タイピング法の一つである DGGE 法や次世代シーケンサーを用いた解析を行い、その実態について調査を行ってきた。本稿ではその概要を解説する。

2. 16S rDNA 塩基配列によるくさや汁の細菌叢解析

これまでのくさや汁中の微生物に関する研究は、分離された菌については主に培養法を用いて同定されてきたため、これらの結果を近年主流になっている 16S rDNA を用いた同定結果と比較してみた。この実験⁸⁾では、新たに新島の3つの加工場よりくさや汁を取り寄せ、好氣的、嫌氣的条件下で微生物を培養後、菌数を測定し、任意の菌を分離した。その結果、新島にて採取した3種類のくさや汁の生菌数は、好氣的および嫌氣的条件ともに $1.2 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^9$ であり、培地の違いによる菌数の差は認められないことから、好氣的に培養可能な菌も嫌氣的条件で培養可能な菌もほぼ同じオーダーで存在していることが明らかとなった。

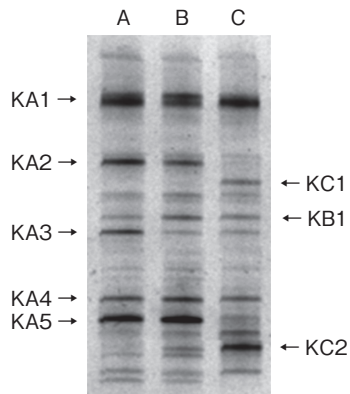
次に、生菌数測定に用いた培地から、好気性菌群、嫌気性菌群としてそれぞれ20株を分離し、16S rDNA 塩基配列に基づく同定を行った。その結果、分離された菌は *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus* などであった。*Pseudomonas* sp. や *Peptostreptococcus* sp. はどのサンプルにも共通して見られ、これまでの報告と一致した。従来優勢菌とされていた *Corynebacterium* 様菌群はこの実験では2株しか分離されなかったが、これは培養開始後1週間で増殖してきた菌を一律に分離したため、増殖の遅い本菌群の分離が困難であったためと考えられ

「温故知新プロジェクト」は生活科学研究所藤井建夫元所長の提案による総合研究プロジェクトで、これまでに42課題の研究が行われています。

た。培養期間を延長し、増殖の遅い菌群がコロニーを形成した後に分離を行えば、これまでの報告にあるような菌叢に近くなると思われる、16S rDNAの配列に基づく分離菌の同定結果は、これまでの報告を裏付けたものとなった。

3. PCR-DGGE法を用いた難培養性菌群も含めた細菌叢の解析

くさや汁より細菌のDNAを直接抽出し、すべての微生物が持ち、菌種の同定に使用される16S rDNA領域に含まれるV3部分をPCRによって増幅し、DGGE解析という方法で解析した例⁸⁾を以下に示す。本法は、培養法を用いずに、解析対象とする検体の中から微生物のDNAを一括して抽出し、微生物の共通遺伝子である16S rDNA領域をPCRによって増幅後、そこに存在するさまざまな菌種に由来する配列の異なる16S rDNAフラグメントを特殊なゲル上で分離する方法である。DGGE解析で用いるゲル中には濃度勾配のついたDNAの変性剤が入っているため、配列が違うDNA断片は違う位置に出現する。



すべての加工場のくさや汁に共通な菌群由来のバンドがいくつか認められるが、Cの加工場では優勢菌群が異なることもわかる

図1 新島の3つの加工場で採取したくさや汁のDGGE解析結果⁸⁾

そのため、電気泳動後、出現したDNAのバンドを一菌種とみなしてフローラの解析を行うことが可能である。解析の結果、新島の3つの加工場より取り寄せた各くさや汁には、5～8種の優勢菌が存在することが明らかとなり、その優勢菌は3つのサンプル間で似ていることも明らかとなった(図1)。

DGGE解析によりゲル上に検出されたバンドをゲル中より回収し、DNAシーケンサー塩基配列を決定、データベースへの照合により同定したところ、サンプル中の優勢菌は*Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Eggerthella lenta*, *Flavobacterium* sp.であることが明らかとなった。*Bacteroides* sp. (バンド位置KA2, KB1), *Fusobacterium* sp. (バンド位置KA3)はともに*Bacteroides-Cytophaga*菌群に属しており、Satomiら⁷⁾の研究で存在が示された菌群と一致した。また、*Eubacterium*菌群に属する*Eggerthella lenta*と同定された(バンド位置)KA5は、同研究で*Eubacterium*と同定されたクローンと同様の菌群であると考えられた。*Clostridium*, *Fusobacterium*と同定されたバンドはこれまでに報告のない菌群であるが、酸化還元電位-320～-360 mVという嫌気度の高い環境であるくさや汁中に存在する菌群としては妥当であると思われる。

DGGEによる解析で検出された菌群は培養法で分離される菌群とまったく異なっており、このことから、くさや汁中には培養できない菌群が多数存在し、それらは培養可能な菌群の少なくとも10倍以上は存在することから、くさや汁のなかでそれらが何らかの機能性をもって存在、関与している可能性が示唆された。

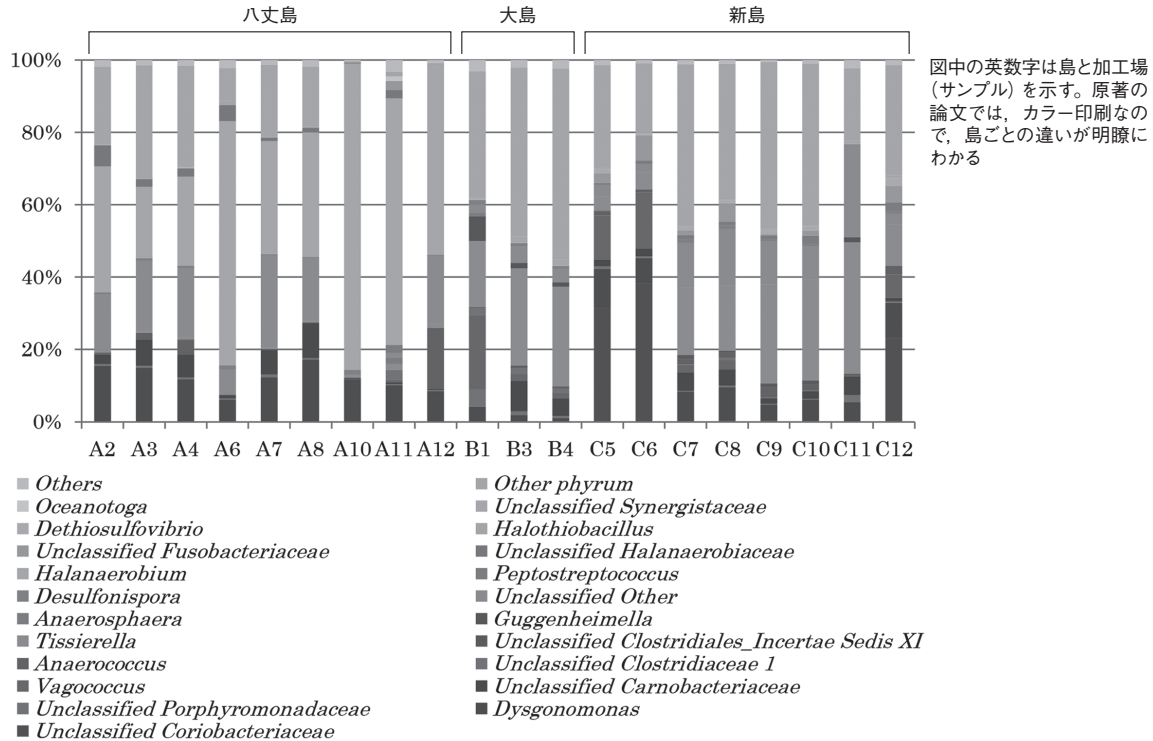


図2 各島の加工場で採取したくさや汁の細菌叢(属レベル)⁹⁾

4. 次世代シーケンサーによるくさや汁の微生物叢の網羅的解析

くさや汁に限らず、発酵食品の細菌叢には多くの培養不可能な菌種が存在する。先に述べたように、DGGE法は多くの発酵食品の細菌叢解析に利用されてきたが、DGGE法によって同定することが可能であるのは、ゲル上にて明確に分離され、バンドとなって現れてくる菌群のみである。先の研究においても、くさや汁中の細菌叢を構成する菌種として、DGGE法によって同定された種は最優勢菌群として存在していると考えられる数種に留まっている。この欠点を克服する技術として、近年、次世代シーケンサー（next generation sequencing；NGS）を利用した細菌叢の解析が注目されている。

従来型のDNAシーケンサーは、解析できるDNAの鎖長は700～1000bp程度である。キャピラリータイプのものが広く普及しており、一度に数検体～96検体程度を同時解析できる。これに対し、次世代シーケンサーは、一度のランで数十万～数十億のリアクションを処理することができ、その読み取り塩基配列数は最も小型のシーケンサーにおいても数千万bpを下回らない。次世代シーケンサーの性能は、年々飛躍的に向上し、ランニングコストも低価格化が進んでいる。また、次世代シーケンサーの種類も解析対象の多様化に合わせ、さまざまな機種が登場してきており、ヒトゲノムを解読できるようなハイスペック機種と並行して、読み取れるデータ量が少ない低価格な機種も提供されている（MiSeq, Ion PGMなど）。また、Pac-

「温故知新プロジェクト」は生活科学全般にかかわる総合研究プロジェクトですが、本誌では食のテーマについて取り上げています。

Bio RS II (Pacific Bioscience) のように、他と比較して長いリード長を読める機種や、他と比較して約半額というランニングコストの低さを売りにしている機種 (Ion Torrent) も登場している。この手法の利点は、細菌叢を構成する細菌を短時間かつ網羅的に解析することが可能であり、さらに得られたデータは定量性を有しているという点である。

筆者ら⁹⁾は、くさやの菌叢解析に次世代シーケンサーを用いて網羅的かつ定量的な解析を行い、従来の方法では知ることのできなかったフローラの全容について解析を試みた。

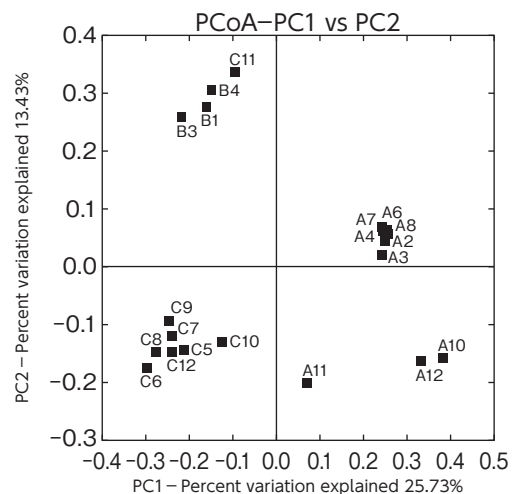
先に述べたとおり、くさやは伊豆諸島を中心に作られており、それぞれの加工場で長い間受け継がれてきている。島という性格上、地理的にも分断されており、同種の発酵食品を作ってはいるものの、その製造に関与する微生物に関しては異なっている可能性が高く、興味を持たれる。本実験では、3つの離島の13のくさや加工場から入手した20サンプルのくさや汁について、次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析を行い、細菌叢の構成を明らかとした。加えて、得られた配列の相同性よりサンプル間での細菌叢の類似性について知見を得た (図2)。

解析の結果、全サンプルより、76科115属が検出された。この菌群の検出数は先のDGGEと比較し、圧倒的に多く、より詳細に存在する菌群に関する解析が可能であることが期待された。すべてのサンプルに存在した科は *Porphyromonadaceae* 科, *Carnobacteriaceae* 科, *Clostridiales* 目に属する unclassified family であった。このうち、*Porphyromonadaceae* 科および *Clostridiales* 目は、過去にくさや汁中に存在していた報告があり、特に *Porphyromonadaceae* 科が属する *Bacteroides-Cytophaga* グループはくさや

汁中の主要な構成グループであることが報告されている^{3,4)}。しかしながら、定量的な解析を行った本研究結果からは、これらの科が細菌叢中で占める割合は、必ずしも最も優勢な菌種ではないことが明らかとなった。*Carnobacteriaceae* 科は、今回、初めてくさや汁中より同定された。*Carnobacteriaceae* は、くさや汁中の細菌叢におけるシェアが小さい (0.1 ~ 9.8%) ことに加え、本属は乳酸菌の一種であり、他の菌群とは栄養要求性が異なるため、これまでの培養法を主とした研究では分離されてこなかった可能性が考えられた。

5. くさや汁の微生物叢は島ごとに異なっている

次世代シーケンサーで解析した各サンプルの微生物叢のデータについて、主成分分析を行ったところ、一部の例外を除いて、ほとんどのサンプルは採取された島ごとにクラス



図中の A, B, C はそれぞれ八丈島、大島、新島を示すが、採取したくさや汁の細菌叢は島ごとにクラスターを形成し、島ごとに細菌叢が特徴づけられていることがわかる

図3 各島の加工場で採取したくさや汁の細菌叢の主成分分析⁹⁾

ターを形成し、島ごとに微生物フローラが特徴づけられていることが明らかとなった(図3)。通常、くさや汁は製造者間で交換することはなく、原料である魚も当然ながら同じものを使用するという事はない。従って、各くさや汁の微生物叢は地理的な要因によって、特徴付けられていることが予想される。例えば、八丈島のくさや汁の細菌叢において大きなシェアを占める *Halanaerobium* は、新島および大島のサンプルにおいては、微生物叢に占める割合が極めて小さく、本菌群は八丈島のくさや汁の微生物フローラを特徴づける主な要因の一つとなっているといえる。八丈島のサンプルは他の島と比較して塩分濃度が高く、本属の生育に適した環境であり、島の地下水や沿岸の海水に含まれる *Halanaerobium* がくさや汁に入った結果、長きにわたり八丈島のくさや汁中で優勢菌群として存在し、八丈島のくさや汁を特徴づける存在となっている可能性が示唆された。一方、八丈島のサンプルと比較して、大島および新島のサンプルに特徴的な属は *Tissierella* であった。 *Tissierella* も *Halanaerobium* と同じく環境中に存在する菌種であり、環境から持ち込まれた本菌群がくさや汁中に定着したものと考えられた。また、いくつかの属は、各サンプル間において特徴的であった。例えば、いくつかのサンプルでは、水圏に広く分布し、魚介類からも広く分離されることが報告されている *Vagococcus* 属の割合が高かった。 *Vagococcus* は、もともとの分布環境を考慮すると、魚に付着してくさや汁中に入り、そのまま生育することにより優勢菌群となっている可能性が考えられた。

本研究では、くさや汁の細菌叢を次世代シーケンサーを利用して網羅的に解析し、それらが島ごとに異なる優勢菌種で特徴付けられていることを明らかにした。加えて、それらの優勢菌種は、地理的な条件と関連付けられていることも示唆した。私たちが知る限り、くさや汁のような長期間にわたって利用が続けられている食品中の細菌叢を、地理的に異なった場所で比較した例は本研究が最初であり、今後の発酵食品を含む細菌叢研究において一つの基礎的な知見となるものと期待された。また、本研究で明らかとされたくさや汁細菌叢の構成は、くさやが有する独特なフレーバーや抗菌活性付与の機序を明らかにする上でも役立つと期待される。

参 考 文 献

- 1) 藤井建夫:『塩辛・くさや・かつお節(増補版)』, p.9-30 (恒星社厚生閣, 2001).
- 2) Simidu, U., *et al.*: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **35**, 109-115 (1969).
- 3) 藤井建夫: 日本水産学会誌, **44**, 45-48 (1978).
- 4) Fujii, T., *et al.*: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **51**, 473-478 (1985).
- 5) Fujii, T., *et al.*: Nippon Suisan Gakkaishi., **59**, 185 (1992).
- 6) Satomi, M., *et al.*: Int. J. Syst. Bacteriol., **48**, 1341-1348 (1998).
- 7) Satomi, M., *et al.*: Fish. Sci., **63**, 1019-1023 (1997).
- 8) Takahashi, H., *et al.*: Jpn. J. Food Microbiol., **19**, 179-185 (2002).
- 9) Fujii, T., *et al.*: Int. J. Food Microbiol., **238**, 320-325 (2016).