

関西学院大学 研究成果報告

2019 年 3 月 10 日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学部
職名：教授
氏名：藤原伸介

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input checked="" type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	三田市で耕畜連携を促進するための微生物利用技術の構築
研究実施場所	関西学院大学
研究期間	2018年4月1日～2019年3月31日（12ヶ月）

◆ 研究成果概要 （2,500字程度）

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

三田市における農業産出額の割合は、耕種農業63%、畜産業36%¹⁾となっており、循環型農業の実現と地域農業の興隆には耕畜連携の維持が重要になる。耕畜連携の一例として、畜産農家が、家畜の糞から作った堆肥を天然肥料として耕種農家に供給し、その見返りとして家畜舎の敷材や水分調整剤に使用するわらやもみ殻を耕種農家から供給してもらう関係がある。この協力関係を促進するためには高品質な堆肥の生産が重要になる。堆肥が良い肥料になるためには、家畜の体内微生物による物質変換と、堆肥の発酵過程で進む有機物分解が効率よく行われる必要がある。本研究では、家畜の腸内菌叢を改善するプロバイオティクスとして有効な菌種と、植物に悪影響を及ぼす真菌類を死滅させるキチナーゼ生産菌を分離し、それらの機能性菌種を活用して堆肥の性能向上技術を確立することを目的とした。

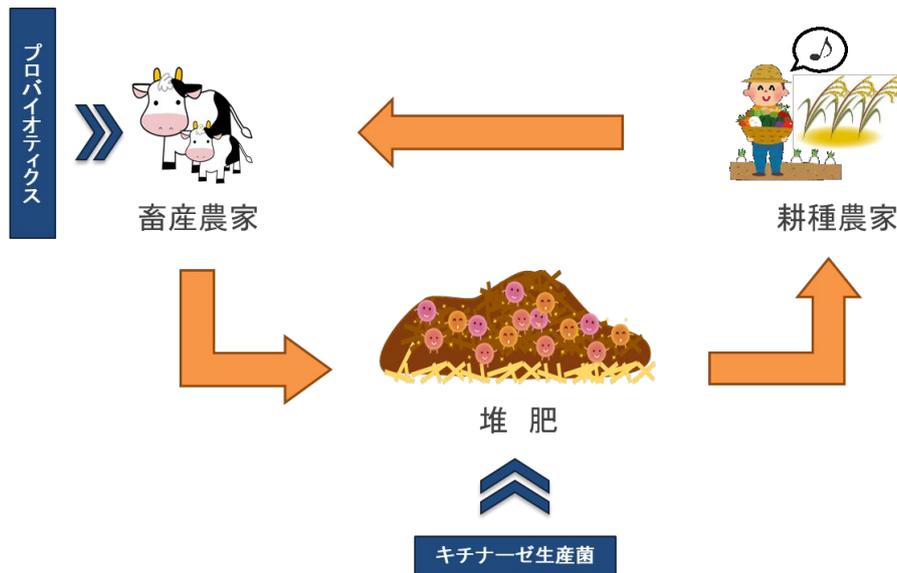


図1 耕畜連携における微生物の活用

1. 結果および考察

(1) 子牛糞便からの乳酸菌分離

三田市の酪農牧場で出生した2頭の子牛（ホルスタイン種）から、出生0日目と10日目の糞便を採取して乳酸菌の分離を試みた。採取糞便を乳酸菌分離培地に塗抹し、37℃にて嫌気培養したところ、0日目の糞便から2種類の株（L1、L2）を、10日目の糞便から1種類の株（L3）を得ることができた。系統解析を行った結果、L1株は *Enterococcus hirae*、L2株は *Streptococcus lutetiensis*、L3株は *Enterococcus faecium* に属する乳酸菌であった。出生後に初めて排泄された糞便中に存在する菌種は今後の腸内菌叢の形成に関与すると推測し、特に、動物の消化管からの分離例が多い *Enterococcus hirae*²⁾ は主要な腸内菌叢と判断した。一方、L3株は、哺乳中の市販人工乳（株式会社セイワ）に配合された乳酸菌と同種であったため、後天的な腸内細菌として存在する菌種であると推測した。

(2) 分離株の人工消化液耐性

プロバイオティクスとして有効な菌種は、殺菌作用がある胃液と胆汁酸に対して耐性を持つことが求められる。L1株について、人工胃液処理（pH3.0）と各胆汁酸濃度の人工腸液処理（胆汁酸0.2～0.5%）における生残性を調べたところ、いずれの処理でも 10^5 CFU/ml レベルで生残した。したがって、L1株は胃酸で死滅することなく下部消化管に生きて到達できる菌種であると判断した。

(3) 分離株のポリアミン生産性

牛のルーメン（第一胃）には、ポリアミンを細胞壁成分とする微生物が存在することが報告されている³⁾。ルーメン内のポリアミン濃度は低いことが知られ、ポリアミンを生産するプロバイオティクスを給与することで、ルーメン細菌が活性化されることが考えられる。そこで、L1株が最少培地中で生産するポリアミンを分析したところ、スペルミンを生産することを確認した。

(4) キチン分解活性を有する微生物の分離

真菌類の細胞壁には構造多糖としてキチンを含むため、キチナーゼを作用させることで真菌病の発生が抑制されることが報告されている⁴⁾。また、キチンが分解されて生成するキトオリゴ糖の中には、植物の生育促進機能を持つものもあり、農業資材としての利用が期待されている。本研究では、各地の堆肥（北海道、愛知県、兵庫県、大分県、佐賀県、熊本県）からキチナーゼ活性を有する微生物の取得を試

みたところ、50℃の好気および嫌気培養条件下でコロイダルキチンと結晶キチンを分解する1菌株（NK5）を得ることができた。系統解析の結果、NK5株は*Bacillus licheniformis*に属する通性嫌気性細菌であった。NK5株を50℃で好気培養し、N-アセチルグルコサミン量によるキチナーゼ活性を経時測定したところ、培養18～24時間後の定常期に活性が見られたが、48時間後には活性が見られなくなった。これは、生産されたプロテアーゼによりキチナーゼが分解されたことによるものと推測した。

2. 今後の展望

プロバイオティクスは、菌株の機能性だけでなく利用上の安全性が不可欠になる。本研究で分離した乳酸菌は、動物の消化管だけでなく、乳房炎を発症した乳汁や心内膜炎病巣から分離された報告⁵⁾があり、産業利用の実現には毒性試験で菌株の安全性を検証する必要がある。

機能性菌種による堆肥の品質向上には、通気性が不均質な堆肥中で機能性菌種を優占化する必要がある。本研究で取得したキチナーゼ生産菌は通性嫌気性菌であるため、堆肥中で増殖させる微生物として適当であると考えられる。申請者は過去に耐熱性キチナーゼの生化学的特性に携わった経験があり^{6,7)}、その経験を活かして今回取得した分離株の機能解析に取り組む。特にキチナーゼの特性と生産条件を精査するとともに、堆肥に本菌株を添加することによる堆肥微生物叢の変動を次世代シーケンサー等で解析していきたい。また、実地試験による堆肥の性能評価（耐病試験）を試みたい。

参考論文

- 1) 平成 28 年市町村別農業産出額(推計), 農林水産省, (2018)
- 2) Devriese, A. L., Kerckhove de van, A., Kilpper-bälz, R., Schleifer, H. K. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 257-259 (1987)
- 3) Kamio, Y. Structural specificity of diamines covalently linked to peptidoglycan for cell growth of *Veillonella alcalescens* and *Selenomonas ruminantium*. *J. Bacteriol.*, 169, 4837-4840 (1987)
- 4) Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., Watanabe, T. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 988-998 (2006)
- 5) Farrow, J. A. E., Collins, M. D. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 73-75 (1985)
- 6) Imanaka, T., Fukui, T., and Fujiwara, S. Chitinase from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Methods Enzymol.*, 330, 319-329. (2001)

Tanaka, T., Fukui, T., Fujiwara, S., Atomi, H., and Imanaka, T. Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and Exo-ss-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biol. Chem.*, 279, 30021-30027 (2004)

- 7) Tanaka, T., Fukui, T., Fujiwara, S., Atomi, H., and Imanaka, T. Concerted action of diacetylchitobiose deacetylase and Exo-ss-D-glucosaminidase in a novel chitinolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. J. Biol. Chem., 279, 30021-30027 (2004)

以 上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。