

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14967

研究課題名（和文）サイレージにおけるClostridium属細菌の多様性と低質化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Identification of clostridia associated with butyric acid fermentation in silage

研究代表者

小林 寿美（Kobayashi, Hisami）

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

研究者番号：80609701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題を通して、サイレージ等から800株以上の芽胞形成細菌を分離した。生理・生化学的性質および分子生物学的手法により、Clostridium zeaeおよび近縁種のClostridium folliculivoransの新種提唱、Clostridium methoxybenzovoransの再分類を行い、Clostridium属の多様性について明らかにした。酪酸発酵能および生育条件等から選定したClostridium属細菌株を接種して調製した実験室規模サイレージは無接種のサイレージと比べて酪酸が多く含まれており、分離した菌株がサイレージ低質化に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により得られた新たなClostridium属細菌種およびClostridium属細菌種の再分類についての成果は、畜産学におけるサイレージの低質化メカニズムの解明への貢献に加えて、微生物学における系統分類研究としての学術的意義としての価値がある。また、実験室規模におけるClostridium属細菌接種試験により選定されたサイレージ酪酸発酵に関与する細菌種を実規模サイレージでの探索にステップアップするとともに、Clostridium属細菌の制御方法を検討していくことで、良質なサイレージ調製技術の確立による畜産業の発展が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：The objectives of this study were 1) to clarify the diversity of Clostridium spp. in silage, fermented forage for livestock and 2) to identify Clostridium spp. associated with the low quality of silages due to butyric acid fermentation. As the results of research for 1), the novel Clostridium species, which the name Clostridium zeae and Clostridium folliculivorans was proposed. In addition, the taxonomic status of the species Clostridium methoxybenzovorans was clarified. On the result of 2), grass silage inoculated with Clostridium spp. isolated silage contained high butyric acids. It suggested that these Clostridium spp. have potential to be associated with butyric acid fermentation in grass silage.

研究分野：飼料調製

キーワード：サイレージ 酪酸発酵 芽胞形成細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界中で家畜飼料作物の多くは発酵飼料「サイレージ」として調製・貯蔵されている。サイレージは乳酸菌による乳酸発酵を利用して調製するが、しばしばサイレージ発酵・貯蔵中に嫌気性芽胞形成細菌である *Clostridium* 属細菌が増殖する。その結果、酪酸やアンモニアが産生され、悪臭を伴う栄養価の低い低質なサイレージとなる。これまでサイレージ品質の改善技術として乳酸菌の添加などが研究され、一定の成果が挙げられているが、サイレージ原料草によってはサイレージ品質改善効果が低くなる[1]。なぜサイレージ発酵の中心となる乳酸菌を添加しても、効果に違いがあるのか。それを明らかにするためには、サイレージ発酵過程における微生物叢の変遷や低質化の原因細菌とされている *Clostridium* 属を分離・分類同定し、その生理・生化学的性質から増殖条件を解明する必要がある。

サイレージ中の *Clostridium* 属細菌に関する先行研究では、形態的特徴や生化学的性質などの表現型による菌種同定が行われてきた。しかしながら、近年は分子生物学的手法の発展により、微生物の分類に 16S rRNA 塩基配列やゲノム解析などの遺伝子型による同定手法が主流となっている。分子生物学的手法により行われた先行研究では、サイレージからは分離報告のない *Clostridium* 属細菌が分離された[2]。また、*Clostridium* 属細菌は低 pH 環境下では増殖が制限されると報告されてきたが、貯蔵中の低 pH サイレージ中で *Clostridium* 属細菌により酪酸発酵が行われたと推察されるケースが確認されている[1]。これまで申請者らは表現型および遺伝子型分類により、低質サイレージから分離した菌株を新種として提唱したが[3]、さらにサイレージには新種の可能性の高い嫌気性芽胞形成細菌が存在していると考えられる。

以上より、サイレージ発酵品質の低下には、これまでサイレージ低質化の原因菌種として報告されていない *Clostridium* 細菌種や、新種が関与している可能性が推察される。本研究課題ではサイレージの発酵過程における微生物の変遷と *Clostridium* 属細菌の多様性、サイレージの低質化に關する *Clostridium* 属細菌の特定を微生物学的手法と分子生物学的手法からアプローチする。

2. 研究の目的

本研究課題ではサイレージの発酵過程における微生物の変遷と *Clostridium* 属細菌の多様性の解明、サイレージの低質化に關する *Clostridium* 属細菌の特定、サイレージの低質化メカニズムの解明を微生物学的分離培養手法と分子生物学的手法から試みる。

3. 研究の方法

(1) サイレージから分離した *Clostridium* 属細菌の生理・生化学的性質の解明と低質化の原因菌の推定

寒地型牧草 4 種 20 品種およびそれらを用いて実験室規模で調製したサイレージ(図 1)の微生物叢を分析するとともに、嫌気性芽胞形成細菌を分離した。分離した菌株について、生理・生化学的性質等を調査し、酪酸発酵能や生育条件等からサイレージ低質化への関与が推定されたものを中心に 16S rRNA 遺伝子解析により種(属)を同定・分類した。

(2) 分離した菌株のサイレージ発酵への影響の解明

サイレージの低質化の原因菌として推定された菌株を飼料作物に接種し、調製したサイレージの発酵品質等からサイレージ発酵への関与について検討を行う。



図 1 調製した実験室規模サイレージ

4. 研究成果

(1) 寒地型牧草 4 種 20 品種からサイレージを調製し、原料およびサイレージから芽胞形成細菌を 800 株以上分離した。トウモロコシサイレージから分離した *Clostridium* 属細菌は、生理・生化学的性質および分子生物学的解析から新種であることが明らかとなり、*Clostridium zeae* として新種提唱を行った(図 2)。*Clostridium zeae* CSC2^T は酪酸と酢酸を生成し、飼料作物に比較的多く含まれるグルコースやスクロース等を資化する能力を有していることが明らかとなった。また、*Clostridium zeae* と 16S rRNA 遺伝子解析により近縁と考えられた *Clostridium* 属細菌株(99.7% 16S rRNA gene sequence similarity)について、サイレージ発酵への影響を分析するとともに、ゲノム解析を行った。その結果、酪酸を生成する *Clostridium* 属の新種であるこ

とが明らかとなり、*Clostridium folliculivorans* として新種提唱をした。

分離した嫌気性芽胞形成細菌と *Clostridium* 属標準菌株の生理・生化学的性質および分子生物学的比較解析を行ったところ、*Clostridium methoxybenzovorans* は種として再分類する必要があることが明らかとなった。

サイレージから分離した嫌気性芽胞形成細菌について、その生理・生化学的性質および分子生物学的解析から新種であることが明らかとなった。この菌株はグルコース添加 peptone yeast extract 培地では酪酸を生成しなかったため、サイレージの酪酸発酵には直接的に関与する可能性は低いと考えられた。

(2) 分離した菌株のうち、生理・生化学的性質や 16S rRNA 遺伝子解析により *Clostridium* 属に分類され、サイレージ発酵に影響を及ぼす可能性が高いと推定された菌株とその近縁種の標準菌株を寒地型イネ科牧草 3 品種にそれぞれ接種し、短期貯蔵後に開封して発酵品質を分析した。その結果、無接種サイレージと比較して分離株を接種した一部のサイレージでは酪酸含量が高く、分離株がサイレージの低質化に関与する可能性が示唆された。しかしながら、分離株が難培養の嫌気性芽胞形成細菌のため、接種菌液に含まれる生菌数を一定にして比較検討することが困難であった。サイレージの低質化に関与する *Clostridium* 属細菌を特定するためには、サイレージ調製時の接種液に含まれる分離菌株の菌数を一定にするための増殖条件の検討を行い、サイレージ接種試験を行う必要があると考えられた。また、本研究課題では実験室規模のサイレージによる試験を行ってきたが、実規模サイレージでの *Clostridium* 属細菌の多様性についても検討を行う必要がある。

本研究により、サイレージの発酵品質に関与する *Clostridium* 属細菌種の候補を選定することが出来た。さらに複数の嫌気性芽胞形成細菌の新種発見や、*Clostridium* 属細菌の再分類を行ったことで、家畜飼料等における嫌気性芽胞形成細菌の多様性解明と分類に貢献することが出来た。

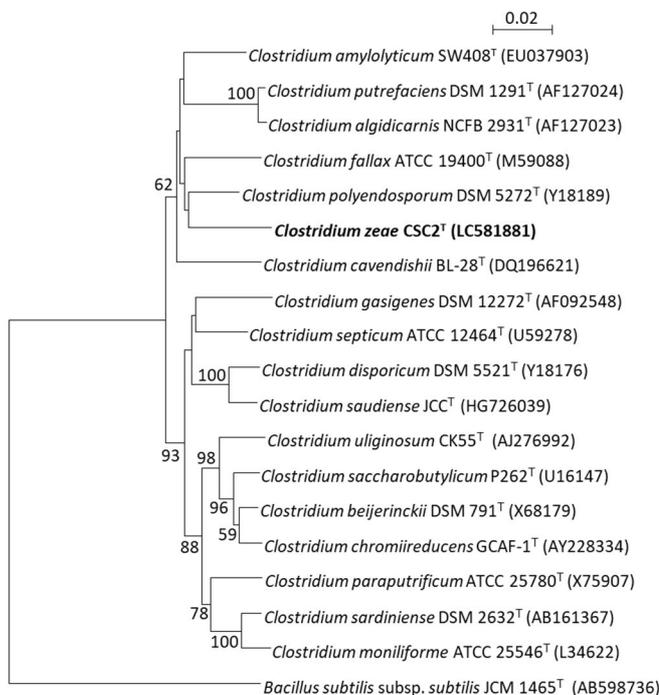


図2 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく *Clostridium zeae* CSC2^T および近縁種の系統樹

参考文献

- 1, 小林 寿美ら, イタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) に付着する微生物の菌種構成と乳酸菌添加による高水分サイレージの発酵特性, 日草誌 56(1):39-46, 2010
- 2, Borreani G. *et al.*, Dairy farm management practices and the risk of contamination of tank milk from *Clostridium* spp. and *Paenibacillus* spp. spores in silage, total mixed ration, dairy cow feces, and raw milk, *J. Dairy Sci.*, 102:8273-8289, 2019
- 3, Kobayashi H. *et al.*, *Clostridium pabulibutyricum* sp. nov., a butyric-acid-producing organism isolated from high-moisture grass silage, *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(12):4974-4978, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Tazawa Junko, Kobayashi Hisami, Tanizawa Yasuhiro, Uchino Akira, Tanaka Fukuyo, Urashima Yasufumi, Miura Shigenori, Sakamoto Mitsuo, Ohkuma Moriya, Tohno Masanori | 4. 巻 73 |
| 2. 論文標題 Clostridium folliculivorans sp. nov., isolated from soil samples of an organic paddy in Japan | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005876 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Hisami, Tanizawa Yasuhiro, Sakamoto Mitsuo, Ohkuma Moriya, Tohno Masanori | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Taxonomic status of the species Clostridium methoxybenzovorans Mechichi et al. 1999 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.004951 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Hisami, Tanizawa Yasuhiro, Yagura Masaru, Sakamoto Mitsuo, Ohkuma Moriya, Tohno Masanori | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Clostridium zeae sp. nov., isolated from corn silage | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.005088 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|