

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05898

研究課題名（和文）新たなサイレージ調製技術の確立に向けた特異的オリゴ糖代謝機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of specific oligosaccharide metabolism for establishment of silage preparation

研究代表者

西本 完 (Nixhimoto, Mamoru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：30399381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はロリオースの機能性、特にサイレージに関連した微生物による利用性を評価することを目的として実施した。その成果として調製したロリオースを用いて培養試験をすることでロリオース資化性微生物を見出し、その基準株のゲノム情報より候補遺伝子を同定した。加えて培養上清の分析によりロリオースの取り込みが少なくとも3パターンあることが示唆された。さらに、ロリオース濃縮液を用いた集積培養により、20株以上のサイレージ関連芽胞形成菌を選抜することに成功した。なお、サイレージ調製試験において添加したロリオース濃縮液によるサイレージの低質化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によるロリオース分解酵素の同定は酵素科学分野における新たな知見として学術的価値が高い。また、ロリオースを資化できる微生物の単離もサイレージ発酵中のロリオースの影響を評価する上で貴重なデータである。さらに、これらのロリオースに関するデータの蓄積は、新たな機能性オリゴ糖の実用的開発を加速するものである。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to evaluate the functionality of loliose, especially its utilization by microorganisms related to silage. As a result, loliose-utilizing microorganisms were identified by culture tests using prepared loliose, and candidate genes were identified from the genome information of the reference strain. In addition, analysis of culture supernatants suggested that there are at least three patterns of loliose utilization. Furthermore, we succeeded in selecting more than 20 strains of silage-associated spore-forming bacteria by integrated culture test using loliose-enriched solution. No silage deterioration due to the addition of loliose-enriched solution in the silage conditioning test was observed.

研究分野：糖質科学

キーワード：Loliose サイレージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始時点において、ライグラス類にロリオースと呼ばれるオリゴ糖が存在していることは報告されていたが (Macleod et al., *Nature*, 20, 1958)、その生理的役割や植物体内での動態もよく分かっていなかった。さらに、ロリオースは市販されていないため、用途開発も容易ではない。我々はこれまでにイタリアンライグラス種子からの簡便なロリオース調製法を開発するとともに、登熟後期にロリオースが種子に蓄積することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

上記のような背景の下、本研究ではロリオースの機能性、特にサイレージに関連した微生物による利用性を評価することを目的として、以下の3項目、ロリオース分解酵素の特性解明、ロリオースに対する資化性検証、サイレージ調製に及ぼす影響、を柱として研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) ロリオースの調製 市販のイタリアンライグラス種子を剥皮後遠心粉砕機によって粉碎し、エタノール抽出などによりオリゴ糖画分を抽出する。抽出液をゲルろ過カラムクロマトグラフィー等に供することでロリオースを分画し精製を行い最終的に凍結乾燥することで高純度なロリオースを得ることができた。なお、研究実施期間の都合上、集積培養試験には抽出液を濃縮したロリオース高含有抽出濃縮液を用いた。

(2) ロリオースに対する資化性試験 上記のロリオース標品を用いて、ライグラスのサイレージ発酵に関連するいくつかの微生物を用意し、炭素源を含まない培地、グルコースのみを炭素源とする培地、ロリオースのみを炭素源とする培地、の3種の培地を用いて培養試験を実施した。培養は30°Cで7日間実施し、培養後の濁度、培地のpHを測定した後、遠心分離により培養上清を回収した。得られた培養上清を高速液体クロマトグラフィーに供することで成分分析を行った。

(3) ロリオース分解酵素の同定 基準株の全ゲノム情報が解析・公開されているロリオース資化性微生物について、ゲノムDNA上に存在するロリオースを加水分解すると予想される酵素の遺伝子ホモログ候補を相同性検索により探索した。得られた候補遺伝子のDNA配列を合成し、異種宿主発現により大腸菌に生産させることでリコンビナント酵素を調製した。リコンビナント酵素は遺伝子合成の際に付与したヒスチジンタグ配列を利用してニッケル-NTA スピнкаラムに供することで簡易精製を行った。加水分解活性はロリオースを基質とした酵素反応を行い、生成物をTLCで評価して確認した。

(4) 集積培養試験およびサイレージ調製 ロリオースを資化し、かつサイレージ発酵に関わる微生物を探索するため、イタリアンライグラスおよびイタリアンライグラスサイレージを分離源としてロリオースのみを炭素源とした培地による集積培養を30°Cで7日間行った。サイレージは無予乾および予乾したイタリアンライグラスにロリオースを4.5%含有するイタリアンライグラス種子抽出濃縮液もしくは滅菌水をそれぞれ10% v/w添加して調製を行った。貯蔵30日後に開封し、サイレージ品質の重要な指標となる酪酸含量を分析した。

4. 研究成果

(1) ロリオースの調製 市販のイタリアンライグラス種子 (ワセアオバ) 1000 gを粉碎し、エタノール抽出によりオリゴ糖画分を抽出した。抽出液からゲルろ過カラムクロマトグラフィー等による精製を行い、最終的に高純度な5.8 gのロリオース標品を得ることに成功した。グラム単位でロリオースを保有しているのは世界中を見渡しても当研究室のみであり、以後、独自性の高い研究開発を進めることができる。

(2) ロリオースに対する資化性試験 上記のロリオース標品を用いて、Clostridiales目に属する15菌株を対象として培養試験を実施した。その結果、6菌株がロリオースのみを炭素源とする培地での培養後に、pHの低下、および濁度の増加を示した。このような現象は炭素源を含まない対照試験では確認されなかったことから、これら6菌株がロリオースを資化して増殖

する可能性が示唆された。また、培養上清中に残存するオリゴ糖の分析により、複数のロリオース代謝パターンの存在が示唆された。

(3) ロリオース分解酵素の同定 部分精製したリコンビナント酵素を用いて加水分解活性を確認した結果、2種のリコンビナント酵素において活性が検出された。この2種の酵素は同じ糖質加水分解酵素ファミリーに属していることから、本ファミリー中にロリオース分解酵素が含まれることが明らかとなった。また、資化性試験の培養上清のオリゴ糖分析をした結果、ロリオースを利用できる微生物は、①そのまま取り込む、② α -ガラクトシダーゼで分解してから取り込む、③ β -フルクトフラノシダーゼで分解してから取り込む、という少なくとも3種類の利用形態があることが示唆された。

(4) 集積培養試験およびサイレージ調製 ロリオースのみを炭素源とした培地による集積培養により、イタリアンライグラスおよびイタリアンライグラスサイレージからそれぞれ12株および14株の芽胞形成細菌を分離することに成功した。計26株の分離は想定以上の成果であり、これらの微生物を同定することでロリオースがサイレージ発酵に及ぼす影響を評価できるようになる。また、ロリオース抽出濃縮液を用いたサイレージ調製試験では、いずれも酪酸の生成量が少なく良質なサイレージであった。ただし、本試験では原料中にサイレージ低質化に関与する *Clostridium* 属細菌が検出限界以下であったことから、さらなる検証が必要である。

以上のように本研究では、ロリオースに対する微生物資化性に係る基礎データを取得・蓄積することができた。特に、イタリアンライグラスやそのサイレージからロリオースを利用可能な微生物を見いだせたことは本研究の今後の進展に大きな意味を持つ有用な成果である。また、サイレージ発酵課程におけるロリオースの動態・影響を明らかにする手掛かりを得ることもでき、今後の研究によりその詳細を明らかにできると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西本 完、小林寿美、遠野雅徳
2. 発表標題 Clostridiales目細菌によるロリオースの利用性
3. 学会等名 2023年度日本草地学会札幌大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西本 完、清 多佳子、田村 健一
2. 発表標題 イタリアンライグラス種子登熟期におけるロリオースの蓄積（第2報）
3. 学会等名 2021年度日本草地学会岩手大会（オンライン）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 寿美 (Kobayashi Hisami) (80609701)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------