

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500940

研究課題名(和文)パンの世界地図－酵母と乳酸菌の遺伝子解析からみるパンの多様性－

研究課題名(英文)World map of bread -Genetic analysis of yeast and lactic acid bacteria-

## 研究代表者

長野 宏子 (NAGANO, Hiroko)

岐阜大学・(連合)農学研究科(研究院)・特別協力研究員

研究者番号：40074984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：人々は紀元前から世界各地のパンを食している。「パンの欠片」中の*Saccharomyces cerevisiae*の遺伝学的解析の可能性を探ることを目的とした。試料は、世界64ヶ国から1990年から2015年まで収集したパンの欠片907個であり、そこからDNAを抽出した。*S. cerevisiae*の多型マイクロサテライト6領域を増幅し、アリル頻度のデータから近隣接合法により、系統樹を作成した。パン酵母の多型の変化は、1990年から現代までの時間的要素が大きく関わり、現代になると*S. cerevisiae*の多型が少なく画一的になっていた。焼く等の調理法に比べ、地理的要因が大きいことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：People around the world have eaten bread since the pre-Christian era. The purpose of this study was to explore the possibility of genetic analysis of *S. cerevisiae* present in pieces of bread collected from around the world.

The study specimens were 907 pieces of bread collected from 64 countries between the years of 1990 to 2015. DNA was extracted from these specimens. Six polymorphic microsatellite loci of *S. cerevisiae* were amplified and a phylogenetic tree was created from the allele frequency data using the neighbor-joining method. The changes in baker's yeast polymorphism in the world from 1990 to the present day are closely associated with time elements, and there has come to be less polymorphism and greater uniformity in *S. cerevisiae* at present. Although bread is cooked in various ways, including steaming, frying, and baking in different kinds of ovens, geographical factors were shown to have a larger impact than the method of cooking.

研究分野：総合領域

キーワード：パン パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* マイクロサテライト多型解析 発酵食品

## 1. 研究開始当初の背景

パンは、世界各地の自然環境下に育つ小麦などの食材を用い、独自の起こしだね(スターター)の作り方や焼く・蒸す等の加熱調理方法を受け継ぎ、地方独特のパンが食されてきた。伝統的なパン(ドウ)中にはパン酵母のみでなく、*Bacillus* 属等が普遍的に存在しており、各種酵素を産生し、パンを低アレルギー化にしている。

一方、パン作りに欠かせないパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、全遺伝子配列が解読され、ゲノム配列から種の分類がおこなわれてきた。現在では、ゲノム配列とマイクロサテライト遺伝子座における比較検討<sup>1)</sup>が行われ、マイクロサテライトによる多型解析の有効性<sup>2)</sup>が報告されている。このマイクロサテライト多型解析により、世界の 56 地域から、パン、ビール、ワインの *S. cerevisiae* が、地域性のあるクラスターを形成している報告<sup>3)</sup>があるが、パン酵母は、僅か 29 種であり、また保存菌である。

現在までの報告は、生菌であり、特にワイン酵母が多く解析されている。パンのように加熱され死菌となったパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイクロサテライト遺伝子座による多型解析は皆無である。

1) A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*: Keith D. Richards, Matthew R Goddard, Richard C. Gardner, Antonie van Leeuwenhoek (2009) 96:355-359. DOI 10.1007/s10482-009-9346-3.

2) Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. Schacherer J<sup>1</sup>, Shapiro JA, Ruderfer DM, Kruglyak L. Nature. 2009 Mar 19; 458 (7236):342-5. doi: 10.1038/nature07670. Epub 2009 Feb 11.

3) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. Jean-Luc Legras, Didier Merdinoglu, Jean-Marie Cornuet and Francis Karst. *Molecular Ecology*. **16**, 2091-2102 (2007)

## 2. 研究の目的

パンの歴史は古く、紀元前から長い間、食し続けている。便利なパン酵母の利用も、パストールが微生物の存在を明らかにした後の僅か 150 年程度の利用にすぎない。世界中で食されているパンは、地域の農産物により、その地域に生活していた人々が、つまり地域の民族が独自の方法により、自然発酵によりパンを作り、代々伝え、食してきた。市販酵母などのスターターはなく、果物や野菜の汁を用いて起こし種(スターター)をつくってきた。そのスターターを絶やすことなく植え次いできた。

1990 年代から世界中の自然発酵食品(パンの欠片)を収集・保存している。パン中の酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の多型領域をマイクロサテライト解析により、系統図を作成し、パン酵母の地理的文化圏を明らかにすることと、世界のパンの系統地図から人々の暮らしを考察することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究試料

世界各国から 30 年近くにわたり、収集したパン欠片(約 900 種)と、国内外の保存菌株を対象とした。パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、保存菌株として、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部 NBRC (NITE Biological Resource Center) から *Saccharomyces cerevisiae* 0555 株、2043 株、2044 株および 2375 株を用いた。また、日本で市販されている天然酵母白神こだま酵母(株式会社サラ秋田白神)及びホシノ天然酵母(有限会社ホシノ天然酵母パン種)を、また、フランス市販乾燥酵母(日仏商事株式会社:原産国フランス)も実験に供した。

### (2) パン欠片からの微生物 DNA 抽出法

生菌であるパン酵母 *S. cerevisiae* など 7 種類は、キット DNeasy Blood&Tissue Kit(QIAGEN)を用い DNA 抽出を行った。世界のパン欠片の試料は凍結乾燥し、粉末にした試料を生菌と同様

にキットを用い DNA 抽出を行った。

(3) マイクロサテライト 6 領域及び解析法

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイクロサテライト多型領域である YKL172 w /YPL009c/C6/ScAAT5/C4/ScAAT1 の 6 領域を用いた。 *S. cerevisiae* のマイクロサテライト6領域をPCR後、その産物の長さをDNAシーケンサーで測定した。マイクロサテライト解析による系統樹は、アリル頻度のデータから Cavalli-Sforza の近隣接合法により作成した。

4. 研究成果

(1) 調理法の異なるパン欠片から DNA 抽出は可能か？

パンの定義<sup>1)</sup>は、生の粉を用いる、水分(水・果汁・ミルク)を加え、混捏後、加熱(焼く・蒸す・揚げる)し、固形となったものとした。試料は、日本で考えているふっくらとしたパンだけではなく、薄いチャパティなども含んでいる。パンは通常、180℃のオーブンで焼成されること多い。石釜焼の場合は 230~240℃に達する。今回は焼成温度 230~240℃のパンや真っ黒に焦げたパンも対象にしたが、焦げたパンからの DNA 抽出はできなかった。パンの調理法である蒸す、揚げる、焼くことによる影響は少なく、抽出した DNA は多型解析を行うことが可能であった。

<sup>1)</sup> 舟田詠子. “パンとは何か.” パンの文化史. (東京). 朝日新聞社, 1998, 12

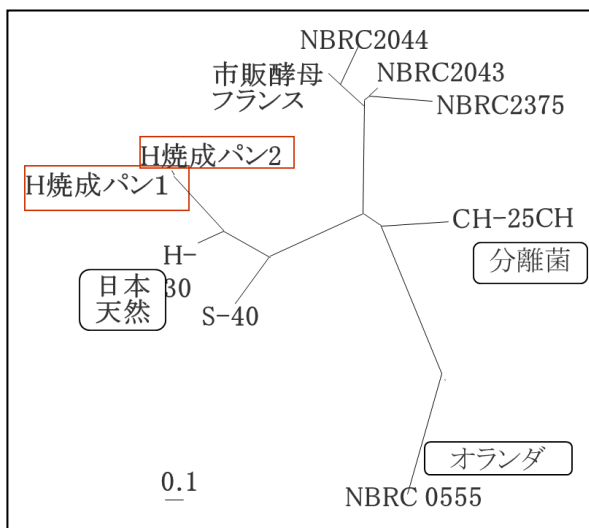


図1. パン酵母 *S. cerevisiae* の系統図

(2) *S. cerevisiae* 同種間の多型解析は可能か？

パン酵母の保存株 *S. cerevisiae* NBRC 0555、2043、2044、2375、日本の天然酵母(白神こだま酵母・ホシノ天然酵母)等の酵母生菌およびパン製品中からの抽出した DNA を用いてマイクロサテライトによる多型解析の結果を図に示した。*S. cerevisiae* 保存菌株の分離源がオランダである NBRC0555 と、他の保存菌株は別のクラスターを作り、日本の天然酵母であるホシノ天然酵母(H-30)と白神こだま酵母(S-4)は、中間に位置していた。マイクロサテライト6領域を用いた同種間の多型解析解析が可能であった。

ホシノ天然酵母(H-30)を用いて焼成したパン(H 焼成パン 1, H 焼成パン 2)は、生菌と同じ位置に存在し、妥当性のある解析結果であった。パン欠片はパン酵母 *S. cerevisiae* のマイクロサテライト多型解析に使えることが明らかになった。

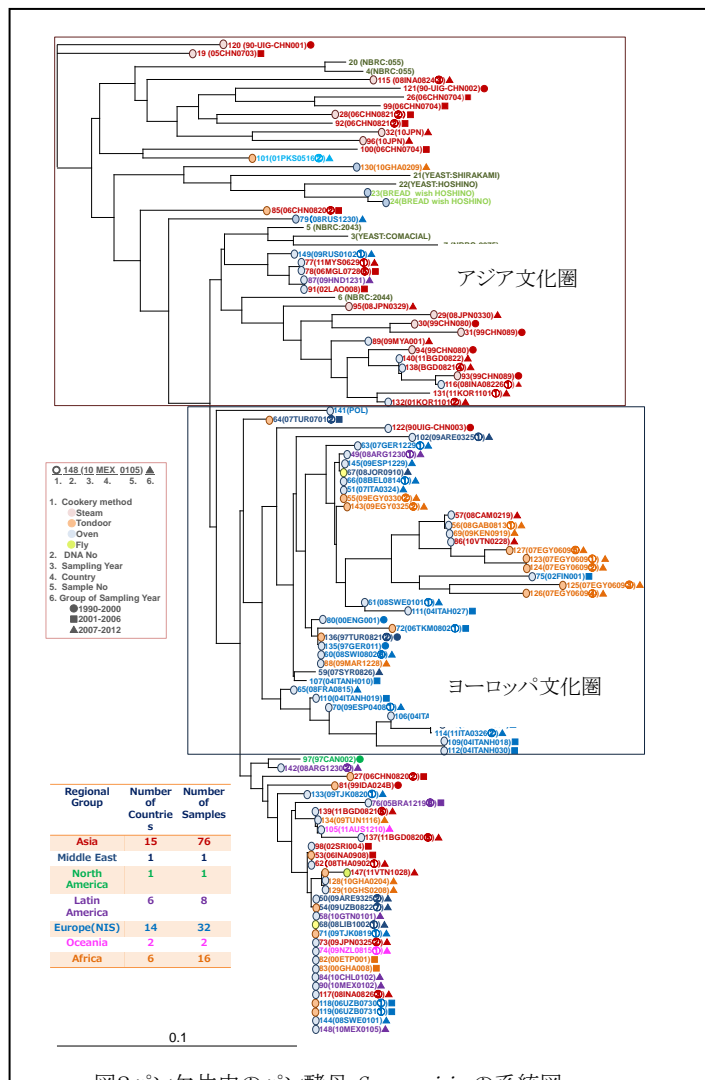


図2. パン欠片中のパン酵母 *S. cerevisiae* の系統図

(3) パン酵母 *S.cerevisiae* は地域・環境をうけているか？

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイクロサテライト多型解析の結果を図 2 に示した。世界中のパン欠片のアリル頻度の遺伝子型からアジアの国々が含まれるアジア文化圏、ヨーロッパ文化圏、多型の少ない 3 つの系統樹を形成した。パン酵母は、地域環境の影響多く受けて、パン作りに用いられていた。また、アジア文化圏の中に保存菌株 NBRC0555 株、2045 株、2375 株が含まれていた。これらの分離源はアジアである可能性を示した。

(4) パン酵母 *S.cerevisiae* の多型解析からみえる現代のパン酵母

多型の少ない画一的なグループは、世界各国のパン欠片の *S.cerevisiae* である。年代別にみると、このグループは、2010 年以降のパン欠片がほとんどである。現代では、パン作りに用いられるパン酵母 *S.cerevisiae* は、アジア、ヨーロッパ、アフリカ、アメリカ、オセアニア諸国において、ほぼ同じものであることが明らかになった。このことは、長い間、地域・地理的影響のもと伝統的な方法で、自然から分離し、人々の智恵で微生物物を受け継ぎパン酵母を用いていたが、パン酵母 *S.cerevisiae* は遺伝子操作をされたものが用いられている事を示唆している。

(5) パン酵母 *S.cerevisiae* の多型解析からみえる人との関わり

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイクロサテライト多型解析によるヨーロッパ文化圏を詳細にみえてみると、米文化圏であるベトナムやカンボジアやイモ文化圏であるガーナ等が入っていることである。これらの国は、フランスに統治された歴史があり、その影響によるのか、引き続き詳細に検討を重ねる必要がある。

人々の動きも反映された結果を得たが、さらに、試料を増やし、調理法、地理的要因、歴史の面からの検討を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 長野宏子, 人々の智恵が育んだ伝統発酵食品と微生物の関わり. 日本家政学会誌(査読無), **65**, 469-478(2014)
- ② 安田怜未, 下山田真, 堀光代, 粕谷志郎, 長野宏子, 小麦発酵食品中の微生物を用いたパンの有効性. 日本家政学会誌, (査読有) **65**, 221-231(2014)
- ③ Xujun HAN,<sup>1</sup> Yuh SHIWA, Masanori ITOH, Tohru SUZUKI, Hirofumi YOSHIKAWA, Toshiyuki NAKAGAWA, Hiroko NAGANO, Molecular cloning and Sequence Analysis of Extracellular Protease from Four *Bacillus subtilis* Strains. *Biosci.Biotechnol. Biochem.*, (査読有) **77**, 870-873 (2013)
- ④ 堀光代, 鈴木徹, 長野宏子, 小麦粉発酵食品中の微生物による小麦たんぱく質への作用, 日本家政学会誌(査読有) **63**, 771-780(2012)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 長野宏子, 村山美穂, 井上英治, 鈴木徹: 世界のパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の多様性, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 30 日, 明治大学(生田校舎) (神奈川県・川崎市)
- ② 川田結花, 柳瀬笑子, 服部正平, 大島健志朗, 横山慎一郎, 野村泉, 長野宏子, 鈴木徹: 大豆食と腸内細菌, 日本調理科学会平成 25 年度大会, 2013 年 8 月 24 日, 奈良女子大学 (奈良県・奈良市).
- ③ 長野宏子, 玉岡ひかり, 堀光代, 粕谷志郎, パンの欠片からみる微生物とパンの機能性, 日本調理科学会, 平成 24 年度大会, 2012 年 8 月 24 日, 秋田大学(秋田県・秋田市)
- ④ Hiroko NAGANO, Miho MURAYAMA, Eiji INOUE, Xujun HAN, Tohru SUZUKI, Diversity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the bread of the World, International Federation for Home Economics (IFHE World Congress 2012), 2012 07 18, (Australia, Melbourne)
- ⑤ 安田怜未, 下山田真, 堀光代, 粕谷志郎, 長野宏子, 酵母と細菌でパンを作る, 日本家政学会第 64 回大会, 2012 年 5 月 13 日, 大阪市立大学(大阪府・大阪市)

[その他]

ホームページ 人々の食と暮らし

(<http://www1.gifu-u.ac.jp/~tabemono/>)

照葉樹林帯の東南アジアを中心に伝統発酵食品のフィールド調査を行ってきた。市場の様子、食材・料理や人々の暮らしの様子を載せている。本研究テーマの試料は、約30年間、旅する人に依頼して収集した世界64ヶ国、パン907欠片である。協力に感謝している。パンの一部をホームページに掲載している。

ホームページは科学研究費補助金をもとに作ったものである。さらに充実する予定である。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長野 宏子 (NAGANO, Hiroko)

岐阜大学・連合農学研究科(研究院)・特別  
協力研究員

研究者番号：40074984

### (2) 研究分担者

鈴木 徹 (SUZUKI, Tohru)

岐阜大学・連合農学研究科(研究院)・教  
授

研究者番号：20235972

### (3) 研究分担者

村山 美穂 (MURAYAMA, Miho)

京都大学・野生動物研究センター・教授

研究者番号：60293552

### (4) 研究分担者

井上 英治 (INOUE, Eiji)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・  
助教

研究者番号：70527895