

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450299

研究課題名(和文)ヒスタミン生成遺伝子の伝播を拒絶する水産食品発酵用乳酸菌スターター株の開発

研究課題名(英文)Development of a fermentation starter for production of fermented seafood which do not receive histamine - forming enzyme gene

研究代表者

里見 正隆 (Satomi, Masataka)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号：00344325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミンを生成する菌に変質することが無い安心安全な水産発酵食品用発酵スターターを選抜するため、ヒスタミン生成酵素遺伝子を受け取らない好塩性乳酸菌を日本産水産発酵食品から分離し、その遺伝子構造を調べ、ヒスタミンなどのアミン類を生成しない発酵スターター候補株を選抜した。そのうち増殖性に優れた2菌株を発酵スターター株として選抜し、ヒスタミン生成菌が混入している魚醤油仕込み液に接種して魚醤油製造試験を行った。その結果、ヒスタミンの蓄積が観察されず、調味料として問題のない品質の魚醤油を製造することができた。

研究成果の概要(英文)：Histamine is a causative agent of allergy like food poisoning and is problematic compound in seafood processing. To develop a fermentation starter for producing safe and reliable fermented seafood, we selected halophilic lactic acid bacteria which do not receive histamine - forming enzyme gene from Japanese fermented seafood. The genetic structure was investigated to select a fermentation starter candidate strain which did not produce biogenic amines such as histamine and tyramine. Among them, two strains were selected as a fermentation starter strain based on its excellent growth, and a brewing test of fish sauce was carried out. As the result, there was no accumulation of histamine, and the products was acceptable quality as a fish sauce.

研究分野：食品微生物学

キーワード：ヒスタミン 乳酸菌 発酵スターター 水産発酵食品 魚醤油 Tetragenococcus

1. 研究開始当初の背景

醤油や魚醤油など発酵調味料の製造ではアレルギー様食中毒原因物質であるヒスタミンの蓄積が問題となっている。ヒスタミン蓄積は発酵調味料製造用発酵スターター（発酵の種株）と同じ種類の好塩性乳酸菌によるものであり、ヒスタミン生成に関与するヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子(*hdc*)は本菌種が持つプラスミドにコードされている。投入されたスターター株に *hdc* を持つプラスミドが伝播して、新たなヒスタミン生成菌が生み出される危険性がある。そのため、魚醤油を含む水産発酵食品の製造業では、ヒスタミン生成菌に変質しない発酵スターターの開発が望まれている。以下に挙げる現状を把握しつつスターターを開発する。

(1) 水産発酵調味料の現状

食の安全安心志向の高まり、資源の有効利用等の観点から、魚介類を原料とした天然発酵調味料（魚醤油）の製造量が増加している。また、近年、CODEX において魚醤油の規格基準が設定されるなど、国際的にも注目されている。しかし、国産魚醤油の場合、ヒスタミン含量が CODEX 基準（400mg/kg）を超えるものが散見され、製品によっては 2000ppm を超えるものもある（日本は基準値なし）²⁾。魚醤油は塩分濃度が約 20% と高く、pH も 5.0 前後と低い。有占する微生物は大豆醤油や味噌から常在菌として分離される好塩性乳酸菌 (*Tetragenococcus spp.*) である。有占菌のうちごく一部の菌株はヒスタミン生成能を有し、ヒスタミンの蓄積に関与していることが明らかとなった³⁻⁶⁾。

(2) 発酵食品のヒスタミン生成菌

魚醤油のヒスタミン生成菌が保有している *hdc* の塩基配列を解析したところ、ワインやチーズなどの乳酸菌の持つピルボイル型酵素遺伝子と非常に高い相同性を示し、この遺伝子は細菌の種、属を超えて分布していることが分かった⁴⁻⁶⁾。さらに、各種魚醤油から分離されたヒスタミン生成菌の *hdc* は全て 20-35kb の環状プラスミドにコードされ、1つの例外を除き全てのプラスミドで複製開始点および複製に関与する遺伝子群は保存されていた (pHDC-A 型プラスミド)⁴⁻⁶⁾。また、ヒスタミン同様、生理活性アミンの 1 種であるチラミンを生成する魚醤油由来の好塩性乳酸菌の遺伝子を解析し、チラミン生成酵素遺伝子も pHDC-A 型プラスミドにコードされていることを見出した⁷⁾。つまり、生理活性アミン生成酵素遺伝子をコードするプラスミドの起源は同一であり、このプラスミドを介してヒスタミン生成能等が伝播したと考えられる。乳酸菌のアミン生成は乳酸発酵による生息環境の酸性化に対する、ストレス応答の一環と考えられ、ヒスタミンなどのバイオジェニックアミンを生成する能力の獲得は魚醤油に存在する好塩性乳酸菌にとって生存戦略上プラスであると予想されている。

(3) 発酵スターター

大豆醤油の製造では、発酵の安定化を図るため好塩性乳酸菌を発酵スターターとして加える。この好塩性乳酸菌は多くの場合、先述したヒスタミン生成菌と同種である。発酵スターターとして期待されるのは、仕込み液の中で優占し、原料由来の雑菌の繁殖を抑え、乳酸発酵を行い、製品に好ましい風味を付与する事である⁸⁾。しかし、魚醤油を含む水産発酵食品の製造ではこのようなスターターを使用する習慣が近年までなかったことから、水産発酵食品用のスターターは開発されておらず、また、ヒスタミン蓄積に関してもあまり研究されてこなかった。先述したように、CODEX で規格基準が設定され、国内生産量も急増していることから、水産発酵食品製造に特化したヒスタミン等のアミン類を生成しない発酵スターターの開発は急務である。

2. 研究の目的

研究の最終目標はヒスタミンやチラミン等のバイオジェニックアミン生成酵素遺伝子をコードしていないプラスミド（複製開始点が pHDC-A 型のプラスミド）を保有している魚醤油発酵スターター株を選抜し実用化することである。つまり、ヒスタミン等のアミン生成酵素遺伝子を持つ外来プラスミドを取り込まない魚醤油発酵スターター株を創出することである（下図）。

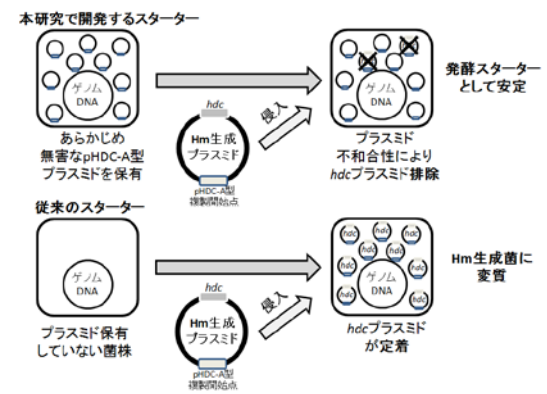


図 本研究で開発する発酵スターターのヒスタミン生成遺伝子排除機構イメージ

そのために以下の研究を行う。

- (1) 好塩性乳酸菌株の収集
- (2) pHDC-A 型プラスミドの特異的検出法の開発
- (3) バイオジェニックアミン（ヒスタミンおよびチラミン）生成遺伝子をコードしていない pHDC-A 型プラスミドを保有している菌株の選抜

3. 研究の方法

(1) 好塩性乳酸菌株の収集

日本各地で製造されている水産発酵食品（魚醤油、魚類塩辛、魚類糠漬けなど 11 製品）から好塩性乳酸菌を収集した。培地には 10%食塩含有 MRS 平板 (pH7.0、メルク)

を、希釈液には10%食塩水を用い、常法に基づき、無菌的に試料を採取・粉碎し、段階希釈を行い、平板培地に塗布した。試料を接種した平板培地は30°Cで好気および嫌気条件下で2週間培養した。培養後得られた微生物の集落を釣菌し、画線培養にて純粋分離を行った。さらに、既報のPCR法⁶⁾にて分離株の中から好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* または *T. muriaticus* に該当するものを選抜した。

(2) pHDC-A型プラスミドの特異的検出法の開発

これまでに著者らがシーケンスを行った好塩性乳酸菌のpHDC-A型プラスミドの塩基配列^{5,7)}を比較し、複製開始点近傍で保存性の高い領域を抽出し、その部分のうちおよそ450bpが増幅できるようにPCRプライマーを設計した(repA-FおよびC13RVR2)。設計したプライマーセットを用いてPCR条件を検討し、pHDC-A型プラスミドを特異的に検出できるPCR法を構築した。PCR条件は以下のとおりである(94°C;1分、30サイクル:94°C;30秒、55°C;30秒、72°C;30秒、72°C;7分)。なお、PCR産物の確認は反応液を電気泳動に付し、臭化エチジウム染色にて行った。

(3) バイオジェニックアミン(ヒスタミンおよびチラミン)生成遺伝子をコードしていないpHDC-A型プラスミドを保有している菌株の選抜

収集した菌株を10%食塩含有MRS液体培地(pH7.0、メルク)で培養し、遠心分離にて菌体を回収した。培養菌体にTE緩衝液を加え、よく分散させたのち、沸騰水にて加熱し、DNA抽出液とした。得られた菌体DNAをPCRの鋳型DNAとし、上述したpHDC-A型プラスミド特異検出PCR法にて本プラスミドの有無を判定した。また、ヒスタミンおよびチラミン生成酵素遺伝子の有無は既報^{4,6)}に従い判定した。

(4) 魚醤油モロミ中でのスターター候補株とヒスタミン生成菌との混合培養

分離菌株の中から菌株の中からバイオジェニックアミン(ヒスタミンおよびチラミン)生成遺伝子をコードしていないpHDC-A型プラスミドを保有している菌株を選抜し、さらに、*T. halophilus*と同定され、10%食塩含有MRS液体培地での発育に優れた2菌株(AおよびB株)を供試菌株とした。カタクチイワシを原料とした魚醤油モロミ(カタクチイワシ、食塩、ブドウ糖:商業用につき原料非公開)に供試菌を約10⁶cfu/g、ヒスタミン生成菌を10²cfu/gとなるようにモロミに接種し、30°Cにて28日間発酵させ、その間のヒスタミン量およびヒスタミン生成菌数、好塩性乳酸菌数およびpHを測定した。スターターを接種していない試料をコント

ロールとした。また、発酵後の資料の呈味性を官能的(味、色、香り)に比較した。

(5) 分離株が保有していたプラスミドの構造解析

分離株AおよびBの保有していたプラスミドの構造を解析するため、市販のプラスミド抽出キット(キアゲン)にてプラスミドを抽出し、得られたプラスミドを制限酵素EcoRIまたはHindIIIにて切断し、pUC118ベクターに組み込み、大腸菌DH5αに形質転換した。形質転換した大腸菌からプラスミドを抽出し、インサート部分の塩基配列を解析した。

4. 研究成果

(1) バイオジェニックアミン(ヒスタミンおよびチラミン)生成遺伝子をコードしていないpHDC-A型プラスミドを保有している好塩性乳酸菌株の収集

国産水産発酵食品11品目から合計1126株の好塩性細菌を分離し、そのうち296株がpHDC-A型プラスミドを保有していた。そのうちヒスタミンおよびチラミン生成酵素遺

表1 ヒスタミン生成酵素遺伝子をコードするプラスミドと同じ複製開始点を持つプラスミドを保有する菌株スクリーニング結果

分離源	分離菌株数	pHDC-A型陽性数		細菌種
		pHDC-A型陽性数	hdcとtdc陰性数*	
エタリ塩辛	185	0	0	
20140218A-スターター添加前(A社)	102	64	61	<i>T. halophilus</i>
20140218A-左(A社)	60	11	11	<i>T. halophilus</i>
20130430番BF0416A(4/26)(A社)	124	62	61	<i>T. halophilus</i>
鯖へしこ(切身)	112	0	0	
鯖へしこ(切身)	107	0	0	
さばへしこ(切身)一切、加熱用	67	65	24	<i>T. halophilus</i>
鯖へしこ(切身)	109	38	22	<i>T. muriaticus</i>
鯖へしこ(切身)	7	0	0	
いわし糠漬	109	55	11	<i>T. muriaticus</i>
サケ菌	144	1	1	<i>T. halophilus</i>
合計	1126	296	191	

*スターター候補株

伝子をコードしていないプラスミドを保有していた菌株は 191 株であった (表 1)。サバやイワシの糠漬けには pHDC-A 型プラスミドを保有する *T. muriticus* が存在するのに対し、魚醤油からは *T. halophilus* しか分離されなかった。本調査で pHDC-A 型プラスミドは両種間に広く分布し、別種にもかかわらず機能していることが明らかとなり、本プラスミドの複製開始点を利用すれば両種で機能するシャトルベクターが構築できると期待される。本研究で解析した pHDC-A 型プラスミドの多くはヒスタミンおよびチラミン生成酵素遺伝子をコードしていなかったが、解析したプラスミドのほとんどがヒスタミン生成酵素遺伝子をコードしている試料もあり、この場合、試料に存在している菌株は高い頻度でヒスタミン生成酵素を有していると考えられた。

(2) 魚醤油モロミ中でのスターター候補株とヒスタミン生成菌との混合培養

発酵スターター候補株 (A および B 株) を実際の魚醤油モロミにヒスタミン生成菌とともに添加して、ヒスタミン蓄積抑制能を評価した。その結果、スターターを添加した試料においてヒスタミンの蓄積が抑制され (図 1)、また、試作品の呈味性などを発酵スターター非添加のものと同様に比較したところ、両者に大きな差は見られなかった。従って、スターター株はヒスタミン生成菌に変質することなく、魚醤油モロミ中で増殖したことが示唆された。

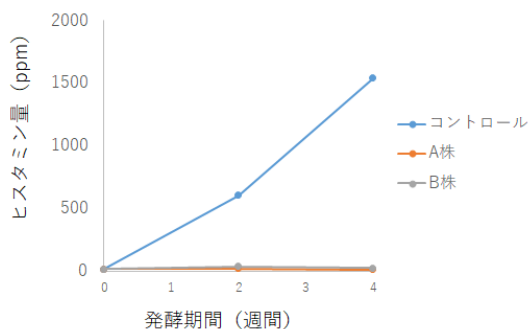


図1 スターター株とヒスタミン生成菌を混合培養した時のヒスタミン蓄積量

(3) 分離株が保有していたプラスミドの構造解析

A および B 株が保有していたプラスミドの構造を解析した結果、pHDC-A 型プラスミドの複製開始点および repA 遺伝子などプラスミドの複製に関する遺伝子群は保存され、これらのプラスミドは pHDC-A 型プラスミドであることが確認された。また、これらのプラスミドは多数のトランスポゾンとアミノ酸脱炭酸酵素遺伝子の近隣の領域に有していた。つまり、ヒスタミンおよびチラミン生成酵素遺伝子をコードしているプラスミド

とはアミノ酸脱炭酸酵素遺伝子の種類が異なるだけで基本構造は同じであった (図 2)。これにより pHDC-A 型プラスミドは複製に関する領域を除き転移性の遺伝子群が複雑に転移を繰り返してきたことが示唆された。

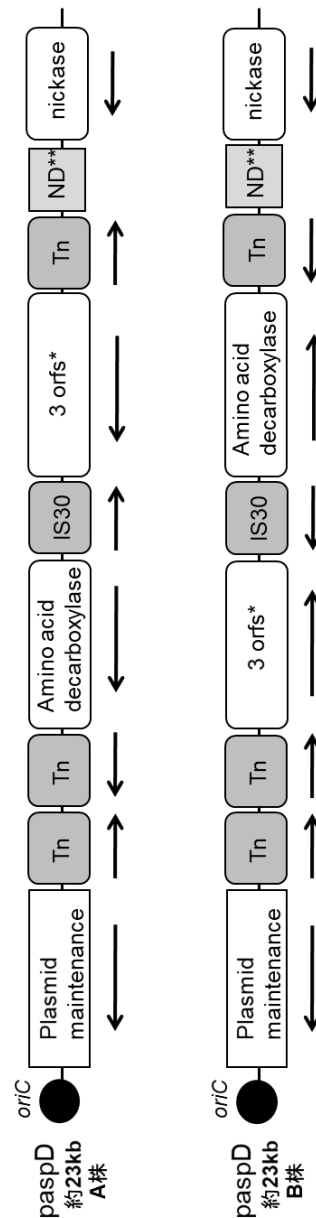


図2 水産発酵食品由来好塩性乳酸菌が保有していたpHDC-A型プラスミドの構造
Tn: トランスポゾン、IS30: IS30ファミリートランスポゾン、ND**:機能未知

文献

- 1) FAO, WHO: Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products (2012). http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO-WHO_Expert_Meeting_Histamine.pdf
- 2) 中里 光男, 小林 千種, 山嶋 裕季子, 立石 恭也, 川合 由華, 安田 和男, 魚醤油中の揮発性塩基窒素及び不揮発性アミ

ン類の分析，東京衛研年報，53，95-100 (2002).

3) Satomi, M., Kimura, B., Mizoi, M., Sato, T., Fujii, T., *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. Int J Syst Bacteriol 47, 832-836(1997).

4) Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yoshikawa-Takahashi M, Yano Y. Analysis of a 30kbp plasmid encoding histidine carboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. Int J Food Microbiol 126, 202-209(2008)

5) Satomi M, Furushita M, Oikawa H, Yano Y. Diversity of plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus* spp. isolated from Japanese fish sauce. Int J Food Microbiol 148, 60-65 (2011).

6) Satomi, M., Koyanagi-Mori, M., Shozen, K., Furushita, M., Oikawa, H., Yano, Y. Analysis of plasmids encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus muriaticus* isolated from Japanese fermented seafoods. Fish Sci 78, 935-945 (2012).

7) Satomi, M., Shozen, K., Furutani, A., Fukui, Y., Kimura, M., Yasuike, M., Funatsu, Y., Yano, Y. Analysis of plasmids encoding the tyrosine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. Fish. Sci. 80, 849-858(2014).

9) 乳酸菌研究集団会：乳酸菌の科学と技術，学会出版センター (1996).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里見正隆 (Masataka SATOMI)

国立研究開発法人 水産研究・教育機構

中央水産研究所 水産物応用開発研究セ

ンター 衛生管理グループ

主任研究員

研究者番号：00344325

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()