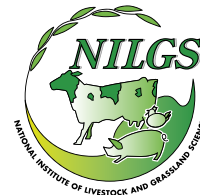


略 号

畜草研研報

Bull. Natl. Inst. Livest.  
Grassl. Sci.

ISSN:1347-0825  
CODEN:CSKKCS



# Bulletin of National Institute of Livestock and Grassland Science



第9号〈No.9〉平成21年3月 -March2009-

**National Institute  
of Livestock and  
Grassland Science  
(NILGS)**

Ibaraki, Japan

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

**畜産草地研究所**

---

畜産草地研究所編集委員会  
Editorial Board

所 長  
Director-General

武 政 正 明  
Masaaki TAKEMASA

草地研究監  
Director, Grassland Research

加 茂 幹 男  
Mikio KAMO

編集委員長  
Editor-in-Chief

寺 田 文 典  
Fuminori TERADA

副編集委員長  
Deputy Editor

中 西 直 人  
Naoto NAKANISHI

編集委員  
Associate Editor

佐 藤 義 和  
Yoshikazu SATO

長 嶺 慶 隆  
Yoshitaka NAGAMINE

千 國 幸 一  
Koichi CHIKUNI

澤 村 篤  
Atsushi SAWAMURA

菅 野 勉  
Tsutomu KANNO

山 本 嘉 人  
Yoshito YAMAMOTO

下 田 勝 久  
Katsuhisa SHIMODA

小 林 真  
Makoto KOBAYASHI

井 出 保 行  
Yasuyuki IDE

---

# 畜産草地研究所研究報告

第9号 (平成21年3月)

## 目次

### 原著論文

- 熟期、品種および切断長の異なるイネホールクロップサイレージを給与した  
ウシの栄養素の利用性、第一胃内発酵および咀嚼時間  
……………樋口浩二・田鎖直澄・野中最子・田島 清・藪元悠介・都丸友久・  
大谷文博・小林洋介・石川哲也・栗原光規・永西 修……1
- イタリアンライグラスうどんこ病抵抗性中間母本「ER3」の育成とその特性  
……………荒川 明・矢萩久嗣・杉田紳一・清多佳子・小松敏憲・内山和宏・水野和彦……15

### 学位論文

- 乳業用乳酸菌 *Lactococcus lactis* のプラスミド育種改良法の開発と乳発酵特性変異の  
解明に関する研究  
……………小林美穂……23
- 家畜排泄物処理における大腸菌の制御に関する研究  
……………花島 大……71

BULLETIN OF  
NATIONAL INSTITUTE OF  
LIVESTOCK AND GRASSLAND SCIENCE

No.9 (2009.3)

CONTENTS

**Research Papers**

- Kouji HIGUCHI, Naozumi TAKUSARI, Itoko NONAKA, Kiyoshi TAJIMA, Yuusuke YABUMOTO,  
Tomohisa TOMARU, Fumihiro OHTANI, Yousuke KOBAYASHI, Tetsuya ISHIKAWA,  
Mitsunori KURIHARA and Osamu ENISHI :  
Effects of grain filling, variety and cutting length of whole crop rice silage on nutrient utilization,  
ruminal fermentation and chewing time in dry cows ..... 1
- Akira ARAKAWA, Hisashi YAHAGI, Shin-ichi SUGITA, Takako KIYOSHI, Toshinori KOMATSU,  
Kazuhiro UCHIYAMA, Kazuhiko MIZUNO :  
Breeding of 'ER3', a Powdery Mildew Resistant Line in Italian Ryegrass, and its Characteristics .....15

**Research Note**

- Miho KOBAYASHI :  
New methods for selective plasmid elimination from *Lactococcus lactis* and characterization of  
the genetic variability of variants derived from Lactococcal starter for milk fermentation .....23
- Dai HANAJIMA :  
Studies on the control of the *Escherichia coli* population during animal waste treatment .....71

# 熟期、品種および切断長の異なるイネホールクロップサイレージを 給与したウシの栄養素の利用性、第一胃内発酵および咀嚼時間

樋口浩二<sup>1)</sup>・田鎖直澄<sup>2)</sup>・野中最子<sup>3)</sup>・田島 清<sup>4)</sup>・藪元悠介<sup>3)</sup>・都丸友久<sup>5)</sup>・  
大谷文博<sup>1)</sup>・小林洋介<sup>1)</sup>・石川哲也<sup>6)</sup>・栗原光規<sup>7)</sup>・永西 修<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 栄養素代謝研究チーム

<sup>2)</sup> 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター

<sup>3)</sup> 畜産温暖化研究チーム

<sup>4)</sup> 機能性飼料研究チーム

<sup>5)</sup> 群馬県畜産試験場

<sup>6)</sup> 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター

<sup>7)</sup> 独立行政法人農業生物資源研究所

## 要 約

体重 600kg 程度のホルスタイン種非妊娠乾乳牛にイネホールクロップサイレージを給与した場合の栄養素の利用性、ルーメン発酵、咀嚼行動に及ぼす熟期（はまさり；乳熟期、糊熟期、黄熟期）、品種（黄熟期；はまさり、クサホナミ、ホシアオバ、クサユタカ）、および収穫機械の違いによる切断長（黄熟期、モミロマン）の影響について検討するため3回の試験を実施した。すべてのイネホールクロップサイレージは飼料専用品種のイネであり、専用の収穫機にてロールベールラップサイレージに収穫調製したものをを用いた。ウシに給与する際には、尿素あるいは大豆粕を併給して粗タンパク質含量を補い、ウシの維持要求量を充足する程度を給与した。

その結果、登熟に伴い、可消化非繊維性炭水化物（NFC）含量が増加し、可消化中性デタージェント繊維（NDF）含量は低下した。可消化養分総量（TDN）は、有意な差はなかったが、登熟に伴い高くなる傾向にあった。また乾物摂取量あたりの咀嚼時間（粗飼料価指数；RVI）は、登熟に伴い有意に短くなったが、NDF 摂取量あたりの咀嚼時間には差はなかった。4品種のうち、はまさりは他に比べて可消化 NFC 含量および TDN が低かった。クサホナミ、ホシアオバ、クサユタカの TDN に有意な差はなかったが、ホシアオバとクサユタカは可消化 NFC 含量が高く、クサホナミは可消化 NDF 含量が高かった。RVI ははまさりが一番高く、その他の品種間には差はなかったが、NDF 摂取量あたりの咀嚼時間はクサホナミが一番短かった。切断長が長い場合、可消化 NFC 含量は高くなったが、TDN には有意な差はなかった。切断長の違いによる咀嚼時間の差は認められなかった。ルーメン液性状には登熟、品種および切断長による顕著な影響は見られなかった。

以上のことから、本実験で用いたイネホールクロップサイレージの TDN 含量はおおよそ同程度であった。また TDN の改善のためには可消化 NFC 含量が高くなることが重要と考えられた。但し、クサホナミは高消化繊維を多く含むことが示された。ルーメン発酵はいずれの処理においても大きな差はなく、粗飼料を給与した場合の典型的な発酵を示した。咀嚼時間には切断長の影響は見られず、品種の違いによる繊維含量や繊維の質が咀嚼時間に影響を及ぼした。

キーワード：イネホールクロップサイレージ、ウシ、栄養価、第一胃内発酵、咀嚼時間

## 緒 言

水稻の飼料化研究は、飼料自給率の向上と水田機能保持という二つの課題に応えうる成果が期待されることから、多くの取り組みがなされてきている<sup>18)</sup>。近年は、水稻をホールクロップサイレージ（イネホールクロップサイレージ）としてウシに給与することを目的とした多収性の飼料用イネ専用品種の開発もおこなわれ<sup>5, 14, 19, 25, 31)</sup>、ロールバールラップサイレージとする収穫調製体系<sup>33, 34)</sup>や、TMR中の輸入乾草をイネホールクロップサイレージと代替して搾乳牛へ給与する技術も検討されている<sup>6, 8, 29, 37)</sup>。しかし、飼料設計時の基礎となるイネホールクロップサイレージの可消化養分総量（TDN）および代謝エネルギー価（ME 価）といった栄養価や、咀嚼時間といった物理性を示す飼料特性についてウシを用いて検討した報告は松山ら<sup>15, 16)</sup>の報告に限られ、さらに同時にルーメン液性状についても検討した報告はない。また、ウシとヤギやヒツジとでは飼料の利用性が必ずしも同程度ではなく<sup>38, 35)</sup>、イネホールクロップサイレージを給与したウシにおいては糞に粉が散見される<sup>15, 16, 29, 37, 38)</sup>などのことから、ウシを用いて評価したデータの蓄積が必要と考えられる。そこで、本研究では熟期、品種および収穫時切断長の異なる飼料専用イネの発酵品質、ウシでの栄養価、粗飼料価指数および第一胃内発酵について比較検討した。

## 材料および方法

### 供試動物、供試飼料および物質出納試験

#### 実験1（熟期の影響について）

供試動物は、フィステルを装着したホルスタイン種非妊娠未経産牛3頭（平均体重624kg）を用いた。供試したイネホールクロップサイレージは、2005年に埼玉県下の農家の同一水田において慣行的に栽培したイネ「はまさり」<sup>19)</sup>であり（6月下旬移植、9月17日出穂）、これを9月28日（乳熟期、出穂後11日）、10月6日（糊熟期、出穂後19日）および10月19日（黄熟期、出穂後32日）にフレール型専用収穫機（YWH1400、ヤンマー農機、大阪）で刈り取り、乳酸菌製剤の畜草1号（雪印種苗、北海道）を原物1トンあたり5g相当量を噴霧しながらロールバールに梱包し、ラップしてロールバールサイレージに調製したものである。調製後約8ヶ月後に開封、フォーレージハーベスターに投入・細切混合し、乳熟期、糊熟期、黄熟期およびこれらを混合した

4種類のサイレージを一食ごとにビニール袋に小分け、脱気した後に5℃以下の冷蔵庫内に給与するまで保管した。馴致期間として2週間は、乳熟期、糊熟期および黄熟期のイネサイレージを混合した飼料を給与した後、予備期9日、本試験期5日間の計14日間を1期とする3×3のラテン方格法に従って飼料を給与した。3つの処理区は乳熟区（MILK）、糊熟区（DOUGH）および黄熟区（YELLOW）とした。給与に際しては、給与飼料の粗タンパク質（CP）含量が12%程度になるよう大豆粕を併給した。

#### 実験2（品種の影響について）

供試牛は、実験1と同個体3頭に同様なフィステル装着未経産牛1頭を加えた4頭（平均体重613kg）を用いた。供試飼料は、2004年に中央農業研究センター谷和原水田圃場において栽培した、玄米千粒重の異なるイネ4品種、「はまさり」（玄米千粒重：19g）<sup>19)</sup>、「クサホナミ」（20g）<sup>25)</sup>、「ホシアオバ」（29g）<sup>14)</sup>、「クサユタカ」（35g）<sup>31)</sup>を選定した。移植・播種日は、5月28日（はまさり、ロングマット）、4月28日（クサホナミ、ロングマット）、4月12日（ホシアオバ、乾田直播）および5月28日（クサユタカ、ロングマット）であり、出穂日は9月5日（はまさり）、8月21日（クサホナミ）、8月5日（ホシアオバ）および8月10日（クサユタカ）であった。収穫日はいずれも黄熟期とし、10月6日（はまさり、出穂後31日）、9月22日（クサホナミ、出穂後32日）、9月9日（ホシアオバ、出穂後35日）および9月14日（クサユタカ、出穂後35日）であった。収穫は、コンバイン型専用収穫機（WB1000、タカキタ、三重）を用い、実験1と同様に「畜草1号」を添加してロールバールサイレージに調製した。調製後約8ヵ月後に開封し、フォーレージハーベスターで細切・混合した後、4品種をそれぞれ一食ごとにビニール袋に小分けし、実験1と同様に保管した。14日間の馴致期間で「はまさり」を給与した後、予備期9日、本試験期5日間の計14日間を1期とする4×4のラテン方格法に従って飼料を給与した。それぞれの品種のサイレージをひとつの給与区に設定し（はまさり区、クサホナミ区、ホシアオバ区、クサユタカ区）、尿素でCP含量を調製して給与した。

#### 実験3（切断長の影響について）

実験2と同じウシを4頭（平均体重600kg）用いた。供試飼料として、中央農業研究センター谷和原水田圃場において2007年に栽培したイネ「モミロマン」（5月

14日移植，8月13日出穂）を，9月19日（黄熟期，出穂後37日）にコンバイン型専用収穫機あるいは細断型ホールクロップ収穫機（タカキタ，三重）で刈り取り，ラップしてロールベールサイレージに調製した。約6ヶ月後に開封，ロールベールを展開し，それぞれの収穫機で調製したサイレージを一食ごとにビニール袋に小分け，脱気した後に5℃以下の冷蔵庫内に給与するまで保管した。コンバイン型専用収穫機（設定切断長12cm）で調製したサイレージを長切区（LONG），細断型ホールクロップ収穫機で設定切断長1.5cmに細切したものを短切区（SHORT）とし，4日間の馴致期間では，毎日両区（朝；長切区，夕；短切区）の飼料を給与した後，予備期9日，本試験期5日間の計14日間を1期とするクロスオーバー法に従って給与した。CP含量の調製には実験2と同様尿素を用いた。なお尿素への馴致は3週間ほど行った。

全ての実験で，動物は温度20℃，相対湿度60%に保った環境調節室に収容して，飼料は午前10時と午後4時に2回に分けて給与，水は自由摂取とした。実験1においては鉍塩も自由摂取とした。給与水準は，実験1から3までいずれも維持量程度<sup>22)</sup>とした。本試験では全糞尿採取による消化試験と開放型呼吸試験装置<sup>10)</sup>による呼吸試験を実施した。また本試験中3日間連続でビデオカメラにより咀嚼行動を記録し，採食時間および反すう時間を計測した。本試験最終日にはルーメン液を朝の飼料給与直前および3時間後に，ステンレス製胃カテーテル（ルミナー；富士平工業，東京）により約300ml採取した。この報告における全ての動物実験は，「独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所動物実験実施に関する要領」に基づいて実施した。

#### 化学分析・統計処理

サイレージ抽出液は，サイレージ新鮮サンプル50gを蒸留水300mlに一晩浸漬し，4重ガーゼで濾過したものをを用い，pH，乳酸，揮発性脂肪酸（VFA），揮発性塩基態窒素（VBN）を測定した。pHはガラス電極で測定した。乳酸は市販のキット（Fキット，D-乳酸/L-乳酸，J.K. インターナショナル，東京），VFAはガスクロマトグラフィー法<sup>7)</sup>，VBNは水蒸気蒸留法<sup>7)</sup>で分析した。供試飼料ならびに糞の一般成分は常法<sup>7)</sup>により，デンプンは阿部（1988）の方法<sup>1)</sup>で測定した。但し，サイレージと糞の窒素含量は新鮮試料を用いてケルダール法<sup>7)</sup>にて測定した。胃液は採取直後に4重ガーゼでろ過，pHを測定した後，分析まで-30℃で保存した。胃液のVFA

はサイレージ抽出液と同様の方法で分析した。熱量は，飼料および糞については通風乾燥後粉碎し，尿については助燃剤を兼ねたポリエチレンフィルム容器内で凍結乾燥し<sup>9)</sup>，燃研式熱量計（CA-4PJ，島津製作所）で測定した。得られたデータについては，実験1および2ではラテン方格法に従って，実験3ではクロスオーバー法に従ってSAS<sup>26)</sup>のGLMプロシージャーで分散分析をおこない，飼料給与の影響を検定，危険率5%以下を有意，10%以下を傾向ありとした。但し，胃液性状についてはSASのMIXEDプロシージャーで混合モデルとして解析をおこない，飼料給与の影響を検定した。実験1および2において飼料給与により有意な差があった場合，さらにTukeyの多重検定を実施し，処理区間の差を検定した。

## 結 果

#### 供試サイレージの化学成分組成

表1に供試サイレージの化学組成を示した。実験1のサイレージ群では，刈り取り時期の天候の影響を受け，とくに糊熟期および黄熟期サイレージの水分は高くなった。また，登熟に伴い非繊維性炭水化物（NFC）およびデンプン含量が増加し，中性デタージェント繊維（NDF）含量は低下した。実験2のサイレージ群でも，「はまさり」は刈り取り時期の天候の影響を受け，水分が高くなった。NFCおよびデンプン含量は，「ホシアオバ」と「クサユタカ」が高く，次に「クサホナミ」，「はまさり」の順であった。一方，NDF含量は，「はまさり」と「クサホナミ」が，「ホシアオバ」と「クサユタカ」に比べて高い値となった。実験3のサイレージ群は，原料草が同一であるために化学成分に差は無かった。これらのサイレージを用いて設計した飼料の組成，および化学成分を表3に示した。

#### イネホールクロップサイレージの発酵品質

供試サイレージの発酵品質を表2に示した。実験1では，サイレージはいずれもpHはほぼ4.0まで低下し，乳酸含有率も1.0～1.3%あり，乳熟期は若干他よりも高めであるが揮発性塩基態窒素濃度（VBN/TN比）も低かったため，V-SCORE<sup>11,32)</sup>も良と判定され，良好な発酵であったことが示された。実験2では，いずれのサイレージもpHは4.2程度にまで低下した。はまさりを除き，実験1には及ばないが乳酸含有率も0.5～0.7%あり，V-SCOREも良と判定され，良好な発酵を示し

Table 1. Chemical composition of whole crop rice silages

Item	Experiment 1			Experiment 2				Experiment 3	
	Milk ripe stage	Dough ripe stage	Yellow ripe stage	Hamasari	Kusahonami	Hoshiaoba	Kusayutaka	Long	Short
DM, %	26.0	23.6	29.1	27.5	39.4	35.5	40.4	32.3	31.4
OM, %DM	83.2	83.1	83.9	81.4	85.4	84.1	82.3	86.8	85.9
CP	8.8	8.8	8.3	5.6	4.8	5.9	5.0	8.0	8.2
NFC	15.8	18.4	28.6	22.5	25.2	29.9	29.0	25.9	25.2
Starch	7.2	11.1	17.1	13.2	16.0	18.4	17.6	16.3	15.9
EE	3.3	3.3	3.0	2.6	2.5	2.7	2.3	3.0	3.0
NDF	55.3	52.6	44.0	50.7	52.9	45.5	46.1	49.9	49.6
ADF	36.4	34.4	29.5	33.1	32.4	29.9	29.0	32.6	31.3
CA	16.9	17.0	16.1	18.6	14.6	15.9	17.7	13.2	14.1
Gross energy, Mcal/kgDM	4.05	4.05	4.01	3.82	3.93	3.90	3.75	4.15	4.10

In the experiment 1, rice plant "Hamasari" was harvested and ensiled at each stages. In the experiment 2, rice plant "Hamasari", "Kusahonami", "Hoshiaoba" and "Kusayutaka" were harvested at yellow ripeness and ensiled. In the experiment 3, rice plant "Momiroman" was harvested by combined type harvester (Long) or round baler for chopped material (Short) and ensiled. DM, dry matter. OM, organic matter. CP, crude protein. NFC, nonfibrous carbohydrates. EE, ether extracts. NDF, neutral detergent fiber. ADF, acid detergent fiber. CA, crude ash.

Table 2. Fermentation characteristics of whole crop rice silages

	pH	Organic acid composition, %Fresh matter				VBN/TN, %	V-SCORE
		Lactic acid	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid		
Experiment 1 (comparison of ripeness stages)							
Milk ripeness	4.0	1.3	0.5	0.0	0.1	8.2	83
Dough ripeness	3.9	1.1	0.5	0.0	0.0	6.5	91
Yellow ripeness	4.1	1.0	0.5	0.0	0.0	6.2	95
Experiment 2 (comparison of varieties)							
Hamasari	4.3	0.2	0.7	0.1	0.3	9.5	61
Kusahonami	4.2	0.5	0.6	0.0	0.0	5.4	94
Hoshiaoba	4.3	0.5	0.6	0.0	0.1	5.6	90
Kusayutaka	4.2	0.7	0.5	0.0	0.0	4.0	95
Experiment 3 (comparison of cutting length)							
Long	4.8	0.3	0.7	0.1	0.2	2.5	78
Short	4.5	0.6	0.6	0.1	0.4	2.6	61

In the experiment 1, rice plant "Hamasari" was harvested and ensiled at each stages. In the experiment 2, rice plant "Hamasari", "Kusahonami", "Hoshiaoba" and "Kusayutaka" were harvested at yellow ripeness and ensiled. In the experiment 3, rice plant "Momiroman" was harvested by combined type harvester (Long) or round baler for chopped material (Short) and ensiled. VBN/TN, volatile basic nitrogen/total nitrogen.

た。はまさりでは、乳酸含有率が0.2%程度であり、酪酸も検出され、さらにVBN/TN比も若干高めであったため、V-SCOREでは低い評価となった。実験3では、pHは4.8および4.5と他の実験と比べて高い水準にあり、長切サイレージでは乳酸含有量は0.3%であった。また、両サイレージとも酪酸が検出されたが、VBN/TN比は低かったため、V-SCOREでは可の評価であった。

#### 実験1

体重、乾物摂取量 (DMI)、消化率ならびにエネルギー

代謝を表4に示した。体重には処理区間の差が認められた。またDMIが乳熟区で有意に多くなっているが、これは給与量が多くなったためである。体重に処理区間差が認められたのは、乳熟区の乾物給与量が多くなってしまったことと、原物給与量が乳熟区(約34kg/day)および糊熟区(約33kg/day)が黄熟区(約27kg/day)よりも多かったためと考えられた。乾物(DM)、有機物(OM)およびデンプンの消化率には処理区間の差はなかったが、NFCの消化率は乳熟区が有意に低くなった。一方、NDFおよび酸性デタージェント繊維



Table 3. Ingredients and chemical composition of the diets

Item	Experiment 1			Experiment 2				Experiment 3	
	MILK	DOUGH	YELLOW	HAMASARI	KUSAHONAMI	HOSHIAOBA	KUSAYUTAKA	LONG	SHORT
Ingredient composition, %DM									
Whole crop rice silage	93.5	92.2	91.0	97.5	97.5	97.5	97.5	96.9	97.0
Soybean meal	6.6	7.9	9.1						
Urea				1.8	1.8	1.8	1.8	1.2	1.0
Mineral mix				0.8	0.8	0.8	0.8	2.0	2.0
Chemical composition, %DM									
OM	83.8	83.9	84.8	81.2	85.0	83.7	82.0	85.2	84.4
CP	11.6	12.2	12.3	10.4	9.7	10.8	9.8	11.1	10.9
NFC	16.1	18.6	27.9	22.0	24.6	29.2	28.3	25.1	24.4
Starch	6.8	10.3	15.6	12.8	15.6	17.9	17.2	15.7	15.4
EE	3.3	3.3	3.0	2.6	2.4	2.6	2.2	2.9	2.9
NDF	52.8	49.8	41.6	49.5	51.6	44.4	44.9	48.3	48.1
ADF	34.7	32.5	27.7	32.3	31.6	29.2	28.3	31.5	30.3
CA	16.2	16.1	15.2	18.8	15.0	16.3	18.0	14.8	15.6
Gross energy, Mcal/kgDM	4.1	4.1	4.1	3.8	3.9	3.8	3.7	4.0	4.0

In the experiment 1, MILK, DOUGH and YELLOW represent the experimental diets composed by whole crop rice silages harvested at milk ripeness, dough ripeness and yellow ripeness, respectively. In the experiment 2, HAMASARI, KUSAHONAMI, HOSHIAOBA and KUSAYUTAKA represent the experimental diets composed by the varieties of whole crop rice silages harvested at yellow ripeness. In the experiment 3, LONG and SHORT represent the experimental diets composed by the whole crop rice silages ensiled by combined type harvester and round baler for chopped material, respectively. DM, dry matter. OM, organic matter. CP, crude protein. NFC, nonfibrous carbohydrates. EE, ether extracts. NDF, neutral detergent fiber. ADF, acid detergent fiber. CA, crude ash.

(ADF) の消化率は、登熟に伴い低くなる傾向が認められた。DMI の増加に伴って、総エネルギー (GE) 摂取量も乳熟区が有意に多くなった。その他のエネルギー配分率および利用効率には区間の差は認められなかったが、熱増加 (HI)<sup>13)</sup> は乳熟区が高い値を示した。ルーメン液性状および咀嚼時間を表 5 に示した。pH、アンモニア態窒素および総 VFA 濃度には差は認められなかったが、酢酸：プロピオン酸比は黄熟区で高い値を示した。咀嚼活動では、乾物摂取量あたりの咀嚼時間は乳熟区で最も長くなったが、NDF 摂取量あたりの咀嚼時間には区間の差は認められなかった。大豆粕の可消化養分総量 (TDN) を 86.8%、可消化エネルギー (DE) 値ならびに代謝エネルギー (ME) 値をそれぞれ 3.83、3.34 Mcal/kgDM とし<sup>22)</sup> 試験飼料から差し引いて求めたイネホールクroppサイレージの可消化養分含量および飼料の栄養価を表 6 に示した。可消化 OM 含量 (DOM) および可消化 CP (DCP) 含量には処理区間の差はなかった。登熟に伴い、可消化 NFC 含量 (DNFC) は増加し、可消化 NDF 含量は (DNDF) 減少した。TDN、DE 値および ME 値には区間の差は認められなかった。

## 実験 2

体重、DMI、消化率ならびにエネルギー代謝を表 7

に示した。体重および乾物摂取量には処理間の差はなかった。はまさり区の DM、OM およびデンプンの消化率は、他の品種に比べて有意に低かった。NFC の消化率は、ホシアオバ区とクサユタカ区が最も高く、次にクサホナミ区で、はまさり区は最も低かった。一方、繊維の消化率には処理間の有意な差は認められなかった。DMI には区間の差はなかったが、はまさり区の GE 摂取量はクサホナミ区に対して有意に低く、糞エネルギー (FE) への配分率は最も高かった。維持へのエネルギー利用効率 (km)、HI および維持への代謝エネルギー要求量 (ME<sub>m</sub>) には区間の差はなかった。ルーメン液の pH、アンモニア態窒素および総 VFA 濃度には区間の差は認められなかった (表 8)。酢酸と酪酸モル比率には処理区間の差は認められなかったが、プロピオン酸のモル比率はクサユタカ区で最も高くなり、従って、酢酸：プロピオン酸比はクサユタカ区が最も低い値となった。DMI あたりの咀嚼時間ははまさり区が最も長かったが (表 8)、NDF 摂取量あたりの咀嚼時間で見た場合、クサホナミ区が他に比べて有意に短くなった。可消化の養分含量について (表 9)、DOM ははまさり区が低い値となり、DNFC はホシアオバ区とクサユタカ区が最も高く、次にクサホナミ区が高い値となった。DNDF はクサホナミ区が高い値であった。TDN、DE および ME は、

**Table 4. Dry matter intake(DMI), digestibilities and energy metabolism in cows fed whole crop rice silage diets in experiment 1**

Item	Diets			SEM	Significance
	MILK	DOUGH	YELLOW		
Body weight, kg	637a	623b	613c	1	0.01
DMI, kg/day	9.25a	8.33b	8.23b	0.06	0.05
Digestibility, %					
DM	48.6	50.6	53.1	1.2	NS
OM	56.1	58.2	59.5	0.9	NS
CP	67.2	67.1	65.8	0.6	NS
NFC	78.4b	84.0a	86.5a	0.6	0.05
Starch	90.5	89.6	89.0	2.9	NS
EE	63.4	63.9	66.0	0.9	NS
NDF	46.2	45.3	38.8	1.3	0.10
ADF	48.7	47.0	43.2	0.9	0.10
GE, Mcal/day	37.9a	34.2b	33.5b	0.3	0.05
FE, %GE	45.1	43.1	41.5	0.9	NS
UE, %GE	4.4	4.0	3.8	0.1	NS
Methane, %GE	6.7	7.0	7.5	0.2	NS
HP, %GE	43.7	72.9	42.5	1.0	NS
RE, Mcal/day	0.0	3.1	4.8	0.4	NS
DE/GE	0.55	0.57	0.59	0.01	NS
ME/GE	0.44	0.46	0.47	0.01	NS
km	0.610	0.703	0.725	0.021	NS
HI, Kcal/kgBW <sup>0.75</sup> /day	53.1a	40.0ab	38.0b	1.9	0.05
ME <sub>m</sub> , kcal/kgBM <sup>0.75</sup> /day	132.1	114.2	110.7	4.4	NS

MILK, DOUGH and YELLOW represent the experimental diets composed by whole crop rice silages harvested at milk ripeness, dough ripeness and yellow ripeness, respectively. DM, dry matter. OM, organic matter. CP, crude protein. NFC, nonfibrous carbohydrates. EE, ether extracts. NDF, neutral detergent fiber. ADF, acid detergent fiber. GE, gross energy. FE, fecal energy. UE, urinary energy. HP, heat production. RE, retained energy. DE, digestible energy. ME, metabolisable energy. km, ME availability for maintenance energy. HI, heat increment (HI=HP-77.7kcal/kg metabolic body weight/day), ME<sub>m</sub>, metabolisable energy requirement for maintenance. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

いずれもはまさり区が低い値となった。

### 実験3

体重およびDMIに処理区間の差はなかった(表10)。またCPおよび粗脂肪(EE)を除いて飼料の消化率、

**Table 5. Ruminal liquor pH, volatile fatty acid (VFA) composition and chewing activities in cows fed whole crop rice silage diets in experiment 1**

Item	Diets			SEM	Significance
	MILK	DOUGH	YELLOW		
pH	6.7	6.8	6.7	0.1	NS
Ammonia-N, mg/100ml	11.8	12.9	9.6	0.9	NS
Total VFA, mmol/L	85.3	84.0	84.2	4.3	NS
Acetate, mol/100mol	64.1b	66.9a	67.1a	0.4	0.05
Propionate, mol/100mol	20.7a	19.9a	17.1b	0.4	0.01
Butyrate, mol/100mol	12.1a	10.2b	13.1a	0.4	0.01
Acetate:propionate	3.1b	3.4b	3.9a	0.1	0.01
Eating time, min/kgDMI	31	13	10	3	0.10
Rumination time, min/kgDMI	58	56	46	2	0.10
Total chewing time, min/kgDMI	90a	69ab	56b	3	0.05
Eating time, min/kgNDFI	60	26	24	6	0.10
Rumination time, min/kgNDFI	111	114	113	4	NS
Total chewing time, min/kgNDFI	171	140	137	8	NS

MILK, DOUGH and YELLOW represent the experimental diets composed by whole crop rice silages harvested at milk ripeness, dough ripeness and yellow ripeness, respectively. DMI, dry matter intake. NDFI, neutral detergent fiber intake. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

**Table 6. Digestible nutrient contents and nutritive values of 3 different stage of whole crop rice silage in experiment 1**

Item	Milk ripe stage	Dough ripe stage	Yellow ripe stage	SEM	Significance
Digestible nutrient contents, %					
DOM	47.1	48.7	50.7	0.9	NS
DCP	7.7	8.3	8.1	0.3	NS
DNFC	12.8b	15.5ab	25.1a	1.2	0.05
DNDF	24.4a	22.4a	16.0b	0.5	0.05
TDN	46.8	47.9	50.0	1.2	NS
DE, Mcal/kgDM	2.13	2.20	2.25	0.05	NS
ME, Mcal/kgDM	1.68	1.75	1.80	0.06	NS

Rice plant "Hamasari" was harvested and ensiled at milk, dough and yellow ripe stage. DOM, digestible organic matter. DCP, digestible crude protein. DNFC, digestible neutral detergent fiber. TDN, total digestible nutrients. DE, digestible energy. ME, metabolisable energy. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

エネルギー配分およびエネルギーの利用効率には差は認められなかった。ルーメン液性状については、長切区の酢酸モル比率が有意に高かったことを除き、いずれも処理区間の差はなかった(表11)。また、DMあるいはNDF摂取量あたりの咀嚼時間いずれについても処理区

**Table 7. Dry matter intake (DMI), digestibilities and energy metabolism in cows fed diets composed by the varieties of whole crop rice silages in experiment 2**

Item	Diets				SEM	Significance
	HAMASARI	KUSAHONAMI	HOSHIAOBA	KUSAYUTAKA		
Body weight, kg	616	612	611	615	2	NS
DMI, kg/day	7.55	7.75	7.75	7.74	0.09	NS
Digestibility, %						
DM	48.0b	54.2a	55.7a	53.0a	1.0	0.01
OM	54.8b	59.6a	61.6a	61.2a	0.9	0.01
CP	67.9	68.6	70.0	69.7	0.6	NS
NFC	86.4c	89.7b	93.2a	93.5a	0.4	0.01
Starch	93.4b	95.2a	96.2a	96.8a	0.4	0.01
EE	59.2b	61.0b	65.6a	57.1b	0.9	0.01
NDF	42.3	47.5	42.9	43.6	1.4	NS
ADF	45.6	48.9	46.9	42.5	3.4	NS
GE, Mcal/day	28.5b	30.1a	29.8ab	28.6ab	0.3	0.05
FE, %GE	46.8a	42.7ab	40.2b	40.7b	0.9	0.10
UE, %GE	3.3	3.2	3.3	3.2	0.1	NS
Methane, %GE	7.8	8.5	8.8	8.9	0.2	0.10
HP, %GE	52.5	48.3	50.8	50.9	1.0	NS
RE, Mcal/day	-2.9b	-0.8a	-0.9a	-1.1ab	0.4	0.05
DE/GE	0.53b	0.57ab	0.60a	0.59ab	0.01	0.01
ME/GE	0.42b	0.46ab	0.48a	0.47ab	0.01	0.01
km	0.584	0.660	0.628	0.653	0.021	NS
HI, Kcal/kgBW <sup>0.75</sup> /day	42.9	40.4	45.5	40.6	1.9	NS
ME <sub>m</sub> , kcal/kgBW <sup>0.75</sup> /day	138.8	122.2	127.9	123.1	4.4	NS

HAMASARI, KUSAHONAMI, HOSHIAOBA and KUSAYUTAKA represent the experimental diets composed by the varieties of whole crop rice silages harvested at yellow ripeness. DM, dry matter. OM, organic matter. CP, crude protein. NFC, nonfibrous carbohydrates. EE, ether extracts. NDF, neutral detergent fiber. ADF, acid detergent fiber. GE, gross energy. FE, fecal energy. UE, urinary energy. HP, heat production. RE, retained energy. DE, digestible energy. ME, metabolisable energy. km, ME availability for maintenance energy. HI, heat increment (HI=HP-77.7 kcal/kg metabolic body weight/day), ME<sub>m</sub>, metabolisable energy requirement for maintenance. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

**Table 8. Ruminal liquor pH, volatile fatty acid (VFA) composition and chewing activities of cows fed diets composed by the varieties of whole crop rice silage in experiment 2**

Item	Diets				SEM	Significance
	HAMASARI	KUSAHONAMI	HOSHIAOBA	KUSAYUTAKA		
pH	6.9	6.9	6.9	6.9	0.1	NS
Ammonia-N, mg/100ml	11.9	12.5	11.0	11.5	1.0	NS
Total VFA, mmol/L	78.0	80.5	79.1	78.9	3.9	NS
Acetate, mol/100mol	72.0	71.6	71.8	70.6	0.4	NS
Propionate, mol/100mol	15.1b	15.4ab	15.0b	16.4a	0.2	0.05
Butyrate, mol/100mol	9.4	9.1	9.0	9.5	0.3	NS
Acetate : propionate	4.9a	4.7ab	4.8a	4.3b	0.1	0.05
Eating time, min/kgDMI	25a	17b	16b	18b	1	0.01
Rumination time, min/kgDMI	70a	62b	63b	62b	1	0.01
Total chewing time, min/kgDMI	95a	79b	79b	80b	1	0.01
Eating time, min/kgNDFI	52a	33b	35b	40ab	3	0.05
Rumination time, min/kgNDFI	142a	121b	142a	138a	2	0.01
Total chewing time, min/kgNDFI	194a	153b	177a	179a	4	0.01

HAMASARI, KUSAHONAMI, HOSHIAOBA and KUSAYUTAKA represent the experimental diets composed by the varieties of whole crop rice silages harvested at yellow ripeness. DMI, dry matter intake. NDFI, neutral detergent fiber intake. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

Table 9. Digestible nutrient contents and nutritive values of 4 varieties of whole crop rice silage in experiment 2

Item	Hamasari	Kusahonami	Hoshiaoba	Kusayutaka	SEM	Significance
Digestible nutrient contents, %						
DOM	45.3b	51.4a	52.3a	50.9a	0.8	0.01
DCP	7.1b	6.7c	7.6a	6.9bc	0.1	0.01
DNFC	15.8c	18.7b	23.9a	23.1a	0.6	0.01
DNDF	20.8b	24.5a	19.1b	19.6b	0.7	0.01
TDN	47.2b	53.3a	54.4a	52.5a	0.8	0.01
DE, Mcal/kgDM	2.01b	2.24a	2.31a	2.21ab	0.04	0.01
ME, Mcal/kgDM	1.58b	1.77a	1.84a	1.74ab	0.03	0.01

Rice plant "Hamasari", "Kusahonami", "Hoshiaoba", and "Kusayutaka" were harvested and ensiled at yellow ripe stage. DOM, digestible organic matter. DCP, digestible crude protein. DNFC, digestible neutral detergent fiber. TDN, total digestible nutrients. DE, digestible energy. ME, metabolisable energy. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

Table 10. Dry matter intake (DMI), digestibilities and energy metabolism in cows fed 2 different cutting length of whole crop rice

Item	Diets		SEM	Significance
	LONG	SHORT		
Body weight, kg	600	602	1	NS
DMI, kg/day	8.67	9.01	0.25	NS
Digestibility, %				
DM	54.7	53.1	1.1	NS
OM	60.3	58.7	1.0	NS
CP	67.1	63.3	0.9	0.10
NFC	90.6	89.4	0.4	NS
Starch	97.0	96.4	0.4	NS
EE	66.1	63.2	0.2	0.01
NDF	44.0	43.6	1.9	NS
ADF	45.1	43.1	2.4	NS
GE, Mcal/day	35.0	35.8	0.9	NS
FE, %GE	41.9	43.5	0.9	NS
UE, %GE	3.9	3.7	0.1	NS
Methane, %GE	6.7	7.0	0.3	NS
HP, %GE	41.8	42.8	0.4	NS
RE, Mcal/day	5.9	3.1	1.2	NS
DE/GE	0.58	0.57	0.01	NS
ME/GE	0.48	0.46	0.01	NS
km	0.707	0.658	0.013	NS
HI, Kcal/kgBW <sup>0.75</sup> /day	43.8	48.5	2.2	NS
ME <sub>m</sub> , kcal/kgBW <sup>0.75</sup> /day	115.2	123.0	2.4	NS

LONG and SHORT represent the experimental diets composed by the whole crop rice silages ensiled by combined type harvester and round baler for chopped material, respectively. OM, organic matter. CP, crude protein. NFC, nonfibrous carbohydrates. EE, ether extracts. NDF, neutral detergent fiber. ADF, acid detergent fiber. GE, gross energy. FE, fecal energy. UE, urinary energy. HP, heat production. RE, retained energy. DE, digestible energy. ME, metabolisable energy. km, ME availability for maintenance energy. HI, heat increment (HI=HP-77.7 kcal/kg metabolic body weight/day), ME<sub>m</sub>, metabolisable energy requirement for maintenance. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

Table 11. Ruminal liquor pH, volatile fatty acid (VFA) composition and chewing activities in cows fed 2 different cutting length of whole crop rice silage diets in experiment 3

Item	Diets		SEM	Significance
	LONG	SHORT		
pH	6.9	7.0	0.1	NS
Ammonia-N, mg/100ml	12.4	13.3	1.1	NS
Total VFA, mmol/L	79.8	79.9	3.2	NS
Acetate, mol/100mol	72.4	70.7	1.1	0.05
Propionate, mol/100mol	15.8	16.6	1.1	NS
Butyrate, mol/100mol	9.4	10.1	0.3	NS
Acetate : propionate	4.7	4.4	0.4	NS
Eating time, min/kgDMI	18	12	3	NS
Rumination time, min/kgDMI	54	55	4	NS
Total chewing time, min/kgDMI	72	67	7	NS
Eating time, min/kgNDFI	38	24	7	NS
Rumination time, min/kgNDFI	114	115	10	NS
Total chewing time, min/kgNDFI	151	139	17	NS

LONG and SHORT represent the experimental diets composed by the whole crop rice silages ensiled by combined type harvester and round baler for chopped material, respectively. DMI, dry matter intake. NDFI, neutral detergent fiber intake. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

間の差はなかった。長切区の DNFC が有意に高くなったことを除き、可消化養分含量および飼料のエネルギー価に処理区間の差は認められなかった (表 12)。

## 考察

一般にイネホールクroppサイレージは、茎が中空のため空気の残存率が高く好気性微生物が増殖しやすい可能性があること<sup>2,3)</sup>、付着乳酸菌数および乳酸発酵基質である可溶性糖類が少ないこと<sup>24)</sup>、さらに水分含量

**Table 12. Digestible nutrient contents and nutritive values of 2 different cutting length of whole crop rice silage in experiment 3**

Item	Long	Short	SEM	Significance
Digestible nutrient contents, %				
DOM	51.4	49.6	0.8	NS
DCP	7.4	6.9	0.1	0.10
DNFC	22.7	21.8	0.1	0.05
DNDF	21.3	21.0	0.9	NS
TDN	53.8	51.9	0.9	NS
DE, Mcal/gDM	2.43	2.32	0.03	NS
ME, Mcal/kgDM	1.99	1.88	0.03	NS

Long and Short represent the whole crop rice silages ensiled by combined type harvester and round baler for chopped material, respectively. DOM, digestible organic matter. DCP, digestible crude protein. DNFC, digestible neutral detergent fiber. TDN, total digestible nutrients. DE, digestible energy. ME, metabolisable energy. SEM, standard error of means. NS, not significant. Means within rows with different letters are significantly different.

が高い場合には酪酸菌の活性が高まる可能性があること<sup>20)</sup>から、乳酸含量が低く、酢酸や酪酸含量の高い低質サイレージになる可能性が高いと考えられている。一方、イネホールクroppサイレージへ乳酸菌製剤である畜草1号を添加すると、乳酸菌の旺盛な増殖により酪酸菌やその他の有害微生物の増殖を抑えるとともに、長期にわたって乳酸発酵を行うため良好な発酵品質となることが示されている<sup>24)</sup>。

本研究では実験1および実験2のイネについては畜草1号を添加した。実験1のイネは刈り取り時期および天候の影響で水分含量が70%以上の高水分サイレージとなったにもかかわらず、pHは4程度、乳酸含量は1%以上あり、酪酸はほとんど検出されないなど、良好な発酵品質であるといえた。これは、蔡ら<sup>24)</sup>の報告にある、本実験と同じくフレール型収穫機で収穫調製し、畜草1号を添加した「はまさり」の発酵品質と類似していた。実験2のイネは、天候の影響を受け高水分となった「はまさり」を除いて、水分含量が60～64%程度で比較的適正<sup>20)</sup>であったことから、乳酸含量は0.5～0.7%程度、酪酸はほとんど検出されず、実験1と同様に良好な発酵品質であるといえた。河本ら<sup>12)</sup>の報告によると、実験2と同様にコンバイン型収穫機で収穫調製したイネに、畜草1号を添加しなかった場合、サイレージの水分含量は本実験とほぼ同等にもかかわらずpHは5.7と高い水準にあったことから、本実験においても畜草1号がイネの発酵品質を高めたものと推察された。実験3では、実験1および2に比べて、サイレージのpHは若干高い水準であり、酪酸も検出されたことから、発酵品

質は若干低くなった。河本ら<sup>12)</sup>の報告によると、水分58%程度のイネを細断型収穫機で収穫調製したサイレージはpH4、乳酸含量は約2%で酪酸は検出されないなど、コンバイン型収穫機で収穫調製したものに比べて発酵品質が良好であるとされる。しかし本実験では、細断型収穫機でイネが細切されたことによる大幅な発酵品質の向上は見られず、これは供試イネの水分含量が約68%と河本ら<sup>12)</sup>の報告と比べて比較的高水分であったことが影響したと推察された。

実験1のサイレージ群は、登熟に伴いNFCおよびデンプン含量が増加し、NDF含量は低下したことから、登熟に伴う典型的な草型の変化を反映するものであると考えられた。実験2のサイレージ群では、NFCおよびデンプン含量は、「ホシアオバ」と「クサユタカ」が高く、次に「クサホナミ」、「はまさり」の順であった。本実験に用いた品種では、「はまさり」、「クサホナミ」、「ホシアオバ」、「クサユタカ」の順に千粒粗重量が小さいが、穂比率では「ホシアオバ」が一番高かったため、NFCおよびデンプン含量は「ホシアオバ」と「クサホナミ」でほぼ同水準となった。一方、NDF含量は、「はまさり」と「クサホナミ」の2品種が、「ホシアオバ」と「クサユタカ」に比べて高い値となった。なお、実験2の「はまさり」のNFC、デンプンおよびNDF含量は、実験1の糊熟期と黄熟期の中間程度の値であること、デンプン含量も松山ら<sup>15,16)</sup>の報告にある黄熟期の「はまさり」より低めであることから、実験2の「はまさり」の生育は十分ではなかったかあるいは遅れた可能性が考えられた。実験3のサイレージ群は、原料草が同一であるために化学成分に差は無かった。供試イネホールクroppサイレージを日本標準飼料成分表(2001)<sup>21)</sup>のイネサイレージと比較すると、実験2のサイレージは粗タンパク質(CP)含量が低く、実験1および2のサイレージは灰分含量が高かった。NDFの含量については、実験1の黄熟期刈り取りのサイレージは低い値であった。灰分含量の高さはそのままTDN含量に負として作用するため好ましくないが、いずれの実験に用いたサイレージもおおよそ成分表に示されたものと同程度であったことから、供試したイネホールクroppサイレージは一般的なイネホールクroppサイレージとほぼ同等のものと考えてよいと思われた。

登熟に伴うNFC消化率の増加と繊維成分の消化率低下は、ヒツジを用いて報告された試験結果と同様であった<sup>18)</sup>。ウシを用いた試験<sup>15)</sup>では登熟に伴う消化率の差異は検出されていないが、本実験においては、NFCの

消化率は乳熟期がその他の熟期よりも有意に低いことが認められた。箭原ら<sup>36)</sup>も乳熟期のイネにおいて栄養素消化率の大きな低下がおこることを報告しており、これは乳熟期における茎葉のADFと粗ケイ酸の含量増加によると考察している。本報告における乳熟期のNFC消化率の低下原因は明らかではないが、穂部に多く含まれるデンプンの消化率には熟期による差は認められなかったので、主に茎葉の利用性が影響したものと考えられた。品種間の比較では、はまさり区でDMおよびOMの消化率が他の処理区よりも有意に低くなった。はまさり区におけるDM消化率の低さは、灰分含量の高さに原因があると考えられた。その上、NFCの消化率も低かったためOM消化率も低い値になったと考えられた。これらのことが、はまさり区のGE摂取量とエネルギー消化率の低下を引き起こし、加えて乾物あたりの咀嚼時間が他の区に比べて有意に長かったことがエネルギー消費量を増大させ、蓄積エネルギー(RE)と代謝率(ME/GE)を低下させたと考えられた。

泌乳牛にイネホールクロップサイレージを給与した場合、フンに大量に排泄される粉が問題視される<sup>37,38)</sup>。本実験においてもフン中に大量の粉が散見されたにもかかわらず、デンプンの消化率はおおむね90%以上であった。イネホールクロップサイレージを給与した場合のデンプンの消化率は、ヒツジでは100%に近い値であること<sup>18)</sup>、ウシでは70~90%程度と報告されている<sup>15,16,18,36)</sup>ことから、ほぼ維持レベルの給与水準であれば、イネホールクロップサイレージ子実内のデンプンはほとんど消化されているものと考えられた。篠田ら<sup>27)</sup>は、より粒の大きい粉の方が、第一胃から流出しにくく反すう・咀嚼をより多く受けるため、利用性が高いことを報告している。実験2では千粒粉重量の異なる品種を選定して供試し、事実、千粒粉重量の大きい品種の方がNFCおよびデンプンの利用性は高かった。但し、給与時にフォーレージハーベスターで細切しているため、子実の大きささと利用性との関係について本実験では明らかにはできなかった。

TDN含量は登熟に伴い有意ではないが増加した。その内訳として、DNFCが有意に増加する一方、DNDF含量は有意に低下した。これら登熟に伴う飼料中可消化成分割合の変化は、これまでに報告されていることとよく一致<sup>18,36)</sup>する結果であった。TDN含量はおおよそ50%程度であり、成分表に示されている値より若干低めであった。TDN含量が50%を上回る場合はおおむねDNFC含量が20%を超えている場合であり、TDN含

量の増加には登熟に伴うDNFC含量の増加が重要な役割を担っていることが伺えた。これは、穂比率によりTDN含量を推定できるとする報告<sup>4)</sup>とも関連する結果と考えられた。但し、「クサホナミ」に関しては、黄熟期にも関わらずDNFC含量は20%を下回り、一方NDF含量は「はまさり」の糊熟期、DNDF含量は同じく「はまさり」の乳熟期とほぼ同等であることから、繊維質に富む茎葉の利用性が高い品種である可能性が伺えた。

一般に、粗繊維含量の高い飼料を給与すると胃液VFAの酢酸割合が高まり、デンプンなどの易発酵性炭水化物含量の高い飼料を給与するとプロピオン酸と酪酸の割合が高まることが通説とされる<sup>29)</sup>。本実験においても、給与したサイレージによりプロピオン酸あるいは酪酸の比率に差は認められた。酢酸の割合を1とした場合、プロピオン酸と酪酸の割合はいずれの実験においても、それぞれ0.2~0.3および0.1~0.2の程度で表された。一方、名久井ら<sup>18)</sup>が示した値は、酢酸の割合を1とした場合プロピオン酸と酪酸いずれも0.6~1.0の範囲であり、本実験よりも圧倒的にプロピオン酸と酪酸の割合が高いことが示されている。それは、名久井ら<sup>18)</sup>の用いたイネは子実重量割合が43~56%、デンプン含量が21~41%であったことから、本実験で用いたイネ(穂比率29~49%、デンプン含量7~18%)に比べてルーメンでの発酵の様相が大きく異なると推察された。そしてルーメン発酵でみた場合、本実験に用いたイネホールクロップサイレージは粗飼料の色合いの強い特性を示したと考えられた。

咀嚼時間は、粗飼料の繊維含量や切断長に比例して長くなることが知られている<sup>17)</sup>。本実験では切断長を2cm程度に細切したものと15cm程度のイネホールクロップサイレージを給与したが、切断長の差異が咀嚼時間に及ぼす影響は明確ではなく、品種および熟期の差異が及ぼす影響のほうが強いことが示された。松山ら<sup>15,16)</sup>も、2cmに切断したイネホールクロップサイレージにおいて、乳熟期のイネホールクロップサイレージ(「はまさり」)は咀嚼時間が長くなることを示している。これは切断長よりも飼料中の繊維の含量や繊維の質がより咀嚼時間に影響を及ぼす可能性を示すものと考えられた。とくに乳熟期のイネホールクロップサイレージは、糊熟期のサイレージと比べてNDF含量が若干高い程度にもかかわらず、DMおよびNDF摂取量あたりの咀嚼時間には大きな差異があるように思われる。これは乳熟期のイネホールクロップサイレージの粗剛性が他の熟期に比べて高いことを示すと考えられた。これとは逆に「クサホ

ナミ」は、NDF 含量が高いにもかかわらずその消化率は高く、一方では咀嚼時間は短かった。

以上の結果から、本実験に用いたイネホールクroppサイレージをウシに給与した場合の特徴として、栄養価としては NFC およびデンプン含量が重要であること、総合的な特性としては、繊維質の含量の高い粗飼料的な特性を強く示すことが挙げられた。それは、登熟により DNFC 含量は増加、DNDF 含量は低下し、TDN としては値が高くなってゆくこと、品種により DNFC と DNDF 含量の比率に差はあるが、その増減は相殺され、TDN でみた場合は黄熟期ではほぼ同等であったことによる。また、NFC およびデンプン含量は登熟により高まるが、繊維の粗剛性が強いいため、ルーメン発酵でみた場合には粗飼料的な発酵を示し、咀嚼時間については切断長の影響は見られなかったことによる。

NFC およびデンプン含量は可消化成分として大きな割合を占めることから、これらの含量の高い品種を選択すること、あるいはクサホナミのような繊維の利用性の高い品種を選択することは、イネホールクroppサイレージの栄養価の向上には重要と考えられた。さらに、イネホールクroppサイレージの灰分含量は実験および品種間で大きく異なった。灰分のうちケイ酸はイネの茎葉に多く含まれ、イネの発育や耐病性にも重要であるため一概に問題視することはできないが、TDN 含量に直接影響する要因でもあるため、茎葉繊維の消化性を高めるような品種育成や土壌付着を避けるような栽培・収穫をすることもイネホールクroppサイレージの栄養価や品質向上に資すると考えられた。

## 謝 辞

本論文の作成にあたり貴重なご意見をいただいた畜産草地研究所の寺田文典博士に感謝いたします。業務科の諸氏には飼料の調製、保存、動物実験に関して多大なる支援を賜った。飼料の栽培・収穫・調製には、埼玉県本庄農林振興センターの根岸七緒技師に多大なる協力をいただいた。一般分析では蕪澤恵美子さん、島田知子さんにご尽力いただいた。皆様のご協力に深く感謝いたします。また本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構の『地域農業確立総合研究「関東地域における飼料イネの資源循環型生産・利用システムの確立」』の支援を受けて実施された。

## 引用文献

- 1) 阿部 亮 (1988). 炭水化物成分を中心とした飼料分析法とその飼料栄養評価法への応用, 畜産試験場研究資料, 第 2 号.
- 2) 永西 修・四十万谷吉郎 (1998). 稲ホールクroppサイレージの発酵特性, 日本草地学会誌, 44 (2), 179-181.
- 3) 永西 修・四十万谷吉郎 (1998). 雄性不稔稲の生育時期別・部位別化学成分とサイレージの栄養価, 日本草地学会誌, 44 (3), 260-265.
- 4) 深川 聡・井上昭芳・吉田 香・小村洋美・石井康之・佐藤健次 (2007). 飼料イネサイレージにおける *in vitro* 乾物消化率および穂重割合からの TDN 含量の推定, 日本草地学会誌, 53 (1), 16-22.
- 5) 春原嘉弘・飯田修一・前田英郎・松下 景・根本博・石井卓朗・吉田泰二・中川宣興・坂井 真・星野孝文・岡本正弘・篠田治躬 (2003). 飼料用水稲新品種「クサノホシ」の育成, 近畿中国四国農業研究センター研究報告, 2, 99-113.
- 6) 細田謙次・西田武弘・石田元彦・松山裕城・吉田宣夫 (2005). 飼料イネ「ホシアオバ」ロールベールサイレージ給与泌乳牛の採食量, 消化率および乳生産, 日本草地学会誌, 51 (1), 48-54.
- 7) 石橋 晃 監修 (2001). 新編 動物試験法, 養賢堂, 東京.
- 8) 石田元彦・M. R. Islam・安藤 貞・坂井 真・吉田宣夫 (2000). 飼料イネ「関東飼 206 号」ロールベールサイレージ給与乳牛の乳生産と飼料の利用性に関する予備的な観察, 関東畜産学会報, 50 (1), 14-21.
- 9) 伊藤 稔・田野良衛 (1977). 助燃剤をかねた容器としてポリエチレンフィルムを用いた未乾燥糞および尿の熱量分析法の検討, 畜産試験場研究報告, 32, 31-43.
- 10) 岩崎和雄・針生程吉・田野良衛・寺田文典・伊藤 稔・亀岡暄一 (1982). 畜産試験場に新設した家畜代謝実験装置について - とくに呼吸試験装置の機能を中心として -, 畜産試験場研究報告, 39, 41-73.
- 11) 自給飼料品質評価研究会編. 改訂 粗飼料の品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 東京.
- 12) 河本英憲・大谷隆二・押部明德・出口 新・田中治・魚住 順 (2005). 細断型ロールベールによる

- て調製された飼料イネサイレージの発酵品質, 日本草地学会誌, 51 (2), 199-201.
- 13) 栗原光規・久米新一・柴田正貴・高橋繁男・相井孝允 (1990). 乾草維持給与時における乾乳牛のエネルギー代謝に及ぼす環境温度の影響, 日本畜産学会報, 61 (4), 315-321.
  - 14) 前田英郎・春原嘉弘・飯田修一・松下 景・根本博・石井卓朗・吉田泰二・中川宣興・坂井 真・星野孝文・岡本正弘・篠田治躬 (2003). 飼料用水稲新品種「ホシアオバ」の育成, 近畿中国四国農業研究センター研究報告, 2, 83-98.
  - 15) 松山裕城・塩谷 繁・石田元彦・西田武弘・細田謙次・額爾敦巴雅爾・安藤 貞・Islam MR・吉田宣夫 (2005). 飼料イネサイレージ「はまさり」, 「夢十色」および「北陸 184 号」の飼料特性, 日本草地学会誌, 51 (3), 289-295.
  - 16) 松山裕城・塩谷 繁・西田武弘・細田謙次・額爾敦巴雅爾・吉田宣夫・石田元彦 (2006). 飼料イネサイレージ専用品種「クサユタカ」, 「はまさり」および「クサホナミ」の栄養価, 日本草地学会誌, 51 (4), 385-389.
  - 17) Mertens, D. R. (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 80, 1463-1481.
  - 18) 名久井忠・柁木茂彦・粟飯原友子・箭原信男・高井慎二 (1988). 稲ホールクロップサイレージの調製と飼料価値の評価, 東北農業試験場研究報告, 78, 161-174.
  - 19) 庭山 孝・鈴木計司・戸倉一泰・矢ヶ崎健治・森田久也・塩原比佐雄・長谷川英世・田村真美・峯岸直子 (1988). 水稻新品種「くさなみ」「はまさり」の育成, 埼玉県農業試験場研究報告, 43, 1-18.
  - 20) 野中和久 (2001). ロールベールサイレージの安定調製と飼料特性, 日本草地学会誌, 47 (5), 553-559.
  - 21) 農業技術研究機構 (2001). 日本標準飼料成分表.
  - 22) 農林水産省農林水産技術会議事務局編 (1999). 日本飼養標準・乳牛(1999年版), 中央畜産会, 東京.
  - 23) 小原嘉昭 (2004). 糖質の代謝調節, 新ルーメンの世界 (小野寺良次監修, 板橋久雄編), 農文協, 東京, 341-354.
  - 24) 蔡 義民・藤田泰仁・村井 勝・小川増弘・吉田宣夫・北村 亨・三浦俊治(2003). 飼料イネサイレージ調製への乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* 畜草 1号) の利用, 日本草地学会誌, 49 (5), 477-485.
  - 25) 坂井 真・井辺時雄・根本 博・堀末 登・中川宣興・佐藤宏之・平澤秀雄・高館正男・田村和彦・安東郁男・石井卓朗・飯田修一・前田英郎・青木法明・出田 収・平林秀介・太田久稔 (2003). 飼料用水稲新品種「クサホナミ」の育成, 作物研究所研究報告, 4, 1-15.
  - 26) SAS/STAT ユーザーズガイド Release 6. 03 Edition (1992). SAS 出版局, 東京.
  - 27) 篠田 満・櫛引史郎・新宮博行・嶺野英子(2007). 穂またはモミの給与およびモミ粒の大きさが牛における糞中未消化モミ排泄量に及ぼす影響, 日本草地学会誌, 52 (4), 227-231.
  - 28) 篠田治躬・岡本正弘・星野孝文・坂井 真・柴田和博・藤井啓史・鳥山國士・山田利昭・小川紹文・関沢邦雄・山本隆一 (1990). 多収水稻新品種「ホシユタカ」の育成, 中国農業試験場研究報告, 6, 135-148.
  - 29) 高橋 強・前原麻奈美・張 延利・本林 隆・石井泰博・神田修平・板橋久雄 (2007). 稲発酵粗飼料の給与が乳牛の乳生産, ルーメン発酵, 血液性状および採食行動に及ぼす影響, 日本畜産学会報, 78 (1), 45-55.
  - 30) 寺田文典・田野良衛・岩崎和雄・針生程吉(1987). 牛およびめん羊, 山羊により測定した同一飼料の栄養価の比較, 日本畜産学会報, 58 (2), 131-137.
  - 31) 上原泰樹・小林 陽・古賀嘉昭・大田久稔・清水博之・三浦清之・福井清美・大槻 寛・小牧有三・笹原英樹・堀内久満・奥野員敏・藤田米一・後藤明俊 (2003). 水稻新品種「クサユタカ」の育成, 中央農業研究センター研究報告, 2, 83-105.
  - 32) 浦川修司・水野隆夫 (1994). 稲ホールクロップサイレージの品質評価, 三重県農業技術センター研究報告, 22, 45-55.
  - 33) 浦川修司・吉村雄志 (2003a). 飼料イネ用カッテングロールベアラの開発, 日本草地学会誌, 49 (1), 43-48.
  - 34) 浦川修司・吉村雄志 (2003b). 飼料イネ用自走式ベールラップの開発, 日本草地学会誌, 49 (3), 248-253.
  - 35) Van Soest, P. J. (1994). Digestive Capacity, Nutritional Ecology of the Ruminant, 45p, Cornell Univ. Press, Ithaca and London.
  - 36) 箭原信男・高井慎二・沼川武雄 (1981). 水稻ホー



ルクroppサイレージの調製利用に関する研究，東北農業試験場研究報告，63，151-159.

- 37) 山本泰也・水谷将也・乾 清人・浦川修司・平岡啓司・後藤正和 (2005). 乳牛におけるイネホールクroppサイレージを用いた混合飼料の飼料特性，日

本草地学会誌，51 (1)，40-47.

- 38) 山本泰也・水谷将也・乾 清人・浦川修司・平岡啓司・後藤正和 (2008). 混合飼料におけるイネホールクroppサイレージの未消化子実排泄に及ぼす併給粗飼料の影響，日本草地学会誌，54 (1)，12-18.

## Effects of grain filling, variety and cutting length of whole crop rice silage on nutrient utilization, ruminal fermentation and chewing time in dry cows

Kouji HIGUCHI<sup>1)</sup>, Naozumi TAKUSARI<sup>2)</sup>, Itoko NONAKA<sup>3)</sup>, Kiyoshi TAJIMA<sup>4)</sup>,  
Yuusuke YABUMOTO<sup>3)</sup>, Tomohisa TOMARU<sup>5)</sup>, Fumihiro OHTANI<sup>1)</sup>, Yousuke KOBAYASHI<sup>1)</sup>,  
Tetsuya ISHIKAWA<sup>6)</sup>, Mitsunori KURIHARA<sup>7)</sup>, and Osamu ENISHI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Endocrinology and Metabolism Research Team

<sup>2)</sup>Research Team for Dairy Production Using Regional Feed Resources,

National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

<sup>3)</sup>Livestock Research Team on Global Warming

<sup>4)</sup>Functional Feed Research Team

<sup>5)</sup>Gunma Prefectural Livestock Experiment Station

<sup>6)</sup>Forage Rice Research Team (Kanto Region), National Agricultural Research Center

<sup>7)</sup>National Institute of Agrobiological Sciences

### Summary

Three experiments were conducted using non-pregnant dry cows to evaluate feed characteristics of whole crop rice silages (WCRS) by making digestible and metabolism trials, examining ruminal liquor characteristics, and monitoring chewing behavior. We examined grain filling (milk ripe stage, dough ripe stage, and yellow ripe stage) of WCRS in the first experiment, varieties (Hamasari, Kushonami, Hoshiaoba, and Kusayutaka) using WCRS harvested at the yellow ripe stage in the second experiment, and cutting lengths (LONG and SHORT) using WCRS harvested at the yellow ripe stage in the third experiment. With grain filling, WCRS lose digestible neutral detergent fiber (NDF) content and chewing time per kg of dry matter (DM) intake, whereas the digestible nonfibrous carbohydrates (NFC) content of WCRS increased. There was a tendency for total digestible nutrients (TDN) content to increase with grain filling. Kushonami, Hoshiaoba, and Kusayutaka have higher TDN contents and shorter chewing time than those of Hamasari. Hoshiaoba and Kusayutaka also have higher digestible NFC content, whereas Kushonami has higher digestible NDF content and shorter chewing time per kg NDF intake, indicating a higher amount of available fiber. WCRS with a long cutting length has higher digestible NFC content, but there was no difference in TDN content between long and short cutting lengths. There was no remarkable difference in ruminal liquor characteristics of the cows fed WCRS, but the ruminal fermentation typically represented forage-type fermentation. These results indicate that WCRS had almost the same nutritive values in terms of varieties and cutting length at the yellow ripe stage in this study.

Key words : whole crop rice silage, cow, nutritive value, ruminal fermentation, chewing time

---

Present address: <sup>2)</sup> 1 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, Hokkaido, 062-8555 Japan.

<sup>5)</sup> 2425 Kogure, Fuzimimura, Seta, Gunma, 371-0103 Japan.

<sup>6)</sup> 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8666 Japan.

<sup>7)</sup> 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8602 Japan.

# イタリアンライグラスうどんこ病抵抗性中間母本「ER3」の育成とその特性

荒川 明・矢萩久嗣<sup>1)</sup>・杉田紳一<sup>2)</sup>・清多佳子<sup>3)</sup>・小松敏憲<sup>4)</sup>・内山和宏<sup>5)</sup>・水野和彦<sup>2)</sup>

飼料作物育種研究チーム

<sup>1)</sup> 茨城県畜産センター

<sup>2)</sup> 草地研究支援センター

<sup>3)</sup> 飼料作物育種工学研究チーム

<sup>4)</sup> 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター

<sup>5)</sup> 畜産温暖化研究チーム

## 要 約

イタリアンライグラスのうどんこ病抵抗性が高い中間母本を育成した。2倍体で早晚性が極早生または早生の8品種・系統を育種素材とし、うどんこ病が罹病しやすい条件である隔離圃場およびガラス室において、自然発病による3世代の表現型循環選抜を行い、うどんこ病抵抗性の新系統「ER3」を選抜した。

本系統は、「ニオウダチ」並の早生で、うどんこ病に対する抵抗性が主要な既存早生品種より強い。選抜材料に用いた品種・系統は、集団として高度に罹病性であったが、これらの品種・系統集団中にも抵抗性遺伝子を保有していたことが確認された。また、既存の罹病性品種との交雑後代において高い頻度で抵抗性個体が得られたことから、本系統のうどんこ病抵抗性は遺伝性が高く、うどんこ病抵抗性を効率よく高めることができると考えられた。

本系統の収量性は「はたあおば」より劣るものの、「ニオウダチ」より優れた。しかし、耐倒伏性がこれらの品種より劣ることから、本系統を利用する場合には、母材選定や選抜過程において、これに配慮する必要がある。なお、「ER3」は平成19年に「イタリアンライグラス中間母本農1号」の名称で品種登録出願が受理された（出願番号：第21404号）。

キーワード：イタリアンライグラス、うどんこ病、中間母本、抵抗性、早生

## 緒 言

イタリアンライグラスうどんこ病（以下、うどんこ病）は、1996年の宮崎県における発生が国内で最初の報告である<sup>12)</sup>。これまで、農業現場での甚大な被害は報告されていないが、イネ科作物においても麦類やオーチャードグラス等でうどんこ病が重要病害となっていることから、今後の温暖化等の気候変動により、イタリアンライグラスにおいてもうどんこ病が重要病害となる可能性がある。

農業の利用が難しい牧草類においては、抵抗性品種の

利用が最も有効な防除方法となるが、我が国のイタリアンライグラス栽培での主力である2倍体の早生品種には、うどんこ病に抵抗性を有するものは見いだされていない。これらの品種は鳥取在来、宮崎在来、黒石在来など、国内の在来系統をその主な母材としているので、これら母材中のうどんこ病抵抗性遺伝子の頻度が低いと推察される。通常、新品種の育成には長期間を要することから、本病による被害が農業現場で顕在化する以前に抵抗性系統を中間母本として育成しておき、迅速に抵抗性品種が育成される態勢を整えておくことは重要である。

うどんこ病は、通常の圃場では発生が安定せず、罹病

性品種においてもほとんど発生が認められない場合もある。そこで、うどんこ病が発生しやすい条件である、日当たりと風通しが悪い隔離圃場および雨滴が植物体に当たらないガラス室において、抵抗性個体を繰り返し選抜する表現型循環選抜を3回行って、うどんこ病抵抗性系統「ER3」を育成した。なお、本系統は、平成19年度に「イタリアンライグラス中間母本農1号」の名称で品種登録出願が受理された（出願番号：第21404号）。

草地研究所（那須塩原市）の日当たりと風通しが悪い隔離圃場に定植した。1999年、出穂期頃にうどんこ病の病徴が認められなかった28個体を隔離条件で交配して個体毎に採種した（「ER1」）。2002年3月22日に「ER1」28母系のうち、種子量が十分であった21母系457個体をガラス室に定植した。うどんこ病の病徴が認められず、草型が立ち型で草勢の良い19母系37個体を選抜し、隔離条件で交配して個体毎に採種した（「ER2」）。2003年3月18日に「ER2」37母系705個体をガラス室に定植し、うどんこ病の病徴が認められず、草型が立ち型で草勢の良い15母系30個体を選抜し、隔離条件で交配し個体毎に採種し、「ER3」とした。各個体からの等量混合種子を1世代増殖し、それによって「ER3」のうどんこ病抵抗性および農業形質を評価した。

材料と方法

1. 「ER3」の育成

図1に、「ER3」の育成経過を示した。1998年10月10日に選抜基礎集団となる8品種・系統639個体を、畜産

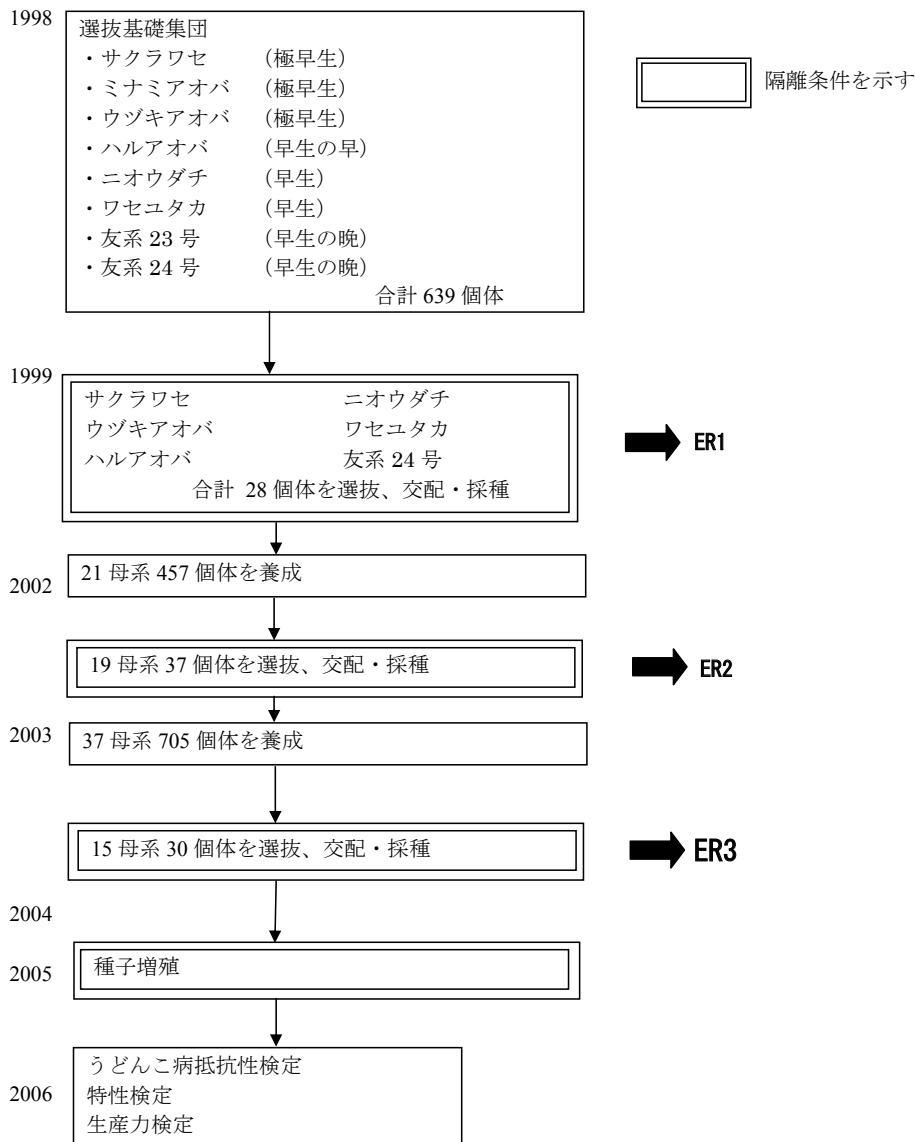


図1. イタリアンライグラスうどんこ病抵抗性系統「ER3」の育成経過

## 2. 「ER3」および単交雑後代のうどんこ病抵抗性

「ER3」のうどんこ病抵抗性を明らかにするために、試験Aでは、「ER1」、「ER2」、「ER3」、「ワセアオバ」、「ニオウダチ」、「ワセユタカ」および「はたあおば」を密個体植え（株間6cm）で、試験Bでは、「ER2」、「ER3」、「ニオウダチ」および「ワセユタカ」を条播で、それぞれ品種・系統間の罹病程度を比較した（表1）。また、試験Cでは「ER3」の任意の個体と早生品種の任意個体（いずれもうどんこ病罹病程度は未調査）との間で4組み合わせの単交雑を行い、後代の罹病程度を個体毎に調査した（表1）。

「ER2」、「ER3」の選抜時（2002年および2003年）および試験A～Cを通じ、うどんこ病罹病程度を評価するための試験は、無加温、自然日長のガラス室において地表灌水により栽培し行った。うどんこ病罹病程度の評価はいずれも、罹病個体で病徴が甚だしくなる5月の出穂期頃に植物体全体を観察し、病徴が確認されなかったものを無、植物体全体が甚だしく罹病しているものを甚とした。試験Cでは0：無～5：甚の6段階で、それ以

外は1：無～9：甚の9段階で評点を付した。

## 3. 「ER3」の農業特性の調査

「ER3」の形態形質や農業特性を評価するため、「ニオウダチ」および「はたあおば」を比較品種として、圃場において個体植えによる特性調査（試験D）および生産力検定試験（試験E）を行った（表1）。試験Dにおける各特性の調査は、種苗特性分類調査（昭和52年）に従って実施した。

## 結 果

### 1. 「ER3」育成過程におけるうどんこ病抵抗性の向上

表2に、選抜基礎集団の隔離圃場における罹病程度と、「ER1」への選抜における選抜個体数および選抜率を示した。選抜基礎集団8品種・系統のそれぞれの罹病程度の平均は3.4～7.2であり、最も著しく罹病した個体の罹病程度は「ハルアオバ」で6であった他は9と甚だしい罹病であった。しかし、「ミナミアオバ」と「友

表1. うどんこ病抵抗性検定および特性調査試験の方法

試験名	播種または移植の時期 年 月 日	場所	栽植様式 (畦間×株間) cm	1区個体数	一区面積 m <sup>2</sup>	反復数	備考
A	2004.3.11	ガラス室	密個体植 (70×6)	25	1.05	4	
B	2003.12.2	ガラス室	条播 (70)	—	1.05	4	
C	2006.4.11	ガラス室	密個体植 (70×10)	20	1.4	2	
D	2005.10.19	圃場	個体植 (80×40)	20	6.4	3	
E	2005.10.5	圃場	条播 (30)	—	6.0	4	生産力検定

表2. 選抜基礎集団のうどんこ病罹病程度と「ER1」への選抜

品種・系統	早晩性	個体数	罹病程度(1～9：甚)		無病微個体数 (選抜個体数)	選抜率(%)
			平均	(レンジ)		
サクラワセ	極早生	29	5.6	(1-9)	2	6.9
ミナミアオバ	極早生	8	7.0	(6-9)	0	0
ウヅキアオバ	極早生	62	4.9	(1-9)	3	4.8
ハルアオバ	早生の早	80	3.4	(1-6)	4	5.0
ニオウダチ	早生	253	4.9	(1-9)	4	1.6
ワセユタカ	早生	162	3.4	(1-9)	14	8.6
友系23号	早生の晩	22	7.2	(4-9)	0	0
友系24号	早生の晩	23	6.2	(1-9)	1	4.3
合計又は平均		639	4.6		28	4.4

系23号)を除く6品種・系統からは無病徴個体が得られ、選抜基礎集団個体の4.4%にあたる28個体が病徴の認められない個体であり、これら28個体全てを選抜して「ER1」とした。表3に、「ER2」および「ER3」への選抜経過を示した。それぞれの世代の選抜時において、その選抜母集団となった「ER1」および「ER2」の無病徴個体の割合はそれぞれ59.3%および87.2%であった。「ニオウダチ」の罹病程度からみて、罹病性個体が十分に罹病する条件であったと考えられる。

2. 「ER3」および単交雑後代のうどんこ病抵抗性

「ER1」、「ER2」および「ER3」は、比較4品種より有

意に罹病程度が低く、これら3選抜世代間に罹病程度の有意差はなかった(試験A, 図2)。試験Bにおいても同様の結果であり(図3),「ER2」および「ER3」は「ニオウダチ」および「ワセユタカ」よりも罹病程度が有意に低かった。「ER2」と「ER3」との間には有意差がなかったが、わずかに「ER3」は「ER2」よりも罹病程度が低かった。

「ER3」個体と早生品種の個体との間の4組み合わせの単交雑後代のうどんこ病罹病程度を表4に示した(試験C)。罹病程度の頻度分布は組み合わせごとに0~5まで分布するもの、1以下の罹病程度の低い個体のみ出現したものなど異なったが、4組み合わせの合計では

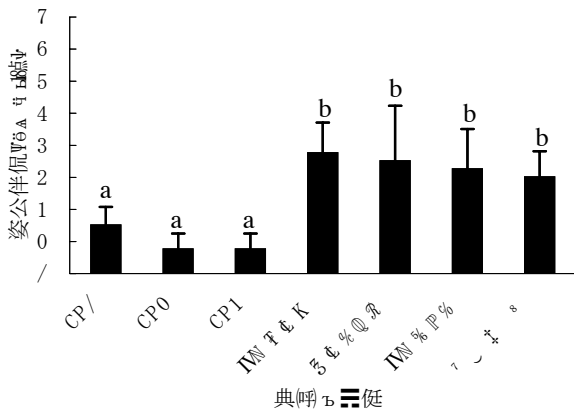


図2. 選抜各世代および早生品種のうどんこ病罹病程度(試験A)。誤差線は標準偏差。Ryan法により異なるアルファベット間に5%水準で有意差があることを示す。

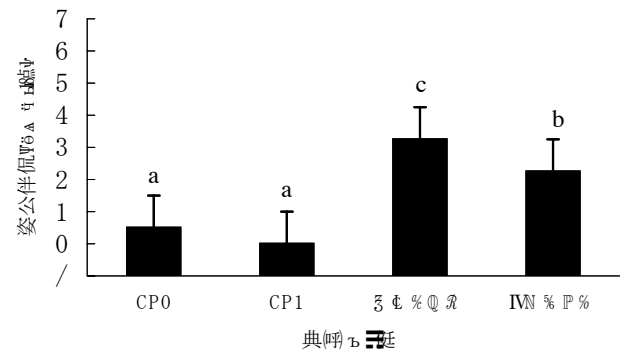


図3. 「ER2」、「ER3」、「ニオウダチ」および「ワセユタカ」の罹病程度(試験B)。誤差線は標準偏差。Ryan法により異なるアルファベット間に5%水準で有意差があることを示す。

表3. 「ER2」および「ER3」への選抜における選抜母集団の無病徴個体割合と選抜率

選抜母集団	選抜母集団の個体数	無病徴個体数	無病徴個体割合(%)	選抜率(%)	選抜母集団罹病程度	ニオウダチ罹病程度
ER1	457	271	59.3	8.1	1.8	4.3
ER2	705	615	87.2	4.3	1.5	3.7

選抜母集団および「ニオウダチ」の罹病程度は評点(1~9:甚)による。「ニオウダチ」の罹病程度は20個体平均。

表4. 「ER3」個体と早生品種個体間の単交雑後代のうどんこ病罹病程度

組み合わせ	罹病程度(0~5:甚)						合計
	0	1	2	3	4	5	
ER3-1 × ND1	18	3	2	3	8	6	40
ER3-2 × ND2	23	16	0	0	0	0	39
ER3-3 × HA1	0	1	9	6	6	18	40
ER3-4 × WA1	28	4	3	2	3	0	40
合計	69	24	14	11	17	24	159
(%)	(43.4)	(15.1)	(8.8)	(6.9)	(10.7)	(15.1)	(100)

ER3-1~4は「ER3」の個体。ND1およびND2は、「ニオウダチ」の個体。HA1およびWA1はそれぞれ「はたあおば」および「ワセアオバ」の個体。

43.4%の個体が無病徴であった。

### 3. 「ER3」の一般特性および収量性

#### 1) 出穂の早晩性および形態的特性

「ER3」の早晩性は、その出穂始日において「ニオウダチ」および「はたあおば」との差が試験DおよびEのいずれにおいても1日以内で”早生”に属する(表5, 表6)。また、草型、稈長および葉身長など、主要な形態形質や越冬前後の生長において、「ニオウダチ」および「はたあおば」と有意差がみられたものはなかった(表5)。

#### 2) 収量性、草丈および倒伏程度

「ER3」の乾物収量は、1番草は「ニオウダチ」より

優れ、「はたあおば」より劣った。2番草は、「ニオウダチ」および「はたあおば」より優れ、合計では「ニオウダチ」より優れ、「はたあおば」より劣った(表6)。草丈は1番草は「ニオウダチ」および「はたあおば」と同等であり、2番草は「ニオウダチ」および「はたあおば」よりやや高かった(表6)。耐倒伏性は、「ニオウダチ」および「はたあおば」より劣った(表6)。

## 考 察

ライグラス類のうどんこ病については、イギリスなどでもいくつかの報告がある<sup>6, 8, 11)</sup>。Carver, T. L. *et al.*<sup>6)</sup>は、イギリスではライグラス類のうどんこ病は穀類の作物のように被害が問題になっていないとし、その要因

表5. 個体植試験における諸特性(試験D)

形質	調査日 年 月 日	ER3	ニオウダチ	はたあおば	
出穂始日		5月6日	5月7日	5月6日	n. s.
草型 <sup>1)</sup>	2006. 4. 25	3.3	3.7	3.5	n. s.
穂数	2006. 6. 8	161	153	155	n. s.
茎の太さ <sup>2)</sup>	2006. 5. 26	2.0	2.2	2.1	n. s.
稈長 <sup>3)</sup>	2006. 5. 26	76.2	78.1	77.0	n. s.
穂長 <sup>3)</sup>	2006. 5. 26	24.1	25.4	25.5	n. s.
小穂数	2006. 5. 26	20.6	20.7	20.6	n. s.
葉身長 <sup>a)</sup>	2006. 5. 17	23.9	24.6	23.1	n. s.
葉幅 <sup>a)</sup>	2006. 5. 17	9.8	9.9	9.9	n. s.
初期草丈 <sup>3)</sup>	2005. 12. 15	19.6	19.2	18.9	n. s.
春期草丈 <sup>3)</sup>	2006. 4. 19	35.7	34.6	32.1	n. s.

<sup>1)</sup>1:直立~9:ほふく, <sup>2)</sup>mm, <sup>3)</sup>cm

<sup>a)</sup>止葉の下第1葉

n. s. は有意差がないことを示す。

表6. 乾物収量、草丈および倒伏程度(試験E)

系統名		調査日 年 月 日	ER3	ニオウダチ	はたあおば	L. S. D. (5%)
出穂始日	1番草		5月1日	5月2日	5月1日	n. s.
乾物収量 <sup>1)</sup>	1番草	2006. 5. 8	104	57.4	110	n. s.
	2番草	2006. 6. 8	107	28.0	105	n. s.
	合計		105	85.4	108	n. s.
	草丈 (cm)	1番草	2006. 5. 8	105	105	105
	2番草	2006. 6. 8	93	88	91	n. s.
倒伏程度 (1:無~9:甚)	1番草	2006. 5. 8	3.5	1.0	1.0	1.9
	2番草	2006. 6. 8	3.0	1.0	1.0	0.8

<sup>1)</sup>ニオウダチ比%, ニオウダチはkg/a.

の一つとして、葉の裏面のワックスが発芽胞子の発生を抑制している可能性を示唆した。国内では、1996年の宮崎県での発生が初めて報告されたものであり<sup>12)</sup>、その後、新潟県<sup>1, 2)</sup>、栃木県など、国内各地で発生が観察されている。特に宮崎県での発生は罹病程度が甚しく、株全体の枯死も観察されている。しかし、今のところ国内の生産現場で大きな問題となっていない。筆者らは畜産草地研究所（那須塩原市）の圃場においてもその発生を観察しているが、その発生の程度は年次によって著しく変動する。一般にうどんこ病は高温かつ湿度が低い条件下で発生しやすいことが知られており<sup>5)</sup>、今後の温暖化等の気候変動でイタリアンライグラスにうどんこ病が発生しやすくなる可能性がある。従って、これが多発するような事態が生じた場合、その抵抗性を効率的に付与できる中間母本があれば迅速な育種対応が可能になる。

佐々木（日本草地畜産種子協会、未発表）の調査によると、イタリアンライグラス 92 品種・系統の中に明瞭にうどんこ病抵抗性を示したものはなく、特に2倍体の極早生および早生のものは高度に罹病性であるものが多かった。「ER3」の選抜基礎集団も2倍体の極早生および早生の品種・系統からなり、甚だしく罹病した個体もみられたが、4.4%の抵抗性（無病徴）個体が認められたことから、これら罹病性の品種・系統の中にも低頻度ながら抵抗性遺伝子が含まれており、その頻度を「ER3」の選抜過程において高めることができたと考えられる。

「ER3」の選抜過程において、3世代の選抜のうち第1世代の選抜の効果が最も大きかったことから、少数の効果の大きい抵抗性遺伝子の関与が示唆される。また、世代による無病徴個体割合の推移から、抵抗性遺伝子の優性効果も高いと考えられた。本報告の試験Cで、「ER3」と既存品種と単交雑後代においては、組み合わせによっては抵抗性個体から罹病性個体まで分布するものや、抵抗性個体が出現しなかったものもあったが、交雑を行った4組み合わせ全体としてみれば43.4%もの抵抗性個体が出現した（表4）。これらのことは、「ER3」のうどんこ病抵抗性は遺伝性が高く、中間母本として交雑に用いることにより、効率よく罹病性系統の抵抗性を高めることができることを示している。

ライグラス類においては、Roderick, H. W. *et al.*<sup>11)</sup>によってペレニアルライグラスで抵抗性の種内変異について報告されているが、抵抗性の選抜や選抜効果の検証はされていない。筆者ら<sup>3)</sup>は、「ER3」育成の材料とは異なるイタリアンライグラスの単交雑後代で、うどんこ病罹病程度が軽微であった個体と甚しく罹病した個体と

に明瞭に分離し、その分離比が1:1に適合した組み合わせを見いだしており、このことは効果の大きい抵抗性遺伝子の関与を示唆すると考えられる。オーチャードグラスにおいては、Nasinec, I.<sup>9)</sup>が選抜初期世代で高い抵抗性を持つ系統を得たが、以後4世代までの選抜では抵抗性の向上はほとんどなかったと報告している。我が国で育成されたオーチャードグラスうどんこ病抵抗性系統「ER571」も、幼苗接種および圃場検定を併用しているとはいえ、1世代のみの選抜で育成された高度抵抗性系統である（藤本ら<sup>6)</sup>）。これらのことから、オーチャードグラスにおけるうどんこ病抵抗性には、比較的効果の大きい遺伝子が関与していることが推察される。なお、オーチャードグラスうどんこ病菌は麦類等のイネ科植物に感染しないことが報告されている<sup>10)</sup>が、ライグラス類うどんこ病については、他のイネ科植物への病原性は明らかになっていない。

「ER3」は隔離圃場およびガラス室で、うどんこ病抵抗性を指標に選抜したが、「ER2」および「ER3」への選抜では、選抜母集団の半分以上の個体で罹病が認められなかったため、草勢による選抜を行った。このように育成した「ER3」の乾物収量は既存品種である「ニオウダチ」や「はたあおば」と比較して同程度の水準であった。しかし、耐倒伏性はこれらの品種より劣った。耐倒伏性は我が国のイタリアンライグラスの最も重要な育種目標の1つであり、指定試験地等の育種場所においても精力的に耐倒伏性を強化した品種が育成されてきた。「ER3」のうどんこ病抵抗性は遺伝性が高いことから、耐倒伏性品種・系統との交雑とその後代からの選抜により、耐倒伏性に優れたうどんこ病抵抗性のイタリアンライグラス品種が迅速に育成されると考えられる。また、我が国のイタリアンライグラスの熟期別シェア（コモンを除く）は、夏作の飼料作物と組み合わせた二毛作で利用できる早生品種が70%を占めており、育種における最重要な熟期である。「ER3」は「ニオウダチ」や「はたあおば」と同じ早生で、この熟期のものとの交雑が容易であることも、今後の育種に利用するための重要な点であると考えられる。

冬作単年利用が主体のイタリアンライグラスにおいては、気候温暖化の進行によって病害発生が増大が懸念される。うどんこ病についても、冠さび病、いもち病とならんで育種の重要目標となる可能性があり、抵抗性の強化に「ER3」が利用できると思われる。



## 引用文献

- 1) 荒井治喜・荒川 明・田瀬和浩・江柄勝雄・中島敏彦 (2000). 新潟県におけるイタリアンライグラスうどんこ病の発生, 北陸病虫研報, 48, 61p.
- 2) 荒井治喜・荒川 明・田瀬和浩・江柄勝雄・中島敏彦 (2000). イタリアンライグラスうどんこ病の新潟県における発生, 北陸病虫研報, 48, 45-48.
- 3) 荒川 明・杉田紳一・藤森雅博・菅原幸哉・御子柴義郎・大久保博人・内山和宏・小松敏憲 (2002). イタリアンライグラスうどんこ病抵抗性遺伝子の推定, 日草誌, 48 (別), 364-365.
- 4) 荒川 明・矢萩久嗣・内山和宏・水野和・杉田紳一 (2005). イタリアンライグラスにおけるうどんこ病抵抗性の選抜効果, 日草誌, 51 (別), 440-441.
- 5) 浅田泰次・井上忠男・後藤正夫・久能 均 (1991). 最新植物病理学概論, 第2次改訂版, 養賢堂, 東京, 156-157.
- 6) Carver, T. L. W., Thomas, B. J., Ingerson-Morris, S. M. and Roderick, H. W. (1990). The Role of the abaxial leaf surface waxes of *Lolium* spp. in resistance to *Erysiphe graminis*, *Plant Pathology*, 39, 573-583.
- 7) 藤本文弘・神戸三智雄・小田俊光・川端習太郎・樋口誠一郎・山口秀和・水野和彦・佐藤信之助・稲波 進 (1993). オーチャードグラスうどんこ病抵抗性中間母本「ER571」の育成, 草地試研報, 48, 27-36.
- 8) Hardison, J. R. (1944). Specialization of pathogenicity in *Erysiphe graminis* on wild and cultivated grasses, *Phytopathology*, 34, 1-20.
- 9) Nasinec, I. (1981). The efficiency of selection of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) for resistance to powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC.) under greenhouse conditions, *Troubsko u Brna*, 7, 191-198.
- 10) 奥尚・山下修一・土居養二・西原夏樹 (1985). オーチャードグラスうどんこ病 (*Erysiphe graminis* DC.) の寄主範囲と分化型について, 日植病報, 51, 613-615.
- 11) Roderick, H. W., Clifford, B. C., Tyler, B. F., Chorlton, K. H. and Thomas, I. D. (1988). Differences in susceptibility of some perennial ryegrass populations to powdery mildew, *Tests of Agrochemicals and Cultivars 9*, (supplement to *Annals of Applied Biology* 112, Ed. by G. A. Wheatley), 80-81.
- 12) 月星隆雄・田中友子・島貫忠幸 (1998). イタリアンライグラスの新病害うどんこ病, 日植病報, 64, 437-438.

## Breeding of 'ER3', a Powdery Mildew Resistant Line in Italian Ryegrass, and its Characteristics.

Akira ARAKAWA, Hisashi YAHAGI<sup>1)</sup>, Shin-ichi SUGITA<sup>2)</sup>, Takako KIYOSHI<sup>3)</sup>,  
Toshinori KOMATSU<sup>4)</sup>, Kazuhiro UCHIYAMA<sup>5)</sup>, Kazuhiko MIZUNO<sup>2)</sup>

Forage Crop Breeding Research Team

<sup>1)</sup> Ibaraki Prefectural Livestock Research Center

<sup>2)</sup> Grassland Research Support Center

<sup>3)</sup> Forage Crop Biotechnology Research Team

<sup>4)</sup> National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

<sup>5)</sup> Livestock Research Team on Global Warming

### Summary

'ER3', an Italian ryegrass line resistant to powdery mildew was developed from 8 diploid, very early and early maturing cultivars after 3 generations of recurrent phenotypic selection for powdery mildew resistance. Superior genotypes, expressing powdery mildew resistance, were selected after natural infection in the field and greenhouse, where plants were easily infected with powdery mildew.

Heading date of 'ER3' is as early as that of 'Nioudachi'. 'ER3' clearly has higher resistance to powdery mildew than the existing early maturing cultivars, though the material cultivars from which 'ER3' is derived are susceptible. Therefore, these very early or early maturing cultivars might have resistance gene (s). Resistant plants were frequently obtained from progenies of paircrosses between genotypes of 'ER3' and susceptible cultivars, so 'ER3' is considered to be effective for the use in breeding powdery mildew resistant cultivars. Dry mater productivity of 'ER3' placed between those of 'Hata-aoba' and superior to that of 'Nioudachi'. But because lodging resistance of 'ER3' was inferior to that of 'Nioudachi' and 'Hata-aoba', the trait will need to be incorporated from other lines when 'ER3' is used for breeding.

Keywords: early maturing, intermediate parent line, Italian ryegrass, powdery mildew, disease resistance

---

Present address : <sup>1)</sup> 1234 Nagoya, Ishioka, Ibaraki, 315-0132 Japan.

<sup>4)</sup> 1 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, Hokkaido, 062-8555 Japan.

# 乳業用乳酸菌 *Lactococcus lactis* のプラスミド育種改良法の開発と 乳発酵特性変異の解明に関する研究

小林美穂

畜産物品質研究チーム

## 要 約

乳製品製造に汎用されている *Lactococcus lactis* の遺伝子構成は、2 Mb 程度の小型の染色体遺伝子と、複数のプラスミド遺伝子を細胞内に保有することが特徴的である。*L. lactis* のプラスミドは、ごく一部の例外を除いて  $\theta$ -複製型プラスミドであり、乳発酵に必須な形質をコードする 경우가多く、ラクトース資化、プロテイナーゼ活性、クエン酸取込み、ファージ耐性、バクテリオシン生産、粘性物質生産などの形質に関与する。*L. lactis* の内在プラスミドの種類や組合せは菌株ごとに異なり、菌株特異的な表現型を決定する。*L. lactis* の分離原は乳製品、生乳、漬物、生草など多岐にわたり、プラスミド構成を変えながら生育環境に適応していると考えられる。中には細胞内に 10 種類程度のプラスミドを保有する株もあり、機能が特定されていないプラスミドも多く残されている。プラスミドの機能解析は、通常まずプラスミド除去株を作出し、変異株の表現形質と親株の表現形質を比較して研究の端緒とする。従って、除去するプラスミドを任意にコントロールすることができれば、プラスミド上の遺伝子機能や関係する表現形質を効率良く推定することができる。また、必要不可欠なプラスミドを損なわずに、1 種類のプラスミドを除去する方法は、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良にも利用できる。第 1 章では、宿主 DNA にランダムに作用する変異剤処理などを行わず、複数の内在プラスミドのうち 1 種類のプラスミドを選択的に除去し、親株と発酵特性の異なる新菌株を作出する方法、即ち、任意の  $\theta$  プラスミドの複製単位を *in vitro* で再構成し、不和合性プラスミド（競合プラスミド）による  $\theta$ -プラスミド選択的除去法を開発した。本法は、1) 複製単位の再構成に共通して用いることのできるプラスミドベクター (pDB1) の作成、2) 任意の *L. lactis*  $\theta$  プラスミドの不和合性配列を増幅しうる PCR プライマーペア (VF3-VF4) の設計、3) *in vitro* での不和合性プラスミドの再構成と、*L. lactis* wild type プラスミドの除去操作、からなる。

この方法で作出した変異株は、細胞内に外来遺伝子を保有せず、また発酵に不都合な遺伝変異も起こっていないと考えられるため、食品加工用のスターターに利用できる。そこで第 2 章では本法を用いた *L. lactis* プラスミド変異株の育種例 2 例について記述した。1 例目としては、前段で *L. lactis* DRC1 に内在し、宿主の増殖速度を抑制するプラスミドの発見と、その解析について述べ、続いてプラスミドの選択的除去法を用い、当該プラスミドを除去することで親株より増殖速度の早いプラスミド変異株を作出したことを上げた。また 2 例目としては、*L. l. lactis bioval. diacetylactis* N7 からクエン酸透過性プラスミドを選択的に除去し、クエン酸の代謝産物であるジアセチルの生成能を失わせたフレーバー変異株育種の試みについて記述し、作出したプラスミド変異株の乳発酵スターターとしての能力について考察した。

第 3 章には、プラスミドの選択的除去で見出された新しいプラスミド性因子の解析例「宿主遺伝子の安定化に働くプラスミドの発見」についてまとめた。

*L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 は、乳発酵スターター乳酸菌のプロトタイプとして、世界中で広く研究に用いられている *L. lactis* NCDO712 の派生株である。*L. lactis* NIAI712 は、5 種類のプラスミドを有し、そのうち約 9 kb のプラスミド pAG6 はコピー数も多く、非常に安定である。それゆえ従来のプラスミド除去法では欠失されず、その機能

は調べられていなかった。そこで開発したプラスミドの選択的除去方法を試みたところ、効率よく pAG6 除去株 (712  $\Delta$  pAG6) が得られた。712  $\Delta$  pAG6 の乳発酵能を調べたところ、乳中での増殖能および乳酸生成能が親株よりも著しく劣っていた。712  $\Delta$  pAG6 と親株からゲノム遺伝子を抽出し、その制限分解パターンを比較したところ、pAG6 の除去に伴って、短期間のうちに遺伝子組み換えによる変異が起こることが明らかとなった。さらにこのゲノム変異によって、カゼイン分解物の取り込みに働く一連の遺伝子群 *opp-pepO* が、例外なく消失していることを突き止め、発酵遅延の主原因であると結論した。

pAG6 には、宿主 DNA のメチル化配列を決定する因子がコードされていた。遺伝子プロモーター近傍の DNA のメチル化状態が、遺伝子の転写活性に影響することは周知の事実である。特に遺伝子の転移を仲介するトランスポゾン の転移酵素遺伝子 *tnp* の転写減衰はよく知られている。それゆえ pAG6 の除去操作中、すなわち、pAG6 と競合プラスミドが同一細胞中に共存する状態で *tnp* の転写活性が上昇するのではないかと予想した。そこで、pAG6 と競合プラスミドが共存する変異株を作成し、*tnp* 転写活性を解析した。その結果、競合プラスミドの共存によって pAG6 の複製が不安定になっている最中には、ある種の *tnp* の発現量が特異的に上昇することを明らかにした。*L. lactis* のプラスミドが、共存する他のプラスミドやクロモゾームなど宿主のゲノム構造の安定化に働く現象は、本研究で明らかにされた新規な知見である。宿主は細胞内で pAG6 を安定に保持することで、ゲノム遺伝子のメチル化状態を正常に保ち、ゲノム内トランスポゾンなど可動性遺伝因子の転移活性を小さくし、ゲノム構造や菌株特異的なプラスミド構成を維持するのかもしれない。*L. lactis* において、DNA メチル化による転写制御の研究はごく少ない。本研究で作出した変異株が、メチル化と菌株特異的な遺伝子発現との関連を解析するモデル菌株になるのではないかと期待している。

キーワード：乳酸菌，プラスミド，生育速度，乳発酵

## 緒 論

乳酸菌の研究は、酪農食品の歴史が古いヨーロッパで始まった。したがって現在では多くの種に分類される乳酸菌群の中であって、チーズ製造用乳酸菌 *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) の研究蓄積は群を抜いている。*L. lactis* は、1873 年に Lister によって酸敗した乳から *Bacterium lactis* として初めて分離された。1919 年には Orla-Jensen により牛乳やクリームに酸を生成する菌として *Streptococcus* 属に位置付けられた<sup>67)</sup>。ランスフィールドの血清学的分類ではグループ N に分類される。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第 9 版ではグループ N の乳酸球菌は *Streptococcus* 属から独立し、新たに *Lactococcus* 属に位置付けられた<sup>38)</sup>。ゲノム DNA の G+C 含量は 38–40 mol% で、低 GC 含量の細菌群に分類される。形態的にはグラム陽性球菌で、二連あるいは短連鎖を形成し、グルコースから L-乳酸を生成する。通性嫌気性でカタラーゼを生産せず、運動性を示さない。

*L. lactis* は、様々な乳製品の発酵に関与する微生物として分離されているが、特にチーズ製造においてはカード形成や食感・風味の生成に適した条件を作り出す細菌「発酵スターター」の主役である。乳成分の資化能、

乳酸や各種フレーバー成分の生成能、発酵基質中での増殖能など発酵スターターの能力は、製品の品質に直結する。そこでこれまでに乳発酵の成否を決定付ける形質、すなわち乳糖の代謝経路、乳タンパク質の分解過程、フレーバーや菌体外多糖などの生成経路、バクテリオファージの感染経路と防御機構などに関して数多くの成果が報告されており、またこれらの形質の支配遺伝子が特定されている<sup>73)</sup>。

近年では、乳発酵食品に対する消費者の期待は多様化し、美味しさの向上に加え、整腸作用や免疫賦活作用など健康機能の強化を目指した発酵食品の開発が行われている<sup>5, 71, 91)</sup>。最近人気が高まっている機能性ヨーグルトなどの機能性発酵食品では、その効能は発酵スターター (*Lactobacillus casei* シロタ株; ヤクルト, *Lactobacillus gasseri* LG21 株; 明治乳業, 等) の菌株特異性、すなわち菌株に特徴的な菌体成分や代謝産物の保健効果に依存している<sup>75, 82)</sup>。このことは、近年スターターの菌株名を積極的に商品に表示するようになったことで、一般消費者にも広く認識される所となった。また、今迄あまり意識されていなかったが、伝統的な乳製品の評価基準である保存性、美味しさ、製造安定性なども実は菌株特異的な性質であった。店頭に並ぶ発酵乳製品の種類が増え、『美味しさの評価基準』も多様化してきた中で、個性の

際立った乳酸菌を発酵に利用して製品のバリエーションを増やすことも、乳製品の消費拡大を図る一手段と言える。このような背景の中で、いま菌株特異性の分子レベルでの解明に光が当たっている。菌株特異性の解明こそ特定の乳酸菌の付加価値を裏付ける明解な科学的データだからである。菌株特異性は、表現型に関わる遺伝子の有無だけで決まるわけでは無い。すなわち、関わる遺伝子群の発現強度や、実際に働いているタンパク質の分解速度などが複雑に影響する。

*L. lactis* の遺伝子構成が、2 Mb 程度の小型の染色体と、通常複数の染色体外遺伝子（プラスミド）を細胞内に保有することを特徴とすることから、著者は、乳系乳酸菌 *L. lactis* subsp. *lactis* および subsp. *cremoris* のプラスミドを研究対象としてきた<sup>52, 79, 81</sup>。各々のプラスミドは宿主細胞の増殖と同調して、あるいは無関係に一定のコピー数を自己複製し、通常正確に次世代の細胞に分配される (Fig. 1)。

*L. lactis* のプラスミドのうち、最初にクローニングされ、全配列が決定されたのは、ローリングサークル (RC) 型で複製する小型のプラスミド pWVO1 と pSH71 である<sup>22, 56</sup>。これらのプラスミドは *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) を宿主としても複製できる広宿主域プラスミドで、現在汎用している *L.*

*lactis* ベクターの基礎となっている。しかしその後の研究から、*L. lactis* に広く分布するほとんどのプラスミドは、pWVO2 および pCI305 に代表される  $\theta$ -複製型プラスミドであることが明らかとなった<sup>45</sup>。現在までに *L. lactis* で RC 型プラスミドを2種類以上保有する菌株は報告されておらず、*L. lactis* に内在する RC 型プラスミドは全て pWVO1-type ファミリーに属することが示唆されている<sup>80</sup>。pWVO2 ファミリーに属する  $\theta$ -プラスミドは宿主域が狭く、安定で、80–100 kb 程度の大型のプラスミドも報告されている。*L. lactis* の  $\theta$ -プラスミドの特徴として、乳発酵に必要な不可欠な表現形質をコードすることが上げられる。現在迄に、ラクトース資化、プロテイナーゼ活性、クエン酸取込み、ファージ耐性、バクテリオシン生産、粘性物質生産などの形質に関与するプラスミドが確認されている<sup>20, 76</sup>。*L. lactis* の内在プラスミドの種類や組合せは菌株ごとに異なり、菌株特異的な表現型を決定している。*L. lactis* の分離源は乳製品、生乳、漬物、生草など多岐にわたり、プラスミド構成を変えながら生育環境に適応していると考えられる。中には細胞内に10種類程度のプラスミドを保有する株も多く、未知機能の発見・解明が期待されている。

プラスミド研究ではプラスミド除去株と野生株の表現型比較を解析の端緒とすることも多く、複製が安定で、既存の方法では除去することが難しいプラスミドの解析は遅れている。従来プラスミド除去株の作出には、アクリジン色素等の変異剤添加培地での継代培養、高温培養、プロトプラスト形成、およびそれらの組合せ法が用いられている<sup>25, 31, 32, 60, 85</sup>。これらの方法では、比較的不安定なプラスミドが先に消失してしまうため、研究に都合の良いプラスミド除去株を、任意に作出することができなかった。また先に述べたように、乳酸菌細胞内のプラスミドの種類や組合せを変えることで、親株とは性質の違う菌株を新しく作出することができる。したがってプラスミド変異株を発酵スターターとして使うと、発酵製品の味や風味の改善が期待できる。しかし従来法では、通常発酵に必須な大型のプラスミドから除去されることから、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良方法としての適用は難しかった。さらに、変異剤は菌の遺伝子にランダムに作用するため、菌の生育や、発酵性能に関与する他の有用な遺伝子群の変異も同時に誘起するほか、有害な遺伝変異が被検菌に導入される可能性も否定できない。そのため、プラスミド除去に汎用されている従来法は、食品の発酵に利用するための菌株の改良には、安全面の点でも不向きであった。

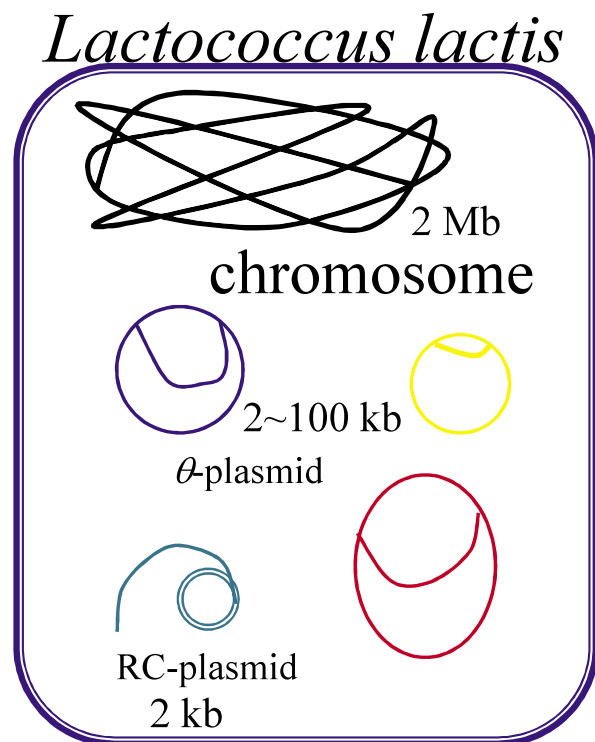


Fig. 1. Theta- replicating ( $\theta$ -) and rolling circle replicating (RC-) plasmids in *Lactococcus lactis*.

同一の細菌細胞内に、近縁の2種類以上のプラスミドが安定に共存できない性質は、「プラスミドの不和合性」として知られ、良く研究されている<sup>4, 12, 21, 65)</sup>。*L. lactis*の $\theta$ -型プラスミドの場合、プラスミドの増幅を制御している複製領域のうち、プラスミドの分配やコピー数などを決めている一部の遺伝子配列(不和合性決定配列)が一致すると、それらのプラスミドは不和合性となり、同一細胞内に安定して共存し続けることはできない<sup>4, 65)</sup>。そこで第1章ではプラスミド解析の効率化を目指し、*L. lactis*細胞内に複数種類内在している $\theta$ -プラスミドのうち任意の1種類を、不和合性を利用して選択的に除去する方法を開発した。この方法の最大の利点は、目的とするプラスミドの除去に際して、内在する他のプラスミド構成に影響しないことであり、発酵食品の製造に用いるスターター乳酸菌の育種法としても応用が可能である。そこで第2章では本法を用いたスターター乳酸菌株の実際の育種例について記述した。続いて第3章では、*L. lactis*に内在する8.7 kbのプラスミドを、選択的に除去することで高頻度に出現する発酵遅延変異株を試験に用い、除去したプラスミドの機能解析を行った結果について詳述する。得られた発酵遅延変異株では、乳資化性遺伝子群の転写活性が著しく低下していた。乳酸菌における菌株特異性には、保有遺伝子の構成や、配列のバリエーションに加えて、保有遺伝子の発現強度も大きく影響すると考えられている。本研究で除去した8.7 kbのプラスミドには、宿主DNAのメチル化配列を決定する因子がコードされていた。DNAのメチル化状態が、転写活性に影響することは周知の事実である<sup>11)</sup>。それゆえ本研究で作出した変異株が、DNAメチル化と菌株特異性との関連を解析するモデル菌株になるのではないかと期待している。本章では、プラスミド除去株で発現抑制を受けている遺伝子群を明らかにするとともに、発酵遅延の原因について考察した。

## 第1章 乳製品のスターター (*Lactococcus lactis* subsp.) に内在するプラスミドの選択的除去法の開発

### 緒 言

乳業用乳酸菌 *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) は、細胞内に通常複数のプラスミドを保有しており、発酵特性を支配している遺伝子群をコードしている場合が多い (Fig. 1)。緒論で述べた通り、*L. lactis* に広く分布するほとんどのプラスミドは、pWVO2-type の $\theta$ -複製型プラスミ

ドである<sup>45)</sup>。また Seegers らは、プラスミド複製領域のDNA配列を認識するプローブを用いてサザン解析を行い、1) *L. lactis* から分離されるプラスミドの大多数は、pWVO2-type のプラスミドファミリーであること、2) 多くの *L. lactis* 菌株は細胞内に、複数の pWVO2-type プラスミドを保有することを示している<sup>80)</sup>。pWVO2-type プラスミドは、複製に際してシスに働くDNA配列、すなわち複製起点 (*ori*) と、トランスに働き、*ori* 配列に特異的に結合してプラスミドの複製開始に働く複製開始因子 (RepB) を必要とする<sup>33)</sup>。通常 *ori* の3'側に隣接して RepB 遺伝子 (*repB*) がコードされている。pWVO2-type の *ori* の構造については、Kiewiet らが詳しく研究し<sup>45)</sup>、保存性が高く、アデニンおよびチミン残基に富む AT-rich box、続いて 22-bp の配列が 3.5 回繰り返される 22-bp repeat (イテロン)、および 2 セットのインバーテッドリピート配列 (IR1, IR2) を *ori* に特徴的な DNA 配列として報告している。イテロンをコードするプラスミド複製領域の詳細な構造と複製メカニズムは、大腸菌の F 因子や P1, *Pseudomonas* 由来の pPS10 などのプラスミドで研究が先行し、不和合性を決定する *ori* の DNA 配列をはじめ、複製開始に必要な複製開始因子の 2 量化や、*ori* との結合に関与するアミノ酸配列とモチーフなどが特定されている<sup>12, 21, 65)</sup>。

pWVO2-type ファミリーに属するプラスミドの複製領域は、互いに高い相同性を示す<sup>34, 45, 80)</sup>。*L. lactis* の細胞内に、同じファミリーに属し、相同性の高い複製モジュールを含む多数のプラスミドが不和合性を示さず、なぜ安定に共存するのかという疑問を解明するために、pWVO2-type プラスミドの複製領域の構造が詳しく研究されてきた<sup>29, 33, 37, 80)</sup>。Seegers らおよび Gravesen らは、*L. lactis*  $\theta$ -プラスミドおよび、P1 プラスミドなどイテロンをコードする既知のプラスミドの *ori* を比較し、pWVO2-type プラスミドでは、*ori* 内の 22-bp repeat と、22-bp repeat に重なる IR1 の配列が不和合性に関与していると結論した<sup>34, 80)</sup>。また RepB についても、既知複製因子との相同性やモチーフ解析から、*ori* との特異的結合や不和合性に関与するアミノ酸配列を推定している<sup>26, 34)</sup>。

*L. lactis* は、様々な分離源から得られ、環境に適応したプラスミド構成を持つ。したがってその機能が特定されていないプラスミドも多く残されている。プラスミドの機能解析においては、通常まずプラスミド除去株を作出し、除去株の表現形質と親株の表現形質を比較して研究の端緒とする。従って、対象とするプラスミドを選択

的に除去することができれば、プラスミド上の遺伝子機能や、関係する表現形質を効率良く推定することができる。また発酵の種菌（発酵スターター）として不可欠なプラスミドの保有状態を変えず、不必要なプラスミドを選択的に除去することができれば、スターターの改良にも便利である。しかし緒論で述べた通り、汎用されているプラスミド除去法では、除去するプラスミドを選べない。

外来プラスミドの導入によって、内在している近縁のプラスミドが不和合性となり選択的に除去される現象は、良く知られている<sup>12, 65)</sup>。近年 *L. lactis* に広く分布する pWVO2-type プラスミドの複製領域の構造について多くの知見が集積されており、*ori* および *repB* 配列のうち、不和合性やコピー数を決定する可変配列と RepB 構造の維持に必要な保存配列を推定できる。そこで、第1章では、効率的な *L. lactis* プラスミド研究と、発酵スターターの改良を目的とし、不和合性を利用したプラスミド除去法を検討した。

これまで不和合性な競合プラスミドをキュアリングに用いている例は多くあるが、競合プラスミドの作成には、目的プラスミドのレプリコンが用いられている。この点を改良すべく、著者は、pWVO2-type プラスミド複製領域の可変配列を効率よく増幅しうるプライマーペアを設計するとともに、保存配列を含むベクターを作成した。またそれらを用いて競合プラスミドを *in vitro* で合成し、*L. lactis*  $\theta$  -プラスミドを選択的に除去する方法を開発した。本法は、競合プラスミドの作成に際して、目的プラスミドの抽出や、シーケンシングによる複製領域の解析を必要とせず、PCRで複製領域の可変配列を増幅できれば、*L. lactis* で複製可能な競合プラスミドを作成できる点が簡便であり新規である。さらに本法は変異剤等を用いないことから、発酵に不都合な遺伝変異や、不可欠なプラスミドの脱落が起りにくいと考えられるため、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良にも利用できる。

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC1 は、5種類のプラスミドを保有し、*L. lactis* のプラスミド抽出に汎用されるマッケイらの方法で再現性良くトータルプラスミドが得られた。また以前、畜産試験場の藤田らは、*L. lactis* DRC1 の全プラスミドを除去し、プラスミドフリー株 *L. lactis* DRC1021 を育種している<sup>30, 97)</sup>。そこで、[不和合性を利用したプラスミドの除去] システムの構築に用いる  $\theta$  -プラスミドの供与菌として、*L. lactis* DRC1 を、維持するための宿主として *L. lactis*

DRC1021 を用いることとした。

## 第1節 *L. lactis* $\theta$ -複製型プラスミドの複製単位 (*ori-repB*) の取得

### 1. 材料および方法

#### 菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 1 にまとめた。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC1 は、National Institute for Research in Dairying (現在 Agricultural and Food Research Council (AFRC) of the Institute of Food Research, Shinfield, UK) から20年以上前に分譲された。*L. lactis* DRC1021 は、*L. lactis* DRC1 の全プラスミドを除去したプラスミドフリー株で、藤田らが作出した<sup>97)</sup>。*Escherichia coli* XL1-Blue は、プラスミドベクターおよび組換えプラスミドの宿主として用いた。プラスミドベクター pBluescript II は、遺伝子クローニングおよび *E. coli* - *L. lactis* シェットルベクターの作成に用いた。XL1-Blue と pBluescript II KS+ は、Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA, USA) から購入した。

#### 培地と培養条件

*L. lactis* の培養には TYG 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5% 塩化ナトリウム, 1% グルコース, 1% コハク酸ナトリウム; pH 6.8), TYL 培地 (1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5% 塩化ナトリウム, 1% ラクトース, 1% コハク酸ナトリウム; pH 6.8) または 10% スキムミルク培地を用い、30°C で静置培養した。*E. coli* は、LB 培地を用いて 37°C で震盪培養した。菌株を繰り返して継代培養する場合には、培養液を 0.1% 接種した。また平板培養には、各々の培地に 1.5% アガーを添加した培地を用いた。TYG 培地, TYL 培地および LB 培地は 121°C で 15 分間, 10% スキムミルク培地は 110°C で 10 分間, それぞれオートクレーブで滅菌し、培養に用いた。

#### プラスミドの調製と組換えプラスミドの作成

*E. coli* XL1-Blue プラスミド DNA の抽出は、Molecular Cloning: a laboratory manual second edition の記述に従って行った<sup>77)</sup>。*L. lactis* プラスミド DNA の抽出は、Anderson and McKay (1983) の方法で行った<sup>3)</sup>。*L. lactis* からプラスミド DNA を抽出する際には、10 mM DL-スレオニンを添加した TYG 培地 (TYG リシス培地) で一晩培養後、定常期の細胞を集菌して用いた。抽出した DNA 画分には、最終濃度が 1 mg/ml になるよ

Table 1. *L. lactis* Strains and Plasmids

Strains and Plasmids	Properties	References or sources
<b>Strains</b>		
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>		
DRC1	Wild type	Swartling (1951); Colling and Harrey (1962)
NIAI N7	Wild type	Lab. collection
527	Wild type	Lab. collection
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>		
NIAI712	Wild type	Lab. collection
IL1403	Plasmid-free derivative of IL594	Chopin <i>et al.</i> , (1984)
DRC1021	Plasmid-free derivative of DRC1	Fujita <i>et al.</i> , (1999)
DRC1121	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1521	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue		
<b>Plasmids</b>		
pGKV21	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> shuttle vector, Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	van der Vossen <i>et al.</i> , (1985)
pDR1-1	7.4 kb $\theta$ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study
pDR1-1B	7.3 kb $\theta$ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study
pDB1	Receptor vector, a partial replicon of pDR1-1B with an Em <sup>R</sup> gene cloned into pBluescriptII, Ap <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	This study
pCV(x)	Part of optional $\theta$ -replicon including incompatibility determinant cloned into pDB1, Em <sup>R</sup>	This study
pBLs1	pDR1-1 cloned into the Sall site of pBluescriptII, Ap <sup>R</sup>	This study
pBLb1	pDR1-1B cloned into the HincII site of pBluescriptII, Ap <sup>R</sup>	This study
pBluescriptII	<i>E. coli</i> cloning vector, Ap <sup>R</sup>	
p8Em1	pUC118 containing pAM $\beta$ 1 Em <sup>R</sup> gene	Ito <i>et al.</i> , (1992)
Em <sup>R</sup> , resistance to erythromycin; Ap <sup>R</sup> , resistance to ampicillin Lab. collection, National Institute of Livestock and Grassland Science collection		

うに RibonucleaseA (RNase A) を添加し, 37°C で 30 分間インキュベートし, RNA を分解した。RNase A 処理後, フェノール:クロロホルム (1:1) を等量加えて処理し, エタノール沈澱法でプラスミド DNA を精製した。プラスミド DNA の制限分解, 末端平滑化反応 (ブランチング), ライゲーション反応には, 各種制限酵素 (Toyobo, Osaka, Japan), DNA Blunting Kit (Takara, Otsu, Japan), Ligation Kit ver. II (Takara) を添付の使用説明書に従って用いた。

#### プラスミドおよび DNA フラグメントのアガロースゲル電気泳動

*L. lactis* から抽出したトータルプラスミドおよび制限酵素で切断した DNA フラグメントは, 0.8% または 1% LO3-アガロース (Takara) で調製した 52 mm (W) × 60 mm (L) ゲル, あるいは 107 mm (W) × 60 mm (L) ゲルを用い, Mupid-2 (Advance, Tokyo, Japan) を使用して泳動し, 分画した。電気泳動バッファーには, 1 × TBE バッファー (89 mM トリス-ホウ酸, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) を用い, 100 V で 30 分~1 時間泳動した。



泳動終了後のアガロースゲルは、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線ランプ照射下で観察した。アガロースゲル電気泳動で分画したプラスミドおよび DNA フラグメントの抽出と精製には、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) を用いた。

## 形質転換

### 1) 大腸菌の形質転換

*E. coli* XL1-Blue の形質転換は、Molecular Cloning: a laboratory manual second edition の記述に従って行った<sup>77)</sup>。形質転換体は 50 mg/ml のアンピシリンナトリウム (Ap) を添加した LB 寒天プレートで選択した。また組換えプラスミド保有菌は、Ap に加えて、IPTG (0.5 mM) と X-Gal (100 mg/ml) を添加した LB 寒天プレートで選択した。

### 2) 選択マーカーを有するプラスミドベクターまたは組換えプラスミドによる *L. lactis* の形質転換

*E. coli* - *L. lactis* シャトルベクター pGKV21 (エリスロマイシン耐性; Em<sup>R</sup>, クロラムフェニコール耐性; Cm<sup>R</sup>) および Em<sup>R</sup> フラグメントを有する組換えプラスミドによる *L. lactis* の形質転換は、Bio-Rad gene pulser (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) を使用し、Holo and Nes の記述に従って、エレクトロポレーション法で行った<sup>38)</sup>。すなわち、あらかじめ氷冷した 2 mm gap のエレクトロポレーションキュベットに、プラスミド DNA (10 ng) と 40 ml のコンピテントセルを混合して入れ、25 mF, 200 Ω and 2.5 kV のシングルパルスに暴露しプラスミドを導入した。パルス暴露直後に 1 ml の SGM17 培地 (GM17 (Difco, Detroit, USA) containing 1% glucose, 20% sucrose) をキュベットに添加し、30℃ で 1.5 時間復帰培養した。培養後、100 ml あるいは 10 ml の培養液をエリスロマイシン (Em) (5 mg/ml) 添加 SR アガープレート (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% glucose, 20% sucrose, 2.5% gelatin, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 1.5% agar, ;pH 6.8) に塗布し、30℃ で 1 晩~3 日間静置培養し、Em 耐性を指標に形質転換体を分離した。

### 3) 野生型プラスミドによる *L. lactis* の形質転換

プラスミド内に、Em<sup>R</sup> などの選択マーカー遺伝子の配列を含まない非組換え *L. lactis* プラスミド (wild type plasmid) を用いた形質転換体の取得には、pGKV21 (Em<sup>R</sup>) をインジケータープラスミドとして用いた<sup>16, 51)</sup>。

方法の概略は Fig. 2 に示した。すなわち、Bio-Rad 社製のエレクトロポレーションキュベットに、*L. lactis* プラスミド画分 (100 ng), pGKV21 (10 ng) および 40 ml のコンピテントセルを混合して入れ、2) と同条件のシングルパルスに暴露し、プラスミドを導入した。形質転換体は、まず Em 添加 SR 寒天プレートで培養し、Em<sup>R</sup> コロニーを単離した。次に単離した各々の Em<sup>R</sup> 菌株からプラスミドを抽出してアガロース電気泳動でプラスミドプロファイルと比較し、pGKV21 の他に、同時に導入した *L. lactis* プラスミドを保有する菌を探索した。分離した菌株を TYG 培地に植菌し、39℃ で連続して継代培養することで、内在する pGKV21 を除去した。

## DNA 配列解析

供試した *L. lactis* プラスミドを適当な制限酵素で切断し、pBluescript II のマルチクローニングサイトにクローニングした。次に Deletion Kit for Kilo Sequencing (Takara) を用いてデリションクローンを作成し、シークエンスのテンプレートとして用いた。Taq dye-primer cycle sequencing kit と M13 universal dye primer (Perkin Elmer) を用いてシークエンス反応し、Applied Biosystems 373A automated DNA sequencer (Applied

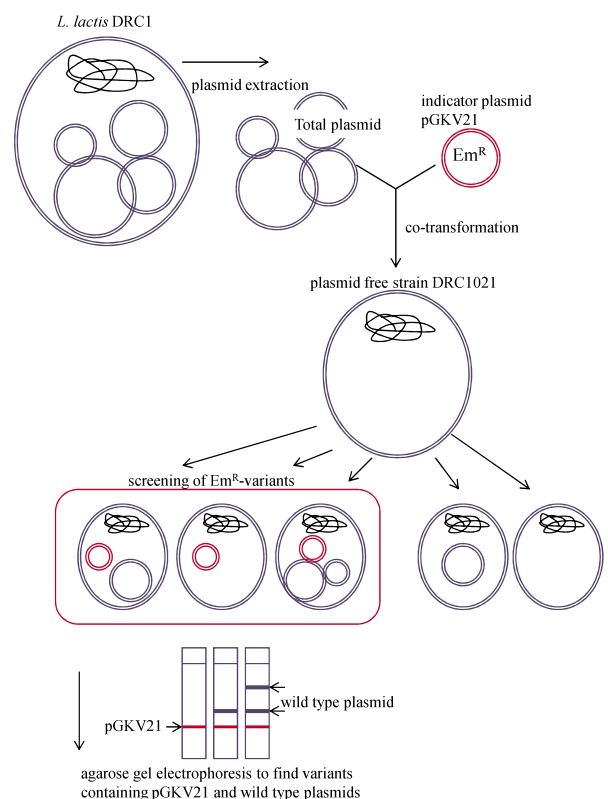


Fig. 2. Isolation of variants containing an indicator pGKV21 and wild type plasmids.

Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて配列データを得た。配列データは Genetyx-Mac ver.9.0.1 を用いて解析した。ORF 解析および相同性解析には、BLAST または FASTA 解析を用いた<sup>2, 69)</sup>。

## 2. 結果

### $\theta$ -型プラスミド pDR1-1 および pDR1-1B の単離

*L. lactis* DRC1 からトータルプラスミドを抽出し、0.8% アガロースゲル電気泳動でプラスミドプロファイル調べた (Fig. 3)。*L. lactis* DRC1 のプラスミドは、以前藤田らが研究し、クエン酸透過性プラスミド (pDR-Cit: 8.3 kb)、乳糖およびカゼイン資化性プラスミド (pDR-Lac: 50 kb)、バクテリオシン生産性プラスミド (約 60 kb; 本研究で用いた電気泳動の条件では泳動されなかった。) を同定しているが、最も分子量の小さい多コピープラスミド pDR1-1 の機能は報告されていない<sup>97)</sup>。乳糖資化性遺伝子群の構成遺伝子 *lacG* (phospho-b-galactosidase gene), *citP* (citrate permease gene) を認識するプローブを用いてサザン解析を行い確認した所、約 50 kb のプラスミドバンドが *lacG*-プローブで、約 8 kb のバンドが *citP*-プローブで認識された (Fig. 3)。

*L. lactis* DRC1 のトータルプラスミドと、インジケータープラスミド (pGKV21) を 10 : 1 の比率で混合し、プラスミドフリー株 *L. lactis* DRC1021 に導入し、*L. lactis* DRC1 由来の wild type プラスミドを 1 個以上保有する形質転換体 9 株 (DRC1121 ~ DRC1921) を得た。そのうち DRC1121 と DRC1521 には、共に pDR1-1 に相当するプラスミドが導入されていた。しかし制限酵素処理の結果、DRC1121 には *SacI* で切断される約 7.5 kb のプラスミドの導入、DRC1521 には *BamHI* で切断される約 7.5 kb のプラスミドの導入が確認された。このことは、アガロースゲル電気泳動で、pDR1-1 とされていたプラスミドバンドは、少なくとも 2 種類のプラスミドを含んでいたことを示唆している。そこで、*SacI* で切断されるプラスミドを pDR1-1、*BamHI* で切断されるプラスミドを pDR1-1B と名付けた。

### 塩基配列分析

*L. lactis* DRC1 の wild type plasmid pDR1-1 および pDR1-1B は *HincII* で 1 箇所切断された。そこで pBlue-script II の *SalI* サイトに両プラスミドをクローニングし、pBLs1 および pBLb1 を作成した。pBLs1 および pBLb1 のデリベーションクローンをシーケンシ、両プラスミドの全配列を決定した (Fig. 4)。その結果、

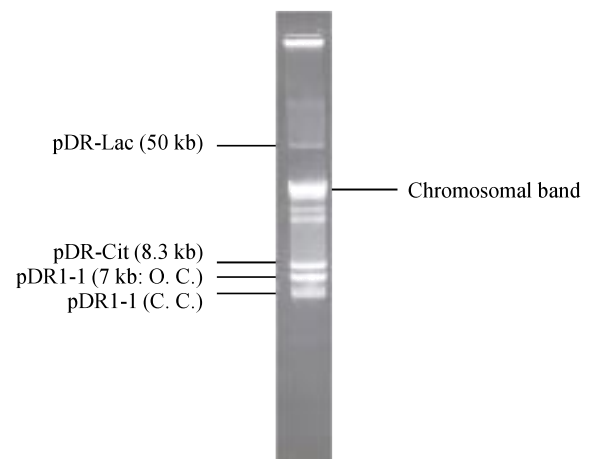
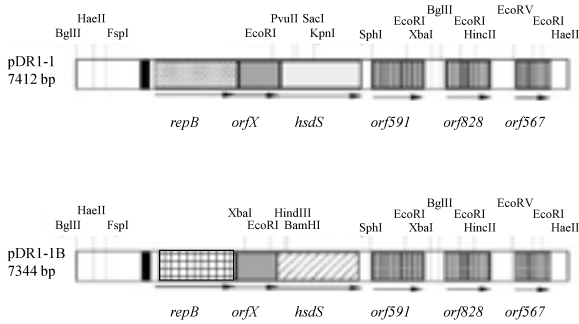


Fig. 3. Plasmid profile of *L. lactis* DRC1. Southern hybridization showed that pDR-Lac contained *lac* genes, pDR-Cit contained *citP* gene. C. C. indicates closed circular plasmid. O. C. indicates open circular plasmid.

pDR1-1 と pDR1-1B の大きさはそれぞれ 7412 bp および 7344 bp で、その GC 含量はどちらも 33.7% だった。またその制限酵素地図は、一部の領域を除いて一致していた。オープンリーディングフレーム (ORF) 解析の結果、両プラスミド共に 6 個の ORF が見つかった。pDR1-1 および pDR1-1B の ORF の大きさと相同性解析の結果を Table 2 に示した。pDR1-1、pDR1-1B 両プラスミドにおいて、第 1 番目の ORF は、*L. lactis* に広く分布している  $\theta$ -複製型プラスミドの複製開始因子遺伝子 (*repB*) と高い相同性があった。*repB* の開始コドンの 10 - 15 bp 上流にはリボソーム結合部位 (RBS), 77 ~ 104 bp 上流にはプロモーター配列 (-10, -35) が存在し、113 - 188 bp 上流には、22-bp フラグメントの 3.5 回繰返し配列 (22-bp repeat), さらに上流に保存性が高く、AT 塩基に富んだ配列 (AT-rich Box) を含む  $\theta$ -プラスミドの複製起点 (*ori*) が存在した。通常 *L. lactis* の  $\theta$ -プラスミドでは、*repB* 配列直後に、プロモーター配列の無い 1 ないし 2 つの ORF が隣接し、*repB* と共に複製領域を形成している<sup>79, 80)</sup>。

pDR1-1 および pDR1-1B においても、*repB* 直下に *L. lactis* プラスミド pCIS3 で最初に報告された *orfX*, さらに下流に type I 制限・修飾システムの認識サブユニット遺伝子 (*hdsS*) と相同性の高い ORF が隣接していた<sup>29, 79)</sup>。また *orfX* および *hdsS* 上流にはプロモーター配列が存在しないことから、*repB-orfX-hdsS* はオペロンを形成し、*repB* 上流のプロモーターによって転写されること



**Fig. 4. Physical and genetic map of plasmid pDR1-1 and pDR1-1B in *L. lactis* DRC1.**  
Same patterns indicate the same DNA sequences.

が示唆された (Fig. 4)。pDR1-1 の *repB*, *orfX*, *hsdS* はそれぞれ 423 アミノ酸残基, 214 アミノ酸残基, 414 アミノ酸残基をコードしていた。また pDR1-1B の *repB*, *orfX*, *hsdS* はそれぞれ 386 アミノ酸残基, 211 アミノ酸残基, 414 アミノ酸残基をコードしていた。pDR1-1 および pDR1-1B の *repB-orfX-hsdS* 領域 (各々約 3.4 kb, 3.3 kb) の配列は 77.4% 一致した。一方 *repB-orfX-hsdS* 以外の配列は, 95% 以上一致した。一致領域に含まれる 3 つの ORF のうち, ORF519 と ORF567 は, 他の乳酸菌で報告されている integrase / recombinase (*int / rec*) と高い相関性があった<sup>1, 17, 18, 26)</sup>。一方 ORF828 の機能は報告されていない。

pDR1-1 および pDR1-1B の複製単位 (*ori-repB*) の遺伝子配列を, DDBJ データバンクの既知配列と比較解析したところ, pDR1-1 の複製単位は新規であったが, pDR1-1B の複製単位は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UC317 の pCI305, および *L. lactis* subsp. *lactis* DPC721 の pAH33, さらに *L. lactis* subsp. *cremoris* UC509.9 の pCIS3 で既に報告されている配列と一致した (Fig. 5)

29, 37, 67, 79)。この結果は, pDR1-1B の複製単位をコードする野生型プラスミドが, *Lactococcus* 属乳酸菌に広く分布していることを示唆する。本研究で解析した pDR1-1 および pDR1-1B の全配列は, DDBJ に登録した。アクセッションナンバーは AB079381 (pDR1-1) および AB079380 (pDR1-1B) である。

**3. 考察**

本研究では, *L. lactis* に広く分布している  $\theta$ -プラスミドを選択的に除去するために,  $\theta$ -プラスミドの複製単位を *in vitro* で再構築し, 不和合性プラスミドを作成することを計画した。任意の *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドに対する不和合性プラスミドの作成に際しては, 1) 複製単位の再構築に共通して用いることのできるプラスミドベクターの作成, 2) 任意の *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの不和合性配列を増幅しうる PCR プライマーペアの設計が必要である。

$\theta$ -複製型プラスミドの供与菌としては, 研究室保存株 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC1 を用いた。*L. lactis* DRC1 の 3 種類のプラスミドの機能は既に特定されているが, 最も分子量の小さい多コピープラスミド pDR1-1 の機能は明らかにされていない。またサザン解析によって, pDR1-1 は, *L. lactis* DRC1 のクエン酸透過性プラスミドの *repB* と相関性のある配列を含むことが示されている (未発表)。そこで, pDR1-1 が多コピーで複製しうる  $\theta$ -型の複製領域 (*ori + repB*) を含むと予想し, 目的とするベクター構築のための素材とした。

*L. lactis* DRC1 全プラスミドをアガロースゲル電気泳動で分離し, ゲルから抽出・精製した pDR1-1 のプラスミドバンドは, 2 つの異なるプラスミド pDR1-1 および pDR1-1B を含んでいた。pDR1-1 と pDR1-1B の両プラ

**Table 2. ORF encoded by pDR1-1 and pDR1-1B**

pDR1-1						
name	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsdS</i>	<i>orf591</i>	<i>orf828</i>	<i>orf567</i>
gene	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsdS</i>	<i>int / rec</i>	unknown	<i>int / rec</i>
size (bp)	1,302	699	1,314	591	828	567
pDR1-1B						
name	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsdS</i>	<i>orf591</i>	<i>orf578</i>	<i>orf567</i>
gene	<i>repB</i>	<i>orfX</i>	<i>hsd</i>	<i>int / rec</i>	unknown	<i>int / rec</i>
size (bp)	1,224	633	1,314	591	828	567
similarity to						
pDR1-1 (%)	68.8%	67.3%	71.5%	100%	100%	100%

pDR1-1B	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PLKMP	FELAV	SCIN	54
pCI305	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PLKMP	FELAV	SCIN	54
pAH33	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PLKMP	FELAV	SCIN	54
pCIS3	1	MSSISKNEH	NC	KQVG	---	LNELSKRKVV	EHNSLIT	SI	AKMDKT	PLKMP	FELAV	SCIN	54
pDR1-1	1	MEI	IA	KKYHY	NY	SDNER	VCS	L	K	E	I	K	60
pDR1-1B	55	TEEPPKDHT	VYLS	SKEEL	F	AF	F	K	V	S	D	N	112
pCI305	55	TEEPPKDHT	VYLS	SKEEL	F	AF	F	K	V	S	D	N	112
pAH33	55	TEEPPKDHT	VYLS	SKEEL	F	AF	F	K	V	S	D	N	112
pCIS3	55	TEEPPKDHT	VYLS	SKEEL	F	AF	F	K	V	S	D	N	112
pDR1-1	61	EDN	P	P	K	N	H	I	L	S	N	T	120
pDR1-1B	113	SIVPIPY	VEWTD	YHDD	V	K	I	E	F	H	R	E	172
pCI305	113	SIVPIPY	VEWTD	YHDD	V	K	I	E	F	H	R	E	172
pAH33	113	SIVPIPY	VEWTD	YHDD	V	K	I	E	F	H	R	E	172
pCIS3	113	SIVPIPY	VEWTD	YHDD	V	K	I	E	F	H	R	E	172
pDR1-1	121	V	I	S	P	L	E	E	T	T	N	D	180
pDR1-1B	173	MNYNQ	YEHYS	YKGG	R	R	E	E	Q	V	E	A	232
pCI305	173	MNYNQ	YEHYS	YKGG	R	R	E	E	Q	V	E	A	232
pAH33	173	MNYNQ	YEHYS	YKGG	R	R	E	E	Q	V	E	A	232
pCIS3	173	MNYNQ	YEHYS	YKGG	R	R	E	E	Q	V	E	A	232
pDR1-1	181	MNYNQ	YEHYS	YKGG	R	R	E	E	Q	V	E	A	240
pDR1-1B	233	I	N	E	N	T	S	F	N	V	T	Y	292
pCI305	233	I	N	E	N	T	S	F	N	V	T	Y	292
pAH33	233	I	N	E	N	T	S	F	N	V	T	Y	292
pCIS3	233	I	N	E	N	T	S	F	N	V	T	Y	292
pDR1-1	241	I	N	E	N	T	S	F	N	V	T	Y	299
pDR1-1B	293	K	-	A	M	E	S	K	Y	T	R	L	351
pCI305	293	K	-	A	M	E	S	K	Y	T	R	L	351
pAH33	293	K	-	A	M	E	S	K	Y	T	R	L	351
pCIS3	293	K	-	A	M	E	S	K	Y	T	R	L	351
pDR1-1	300	A	G	E	N	L	K	Y	T	K	L	L	359
pDR1-1B	352	S	S	K	K	E	A	Y	S	K	R	N	386
pCI305	352	S	S	K	K	E	A	Y	S	K	R	N	386
pAH33	352	S	S	K	K	E	A	Y	S	K	R	N	386
pCIS3	352	S	S	K	K	E	A	Y	S	K	R	N	386
pDR1-1	360	A	S	K	K	E	A	Y	S	K	R	N	407

Fig. 5. Alignment of the RepB of pDR1-1B, pDR1-1 and three lactococcal plasmids.

Amino acid sequences identical to RepB of pDR1-1B are boxed.

The complete plasmid sequences of pDR1-1, pDR1-1B, pCI305 (Hayes *et al.* 1991), pAH33 (O'sullivan *et al.* 2000), and pCIS3 (Seegers *et al.* 2000) have been assigned to DDBJ with accession numbers AB079381, AB079380, AF179848, AF207855, and AF153414, respectively.

スミドは、*ori-repB-orfX-hsdS* 遺伝子クラスターからなる典型的な  $\theta$ -型複製モジュールをコードしていた。*L. lactis*  $\theta$ -型プラスミドの複製モジュール内に頻繁に見出される *hsdS* は、Type-I 制限/修飾の認識サブユニット HsdS をコードしており、プラスミドの複製には関与しない<sup>29, 79)</sup>。HsdS は乳酸菌細胞内で自己と非自己遺伝子を見分ける役割を担い、バクテリオファージ感染など外来遺伝子の侵入防御に働くプラスミド性因子である<sup>8)</sup>。多くのファージとファージの進化に対抗するためには、認識配列の異なる多くの HsdS 種を細胞内に発現

している必要がある。*L. lactis* の細胞内に複数共存する  $\theta$ -型プラスミドの *ori-repB-orfX-hsdS* 配列は、しばしば相同組換えを起こすことが知られている。その結果、親プラスミドと異なる不和合性グループに属し、かつ異なる DNA 配列を認識する '新 HsdS' をコードする組換えプラスミドを生じさせる<sup>67)</sup>。O' Sariban らは、内在プラスミドとは配列の異なる *hsdS*-コードプラスミドの導入によって、ファージ抵抗性が高まることを報告している。*L. lactis* DRC1 から分離した双子プラスミド pDR1-1 と pDR1-1B も、おそらくファージ感染に対抗する進化

の過程で生じたものであろう。FASTA プログラムによる相同解析の結果、pDR1-1 の *ori-repB-orfX-hsdS* 配列は新規であったが、pDR1-1B の同配列は、*L. lactis* subsp. *lactis* および *L. lactis* subsp. *cremoris* のプラスミドで既に 100% 一致した配列が報告されていた。この結果は、pDR1-1B と同じ複製単位を有する野生型プラスミドが、*Lactococcus* 属乳酸菌に広く分布することを示唆する。もしかすると pDR1-1B の *repB* 配列の方が系統進化的に古く、pDR1-1 は pDR1-1B から派生したものかも知れない。

本研究で計画したプラスミドベクターの構築と、任意の *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの不和合性配列を増幅できる PCR プライマーペアの設計には *Lactococcus* 属乳酸菌に広く分布する  $\theta$ -型複製単位の利用が望ましいと考えた。そこで、pDR1-1B の複製単位の配列を利用することとした。

## 第2節 不和合性誘導プラスミドの作成

### 1. 材料および方法

#### 菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 1 にまとめた。pAMb1 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子 ( $Em^R$ ) とマルチクローニングサイトを含む p8Em1 は、明治乳業の佐々木博士から分譲して頂いた。

#### 培地と培養条件

*L. lactis* の培養には TYG 培地または TYL 培地を用い、30°C で静置培養した。*E. coli* は、LB 培地を用いて 37°C で振とう培養した。また平板培養には、各々の培地に 1.5% 寒天を添加した培地を用いた。培地は 121°C で 15 分間オートクレーブして滅菌し、培養に用いた。

#### プラスミドの調製と組換えプラスミドの作成

*E. coli* プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分解、ランニング、ライゲーション反応は、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。

#### プラスミドおよび DNA フラグメントのアガロースゲル電気泳動

プラスミドおよび DNA フラグメントは、1% LO3-アガロースゲル 52 mm (W) × 60 mm (L) あるいは 107 mm (W) × 60 mm (L) を用い、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。アガロースゲル電気泳動で分画し

たプラスミドおよび DNA フラグメントの抽出と精製には、QIAquick Gel Extraction Kit を用いた。

### 形質転換

#### 1) 大腸菌の形質転換

プラスミドベクターの作成および増幅には、宿主として *E. coli* XL1-Blue を用いた。形質転換は、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。ベクターを保有する形質転換体は Ap (50 mg/ml) と Em (500 mg/ml) を添加した LB アガー培地で選択し、継代培養および保存には Ap 添加 LB 培地を用いた。

#### 2) *L. lactis* の形質転換

*L. lactis* の形質転換は、第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。Em<sup>R</sup> 遺伝子を有する組換えプラスミドによる *L. lactis* の形質転換では、10 ng の組換えプラスミド DNA を用いて第 1 章、第 1 節に記述した方法で行った。不和合性誘導プラスミドの導入には、精製したプラスミド DNA を 10 ng あるいは 100 ng 用いた。

### Polymerase chain reaction (PCR)

PCR には、Perkin-Elmer 社 (Wellsley, MA, USA) 製の GeneAmp PCR System 2400 と、KOD-plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて、20 ml あるいは 50 ml 容量の反応液で PCR 反応を行った。テンプレートには DNA を 1 ng/ml 程度に希釈し、2 ml 用いた。pDR1-1B の複製配列上の、PCR プライマーの認識部位および増幅フラグメントの名称を Fig. 6 に図示した。

pDR1-1B の *ori* 配列の上流部分を含むフラグメントを (Fub1)、および pDR1-1B の *repB* の下流部分を含むフラグメントを (FDb1) と名付け、Fub1 と FDb1 を増幅できる PCR プライマーを設計した。その増幅条件は、ヒートショック 94°C で 2 分間保持、続いて 1) 変性、94°C で 15 秒、2) アニーリング 53°C で 30 秒、3) 伸長 68°C で 45 秒、1) ~ 3) の反応を 40 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分間保持した。これまでに報告されている *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの複製領域との DNA 配列の比較から、Fub1 は  $\theta$ -型複製単位の 5' 側不変配列、すなわち AT-rich Box を含むように設計した。また FDb1 は、*repB* の 3' 領域を含むように設計した (Fig. 6)。pDR1-1B の *ori* 配列の 22-bp repeat, IR1、および *repB* の上流部分を含む可変領域 (variable fragment) すなわち「pDR1-1B 不和合性決定配列」を VF と名付けた。VF を増幅し、Fub1 と FDb1 間に結合できる PCR プラ

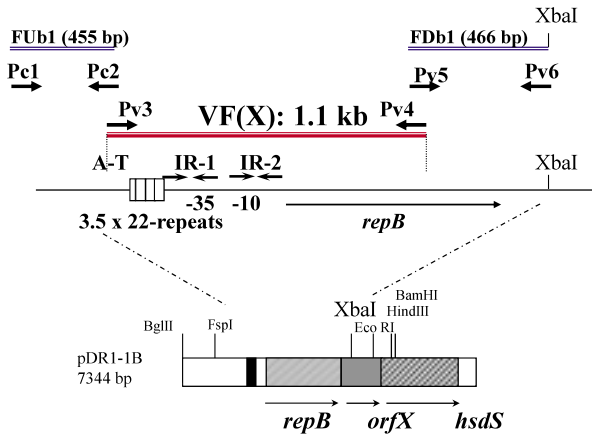


Fig. 6. Genetic organization of the replication module pDR1-1B and positions of PCR primers to amplify Fub1, FDb1, and VF(X).

Relevant features of the plasmids and noticeable restriction sites are indicated. Thin arrows indicate ORFs. The rightward- and leftward-pointing thick arrows indicate the relative positions of PCR primers Pc1, Pc2, Pv3, Pv4, Pc5, and Pc6. The Fub1, FDb1, and VF(X) correspond to the PCR fragments resulting from the amplification of Pc1-Pc2, Pc5-Pc6, and Pv3-Pv4 primer sets, respectively. The A-T, 22-repeat, IR1 and IR2 correspond to the A-T rich box, 22 bp direct repeats, and two inverted repeats in replication origin, respectively.

イマーを設計した (Fig. 6)。VF の増幅条件は、ヒートショック 94℃で2分間保持, 続いて1) 変性, 94℃で15秒, 2) アニール 45℃で30秒, 3) 伸長 68℃で2分, 1) ~ 3) の反応を40サイクル行い, 最後に68℃で7分間保持した。PCR反応後の増幅産物はすべてPCR purification Kit (Takara) で精製した。

## 2. 結果

### pDR1-1B の複製単位を再構成するためのスキームとプライマーの設計

pDR1-1B の複製単位は, *ori* 配列および386アミノ酸残基をコードする *repB* からなる。pDR1-1B の複製単位を *in vitro* で再構成するためのスキームと, 複製単位の部分配列を増幅しうるプライマーの位置を, Fig. 6 に示した。*L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの複製単位における, 5'側共通配列 (Fub1) を増幅するために, pDR1-1B の複製起点上流を認識するフォワードプライマー Pc1, AT-rich-box を認識するリバースプライマー Pc2 を設計した。3'側共通配列 (FDb1) を増幅するために, pDR1-1B の *repB* 内部配列を認識するフォワードプライマー Pc5, *repB* を認識するリバースプライマー Pc6 を設計した。さらに pDR1-1B の不和合性決定配列を増幅するために, AT-rich-box を認識するフォワードプライ

マー Pv3, *repB* 内部配列を認識するリバースプライマー Pv4, を設計した (Fig. 6)。設計したプライマーの配列と, 予想される増幅産物の大きさを Table 3 に示した。

緒言でも言及したが, これまでに配列が決定され, データベースに登録されている *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの *ori* 配列の比較から, *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの不和合性は, 22-bp repeat と IR1 の配列によって決定されることが示唆されている<sup>28, 33)</sup>。Fig. 7 には, pDR1-1B の *ori* 配列と, プライマー Pc2 と Pv3 の位置, および DNA 配列を示した。図中の四角で囲った AT-rich-box は, 特に保存性の高い配列であることから, この部分を認識するフォワードプライマー Pv3 とリバースプライマー Pc2 を図の様に設計した。Pc1 - Pc2 で増幅される Fub1 を市販ベクター pBluescript II に組込むために, Pc1 配列内に BanIII サイトを, Pc2 配列内に EcoRI サイトを作った。また Pv3 - Pv4 で増幅される pDR1-1B の不和合性決定配列と結合するために, Pc2 配列内に NruI サイトを作った。Fig. 8 には, pDR1-1B の *repB* と推定アミノ酸配列, およびプライマー Pv4, Pc5, Pc6 の位置とその DNA 配列を示した。*L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの RepB は, *E. coli*, *B. subtilis*, で報告された  $\theta$ -型プラスミドの複製因子と比較され, プラスミドの複製開始に働く2量化, コピー数制御, *ori* 特異的 DNA 結合活性に関与するアミノ酸配列が特定されている<sup>12, 26)</sup>。Fig. 8 ではそれぞれを実線, 二重線, 太線で示した。図中の点線で示した部分は, 特に保存性の高い配列であることから, この部分を認識するリバースプライマー Pv4 とフォワードプライマー Pc5 を図の様に設計した。Pc5 - Pc6 で増幅される FDb1 を pBluescript II に組込むために, Pc5 配列内に PstI サイトを作った。また Pv3 - Pv4 の増幅断片と結合するために, Pv4 および Pc5 配列内に XhoI サイトを作った (Fig. 8)。

### ベクターの構築

pB1b1 をテンプレートとして PCR 反応を行い, 455 bp の Fub1 と, 466 bp の FDb1 を得た。Fub1 を BanIII および EcoRI で, FDb1 を PstI と XbaI でそれぞれ制限分解し, pBluescript II の BanIII - EcoRI サイトおよび PstI - XbaI サイトにクローニングした。またその SacI サイトに, p8Em1 を SacI 分解して得た Em<sup>R</sup> フラグメントをクローニングし, pDB1 と名付けた (Fig. 9)。プラスミドベクター pDB1 は, pBluescript II 由来の *ori* を有するので *E. coli* を宿主として増幅できるが, pDR1-1B の複製単位から, *ori* と *repB* の一部約 1.1-kb からなる不和合

Table 3. Oligonucleotide primers and probes used in this study

Primer	Gene target	Fragment size (bp)	Sequence
		445 bp	
Pc1	upstream sequence of <i>ori</i>		AACGCTCTAAAAATCGATTAAAGCGA * containing a substitution (boldface) generating a BanIII site
Pc2	AT-rich box in <i>ori</i>		AAAGAATTCGCGATAAATATATATATAGGC * containing six substitutions (boldface) generating a NruI and an EcoRI site
		1,100 bp	
Pv3	AT-rich box in <i>ori</i>		ATATTATGCATATATATTTAATCTTTTGTCTTTTG * containing four substitutions (boldface) generating an Eco22II site
Pv4	consensus sequence in <i>repB</i>		TTTATCCTCGAGCTTGTAGCTGTTATCATCTGC * containing three substitutions (boldface) generating an XhoI site
		466 bp	
Pc5	consensus sequence in <i>repB</i>		CAGCTGCAGGCTCGAGGATAAAGATTATCAATCCGA * containing five substitutions (boldface) generating a PstI site and an XhoI site
Pc6	downstream sequence of <i>repB</i>		CTGGAGAGTATCATCTGCTTCATCAATA

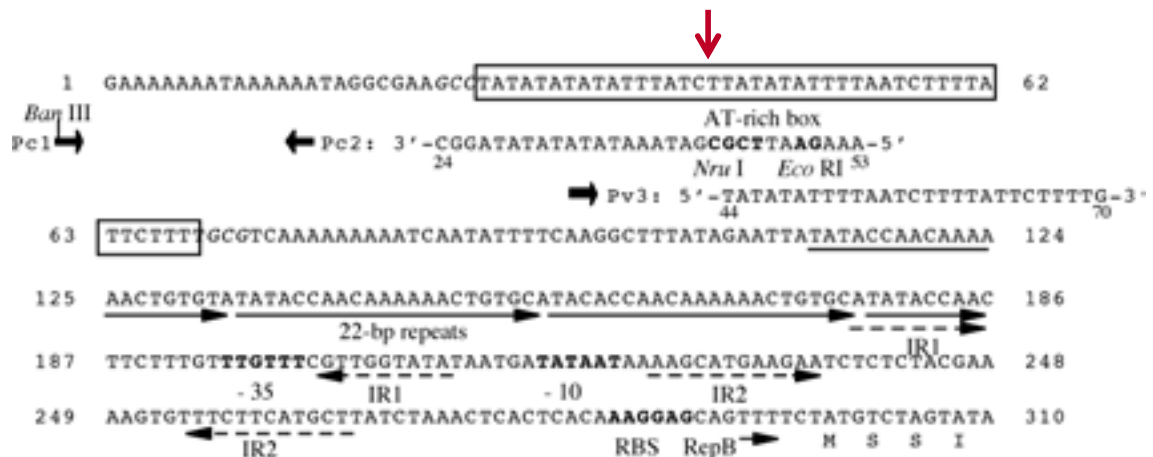


Fig. 7. Replication origin of pDR1-1B.

The -35 and -10 boxes of *repB* promoter and RBSs are indicated in boldface. AT-rich boxes among the q-replicons are boxed. The solid arrows indicate 22-bp direct repeats. The dashed arrows indicate two inverted repeats, IR1 and IR2. The PCR primers Pc1 (5'-AACGCTCTAAAAATCGATTAAAGCGA-3'), Pc2, and Pv3 are illustrated at their positions, and nucleotide substitutions are indicated in boldface. The red arrow indicates a substitution of one nucleotide in the AT-rich box when synthetic replicons were constructed.

性決定配列を欠失しているため、*L. lactis* では複製できなかった。

#### 親プラスミド pDR1-1B の複製単位の再構成

pBlb1 をテンプレートとして PCR 反応を行い、1.1-kb の特異的フラグメントを増幅し、VF5 と名付け

た。VF5 を XhoI で制限分解した後、pDB1 の NruI - XhoI サイトに結合し、pDR1-1B に対する不和合性誘導プラスミド作成し pCV5 と名付けた。pCV5 は、NruI サイトの導入に起因し、AT-リッチボックス内に 1 塩基置換された (Fig. 7)。また XhoI サイトの導入に起因し、*repB* 内に 3 塩基置換された (Fig. 8)。ただし *repB* 内の

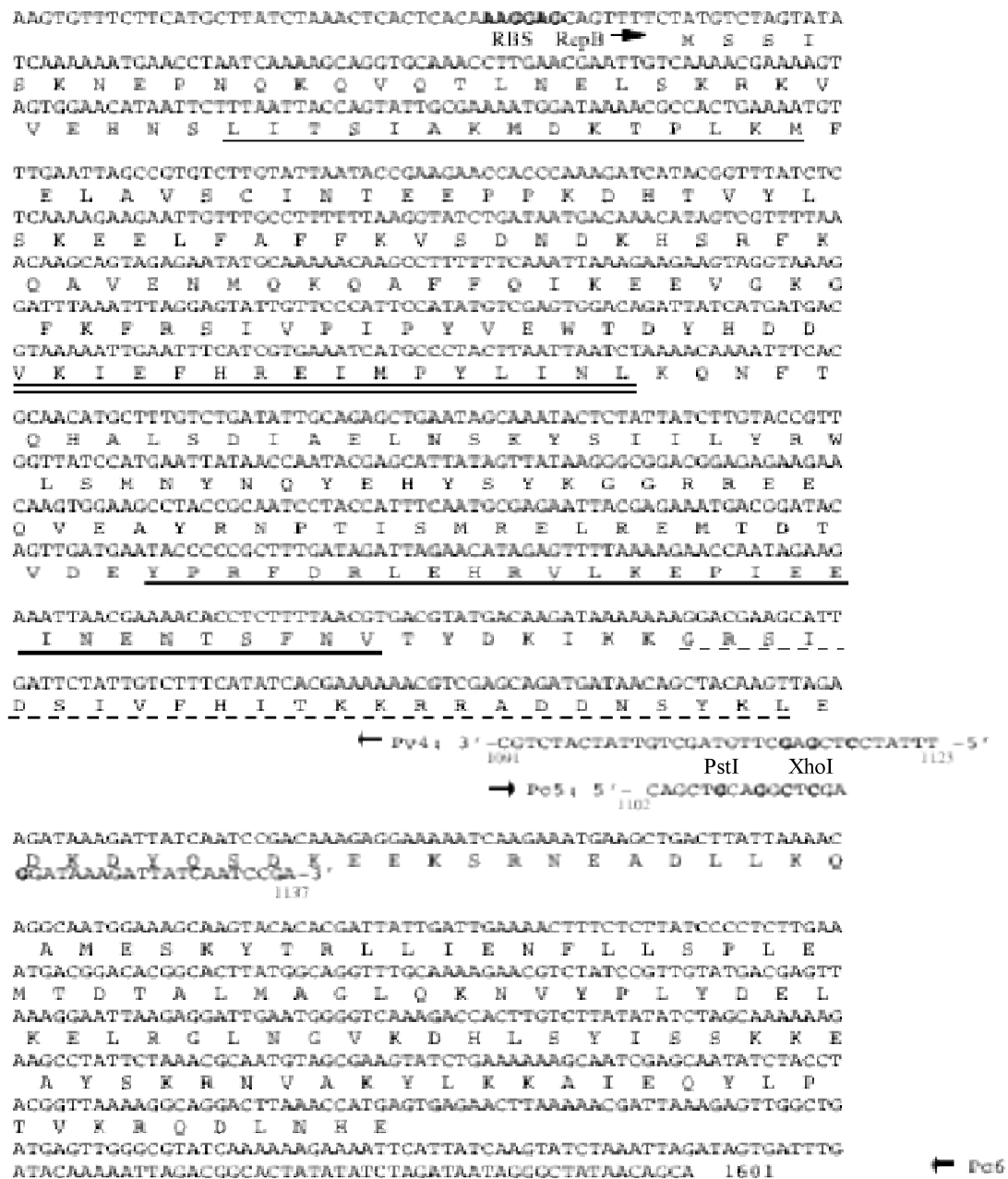


Fig. 8. RepB of pDR1-1B.

The one-letter code is used for deduced amino acid sequences. The thin line indicates the conserved domain of RepB for protein dimerization. The double line indicates the conserved domain for copy number control. The thick line indicates the conserved domain for governing ori-specific interactions. The dashed line indicates conserved amino acid sequences, which were located from 249 to 272, among lactococcal  $\theta$ -replicons.

The PCR primers Pv4, Pc5 and Pc6 (5'-CTGGAGAGTATCATCTGCTTCATCAATA-3') are illustrated at their positions, and nucleotide substitutions are indicated in boldface.

塩基置換はアミノ酸配列には影響しない。

#### pCV5 の *L. lactis* における複製能の確認

再構成した複製単位を持つ pCV5 の *L. lactis* での複製能の回復を確かめるために、*L. lactis* DRC1021 にエレクトロポレーションで導入し、エリスロマイシン耐性を指標に形質転換体を 16 株取得した。アガロース電気泳

動の結果、全ての形質転換体で 6.1 kb プラスミド pCV5 の導入が確認された。このことは、pDR1-1B の複製単位の再構成に際して、AT-リッチボックス内に 1 塩基置換、*repB* 内に 3 塩基置換が起こっても、プラスミドの自立的複製能力が回復したことを示す。



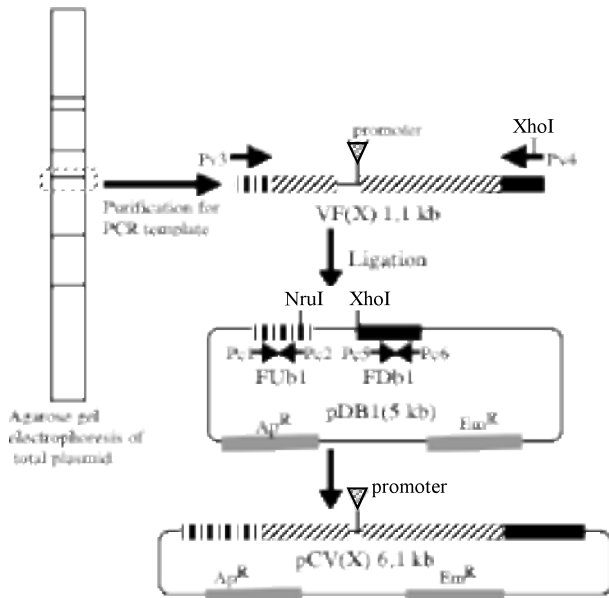


Fig. 9. Schematic illustration of the strategy for the construction of pCV(X).

The antibiotic markers for ampicillin and erythromycin are indicated as Am<sup>R</sup> and Em<sup>R</sup> respectively. Relevant PCR primer sets Pc1-Pc2, Pv3-Pv4, and Pc5-Pc6, with restriction sites useful for ligation, are indicated. The vector pDB1 contained a sequence of an upstream part (FUb1) and a downstream part (FDb1) of pDR1-1B with an erythromycin resistance gene. The NruI and XhoI sites of pDB1 indicate VF(X) insertion sites.

### 不和合性誘導プラスミド pCV5 による pDR1-1B の選択的除去試験

pCV5 を *L. lactis* DRC1 に導入し、不和合性プラスミド pDR1-1B の除去を試みた。操作の概要は Fig. 10 に示した。pCV5 の導入には、精製した pCV5-DNA を 10 ng あるいは 100 ng 用いた。形質転換頻度は、1 mg DNA あたり  $2.1 \times 10^3$  CFU だった。pDR1-1B 非保有菌の判定は、pDR1-1B の *hdsS* 配列の有無を PCR で確認した。TYL-E 培地で 5 回継代培養して TYL-E 寒天培地に塗布し、出現したコロニーを PCR スクリーニングして pDR1-1B 非保有菌 DRC1  $\Delta$  pDR1-1B<sup>ER</sup> を得た。DRC1  $\Delta$  pDR1-1B<sup>ER</sup> を TYL で 5 回継代培養して TYL アガーに展開し、出現したコロニーのうち、エリスロマイシン感受性菌 DRC1  $\Delta$  pDR1-1B を得た。分離した DRC1  $\Delta$  pDR1-1B から抽出したトータルプラスミドをアガロースゲル電気泳動したところ、pCV5 に相当するバンドは検出されなかった。

### 3. 考察

pDR1-1B の複製単位の内部配列 1.1 kb (VF5) を増幅するプライマーペア Pv3 - Pv4 と、PCR 増幅フラグメン

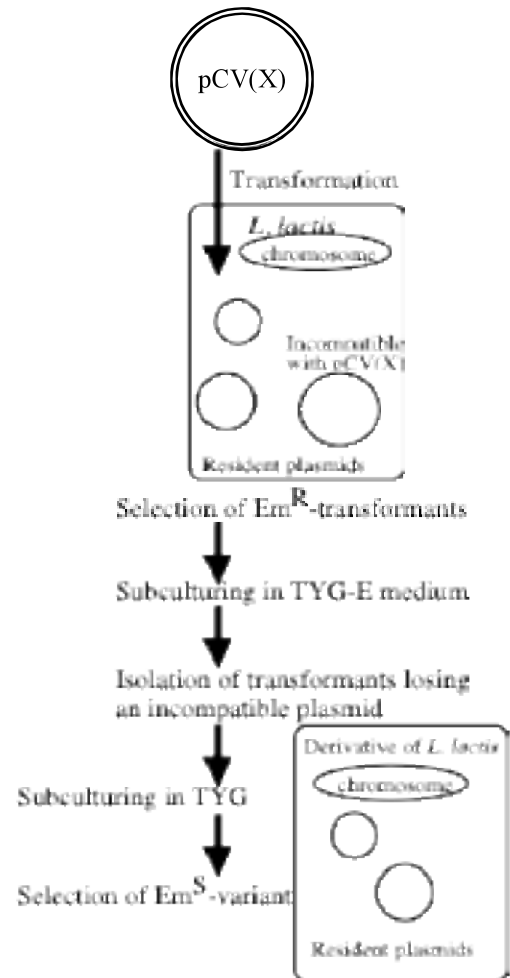


Fig. 10. Strategy for plasmid elimination with pCV(X). Resident plasmids in *L. lactis* are indicated by single circles. Synthetic replicon pCV(X) is indicated by the double circle.

ト VF5 を組込むことで、pDR1-1B の複製単位を再構築できるプラスミドベクター pDB1 を作出した。VF5 を pDB1 に組込んで構築した合成複製単位は、*L. lactis* で複製能を回復した。作出した組換えプラスミド pCV5 は、プラスミドフリー株 DRC1021 および、形質転換頻度は著しく低下したものの、親株 *L. lactis* DRC1 で複製することが確認された。以前の研究でも指摘されているが、*L. lactis* DRC1 における形質転換頻度の低下は、内在する野生型プラスミド pDR1-1B と pCV5 との不和合性が原因であると推定された<sup>65</sup>。PCR スクリーニングの結果、TYG-E 培地で分離直後の形質転換体は、Em<sup>R</sup> 形質を持ちながらも、pDR1-1B を保持している。このことは、*L. lactis* DRC1 細胞内で、pDR1-1B と pCV5 が共存することを示唆する。しかし TYG-E 培地で継代的に培養し、pCV5 保有株を選択することで、pDR1-1B は選択的に細胞内から失われた。

本研究で考案した *L. lactis*  $\theta$  - プラスミドの選択的除去システムは、以下の優れた特徴を持つ。1) pDR1-1B との不和合性を有するプラスミド pCV5 を *in vitro* で構築できること。2) pCV5 を用いて、*L. lactis* DRC1 の他の内在プラスミドの保有状態を変えずに、pDR1-1B を選択的に除去できること。3) 選択圧が無い場合 pCV5 は複製が不安定で、Em 無添加培地による継代で速やかに欠失すること。そこで次節では、本システムが任意の *L. lactis*  $\theta$  - プラスミドの除去にも用いることができるか試験することとした。

### 第3節 任意の *L. lactis* $\theta$ - プラスミドの選択的除去への応用

#### 1. 材料と方法

##### 菌株およびプラスミド

試験に供した微生物およびプラスミドは Table 1 にまとめられた。*L. lactis* は全て研究室保有株を用いた。

##### 培地と培養条件

*E. coli* および *L. lactis* の培養は、第1章、第2節に記述した方法で行った。

##### プラスミドの調製と組換えプラスミドの作成

*E. coli* プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分解、ブランチング、ライゲーション反応は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

##### *L. lactis* トータルプラスミドのアガロース電気泳動

*L. lactis* のプラスミドサンプルは、約  $10^{10}$  個の *L. lactis* 細胞から調製して 20 ml の TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) に溶解し、その全量を 1 ウェルで泳動した。トータルプラスミドの泳動には、0.8% LO3-アガロースゲル 109 mm (W) × 100 mm (L) を用い、100 V で 90 分間通電した。電気泳動で分離したプラスミドバンドは、エチジウムブロマイドで染色し可視化した。

##### PCR テンプレートの調製

アガロース電気泳動で分離したプラスミドバンドを、長波長の紫外線照射下でカミソリを用いて切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製し、50 ml の滅菌蒸留水に懸濁した。ゲルから 20 kb 以上のプラスミドを抽出する場合には、ゲル溶解液をピペッ

ティングし、大型のプラスミドを物理的に切断してから処理した。精製したプラスミド溶液 2 ml を PCR のテンプレートに供した。

#### 形質転換

##### 1) 大腸菌の形質転換

不和合性誘導プラスミド pCV (X) による *E. coli* XL1-Blue の形質転換および形質転換体の選択は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

##### 2) *L. lactis* の形質転換

不和合性誘導プラスミド pCV (X) の *L. lactis* への導入は、第1章、第2節で記述した pCV5 の *L. lactis* DRC1 への導入と同じ条件で行った。

#### PCR

任意の *L. lactis*  $\theta$  - プラスミドの不和合性決定配列は、VF の文字を共通させて名付けた。(VF (X)) を得るために、第1章、第2節で記述した pDR1-1B の不和合性決定配列 (VF5) の増幅と同じ条件で PCR を行った。PCR 反応後のサンプルは、1% LO3-アガロースゲルで電気泳動し、増幅フラグメントが得られた場合には QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した。

#### プラスミド安定性の検定

エリスロマイシン耐性プラスミドを保有する菌株を、TYG-E 培地で 12 時間前培養し 0 世代とした ( $T = 0$ )。前培養した培養液 10 ml を 10 ml の TYG 培地に接種し、定常期まで培養した ( $T = 1$ )。以降、定常状態まで培養した試験菌を TYG 培地に 0.1% 接種し、30°C で定常期まで静置培養する作業を 10 回繰り返した。 $T = 0$  および 5 回目 ( $T = 5$ ) と 10 回目 ( $T = 10$ ) の培養が終了した培養液 10 ml を滅菌蒸留水 1 ml で希釈し、TYG アガープレートに展開した。30°C で 24 時間培養し、形成したコロニーをランダムに 100 個釣菌し、TYG-E アガープレートにレプリカした。30°C で 24 時間培養し、増殖したエリスロマイシン耐性コロニーを数え、プラスミド保有菌の割合を算出した。

#### 2. 結果

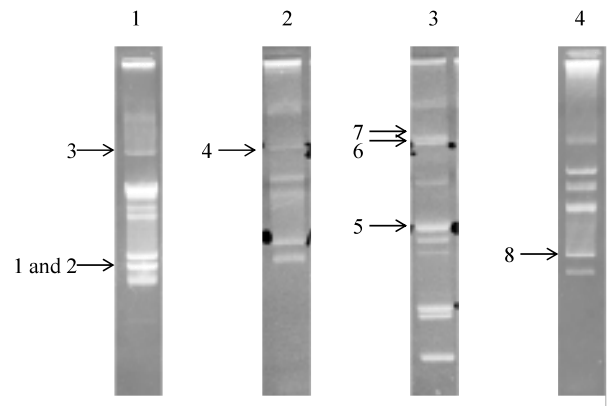
##### 任意の $\theta$ - プラスミドの不和合性誘導プラスミドの作成

プラスミドを複数保有し、畜産草地研究所で乳発酵に用いている *L. lactis* DRC1, 527, NIAI712, N7 を、試験

菌株とした。各々の菌株から抽出したトータルプラスミドをアガロース電気泳動で分離し、DNA をエジジウムブロマイド染色で可視化した。ゲルから切り出したプラスミドバンドを PCR のテンプレートに用い、不和合性決定配列 VF (X) を増幅した。得られた約 1.1-kb のインサートを *XhoI* で制限分解した後、pDB1 の *NruI* - *XhoI* サイトに結合し、作成した不和合性誘導プラスミドを *E. coli* を宿主として増幅させた。本試験では 8 種類の不和合性誘導プラスミドが得られた。各々のインサート (VF (X)) の増幅に用いたプラスミドバンドは Fig. 11 に図示した。不和合性誘導プラスミドの名称は、pCV を共通させた。作成した pCV (X) と、テンプレートに用いた親プラスミド、および菌株名は Table 4 にまとめた。Table 4 のプラスミド番号は、Fig. 11 のプラスミドバンドの番号と一致させた。プラスミドのアガロース電気泳動では、同じ種類のプラスミドであっても閉環型、開環型、直線型では移動度が異なり、トータルプラスミドの電気泳動像は複雑になる。Fig. 11 のプラスミド番号と矢印は、テンプレートに用いたプラスミドバンドのうち、閉環状プラスミドを指している。

**pCV (X) の複製起点の配列解析**

pBluescript II の T3 プロモーター配列を認識する T3 プライマー：5' -AATTAACCCCTACTAAAGGG-3' を用いて、8 つの pCV (X) のインサートの DNA 配列をシーケンスで確認した (Fig. 12)。FASTA プログラムによる相同性解析の結果、pCV (X) のインサートは全て *L.*



**Fig. 11.** Agarose gel electrophoresis for isolation of *L. lactis* plasmids to make competitors ( pCV(X) ) to wild type plasmids in parent strains. Total plasmids from *L. lactis* subsp. *lactis* DRC1 (lane 1), *L. lactis* subsp. *lactis* 527 (lane 2), *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 (lane 3), and *L. lactis* subsp. *lactis* N7 (lane 4).

*lactis*  $\theta$  -プラスミドの複製領域と高い相同性があった。このことは、pDR1-1B の不和合性決定配列を増幅するプライマー Pv3 および Pv4 が、任意の  $\theta$  -プラスミドの複製領域も認識することを示している。図中の赤矢印で示した塩基は、プライマー Pc2 の配列に由来する 1 塩基置換箇所である。

***L. lactis* における pCV (X) の複製能の確認と形質転換効率の解析**

プラスミドフリー株 *L. lactis* IL1403 は、*L. lactis* の実験株として広く世界中で用いられており、厳しい制限・

**Table 4.** Origin of pCV (X)

Stain and Plasmid	Plasmid size	Properties	pCV (X)	No. in Fig. 10
<i>L. lactis</i> DRC1				
pDR1-1	7.4kb	unknown	pCV1	1
pDR1-1B	7.3kb	unknown	pCV5	2
pLac-DRC1	50kb	Lac <sup>+</sup> , prt <sup>+</sup>	pCV28	3
<i>L. lactis</i> 527				
pLac-527	50kb	Lac <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup>	pCVL3	4
<i>L. lactis</i> NIAI712				
pAG6	8.7kb	unknown	pCVm6	5
pAG3	50kb	unknown	pCVL1	6
pLac-Prt	55kb	Lac <sup>+</sup> , Prt <sup>+</sup>	pCVL10	7
<i>L. lactis</i> N7				
pCit-712	8.3kb	Cit <sup>+</sup>	pCVc8	8

Lac<sup>+</sup>, lactose utilization activity; Prt<sup>+</sup> proteinase activity; Cit<sup>+</sup> citrate utilization activity

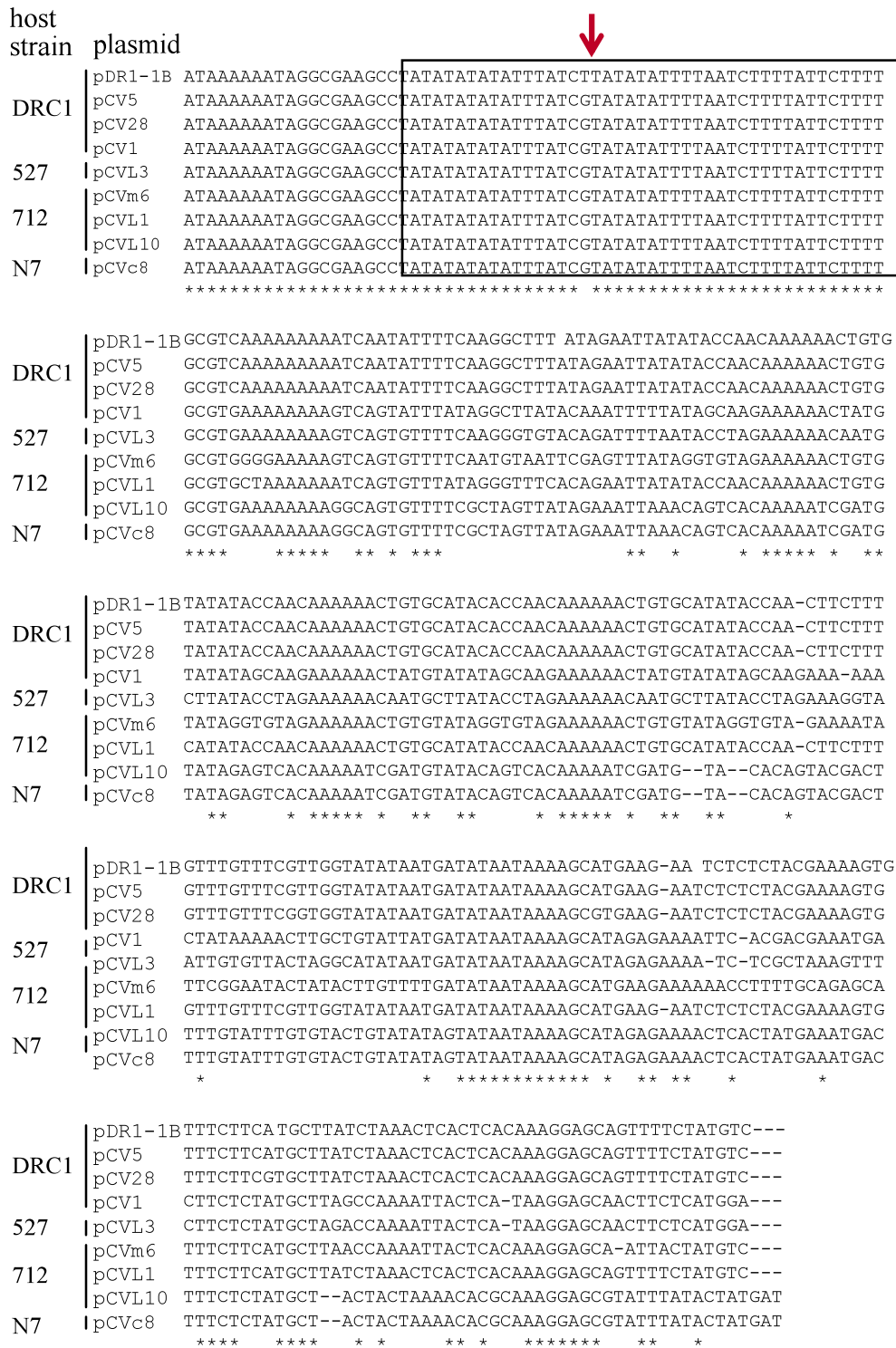


Fig. 12. Alignment of the Replication Origins of pDR1-1B and Synthetic Hybrid Replicons. Sequences identical in all plasmids are indicated by asterisks. AT-rich boxes are boxed. An arrow indicated a substitution of one nucleotide in the AT-rich box when synthetic replicons are constructed.

修飾システムを持たないことが報告されている<sup>6)</sup>。そこで、作成した pCV (X) を *L. lactis* IL1403 に導入し、複製能を確認した。形質転換効率およびプラスミドの安定性は Table 5 にまとめた。 $1.2 \times 10^5 \sim 9.8 \times 10^5$  の効率で全ての pCV (X) は *L. lactis* IL1403 に導入され、TYL-E 培地での継代培養では、宿主に安定に保持された。アガロース電気泳動の結果、全ての形質転換体で 6.1 kb プラスミド pCV (X) の導入が確認された (Fig. 13)。これらの結果は、任意の *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの複製単位に由来するインサートを pDB1 に組込むことで、プラスミドの複製能が回復したことを示唆する。

### pCV (X) の導入による不和合性の誘導とプラスミドの選択的除去

各々の pCV (X) を、インサートの鋳型にしたプラスミドを含む親株に導入し (Table 4, Fig. 11)、内在する不和合性プラスミドの除去を試みた。10 ng あるいは 100 ng の pCV1, pCV5, pCV28 を *L. lactis* DRC1 に、pCVL3 を *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527 に、pCVm6, pCVL1, pCVL10 を *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 712 に、pCVc8 を *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 にエレクトロポレーションで導入し、エリスロマイシン耐性を指標に選抜したところ、pCV1, pCV5, pCVm6 および pCVc8 の導入株 DRC1 (including pCV1)<sup>ER</sup>, DRC1 (including pCV5)<sup>ER</sup>, 712 (including pCVm6)<sup>ER</sup>, N7 (including pCVc8)<sup>ER</sup> が得られた。導入した pCV (X) を選択するために、TYL-E 培地で 5 回継代培養して TYL-E 寒天培地に展開し、コロニーを形成させた。pCV1, pCV5 の親プラスミド pDR1-1, pDR1-1B 非保有菌の判定は、内在する各 *hsdS* 配列の有無を PCR で確認した。pCVm6 および pCVc8 の親プラ

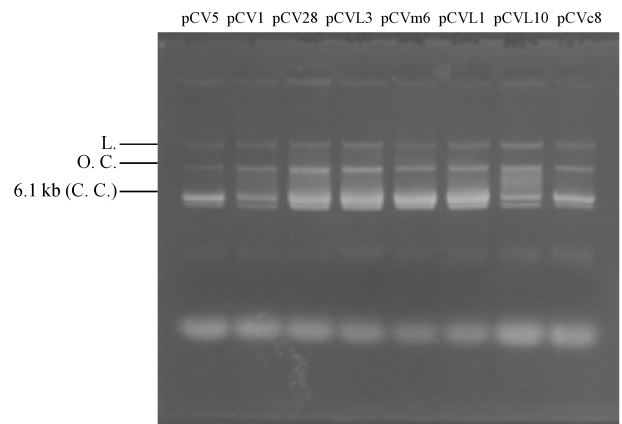


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of synthetic hybrid replicons (pCV(X)). Plasmid free strain *L. lactis* IL1403 was used as a host. C. C. indicates closed circular plasmid. O. C. indicates open circular plasmid. L. indicates linear plasmid.

スミド非保有菌の判定は、電気泳動でプラスミドパターンを親株と比較した。試験に供した pCV (X) 導入株全てでインサートの鋳型となった親プラスミドの除去株が得られた。pCV1 による pDR1-1 の除去、pCVc8 によるクエン酸資化性プラスミド pN7-Cit の除去は、次章に詳述した。また pCVm6 による機能未知プラスミド pAG6 の除去は第 3 章に詳述した。

*L. lactis* IL1403 を宿主に用いた場合、エリスロマイシン無添加培地では、pCV (X) の安定性は低かった (Table 5)。そこで、得られたプラスミド除去株を TYL で 5 回継代培養し、pCV (X) の除去を試みた。継代培養後 TYL 寒天培地に展開してコロニーを形成させ、レプリカ法でエリスロマイシン感受性菌を得た。また分離したエリスロマイシン感受性菌が、pCV (X) を含まないこ

Table 5. Transformation Efficiency and Stability of pCV(X) in IL1403

Tested plasmid	Transformation efficiency *	Em <sup>R</sup> colony at T = 0 **	Em <sup>R</sup> colony at T = 5 **	Em <sup>R</sup> colony at T = 10 **
pCV1	$8.1 \times 10^5$	100	5	0
pCV5	$9.8 \times 10^5$	100	13	2
pCV28	$7.8 \times 10^5$	100	0	0
pCVc8	$1.2 \times 10^5$	100	0	0
pCVL3	$5.0 \times 10^5$	100	6	2
pCVL1	$3.2 \times 10^5$	100	5	0
pCVL10	$6.2 \times 10^5$	100	12	0
pCVm6	$8.3 \times 10^5$	100	24	0

Em<sup>R</sup>, resistance to erythromycin

T indicates transfer times in TYG

\* number of transformants per microgram of pCV(X) DNA

\*\* percentage of Em<sup>R</sup> colonies in the population

とをアガロースゲル電気泳動および PCR で確認した。これらの結果は、pDB1 および PCR プライマーペア Pv3-Pv4 を利用した不和合性誘導プラスミド pCV (X) の構築と、pCV (X) を用いたプラスミドの選択的除去が、任意の *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドに適応が可能であることを示唆している。また、最終的に得られたプラスミド除去株は、組換え遺伝子を含まず、食品加工に利用が可能であると考えられた。

### 3. 考察

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC1, N7, および *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 のプラスミドから、*L. lactis* IL1403 で複製する 8 種類の合成レプリコン (pCV (X)) を得た。すなわち、プライマーセット Pv3-Pv4 によって、任意の *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの不和合性決定配列を PCR で増幅でき、pDB1 にクローニングすることで、*L. lactis* での複製能を回復することを確認した。これら *in vitro* で作成した競合プラスミドを用いて、*L. lactis* DRC1, N7, および NIAI712 のプラスミドを選択的に除去することができ、考案した方法が、*lactis* および *cremoris* の両亜種で使用可能であることを確認した。

*L. lactis* DRC1 のプラスミドからは、3 種類の競合プラスミド (pCV1, pCV5 および pCV28) を得た。そのうち pCV28 に組込んだ VF28 は、藤田らがラクトース資化性プラスミドと同定したプラスミドより得たフラグメントである。*L. lactis* DRC1 への pCV5 の導入によって、pDR1-1B は除去されたが、派生株 DRC1  $\Delta$  pDR1-1B はスキムミルクで生育でき、電気泳動でも 50 kb のラクトース資化性プラスミドが確認された。Fig. 12 で示した通り、pCV5 の *ori* と、pCV28 の *ori* 配列の違いは、3 塩基であった。したがって、pCV5 は、3 塩基の違いを区別し、pDR1-1B 特異的に不和合性を誘導できることが示唆された。

pCVc8 に組込んだ VFc8 は、クエン酸資化性プラスミドと同定されている約 8.3 kb のプラスミドより得たフラグメントである<sup>97)</sup>。pCVc8 の *ori* 配列は、pCVL10 と一致した。pCVL10 は、*L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 のプラスミドに由来した。現在迄に、*cremoris* 亜種から CitP プラスミドが分離された報告はなく、実際 *L. lactis* NIAI712 はクエン酸を資化しなかった。このことは、*cremoris* 亜種には CitP 遺伝子は存在しないが、複製単位は組換えによって受継がれ、CitP とは別の機能をコー

ドする、もっと大型の (> 40 kb) プラスミドの複製単位として利用されていることを示唆する。

本研究で、供試菌株から除去できたプラスミドはいずれも 10-kb 以下の多コピープラスミドで、ラクトース資化やプロテイナーゼ活性に関与する 20-kb 以上の大型のプラスミドの除去には成功しなかった。ラクトース資化プラスミド等の大型のプラスミドは、概してコピー数が少ない<sup>83)</sup>。考案したシステムでは、除去するプラスミドが多コピーで、細胞内に pCV (X) と親プラスミドが共存する状態が必要なかもしれない。また大型のプラスミドは、通常分子内に複製領域を 2 カ所以上コードしている<sup>83)</sup>。その場合、*in vitro* で構築した競合プラスミドで、不和合性によるプラスミド除去を誘導できない可能性がある。しかしながら、大型でコピー数の少ないプラスミドは、変異剤等を用いる従来法で効率よく除去できるため<sup>23, 32)</sup>、機能解析も進んでいる。一方  $\theta$ -複製型で、10-kb 以下の多コピープラスミドは複製が安定で、従来法による除去操作に抵抗し、機能の推定が難しかった。本研究で考案した方法は、従来法では難しいプラスミドを効率よく除去できることから、プラスミドの新機能の発見が期待できる。

考案したシステムでは、プラスミド除去に用いる競合プラスミドの複製が不安定であるため、最終的に育種されるプラスミド除去株は、細胞内に外来遺伝子を含まない。現在食品の加工に、組換え微生物の使用が許可されている国は無い。また医療現場では、水平伝搬によって複数の抗生物質耐性遺伝子を保有する多剤耐性菌の出現が問題視されている<sup>72)</sup>。*L. lactis* においても、抗生物質の暴露によって、自然耐性菌の出現例が古くから報告されているが<sup>27)</sup>、有害微生物への耐性遺伝子の水平伝搬が危惧されることから、食品加工には、耐性菌を用いるべきではない。従って本法は、食品加工に用いる *L. lactis* のプラスミド育種に適した方法である。第 2 章には本法を用いた乳加工用乳酸菌の育種例を記述した。

## 第 2 章 プラスミドの選択的除去操作を利用した乳発酵スターターの育種

### 緒 言

*Lactococcus lactis* が、菌の生育上不可欠なプラスミドの他に、機能の特定されていない、あるいは明らかに生育に不必要なプラスミドも多数保有していることは前述した。プラスミドを保有する様々な微生物において、プラスミドの保有と、細胞増殖速度の関係について多くの

研究がなされており、プラスミドの複製や、コードしている遺伝子産物の発現が宿主細胞の増殖速度を抑制する例が報告されている<sup>10, 24, 36)</sup>。しかし *L. lactis* 野生株に内在する wild type プラスミドと、宿主増殖速度との関係は調べられていない。

本章、第1節ではまず、*L. lactis* DRC1 に内在し、宿主の増殖速度を抑制するプラスミドの発見と、その解析について述べた。次に第1章に記述した、プラスミドの選択的除去法を用いたスターターの育種例について述べた。スターターの増殖速度の改善は、発酵の効率化に直結する。そこで、親株 *L. lactis* DRC1 から増殖速度を抑制するプラスミドを選択的に除去し、増殖速度の早いプラスミド除去株の作出を試験した。

続いて第2節では、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 からクエン酸透過酵素 (CitP) をコードする 8.3-kb プラスミドの選択的除去の試みについて述べた。*Lactococcus* のうち、ジアセチラクティスとして区別される菌群は、牛乳中に 0.1 ~ 0.2% 含まれるクエン酸を代謝し、芳香成分ジアセチルを生産する。ジアセチルはポップコーンなどの香り成分として好まれ、添加されたりもするが、発酵乳の香りとしては好まれない<sup>94)</sup>。しかし、近年 *Lactococcus* 属乳酸菌、特にジアセチラクティスの機能性が着目され、機能性ヨーグルト開発をめざして試験されるようになってきており<sup>46)</sup>、クエン酸透過性プラスミドを除去できれば、ジアセチラクティスを用いた機能性ヨーグルトの風味改善をはかることができると考えられる。ところがクエン酸透過性プラスミドは安定で、選択的な除去は困難であるとされている<sup>70)</sup>。そこで本章では、第1章で開発した方法を用いてジアセチル生成能欠損株の育種を試み、作出したプラスミド除去株の乳発酵スターターとしての能力について考察した。

## 第1節 宿主の増殖速度を決定しているプラスミドの発見と増殖速度の速い菌株の育種

### 1. 材料および方法

#### 菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 6 にまとめた。DRC1121, および DRC1521 の作出手順は第1章、第1節に記述した。DRC121 は、DRC1021 に pGKV21 をエレクトロポレーションで導入して作出した。DRC11 は、DRC1121 を TYG 培地で高温条件(39°C)のもと連続して培養することで pGKV21 除去して派生させた。pDR1-1 のデリベーションプラスミド pBE1 は、

pDR1-1 の EcoRI – BglII フラグメント (3-kb) と、Em<sup>R</sup> フラグメントを結合して作成し、DRC1021 を宿主として増幅した (Fig. 14)。

### プラスミドの調製と形質転換

プラスミド DNA の調製、制限酵素分解、ランニング、ライゲーション反応および形質転換は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

### 増殖速度の測定

供試菌は、菌体培養液 0.1% を 10 ml の TYG 培地に植菌し、30°C で 2 回以上繰返して培養して活性化し、準備した。活性化後、一晚培養した定常状態の供試菌培養液 10 ml を、あらかじめ 30°C に加温した新鮮な TYG 培地に植菌し、30°C で静置培養した。試験には 11 mm 径のねじ口試験管を使用した。菌の増殖は、Bausch & Lomb Model 21 spectrophotometer (Bausch & Lomb, Rochester, NY) を使用し、620 nm の波長で培養液の濁度を 1 時間毎に測定した。生菌数は、100 ml の培養液を滅菌蒸留水で段階的に希釈して TYG 寒天プレートでカウントした。バッチ培養における対数増殖期の細胞倍加時間 (ジェネレーションタイム =  $T$ ) は、経時的な生菌数の増加をグラフにプロットし、対数増殖期のグラフの傾きから求めた。また比増殖速度 ( $\mu$ ) は、以下のように算出した。すなわち、対数増殖期のジェネレーションタイムを  $T$  とした場合、 $\mu = \ln 2 / T$ 。

### 統計処理

増殖速度の測定は、すべての供試菌で 3 回繰返し

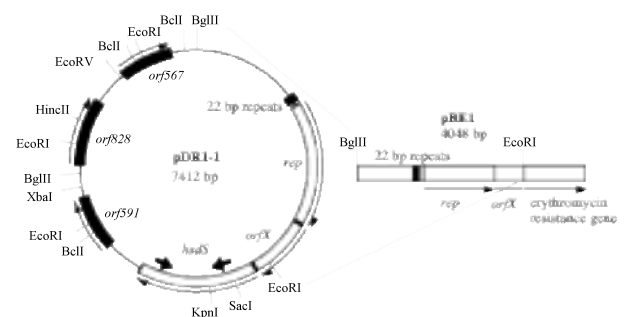


Fig. 14. Construction of recombinant plasmid pBE1. Thin arrows indicate ORFs. The 22 bp repeats refer to the putative replication origin (*ori*) preceding the replication genes (*rep*). Open boxes indicate the *rep-hsdS* operon-like structure (replication module). The rightward- and the leftward-pointing thick arrows indicate the relative positions of the PCR primers SES1 and SC15c, respectively.

Table 6. *L. lactis* Strains and Plasmids

Strains and Plasmids	Properties	References or sources
<b>Strains</b>		
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>		
DRC1	Wild type	Swartling (1951); Colling and Harrey (1962)
NIAI N7	Wild type	Lab. collection
13675	Wild type	Lab. collection
DRC1021	Plasmid-free derivative of DRC1	Fujita <i>et al.</i> , (1999)
DRC121	DRC1021 harboring pGKV21	This study
DRC1121	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1821	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1921	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1	This study
DRC1321	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
DRC1521	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
DRC1621	DRC1021 harboring pGKV21 and pDR1-1B	This study
DRC11	DRC1021 harboring pDR1-1	This study
DRC1 <sup>2</sup> pDR1-1	DRC1 eliminating pDR1-1	This study
N7 <sup>2</sup> CitP	N7 eliminating pN7-Cit	This study
<b>Plasmids</b>		
pGKV21	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> shuttle vector, Em <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	van der Vossen <i>et al.</i> , (1985)
p8Em1	pUC118 containing pAM β 1 Em <sup>R</sup> gene	Ito <i>et al.</i> , (1992)
pDR1-1	7.4 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study (chapter 1)
pDR1-1B	7.3 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	This study (chapter 1)
pN7-Cit	7.8 kb θ -plasmid from <i>L. lactis</i> N7, Cit <sup>+</sup>	This study (chapter 1)
pBE1	Em <sup>R</sup> gene from p8Em1 fused to 3.0 kb BglIII – EcoRI fragment of pDR1-1	This study
pCV1	competitor to pDR1-1	This study (chapter 1)
pCVc8	competitor to pN7-Cit	This study (chapter 1)

Em<sup>R</sup>, resistance to erythromycin; Cit<sup>+</sup> citrate utilization activity.

Lab. collection, National Institute of Livestock and Grassland Science collection

た。統計処理は、Student's *t*-test を用い、統計学的有意差は、危険率 5% 水準未満で判定した。

### コロニー PCR によるスクリーニング

pDR1-1 がコードしている *hsdS* 遺伝子 (*hsdS*/pDR1-1) 保有株のスクリーニングはコロニー PCR で行った。供試菌は TYG 寒天プレートで培養してコロニーを形成させ、100 ml の滅菌蒸留水に 1 個のコロニーを釣菌し懸濁した。*hsdS*/pDR1-1 の内部配列を認識するプライマーペア SES1 - SC15c (SES1: 5' -GGTGGAA-CACCAAGTACATCGAACTCTG-3', SC15c: 5' -CTA-CACTGCCTTTAGAGATATTCAGTTG-3') と、テンプレートとしてコロニー懸濁液 2 ml を用い、反応液量 20 ml で PCR 反応を行った。増幅条件は、ヒートショック

94℃ で 2 分間保持、続いて 1) 変性、94℃ で 15 秒、2) アニーリング 53℃ で 30 秒、3) 伸長 68℃ で 1 分、1) ~ 3) の反応を 30 サイクル行い、最後に 68℃ で 7 分間保持した。フラグメントの増幅は、1% アガロース電気泳動で確認した。また増幅したフラグメントの DNA 配列を調べた。

## 2. 結果

### 野生株とプラスミドフリー菌株の増殖速度の比較

*L. lactis* DRC1 は、乳糖およびカゼイン資化性プラスミド (50 kb)、バクテリオシン生産性プラスミド (約 60 kb) など大型のプラスミドを含む少なくとも 5 種類のプラスミドを有している (第 1 章、第 1 節参照, Fig. 3)。 *L. lactis* DRC1 およびそのプラスミドフリー株



DRC1021の増殖を比較した。TYG培地で培養した場合、DRC1021は*L. lactis* DRC1よりも明らかに増殖が早かった (Fig. 15)。乳酸球菌の培養に汎用されるGM17培地 (1% グルコース添加 M17, Difco) を用いた測定でも同じ結果であった。

**L. lactis DRC1 の増殖速度を抑制するプラスミドの同定**

*L. lactis* DRC1 の増殖速度に影響する内在プラスミドの有無を調べるために、*L. lactis* DRC1 のトータルプラスミドをインジケータープラスミド pGKV21 と同時に DRC1021 に導入し、*L. lactis* DRC1 由来のプラスミドを1個以上保有する派生株を9株 (DRC1121 ~ DRC1921) 得た。得られた派生株の増殖を DRC1021 と比較したところ、増殖の遅い3株 DRC1121, DRC1821, DRC1921 を得た。アガロースゲル電気泳動で確認したところ、DRC1 の最も小さいプラスミドが導入されており、導入されたプラスミドを pDR1-1 と名付けた。しかし、アガロース電気泳動の結果、DRC1021

と増殖の変わらない派生株のうち5株が、pDR1-1と同じ大きさのプラスミドを保有することが示された。そこで、増殖の遅い DRC1121, DRC1821, DRC1921 と、増殖の早い DRC1321, DRC1521, DRC1621 からトータルプラスミドを抽出し、制限酵素の切断パターンを比較した。その結果、どちらのグループのプラスミドも HincII で切断されるが、増殖の遅いグループのプラスミドは SacI, KpnI で切断され、増殖の早いグループのプラスミドは BamHI で切断された。そこで、宿主の増殖に影響し、SacI で切断されるプラスミドを pDR1-1、宿主の増殖に影響せず、BamHI で切断されるプラスミドを pDR1-1B とした。pDR1-1 および pDR1-1B の構造は第1章、第1節の (Fig. 4) に、その DNA 配列から予想される6つの ORF の相同性を Table 2 に示した。pDR1-1 および pDR1-1B の複製領域は、プラスミドの複製に際してシスに働く *ori* 配列の下流に *repB*、続いてプロモーター配列を伴った *orfX* と *hsdS* が近接し、*L. lactis* に広く分布する  $\theta$ -複製型プラスミドの典型的な構造を示した。*hsdS* 下流の ORF591, ORF578, ORF567 のアミノ酸配列は、100%一致した。そこで、pDR1-1 の最小複製単位と Em<sup>R</sup> を結合して作出した組換えプラスミド pBE1 を DRC1021 に導入し、影響を調べた。pBE1 保有株 (DRC117) の増殖速度は DRC1021 と有意な差は無かった。Table 7 に本研究で作出した *L. lactis* DRC1 派生株の増殖速度をまとめた。*L. lactis* DRC1 および菌体内に pDR1-1 のみ保有する派生株 DRC11 の  $\mu$  は互いに有意差がなく、pDR1-1 非保有株よりも有意に小さいことが示された。これらの結果から、*L. lactis* DRC1 の増殖速度は、共存するプラスミドの複製による総和的な抑制ではなく、実質的に1種類のプラスミド pDR1-1 の抑制によって決定されることが示唆された。

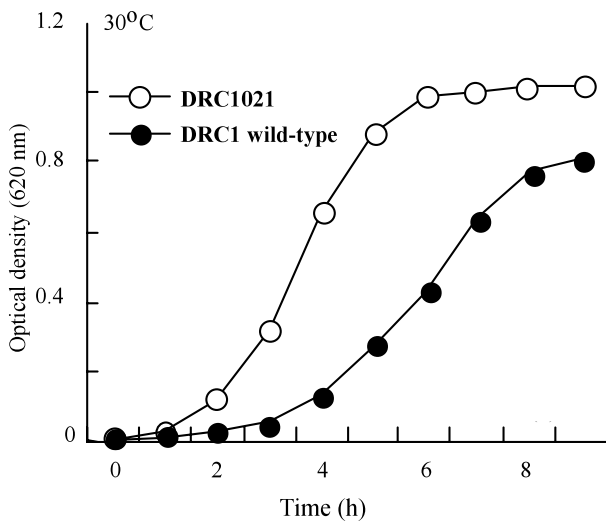


Fig. 15. Growth of DRC1 wild-type and a plasmid-free derivative. Cultures were incubated at 30 °C.

Table 7. Specific growth rate ( $\mu$ ) of DRC1 and variants

Strains	Presence of pDR1-1 <sup>a)</sup>	$\mu$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>	Generation (T, min)
<i>L. lactis</i> DRC1 (Wild type)	+	0.853 ( $\pm$ 0.044)	49
DRC11	+	0.833 ( $\pm$ 0.071)	50
DRC1021	-	1.14 ( $\pm$ 0.032) <sup>c)</sup>	36
DRC117	-	1.12 ( $\pm$ 0.077) <sup>c)</sup>	37
DRC1 <sup>2</sup> pDR1-1	-	1.12 ( $\pm$ 0.013) <sup>c)</sup>	37

a), pDR1-1 was detected by PCR. +, PCR products were obtained with pDR1-1 specific primers; -, no PCR products were obtained.

b), Values are means of 3 trials ( $\pm$  S. D.)

c), Significantly different from the value of the DRC1 wild type strain ( $P < 0.05$ )

### pDR1-1 類似プラスミドの *L. lactis* における分布

研究室で保存している *L. lactis* 24 株をコロニー PCR で試験したところ、*L. lactis* DRC1 および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* 13675 に由来する増幅フラグメントが得られた。得られたフラグメントはいずれも 972 bp で、DNA 配列は 100% 一致した。また増幅フラグメントの内部配列からプライマーを合成し、プライマー walking で *hsdS* の全配列を決定したところ、*L. lactis* 13675 は *hsdS*/pDR1-1 と一致する遺伝子を有することが明らかとなった。サザン解析の結果、*hsdS*/pDR1-1 は、*L. lactis* 13675 においても pDR1-1 とほぼ同じ大きさのプラスミドにコードされていた (Fig. 16)。

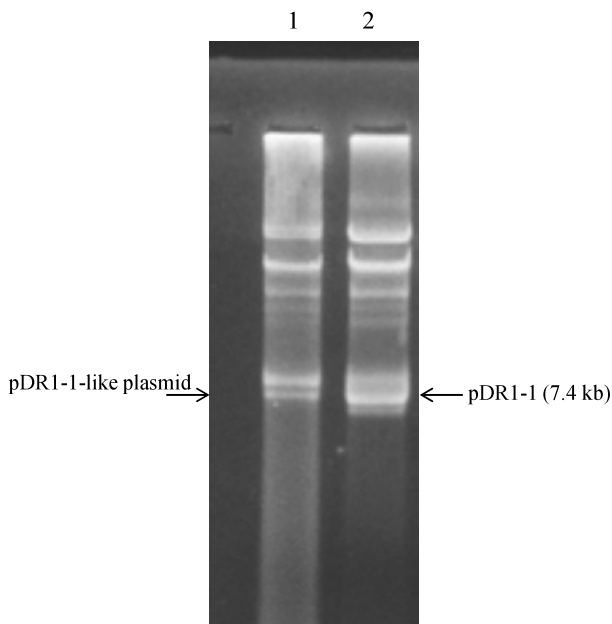


Fig. 16. Plasmid profile of *L. lactis* DRC1 and *L. lactis* 13675.  
1, *L. lactis* 13675 wild type strain  
2, *L. lactis* DRC1 wild type strain

### pDR1-1 を保有する乳酸菌株と保有しない乳酸菌株の増殖比較

pDR1-1 を保有する乳酸菌株 (*L. lactis* DRC1 と *L. lactis* 13675) と保有しない乳酸菌株 *L. lactis* N7 と *L. lactis* DRC1021 の増殖を比較した。1 時間ごとの吸光値をグラフにプロットしたところ、pDR1-1 を内在している *L. lactis* DRC1 と *L. lactis* 13675 の増殖カーブは一致し、pDR1-1 を内在していない *L. lactis* N7 の増殖カーブは DRC1021 と一致した (Fig. 17)。また対数増殖期の  $\mu$  も、pDR1-1 保有株と非保有株では有意に異なっていた (Table 8)。

### 増殖速度の速い菌株の育種

第 1 章、第 3 節で作出した不和合性誘導プラスミド pCV1 のインサートは、pDR1-1 の複製単位を鋳型に増幅した。*L. lactis* DRC1 に pCV1 を導入し、pCV1 の不和合性プラスミド pDR1-1 を除去したプラスミド除去株 DRC1  $\Delta$  pDR1-1 を作出した (Fig. 18)。DRC1  $\Delta$  pDR1-1 は、親株 *L. lactis* DRC1 よりも対数増殖期の増殖速度が

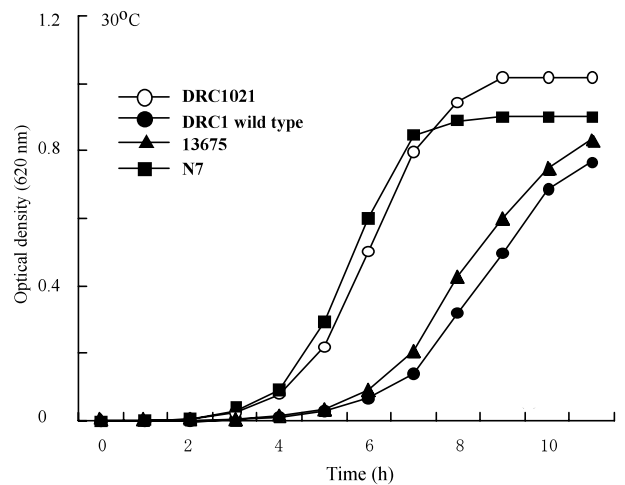


Fig. 17. Comparison of growth of *L. lactis* strains with or without pDR1-1.  
Cultures were incubated at 30 °C.

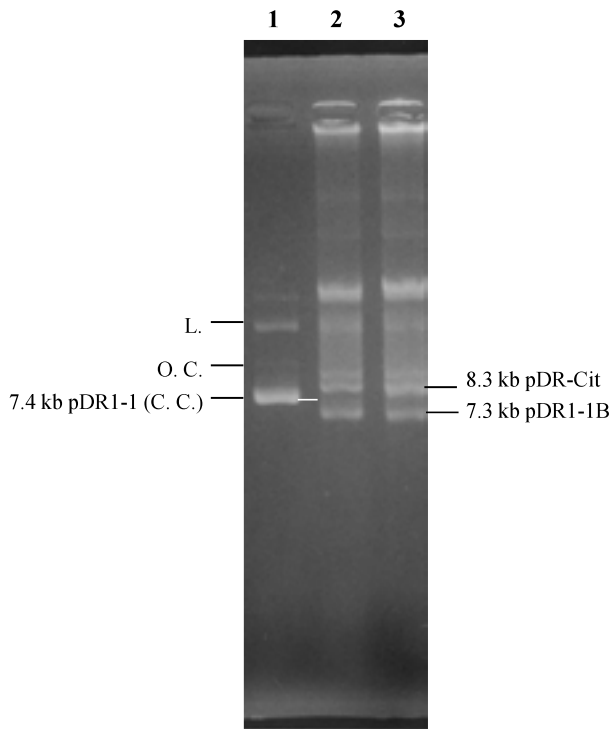
Table 8. Specific growth rate ( $\mu$ ) of *Lactococcus lactis* strains

Strains	Presence of pDR1-1 <sup>a)</sup>	$\mu$ ( $h^{-1}$ ) <sup>b)</sup>	Generation ( <i>T</i> , min)
<i>L. lactis</i> DRC1	+	0.853 ( $\pm$ 0.044)	49
DRC1021	-	1.14 ( $\pm$ 0.032) <sup>c)</sup>	36
<i>L. lactis</i> 13675	+	0.933 ( $\pm$ 0.054)	44
<i>L. lactis</i> N7	-	1.22 ( $\pm$ 0.029) <sup>c)</sup>	34

a), pDR1-1 like plasmid was detected by PCR. +, PCR products were obtained with pDR1-1 specific primers; -, no PCR products were obtained.

b), values are means of 3 trials ( $\pm$  S. D.)

c), significantly different from the value of the DRC1 wild type strain ( $P < 0.05$ )



**Fig. 18. Plasmid profile of *L. lactis* DRC1 and variants.**  
 1, DRC11 (*L. lactis* DRC1021 containing pDR1-1)  
 2, *L. lactis* DRC1 wild type  
 3, DRC1ΔpDR1-1 (DRC1 eliminating pDR1-1)  
 pDR-Cit indicates CitP-plasmid.  
 C. C. indicates closed circular plasmid.  
 O. C. indicates open circular plasmid.  
 L. indicates linear plasmid.

25%以上早かった (Table 7)。さらに pDR1-1 の除去に用いた pCV1 は Em 無添加培地で培養すると宿主から用意に除去された (第 1 章, 第 3 節)。したがって DRC1 Δ pDR1-1 は, 菌体内に外来遺伝子を含まず, 乳発酵スターターとして用いることができる。

### 3. 考察

核外遺伝子を保有する様々な微生物で, プラスミドの保有に起因する宿主増殖速度の低下が報告されている。プラスミドの複製や, コードしている遺伝子産物の生産, 蓄積が, 宿主の代謝や細胞成分の生合成の負担になり, 増殖速度の低下や総菌数の減少をもたらすと説明されている<sup>10, 24, 36)</sup>。*L. lactis* は, 細胞内に多くのプラスミドを保有する代表的な菌種である<sup>52, 80, 81)</sup>。これまで *L. lactis* で用いられる代表的なプラスミドベクターと宿主増殖速度についての報告はあるものの<sup>57)</sup>, 内在する wild type- プラスミドと宿主増殖速度の関係は調べられていなかった。以前藤田らは, *L. lactis* DRC1 のプラスミドフリー株 *L. lactis* DRC 1021 を育種した。DRC 1021

と親株 *L. lactis* DRC1 の増殖速度を比較したところ, DRC 1021 の方が, 対数増殖期の増殖速度が約 25% 早いことを見出した。そこで *L. lactis* DRC1 のプラスミドを *L. lactis* DRC1021 にランダムに導入し, 増殖の遅いプラスミド変異株を分離した。分離した菌株の増殖速度は, *L. lactis* DRC1 と有意差が無く, 全ての変異株が 7.4 kb のプラスミド pDR1-1 を保有していた。第 1 章で記述した通り, *L. lactis* DRC1 は, pDR1-1 の他に, 60 kb, 50 kb, 8.3 kb, 7.3 kb の少なくとも 5 種類の wild type- プラスミドを保有している。それゆえ, *L. lactis* DRC1 の増殖速度は, 共存するプラスミドの複製による総和的な抑制ではなく, 実質的に 1 種類のプラスミド pDR1-1 の抑制によって決定されていると結論した。抑制の原因としては, デリションプラスミド pBE1 には増殖速度抑制効果がないこと, pDR1-1 とは複製モジュールの構造のみが異なる pDR1-1B には抑制効果がないことから, pDR1-1 の複製モジュールの *hsdS* の遺伝子産物が, 宿主の増殖に何らかの影響を与えるのではないかと予想している。HsdS は制限/修飾システムのサブユニットであり, DNA メチル化配列を決定する機能を持つ<sup>61)</sup>。DNA のメチル化は, 様々な遺伝子の発現に関与することが報告されていることから, 著者は *L. lactis* DRC1 と DRC1 Δ pDR1-1 のメチル化状態の比較解析や, 代謝性遺伝子の発現比較に興味を持っている。しかしその解析は今後の課題である。

pDR1-1 がコードする *hsdS* (*hsdS*/pDR1-1) の可変領域を認識するプライマーペアを用いて, 研究室保存株の中から *hsdS*/pDR1-1 を保有する菌株をスクリーニングした。その結果, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis 13675 が, 全く同じ配列の複製モジュールを含むプラスミド保有していた。*L. lactis* 13675 の増殖速度は, *L. lactis* DRC1 と有意差が無く, また *hsdS*/pDR1-1 を保有しない *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis N7 の増殖速度は DRC 1021 と有意差がなかった。従って pDR1-1 類似プラスミドは他の *L. lactis* にも分布し, *L. lactis* DRC1 と同様な機作で宿主増殖を抑制すると予想した。

第 1 章で詳述した方法で *L. lactis* DRC1 から選択的に pDR1-1 を除去することができた。作出したプラスミド除去株 *L. lactis* DRC1 Δ pDR1-1 は野生株よりも約 25% 増殖速度が速かった。発酵産業において, スターター微生物の増殖速度は生産効率に直結する。この結果は, wild type- プラスミドの選択的除去による発酵製造の効率化の可能性を示唆する。

## 第2節 ジアセチル臭を生じさせない菌株の育種

### 1. 材料および方法

#### 菌株およびプラスミド

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis N7 は、研究室保存株である。

pCVc8 の作成法および性質は第1章、第3節に記述した。

#### 形質転換と不和合性プラスミドの除去

エレクトロポレーションによる pCVc8 の *L. lactis* N7 への導入と、内在プラスミドの選択的除去操作は、第1章、第3節に記述した。

#### 乳酸生成能の検定

供試菌株は、前日から一晩 TYG で培養し用いた。500  $\mu$ l の培養液を 16,000 g, 10 分間遠心分離して菌を回収し、滅菌蒸留水で2回洗浄して等量の滅菌蒸留水に再懸濁し、全量を 50 ml のスキムミルク培地に植菌した。植菌後 0, 6, 12, 24 時間後の pH を測定した。

#### プロティナーゼ活性の検定

ミルク培地で培養した乳酸菌のプロティナーゼ活性は、*o*-フタルジアルデヒド (*o*-phthalaldehyde) 法 (OPA 法) で検定した。試験に用いた OPA 溶液 (50 mM クエン酸三ナトリウム, 1% SDS, 6 mM OPA, 0.2%  $\beta$ -メルカプトエタノール) は、使用直前に調製した。試験菌は 10% スキムミルク培地に 1% 接種し、30°C で 24 時間培養した。50  $\mu$ l のミルク培養液を 1 ml の OPA 溶液に加えて混合し、室温で 2 分間インキュベートした後、BECKMAN DU 640 Spectrophotometer (BECKMAN, CA, USA) を用いて 340 nm の吸光値を測定した。

#### クレアチンテスト

スキムミルク培地で培養した乳酸菌のジアセチル生成能は、クレアチンテストで確認した。供試菌を 10% スキムミルク 5 ml で一晩培養後、1 ml の 0.5% クレアチンと、試験直前に調製した 1 ml の 2.5 M 水酸化ナトリウム、5% *a*-ナフトールを添加して混合し、室温で 1 時間放置し、赤色化の有無を観察した。

### 2. 結果

#### プラスミド除去株の取得

pCVc8 のインサートは、*L. l. lactis* biovar diacetylactis

N7 に内在するプラスミドの複製単位を鋳型に増幅した。pCVc8 のインサートの DNA 配列は、既知のクエン酸資化性プラスミドの複製単位の配列と高い相同性があった<sup>70)</sup>。*L. lactis* N7 に pCVc8 を導入して内在する不和合性プラスミドを除去し、プラスミド除去株 *L. lactis* N7  $\Delta$  pCit を育種した (Fig. 19)。

#### プラスミド除去株の乳発酵能の解析

*L. lactis* N7 とプラスミド除去株 *L. lactis* N7  $\Delta$  pCit を接種したスキムミルク培地の pH 変化と、スキムミルクの凝固時間を比較した。*L. lactis* N7  $\Delta$  pCit 接種区のスキムミルクの pH 低下は、*L. lactis* N7 接種区よりも早く、短い時間でスキムミルクを凝固させた (Table 9)。この結果は、プラスミド除去株の乳発酵能は、pCVc8 によるプラスミド除去操作で低下せず、むしろ野生株よりも乳発酵完了までの時間が短縮されたことを示唆している。また OPA 法で N7, N7  $\Delta$  pCit およびプロティナーゼ活性の無いプラスミドフリー株のプロティナーゼ活性を比較した。 $\Delta$  OD340 nm の測定値は各々 0.084, 0.091, 0.002 であり、プラスミド除去株には野生株と同等のプロティナーゼ活性があった。

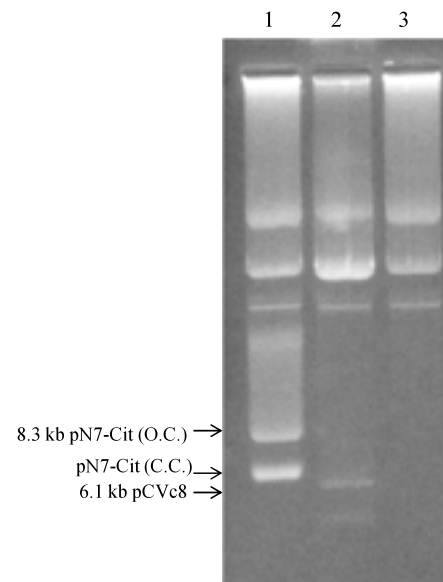


Fig. 19. Plasmid profile of *L. lactis* N7 and variants.

- 1, *L. lactis* N7 wild type strain
  - 2, *L. lactis* N7 containing pCVc8 and eliminating pN7-Cit
  - 3, N7 $\Delta$ pCit variant (*L. lactis* N7 eliminating pN7-Cit and pCVc8)
- C.C. indicates closed circular plasmid  
O.C. indicates open circular plasmid  
pCVc8 indicates competitor to pN7-Cit

Table 9. Comparison of milk fermentation ability of *L. lactis* N7 with N7<sup>2</sup>pCit

Strain	Lactose utilization	Proteinase activity	Diacetyl production	6h-pH <sup>a)</sup>	12h-pH <sup>b)</sup>	Coagulation time <sup>c)</sup>
<i>L. lactis</i> N7	+	+	+	5.8	4.7	12
N7ΔCitP	+	+	-	5.4	4.5	10

a), culture pH of *L. lactis* N7 and N7<sup>2</sup>pCit -N7 in sterile 10% (w/v) reconstituted skim milk from a 1% inoculum after 6 h of growth at 30°C (initial pH of 10% reconstituted skim milk was 6.6).

b), culture pH of *L. lactis* N7 and N7<sup>2</sup>pCit -N7 after 12 h of growth at 30°C

c), coagulation time (hour) of skim milk from a 1% inoculum

a), b), and c), values are means of 3 trials.

### プラスミド変異株のジアセチル生成能の解析

クレアチンテストの結果、プラスミド除去株 N7 Δ pCit は、クエン酸代謝によって生じるジアセチルの生成能を失っていた (Table 9)。したがって除去された約 8 kb のプラスミドは、クエン酸資化性プラスミドであることが確認された。*L. lactis* N7 Δ pCit も第 2 章、第 1 節に記述した DRC1 Δ pDRI-1 と同様に、菌体内に外来遺伝子を含まず、乳発酵スターターとして用いることができる。

### 3. 考察

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の中には、牛乳中のクエン酸を代謝し、ジアセチルやアセトインを生産する菌株があり、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* として区別されている<sup>15)</sup>。*diacetylactis* は、pH5.0 - 6.0 に至適 pH をもつプロトン共輸送系のクエン酸パーミアーゼ (citrate permease: CitP) の働きで、培地中のクエン酸を菌体細胞内に取込み、クエン酸リアーゼによってオキサロ酢酸と酢酸に分解する。オキサロ酢酸はオキサロ酢酸デカルボキシラーゼによってピルビン酸に転換され、いくつかの中間体を経て芳香成分であるジアセチルを生成する。*L. lactis* のクエン酸代謝経路のうち、CitP は、通常プラスミドにコードされているが、その他の遺伝子はクロモゾーム支配である<sup>43, 44)</sup>。またクエン酸リアーゼはクエン酸誘導酵素であることから、CitP- プラスミドを持たない菌株では、クエン酸リアーゼ活性がかなり低くなる。したがって、*L. lactis* のジアセチル生成能は、実質 CitP- プラスミドの内在によって決定される。

*L. l. lactis* biovar *diacetylactis* N7 は、乳製品から分離された研究室保有株で、3 種類のプラスミドを保有している。サザン解析の結果から、そのうち 8.3-kb のプラスミドが CitP- プラスミドと推定された (未発表)。

*L. lactis* N7 は、胆汁酸耐性、pH 耐性共に高く、マウスの試験では生きたまま腸に到達することが確認されており、プロバイオティクスとしての利用が期待されている (木元ら特許: 特許第 3777296 号)。また増殖期の菌体は、培地中のコレステロールを除去する能力が高い、抗酸化能力が高いなど、生体調節機能を付加した発酵食品、例えば機能性ヨーグルトなどの種菌としての利用が期待されている<sup>46)</sup>。

ジアセチルは非常に強い臭いを有する化合物であり、微量でも発酵飲食品の香味品質に大きな影響を与える。同時に抗菌性も有し、200 μg/ml でイーストやグラム陽性菌の、300 μg/ml でグラム陰性菌の増殖を阻止する。乳酸菌自体は 350 μg/ml でも抑制されない。発酵乳製品では、ジアセチル臭を品質特徴とするものが多い。特にカッテージチーズやクリームチーズなどの非熟成チーズ、発酵バター、サワークリームなどでは好まれる香りであり、その製造には種菌としてジアセチル生成能の高い *L. l. lactis* biovar *diacetylactis* や *Leuconostoc cremoris* などが用いられる。しかしこのジアセチル臭は、アセトアルデヒドの爽やかな香りが好まれる発酵乳や乳酸菌飲料では、むしろ感じられない方が好ましい。特に我が国の場合、欧米に比べ、ジアセチルに対する馴染みのなさが指摘されている<sup>94)</sup>。

*L. lactis* N7 の 8.3-kb プラスミドに対する不和合性プラスミド pCVc8 を構築し、*L. lactis* N7 に導入することによって、本プラスミドを選択的に除去し、*L. lactis* N7 Δ CitP を育種した。クレアチンテストの結果、*L. lactis* N7 Δ CitP はジアセチルを生成しないことが確かめられた。親株あるいは *L. lactis* N7 Δ CitP をスターターに用いて 6 時間および 12 時間発酵させた発酵乳中の乳酸菌数に有意差は無く、乳中での両菌株の増殖能は変わらなかった (未発表)。しかし *L. lactis* N7 Δ CitP を用いた場合には、親株よりも発酵乳の pH 低下が早く、乳凝固時間が

有意に短縮し、発酵乳の最終 pH も低かった。また *L. lactis* N7 Δ CitP を用いた発酵乳は、親株を種菌としたものよりもカードが固く、酸味が際立ち、ヨーグルト臭が強く感じられた。クエン酸透過性プラスミド除去株は、牛乳中に約 0.1 – 0.2% 含まれるクエン酸を全く代謝しない。そのため *L. lactis* N7 Δ CitP を用いた発酵乳では味やフレーバーに違いが感じられたのかもしれない。

*L. lactis* の CitP- プラスミドは、変異剤などで処理しても容易に欠損株を得られないことが知られている。本研究で考案したプラスミドの選択的除去は、CitP- プラスミドの除去を容易にした。本法により乳発酵能を損なうこと無く種菌の発酵特性を変更でき、製品の風味改良に繋がる。

### 第3章 プラスミドの選択的除去で見出された新しいプラスミド性因子の解析

#### – 宿主遺伝子の安定化に働くプラスミドの発見 –

#### 緒 言

遊離アミノ酸量が少ない牛乳中で、*Lactococcus lactis* が生育するためには、細胞壁結合型プロティナーゼ (PrtP および PrtM) と幾つかのペプチダーゼが働いて、カゼインを *L. lactis* が必要とするアミノ酸や分子量の小さなペプチドにまで分解することは極めて重要である。さらに細胞膜に位置し、カゼイン分解ペプチドの取込みに働くオリゴペプチドトランスポーター (Opp) が、fast-coagulation-phenotype (短時間に乳を凝固する表現形質) には必要不可欠であることが示されている<sup>20, 93)</sup>。Opp システムは初め、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SSL135 のクロモゾームに由来する約 8.9 kb フラグメントとしてクローニングされ、ミルク培地における *L. lactis* の速やかな生育に必要な遺伝子群として同定された<sup>90)</sup>。またその後の遺伝子解析によって、8.9 kb フラグメントは、*oppA*, *B*, *C*, *D*, *F* およびペプチダーゼ (*pepO*) を含む遺伝子クラスターをコードしていることが明らかとなった<sup>89)</sup>。通常 *prt* や *opp*, さらに乳糖分解に働く *lac* など発酵に重要な形質は、insertion sequence (IS) に隣接し、時には複合トランスポゾン形成し、乳酸菌のゲノム内を転移することが知られている<sup>74)</sup>。

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO712 とその派生株は、*L. lactis* のプロトタイプとして、世界中で最も研究されてきた菌株である<sup>32, 92)</sup>。*L. lactis* NCDO712 は、pLP712, pSH74, pSH73, pSH72, および pSH71 の 5 種類のプラスミドを内在している<sup>32)</sup>。そのうち pSH71 と

pLP712 については詳しく研究されている。すなわち pSH71 はローリングサークル複製型プラスミドで、*L. lactis*, *E. coli*, および *Bacillus subtilis* で複製することから、その複製領域の DNA 配列が、*L. lactis* で汎用するクローニングベクターの構築に利用されている<sup>22, 56)</sup>。一方 *L. lactis* NCDO712 に内在する最も分子量の大きい 55 kb のプラスミド pLP712 は、 $\theta$ -複製型プラスミドであり、*lac*-遺伝子クラスター、*prtP* および *prtM*, さらに *opp-pepO* 遺伝子クラスターをコードしている<sup>59)</sup>。Le Bourgeois らは、*L. lactis* NCDO712 とその派生株のクロモゾームを NotI, ApaI, および SmaI で消化し、パルスフィールド電気泳動を用いて制限酵素分解多型を調べている。その結果、*opp-pepO* クラスターの遺伝子座は、ごく近縁の菌株間でも一致せず、*opp-pepO* クラスターが隣接する IS エlement と共に複合型トランスポゾン形成し、短い期間に転移を繰り返していることを示唆した<sup>53)</sup>。*L. lactis* NCDO712 においては、*opp-pepO* クラスターは前述の通り pLP712 にコードされていたが、クロモゾームにも ISS1 と IS982 に挟まれ 1 コピー存在した<sup>53)</sup>。隣接する IS と共に *opp-pepO* がゲノム内を転移する状況証拠は多く得られているものの、転移を誘起する特異的な信号や、細胞の状態は特定されていない。

我々の研究室で継代し保存している *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 も *L. lactis* NCDO712 の派生株である。しかし 55 kb プラスミド (*L. lactis* NCDO712 では pLP712) の制限酵素分解パターンが、親株の pLP712 とは異なるなど、研究所での継代期間中に、既にプラスミドの組み換えが起こったことが示唆されている (Fig. 20)。*L. lactis* NIAI712 は、親株である *L. lactis* NCDO712 と同様に、5 種類のプラスミドを有している (Fig. 20)。そのうち約 9 kb のプラスミド pAG6 はコピー数も多く、非常に安定である。*L. lactis* NCDO712 においても同じ分子量のプラスミド pSH73 は、特異的な除去株が得られておらず、その機能は調べられていない<sup>32)</sup>。本章では、第 1 章に記述した方法を用いて、pAG6 を選択的に除去し、その機能解析を行った。*in vitro* で作出した競合プラスミドによって pAG6 を選択的に除去すると、高頻度で発酵遅延株が出現した。この結果は、pAG6 除去株では、乳発酵能を損なうような遺伝子変異が高頻度で起こっていることを示唆している。本章では pAG6 の選択的除去を端緒として見出されたプラスミドの新しい機能とその解析結果について記述した。

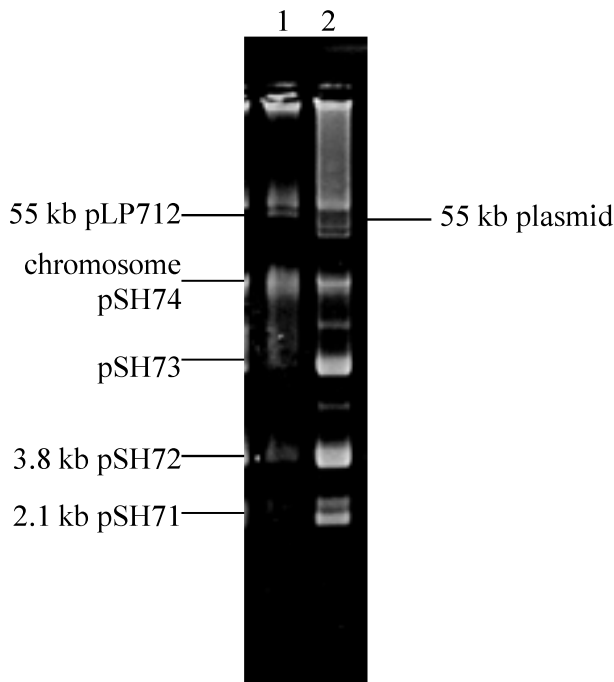


Fig. 20. Plasmid profile of *L. lactis* NIAI712 and parent strain *L. lactis* NCDO712.  
 1, Total plasmid of *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO712  
 2, Total plasmid of *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712  
 The accurate sizes and properties of pSH73 and pSH74 have not been studied.

## 第1節 プラスミドの選択的除去による発酵不良の原因解明

### 1. 材料および方法

#### 菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 10 にまとめた。*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 は、定期的に復帰培養し、20年以上保存している当研究室の研究室保存株であるが、最初の由来は *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO712 の派生株である<sup>32)</sup>。

#### 培地と培養条件

*E. coli* および *L. lactis* の培養は、第1章、第2節に記述した方法で行った。Em<sup>R</sup>をコードしたプラスミドを保有する *L. lactis* は、TYGに2 μg/mlのエリスロマイシンを添加したTYG-Eで培養した。

#### プラスミドの調製、組換えプラスミドの作成および形質転換

*E. coli* プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分

解、ブランチング、ライゲーション反応および形質転換は、第1章、第1節に記述した方法で行った。pAG6 に対する不和合性誘導プラスミド pCVm6 の作出法、性質、および pCVm6 を用いたプラスミドの除去法は第1章、第3節に記述した。

#### アガロースゲル電気泳動

プラスミドおよび DNA フラグメントのアガロースゲル電気泳動は、第1章に記述した方法で行った。

#### DNA 配列解析

供試したプラスミド pAG6 は、*L. lactis* NIAI712 トータルプラスミドのアガロース電気泳動ゲルから精製し、実験に供した。プラスミドの全配列を解析するために、約 9-kb の pAG6 を Hind III で 4-kb と 5-kb のフラグメントに切断し、pBluescript II にクローニングした。作出したプラスミド pBAG61, pBAG62 から、デリーションクローンを作成し、シーケンズのテンプレートとして用いた。BigDye Kilo Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてシーケンズ反応し、Applied Biosystems 3730 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて配列データを得た。配列データは GenetixMac ver. 11 (Genetyx, Tokyo, Japan) を用いて解析した。ORF 解析および相同性解析には、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) database の BLAST または FASTA 解析を用いた。全配列を DDBJ データバンクに登録した (アクセッションナンバー: AB198096)

#### 増殖測定

第2章、第1節の方法に従って行った。

#### 乳酸生成能の検定

第2章、第2節の方法に従って行った。

#### 乳発酵能の検定

乳発酵能は、接種した試験菌の乳酸生成によるカード形成を指標に評価した。すなわち TYG で前培養した供試菌 5 μl を 10% スキムミルク 5 ml (11 mm 試験管) に接種し、30℃ で 12 時間静置培養した。培養後試験管を転倒し、発酵乳の凝固状態を調べた。発酵乳のカードが壊れなければ凝固と判定した。また試験培養中の発酵乳を 1 時間毎に静かに転倒し、供試菌接種から凝固までの時間を測定して乳凝固時間とした。

Table 10. *Lactococcus lactis* strains and plasmids

Strain or Plasmid	Properties	Reference or source
<b><i>Lactococcus lactis</i></b>		
NIAI712	Wild type	Lab. Collection
MG1363	Plasmid-free derivative of NCDO712	Gasson <i>et al.</i> , (1983)
$\Delta$ pAG6 variant		
712d35	pAG6-cured derivative of NIAI712	This study
712d51	pAG6-cured derivative of NIAI712	This study
712d61	pAG6-cured derivative of NIAI712	This study
712dR variant		
712dR1	derivative of NIAI712 harboring pAG6dR	This study
712dR2	derivative of NIAI712 harboring pAG6dR	This study
712dR3	derivative of NIAI712 harboring pAG6dR	This study
<b>Plasmids</b>		
pAG6	8.7-kb $\theta$ -plasmid from <i>L. lactis</i> NIAI712	This study
pAG3	50-kb $\theta$ -plasmid from <i>L. lactis</i> NIAI712	This study
pLac-Prt	55-kb $\theta$ -plasmid from <i>L. lactis</i> NIAI712 carrying Lac-operon and PrtP/M	This study
pDR1-1B	7.3-kb $\theta$ -plasmid from <i>L. lactis</i> DRC1	Kobayashi <i>et al.</i> (2007)
pDB1	shuttle vector for <i>E. coli</i> and <i>L. lactis</i> . Partial replicon of pDR1-1B with an EmR gene cloned into pBluescriptII, ApR, EmR	Kobayashi <i>et al.</i> (2007)
pCVm6	Competitor to pAG6. An incompatibility determinant of pAG6 cloned into pDB1, EmR (strongly incompatible with pAG6 and unstable)	Kobayashi <i>et al.</i> (2007)
pAG6dR	A competitor to pAG6. A truncated- <i>rep</i> and <i>ori</i> of pAG6 with an EmR gene cloned into pBluescriptII, ApR, EmR (weakly incompatible with pAG6)	This study
p8Em1	pUC118 containing pAM $\beta$ 1 EmR gene	Ito and Sasaki (1994)

EmR, resistance to erythromycin; ApR, resistance to ampicillin

## RNA の調製

供試菌株は、前日から一晩 TYG で培養し用いた。40  $\mu$ l の培養液を 40 ml TYG リシス培地に接種して、30°C で OD = 0.25 ~ 0.3 まで静置培養し、菌を 1,800 g で 10 分間遠心分離して集菌した。菌は滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、100  $\mu$ l のリゾチーム (3 mg/ml) 添加 TE バッファー (pH 8.0) に懸濁して 37°C で 15 分間インキュベートした。細胞壁を消化した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い、付属の使用説明書にしたがってトータル RNA を精製した。RNA の濃度と精製度は、DU 640 spectrophotometer (BECKMAN) を用いて 260 nm と 280 nm の吸光度を測定して確認した。

## マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析に用いるジーンチップの設計、ハイブリダイゼーション、RAM (Robust Multi-chip Analy-

sis) アルゴリズムによるデータ補正、解析、および統計処理はジーンフロンティア社に依頼した (GeneFrontier Corporation, Tokyo, Japan)。 *L. lactis* strain は通常、約 2-Mb のクロモソームと複数のプラスミドを有する。また乳発酵に重要な遺伝子は、プラスミドにコードされている。そこで GenBank (DDBJ) に登録されている、プラスミドフリー株 *L. lactis* IL1403 の全遺伝子配列および *L. lactis* 由来のプラスミド配列 (J05748, AF247159, X99798, AF409136, AF242367, AF036485, AF243383, AF207855, J04962, AE005176) をもとにアレイを設計した。マイクロアレイのスペックは Table 11 にまとめた。アレイには 2,533 遺伝子を搭載したが、これはアレイ設計に用いた *L. lactis* IL1403 およびプラスミドの DNA 配列から推定される ORF の合計なので、機能の同じ遺伝子を重複する場合もある。マイクロアレイの詳細なスペックは、NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)



Table 11. Microarray specification

Strain	<i>Lactococcus lactis</i>
Data source	DDBJ accession No (J05748, AF247159, X99798, AF409136, AF242367, AF036485, AF243383, AF207855, J04962, and AE005176)
Number of genes	2,533
Number of probes	44 perfect match probes × 2,533 (111,452)
Probe size	24 mer

に登録した。アクセッションナンバーは、GPL6536 である。マイクロアレイ解析結果は同じく GEO に登録した。 *L. lactis* NIAI712 の結果はアクセッションナンバー GSM269644, 712d35 の結果は GSM269645 である。

コロニー PCR による保有遺伝子の確認

遺伝子の確認に用いた PCR プライマーは Table 12 にまとめた。操作は第 2 章, 第 1 節に記述した方法で行った。

パルスフィールド電気泳動 (PFGE ; Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

パルスフィールドゲル電気泳動を用いた染色体電気泳動は、Kojic らの方法を参考に行った。供試菌は OD = 0.6 まで TYG リシス培地で培養し、遠心分離で集菌した。EET バッファー (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) で 2 回洗浄し、10<sup>9</sup> cell/ml になるように、TEE に再懸濁した。溶解した 2% Certified™ Low Melt Agarose (Bio-Rad Laboratories) と懸濁した菌とを 1 : 1 に混合し、100 μl のキャスティングモールドに入れ、4℃, 10 分間冷却して固めた。細胞壁を分解するために、4 個のプラグを N-lauroyl sarcosine (0.05% w/v) と lysozyme (1 mg/ml) を含んだ TEE バッファー 1 ml に入れ、37℃で 4 時間インキュベートした。次にアガロースプラグをプロテイナーゼ K バッファーに移し、55℃で一晩インキュベートした。プロテイナーゼ K 処理後、プラグは 20 ml の TE バッファー (10 mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8.0) で 2 時間ずつ 2 回洗浄した。

Table 12. Oligonucleotide primers and probes used in this study

Primer	Gene target	Fragment size (bp)	Sequence
CdAF	<i>cadA</i>		TTGCCAGGAGTTACGAGTGCACACAGT
CdAR	<i>cadA</i>	1200	TGGTTGCAATGAAATCCGTTACGACA
HsF1	<i>hsdS</i> in pAG6		GGGGTTATTATCTAATTATAGACC
HsR1	<i>hsdS</i> in pAG6	690	TCGGTTCATTCTTTAAACAGCTGG
HsF2	<i>hsdS</i> -homolog		AAAATGTTCCCTAAAAATGGT
HsR2	<i>hsdS</i> -homolog	552	AAACATCTTTTGTA AAAAGCC
LGF1	<i>lacG</i>		GAATGCCACAAGCGTCATGTTGAACC
LGR1	<i>lacG</i>	1000	TGACCATGAGAAAACGTCCATAAGTG
763prF	<i>priP</i>		ACATGTCCTTAGGATCTGATTTCAG
763prR	<i>priP</i>	950	TTGATGGCTGGGCAGTATTCATC
OpAF	<i>oppA</i>		ACTCCTAAGTGCTTGTGGTTCTAA
OpAR	<i>oppA</i>	1700	TCAAGCGTCATTCCAACACTACAG
OpDF	<i>oppD</i>		CACTCACTGCGCTTAATCCATTGATG
OpFR	<i>oppF</i>	790	TCTGTCACCTCGATTAAGAAACCA
OpCF	<i>oppC</i>		TCTAGTTGCTGTCTTTCTAATCGT
OpCR	<i>oppC</i>	770	GCCACTCGTCTTAGTGCATTCCG
S1F	<i>tmpS1</i>		GCGCCCTCTATTGGTTCTGCATTTAG
S1R	<i>tmpS1</i>	162	GGTTGAGGCAGTTCGTAGACTTCGAT
981F	<i>tmp981</i>		TAACCGAGGAATCTATGGTGCTCCTA
981R	<i>tmp981</i>	157	GTGATCACTTAGTGAGTATCCAGGCT
982F	<i>tmp982</i>		CCTCTTACCGAGTATCCAAGTCATTC
982R	<i>tmp982</i>	154	GCCAACATTGCATAATCTCCAAGAC
1077F	<i>tmp1077</i>		TAAATGACAGACGCTTCAGAAGCTT
1077R	<i>tmp1077</i>	156	GAGATATGATAACTAATCACCTCGT

次に1 mlのApaIバッファーに浸漬し、4℃で30分間インキュベートした。次にApaI 20 ユニットを含む200  $\mu$ lのApaIバッファーにプラグを1個ずつ入れ、37℃でインキュベートし、2時間後、さらにApaI 20 ユニートを加えて2時間反応させた。次にプラグを染色バッファー(40% シュークローズ、10 mM EDTA、0.01% BPB)に移して制限酵素反応を止めた。制限分解後のプラグをナイフで1/2に切断し、1% アガロースゲルのサンプル wellに詰め、0.5  $\times$  TBE (45 mM Tris、45 mM ホウ酸、1 mM EDTA、pH 8.0) で泳動した。PFGEは、CEFF DR-III (Bio-Rad) を用いて以下の設定で行った。電圧6 V/cm、スイッチングタイム50-90秒、アングル120°、22時間、14℃。ランニングバッファーには0.5  $\times$  TBE 21を用いた。サイズマーカーとしてファージ $\lambda$ コンカテマーを用いた<sup>91)</sup>。

### Southern 解析

Southern トランスファーにはHybond-Nメンブレン(Buckinghamshire, UK)を用い、VacuGene XL (GE Healthcare, Tokyo, Japan)で、付属の使用説明書に従って行った。ハイブリダイゼーションプローブは、*lacG*、およびISS1、IS982、IS1077の転移酵素*tnpSI*、*tnp982*、*tnp1077*の内部配列をDIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いてDIG-標識して調製した。ハイブリダイゼーション操作および検出操作は、Kit付属のロシュ社の使用説明書に従って行った。ハイブリダイゼーションおよびメンブレン洗浄の条件は次の通りである。すなわち、ハイブリダイゼーションは、トランスファーメンブレンとDIG-標識プローブを42℃一晩インキュベートして行った。メンブレンの洗浄は、2  $\times$  SSC、0.1% SDS、室温5分間2回、0.5  $\times$  SSC、0.1% SDS、68℃、15分間2回、いずれもフナコシ社のHB-1000 Hybridizerで振とうしながら洗浄した。

## 2. 結果

### プラスミドの選択的除去による変異株の作出

*L. lactis* NIAI712は、約9-kbの機能未知なプラスミドpAG6を含む5種類のプラスミドを保有している。pAG6の機能を調べるために、*in vitro*で作成した競合プラスミドpCVm6を*L. lactis* NIAI712にエレクトロポレーションで導入し、異なるコロニー由来のpAG6除去株( $\Delta$ pAG6)を作出した(Fig. 21)。すなわち、pCVm6導入菌株NIAI712 (including pCVm6)<sup>ER</sup>をTYL-Eアガープレ

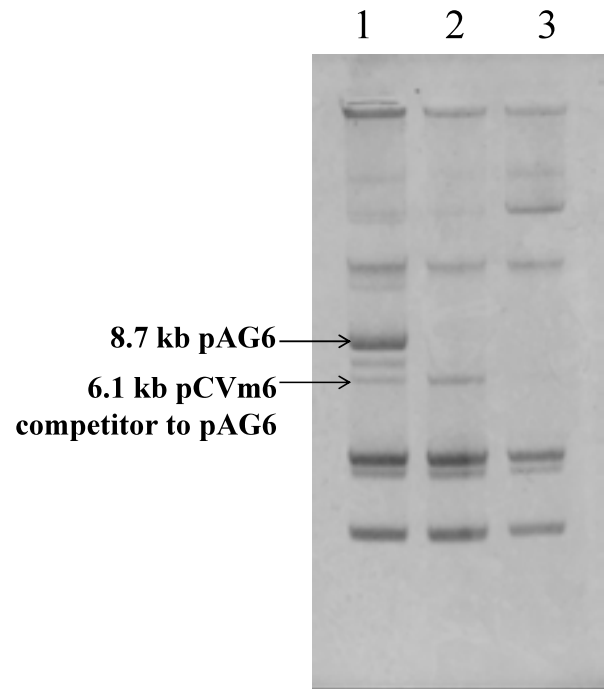


Fig. 21. Plasmid profile of *L. lactis* NIAI712 and variants.  
1, *L. lactis* NIAI712 containing a competitor pCVm6  
2, *L. lactis* NIAI712 containing pCVm6 and eliminating pAG6  
3,  $\Delta$ pAG6 variant (*L. lactis* NIAI712 eliminating pAG6 and pCVm6)

ートで培養して出現したコロニーを釣菌し (Fig. 21, lane 1), 10 mlのTYL-E培地で5回培養を繰り返した後、再びTYL-Eアガープレートでコロニーを形成させた。コロニーを釣菌してTYGリシス培地で培養してプラスミドを抽出し、pAG6除去菌株を選抜した (Fig. 21, lane 2)。最後にプラスミド除去に用いた競合プラスミドpCVm6を除去するためにTYL培地で5回培養を繰り返した後、TYLアガープレートでコロニーを形成させ、TYL-Eアガープレートにレプリカしてエリスロマイシン感受性菌を選抜した。選抜した菌株( $\Delta$ pAG6株)はすべてpCVm6非保有菌で、トータルプラスミドの電気泳動像は、Fig. 21, lane 3に示したものと同じだった。異なるNIAI712 (including pCVm6)<sup>ER</sup>コロニー由来の菌株の内、9株を保存した。Table 10に、本章の研究に用いた菌株とプラスミドをまとめた。作出した $\Delta$ pAG6株のうち3株*L. lactis* 712d35, 712d51, 712d61を発酵試験に用いた。 $\Delta$ pAG6株と親株*L. lactis* NIAI712をスキムミルクに接種し、乳発酵能を比較した。菌接種12時間後の発酵乳の凝固状態を調べたところ、 $\Delta$ pAG6株接種区のスィムミルクはカードを形成せず、乳発酵能が野生株に比べて著しく劣っていた (Fig. 22)。*L. lactis*



Fig. 22. Skim milk after 12 h fermentation using *L. lactis* NIAI712 or ΔpAG6 variants.

Five μl of TYG-culture solutions were inoculated into 5 ml of skim milk and fermentation were performed at 30 °C. 1 and 2, Fast coagulation phenotype (*L. lactis* NIAI712 wild type strain). 3 and 4, Slow coagulation phenotype (ΔpAG6 variant 712d35 and 712d51).

NIAI712 は、当研究所でチーズスターターとして用いており、乳の発酵能力が高い。しかし乳発酵試験の結果から、機能未知プラスミド pAG6 を除去すると乳発酵遅延が起こった。このことから著者は pAG6 が乳発酵に重要な未知の機能に関与すると考え、pAG6 の機能解析を行った。

### 発酵不良原因の調査

Δ pAG6 株の示す発酵不良の原因を調べるために、乳糖資化能とカゼイン資化能を *L. lactis* NIAI712 と比較した。まず Δ pAG6 株の乳糖資化能を試験するために、*L. lactis* 712d35 の TYL 培地における増殖を野生株と比較した。*L. lactis* 712d35 は TYL 培地で良く増殖すると共に、ラクトースを糖源として乳酸を生成し、培地の pH

を速やかに低下させた。Δ pAG6 株の増殖カーブおよび pH カーブは *L. lactis* NIAI712 のものと一致し、ラクトース代謝能力は野生株と変わらないことが示唆された。次に、Δ pAG6 株のカゼイン資化能を試験するために、*L. lactis* 712d35 のスキムミルク培地、および 1% トリプトン添加スキムミルク培地における増殖を野生株と比較した。*L. lactis* NIAI712 をスキムミルクに接種し、発酵乳の pH 低下を測定するとともに乳凝固時間を調べた。その結果、発酵開始から 7 時間後、pH4.8 で発酵乳は凝固した。また発酵 8 時間後の pH は 4.6 に低下し、カゼインの等電点 (pH4.6) に達した。しかし 712d35 を接種した試験区では、培養 24 時間後においても発酵乳の pH は 5.1 であり、カードは形成しなかった。一方スキムミルクにトリプトンを添加した培地で培養すると、*L. lactis* 712d35 を接種した試験区でも pH は速やかに低下し、培養 7 時間後、pH4.6 でカードが形成された。*L. lactis* 712d51 および 712d61 の生育試験の結果は *L. lactis* 712d35 の結果と一致した。これらの結果から、Δ pAG6 株の発酵不良原因は、カゼイン代謝能の欠陥によることが明らかとなった。

### pAG6 の塩基配列分析

pAG6 の機能を調べるために、プラスミドの全 DNA 配列を決定した。また pAG6 の全配列および推定されるオープンリーディングフレーム (ORF) の情報を DDBJ に登録した (アクセッションナンバー; AB198096)。pAG6 全配列中の G+C 含量は 33.7% で、8,662 bp からなり、6 個の ORF が存在した。pAG6 の制限酵素地図および ORF の大きさと向きを Fig. 23 に、FASTA プログラムによる相同性解析の結果を Table 13 示した。第 1 番目の ORF は、*repB* と高い相同性があり、*repB* 上流には、22-bp フラグメントの 3.5 回繰返し配列を含む *ori* が存在した。また *repB* 直下に *orf588*, *orfX*, さらに type I 制限/修飾システムの認識サブユニット遺伝子 *hdsS* が隣接し、典型的な *L. lactis* θ -複製型プラスミドの複製領域の構造が保存されていた。*orf588*, *orfX* および *hdsS* の 5' 側にはプロモーター配列が無く、*orf588*,

Table 13. ORF encoded by pAG6

Gene name	<i>repB</i>	<i>orf588</i>	<i>orfX</i>	<i>hdsS</i>	<i>cadC</i>	<i>cadA</i>
properties	plasmid replication	unknoun	plasmid replication	type I-R/M subunit	transcriptional regulatory repressor	cadmium resistance
size (bp)	1,221	588	651	1,236	369	2,130

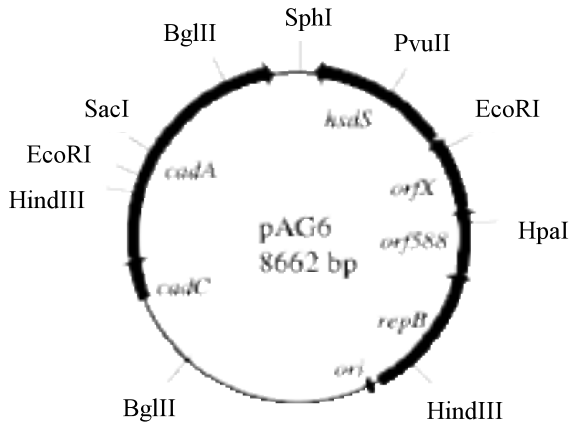


Fig. 23. Physical and genetic map of plasmid pAG6 in *L. lactis* NIAI712.

*orfX* および *hsdS* の転写は、上流の *repB* プロモーターに制御されていることが示唆された。*hsdS* 下流の5番目と6番目のORFは、既知のCd<sup>2+</sup>-specific P-type efflux ATPase (CadA; カドミウム耐性因子) と転写レPRESSA (CadC) の遺伝子配列と一致した<sup>41, 55, 58, 66</sup>)。 *L. lactis* のカドミウム耐性プラスミドは、1994年にLuiらによって最初に報告された<sup>58</sup>)。同定されたカドミウム耐性プラスミド pND302 は8.8-kbと報告されているが、その制限酵素地図、最小複製単位 (*ori* and *repB*) および *cadA-cadC* 領域の配列は、pAG6と完全に一致した。*L. lactis* NIAI712のカドミウム耐性を試験したところ、野生株は300 μM CdCl<sub>2</sub> 添加培地で生育したが、Δ pAG6株は20 μM 添加培地で生育できなかった (data not shown)。このことからpAG6もpND302と同様に、宿主のカドミウム耐性を決定することが示唆された。

#### *L. lactis* NIAI712 および *L. lactis* 712d35 の発現遺伝子の網羅的解析

対数増殖期の *L. lactis* NIAI712 とそのΔ pAG6株 *L. lactis* 712d35 の遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて比較解析した。本試験で使用したマイクロアレイは、1遺伝子あたり、44のパーフェクトマッチプローブを用いている。

2サンプル間で発現に有意差 (危険率5%以下) が認められた276遺伝子中、1.5倍以上発現量の異なる遺伝子は53あった。そのうち、野生株と比較して、*L. lactis* 712d35で75%以下に発現が低下している遺伝子は43で、12.5%以下に低下しているものが33遺伝子あった。33遺伝子は、i) ラクトース資化 (Lac) に関する10

遺伝子、ii) プロテイナーゼ活性 (Prt) に関する10遺伝子、iii) オリゴペプチドトランスポーター (Opp) に関する4遺伝子の、iv) 除去されたpAG6にコードされている9遺伝子の、4つのグループに分類された。グループi) およびii) に分類される遺伝子の発現量の低下は、1/10～1/20であるのに対して、グループiii) およびiv) に分類される遺伝子では1/80以下に発現量が低下しており、Oppシステムの構成遺伝子である *oppF* は約1/200に低下していた。また *L. lactis* 712d35では、遺伝子転移の原因となるISS1, IS982, IS1077の転移酵素 (トランスポゼース; Tnp) の発現量が、野生株の75%～25%に低下していた。

#### 遺伝子の確認

アレイ解析の結果、*L. lactis* 712d35では、野生株 *L. lactis* NIAI712と比較して乳糖資化性遺伝子群 (*lac*)、菌体外プロテイナーゼ遺伝子 (*prtP*, *prtM*)、およびオリゴペプチドトランスポーター遺伝子群 (*opp*) の発現が著しく低下していることが明らかとなった。変異剤やプロトプラスト形成法によるランダムなプラスミドの除去操作では、同時に2種類以上のプラスミドが失われる現象がしばしば起こる。また、*L. lactis* NIAI712の近縁株 *L. lactis* NCDO712では、*lac*, *prt*, *opp* 遺伝子群は、同じ55-kbのプラスミド pLP712にコードされている<sup>32</sup>)。そこで、*L. lactis* 712d35で1/8以下に発現量の低下した *lac*, *prt*, *opp* 遺伝子群の有無を、コロニーPCRで確認した。増幅フラグメントの有無はTable 14にまとめた。*L. lactis* NIAI712の試験区では、*cadA*, *hasS*, *lacG*, *prtP*, *oppA*, および *oppD* に由来する増幅フラグメントが得られ、その大きさは既知配列の予想と一致した (Table 14)。一方 *L. lactis* 712d35の試験区では、*lacG*, *prtP* に由来する増幅フラグメントのみ得られた。*L. lactis* 712d51 および 712d61の試験区の結果は712d35と同じだった。このことは、Opp遺伝子群がΔ pAG6株のゲノムから消失していることを示唆している。

#### オリゴペプチドトランスポーターオペロンの確認

Fig. 24には、以前報告された *L. lactis* NCDO712の pLP712にコードされている *lac*, *opp* 遺伝子群のオペロン構造を示した。*L. lactis* NCDO712では、約9kbにわたるOppクラスターは、Prt遺伝子群 (*prtP* & *prtM*) およびLacクラスターと共に約55KbのpLP712にコードされ、さらにクロモゾームにも同じ構造の遺伝子群がコードされていることが確認されている<sup>53</sup>)。コロニー

Table 14. PCR analysis to confirm the residence of the *lac*-cluster, *prtP/M*, and *opp-pepO* in *Lactococcus lactis* NIAI712 and variants.

Strain	<i>cadA</i>	<i>hsdS</i> (pAG6)	<i>hsdS</i>	<i>lacG</i>	<i>prtP</i>	<i>oppA</i>	<i>oppD</i>
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>							
NIAI712	+	+	ND	+	+	+	+
MG1363 (plasmid-free)	-	-	+	-	-	+	+
712d35 ( $\Delta$ pAG6)	-	-	+	+	+	-	-

+ a specific amplicon could be obtained by PCR  
 - no product could be amplified  
 ND, not done

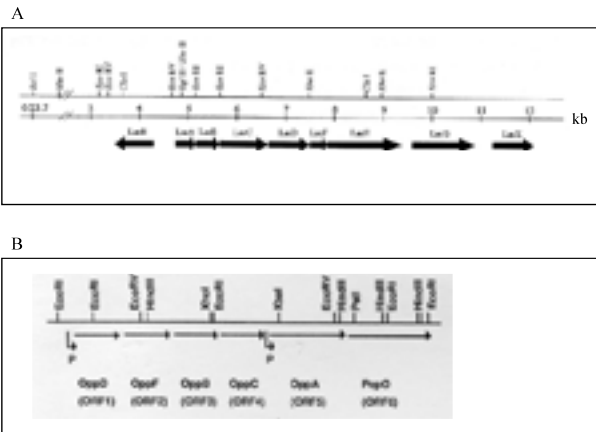


Fig. 24. Construction of Lac-operon and Opp-PepO-operon.

A: This figure (Lac-operon) was copied from 乳酸菌の科学と技術 (学会出版センター) p190  
 B: This figure (Opp-PepO-operon) was copied from *J. Bacteriology* (1993) 175 (23) 7523 - 7532

PCRの結果、 $\Delta$  pAG6株でのOppクラスターの消失が示唆されたが (Table 14), 本研究の供試菌株 *L. lactis* NIAI712においては、Oppクラスターが、どのプラスミドに存在しているのか、さらにクロモゾームにも存在しているのかは不明であった。そこで、*L. lactis* NIAI712と $\Delta$  pAG6株のプラスミドプロフィールと、クロモゾーム遺伝子の制限分解多型を調べた。さらにサザン解析でOppクラスターの所在を調べた。

1) *L. lactis* NIAI712と $\Delta$  pAG6株のプラスミドの解析

*L. lactis* NIAI712と $\Delta$  pAG6株 *L. lactis* 712d35, 712d51のトータルプラスミドの電気泳動パターンを比較したところ、 $\Delta$  pAG6株では、全プラスミドのうち2番目に大きい約50 kbのプラスミド pAG3が消失していた (Fig. 25)。サザン解析の結果、*L. lactis* NIAI712では、*lacE*および*prtP*のプロープは、最も大きい55 kbのプラスミド pLacPrtを認識し (data not shown), *oppC*プロープはpAG3を認識した (Fig. 26)。これらの結果

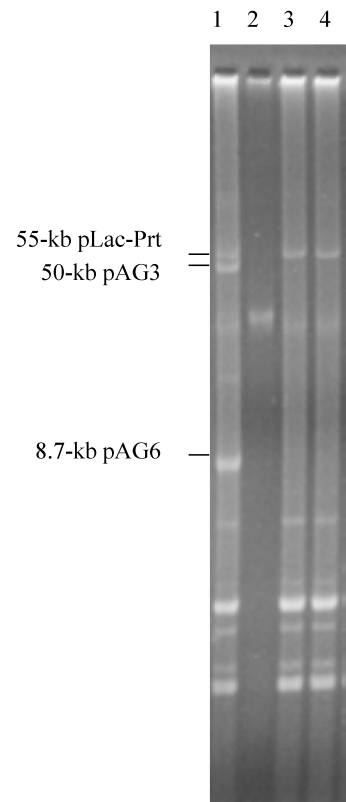


Fig. 25. Plasmid profiles of *L. lactis* NIAI712 strain and variants.

Total plasmids from NIAI712 (lane 1), MG1363 plasmid-free variant (lane 2), 712d35 (lane 3) and 712d51 (lane 4). pLac-Prt contained *lac* and *prt* genes and pAG3 contained *opp-pepO* genes.

は、*L. lactis* NIAI712の保存中にプラスミド間およびプラスミド-クロモゾーム間で組換えが生じ、親株 *L. lactis* NCDO712とは異なるプラスミド構成となっていることを示唆する。

2) *L. lactis* NIAI712と $\Delta$  pAG6株のクロモゾームの解析

*ApaI*で切断したフラグメントのPFGEパターンを比較した (Fig. 26)。ほとんどの切断フラグメントは一致したが、野生株の230 kbのフラグメントが変異株ではなかった。この切断多型は、クロモゾーム遺伝子に

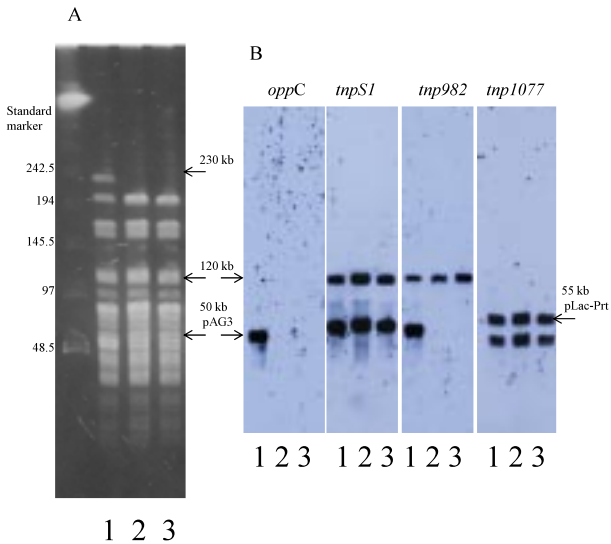


Fig. 26. PFGE analysis, and Southern hybridization using *oppC* probe, *tnpS1* probe, *tnp982* probe, and *tnp1077* probe. PFGE (A) and Southern hybridization (B) were performed on *Apal* digests of total DNA isolated from NIAI712 (lane 1) and  $\Delta$ pAG6 variants 712d35 (lane 2) and 712d51 (lane 3).

組換えが生じたことを示唆している。*opp-pepO* に対するサザン解析の結果、ポジティブシグナルは、*L. lactis* NIAI712 の 50 kb フラグメントだけ認識した。*oppC* ポジティブシグナルの大きさは、pAG3 と一致した。

### 3) *L. lactis* NIAI712 および $\Delta$ pAG6 株の insertion sequence (IS) エLEMENTの解析

親株 *L. lactis* NCDO712 といくつかの近縁株の研究から、Opp クラスターは IS エLEMENT と共に複合型トランスポゾン形成してゲノム内を頻りに転移し、時には欠失し、多くの派生株を生ずる原因となっていることが状況証拠と共に示唆されている<sup>53, 92)</sup>。しかし転移を誘引する具体的なきっかけは明らかになっていない。本研究で行ったマイクロアレイ解析の結果から、野生株と  $\Delta$ pAG6 株では 3 種類のトランスポゼース遺伝子 *tnpS1*, *tnp1077*, *tnp982* の発現量が有為に異なることが明らかとなった。著者は、 $\Delta$ pAG6 株で生じた Opp クラスターの消失が、トランスポゼース *TnpS1*, *Tnp1077*, *Tnp982* がコントロールする、3 種類の IS エLEMENT (ISS1, IS1077, IS982) の転移と関係があると予想し、*L. lactis* NIAI712 と  $\Delta$ pAG6 株の IS エLEMENT の位置をサザン解析で調べた (Fig. 26)。サザン解析のプロローブは、*tnpS1*, *tnp1077*, *tnp982* の配列をテンプレートして合成した。その結果、*tnp982* プロローブのハイブリパターンが *L. lactis* NIAI712 と  $\Delta$ pAG6 株で異なることが明らか

となった。*L. lactis* NIAI712 では、50 kb と 120 kb のフラグメントが *tnp982* プロローブで認識されたが、 $\Delta$ pAG6 株では 120 kb のフラグメントのみ認識された。50 kb の *tnp982* ポジティブフラグメントは、その大きさから pAG3 と推定された。この結果は、pAG3 が、Opp クラスターと *tnp982* をコードしていることを示唆している。*L. lactis* NIAI712 と  $\Delta$ pAG6 株の両方に存在する 120 kb の *tnp982* ポジティブフラグメントは、クロモゾーム由来と推定される。一方 *tnpS1* と、*tnp1077* プロローブは、pLacPrt を認識した。*tnpS1* と、*tnp1077* プロローブによるサザン解析では、*L. lactis* NIAI712 と  $\Delta$ pAG6 株の結果は同じであった。

### 3. 考察

研究室保存株 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 は、もともと *L. lactis* NCDO712 から派生した<sup>32)</sup>。*L. lactis* NIAI712 のプラスミドプロファイルは、親株の *L. lactis* NCDO712 と区別がつかなかった。しかし、パルスフィールド電気泳動を用いた制限分解多型とは両菌株で異なり、また両菌株共に保有している 55-kb のラクトース資化性プラスミドの制限分解パターンが一致しなかった。*L. lactis* NIAI712 では、*lac*-オペロンと、*prtP*/*prtM* 遺伝子群は 55-kb のプラスミド pLac-Prt にコードされていた。しかしオリゴペプチドトランスポーター遺伝子クラスター (*opp-pepO*) は、50 kb のプラスミド pAG3 にコードされ、クロモゾームには存在していない。これらの結果から、我々の研究室での継代と保存の間に、*opp-pepO* の転移が起こり、*L. lactis* NIAI712 が派生したと考えられる。*L. lactis* NIAI712 は乳発酵能が優れている。しかし  $\Delta$ pAG6 株は、発酵遅延の表現型を示す。野生株と  $\Delta$ pAG6 株のゲノム遺伝子を *Apal* で分解し、制限フラグメント多型を比較すると、野生株にある 230 kb のクロモゾーム由来のフラグメントと、プラスミド由来の 50 kb フラグメントが  $\Delta$ pAG6 株には無かった。このことは、pAG6 除去株では、ゲノム遺伝子にコンスタントな組み換え変異が起こることを示唆している。PFGE とマイクロアレイ結果から、 $\Delta$ pAG6 株の乳発酵遅延は、pAG3 にコードされている *opp-pepO* の欠失によるものであると結論した。

## 第2節 プラスミド除去に伴うトランスポゼースの発現解析

### 1. 材料および方法

#### 菌株およびプラスミド

本研究で使用した微生物およびプラスミドは Table 10 にまとめた。

#### 培地と培養条件

*E. coli* および *L. lactis* の培養は、第1章、第1節に記述した方法で行った。

*L. lactis* NIAI712 はカドミウム自然耐性菌である。カドミウムとエリスロマイシンを同時にセレクションマーカーとして用いる場合には、20 nM Cd, 0.5 μg/ml Em を添加した TYG-EC 培地あるいはスキムミルク-EC 培地を用いた。

#### 競合プラスミド pAG6dR の作成

*E. coli* プラスミド DNA および *L. lactis* プラスミド DNA の抽出と精製、さらにプラスミド DNA の制限分解、ブランチング、ライゲーション反応および形質転換は、第1章、第1節に記述した方法で行った。本研究では、pAG6 の複製起点から *hsdS* のターミネーターまでの複製領域全配列を PCR で増幅し、Em<sup>R</sup> フラグメントとともに pBluescript II にクローニングし、pAG6RS を作出した (Fig. 27)。この組換えプラスミドをテンプレートとして、PCR で *orf588*, *orfX*, *hsdS* を除いた約 7 kb を増幅して環状化し、pAG6dR を作出した (Fig. 27)。

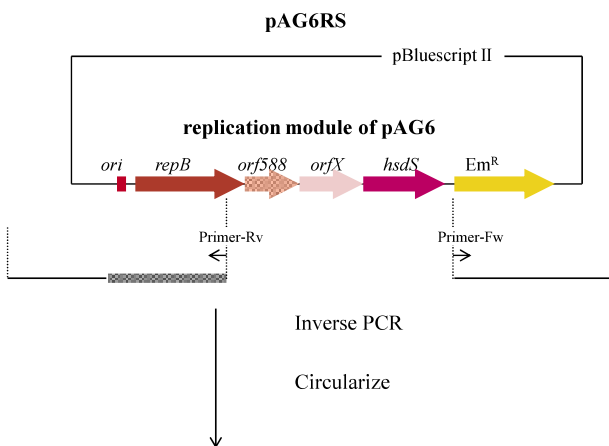


Fig. 27. Physical and genetic map of replication module of pAG6 and schematic representation of pAG6dR.

#### 競合プラスミドによる形質転換と内在プラスミドの除去操作

*L. lactis* NIAI712 への pAG6dR の導入法と、内在プラスミド pAG6 の除去法は第1章、第3節に記述した方法で行った。

#### 逆転写 PCR による cDNA の合成

トータル RNA の調製は、第3章、第2節に記述した方法で行った。逆転写反応には、供試菌から抽出した 500 ng のトータル RNA をテンプレートとして用いた。cDNA の合成は、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用い、添付の使用説明書に従って行った。

#### 半定量リアルタイム PCR

半定量リアルタイム PCR は、QuantiTect SYBR green (Qiagen) を用い、添付の使用説明書に従って行った。テンプレートには 1 μl の cDNA を用い、20 μl の PCR ミクスチャーを反応に供した。リアルタイム PCR には、Light Cycler (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Valles, Spain) を用いた。サイクルパラメーターは、95°C で 10 分間変性した後、変性 95°C で 15 秒、伸長 60°C で 60 秒を 50 回繰り返した。試験は 3 連で行った。すなわち、トータル RNA は 3 回調製し、各々のサンプルから cDNA を合成してリアルタイム PCR に供した。プライマーペアは、GTPases-translation elongation factors (*tuf*) および, *tnpS1*, *tnp982*, *tnp1077*, *tnp981* を認識する配列を用いた。プライマーの配列と増幅フラグメントの大きさは Table 13 にまとめた。解析結果の数値は、*tuf* の発現データを内部標準として用い補正した<sup>7)</sup>。

#### 統計処理

統計処理は、Student's *t*-test を用い、統計学的有意差は、危険率 5% 水準未満で判定した。

## 2. 結果

### pAG6 と競合プラスミドの両方を含む変異株の作出

本研究で見出された、pAG6 の除去に伴う Opp- クラスターの消失や、クロモゾーム内遺伝子の変異 (あるいは転移) は、細胞内に pAG6 と競合プラスミドが共存し、pAG6 の複製が不安定になる状況で起こると予想した。そこで、同一細胞内に pAG6 と競合プラスミドの両方を含む変異株の作出を計画した。しかし第1節で pAG6 の除去操作に用いた pCVm6 を *L. lactis* NIAI712 に導入し、派生株 (pCVm6<sup>+</sup>, pAG6<sup>+</sup>) をカドミウムと

エリスロマイシンを添加したダブルセレクション培地 TYG-EC で培養すると、その増殖速度は著しく低下した。また派生株 (pCVm6<sup>+</sup>, pAG6<sup>+</sup>) を TYG-E に移植すると、1 回の植継ぎ操作で pAG6 が失われ、目的とする解析が出来なかった。この結果は、pCVm6 の不和合性誘導能の強さが原因であると予想した。そこで、宿主の増殖を阻害せずに pAG6 と共存できる弱い競合プラスミドの作成を試みた。すなわちまずインバース PCR で pAG6RS の欠失プラスミドを作成し (Fig. 27), *L. lactis* NIAI712 に導入した。次に分離した派生株を TYG-E 培地で継代培養した後、TYG-EC 寒天培地に 10<sup>3</sup> 細胞程度塗布し、形成したコロニー (Em<sup>R</sup>, Cd<sup>R</sup>) の数をカウントして pAG6 保有株の割合を算出した。試験した派生株のうち、*L. lactis* NIAI712 に pAG6dR を導入したものは、TYG-E 培地で 2 回培養後、80% 以上 pAG6 を保有していた。そこで、pAG6dR を用いて pAG6 と pAG6dR の共存する試験菌株 *L. lactis* 712dR1, 712dR2, 712dR3 を作出した (Table 10)。

#### weak competitor pAG6dR の配列解析

作出した pAG6dR のインサートの配列をシークエンスで確認したところ、pAG6dR の複製領域を構成している *repB* は 3' 領域が欠失し、内部に 1 塩基置換があった (Fig. 27)。

#### リアルタイム PCR を用いたトランスポゼース遺伝子 (*tnp*) の発現解析

マイクロアレイの結果から、*L. lactis* 712d35 では、*tnpS1*, *tnp1077*, *tnp982* の遺伝子発現が 1.5 ~ 4 倍低下していたが、*tnp981* や *tnp905* の発現に有意差はなかった。そこで半定量リアルタイム PCR を用いて、トランスポゼースの発現量の変化を確かめた。トータル RNA の調製に際しては、*L. lactis* NIAI712 および  $\Delta$ pAG6 (712d35, 712d51, 712d61) を、TYG で一晩培養して活性化し、0.1% の培養液を新鮮な TYG に接種した。約 5 時間後、OD = 0.25 まで培養した細胞を集菌して RNA を抽出した。一方 712dR は、スキムミルク-EC 培地で継代培養し、pAG6 と競合プラスミド pAG6dR および *opp-pepO* coding プラスミド pAG3 を維持した。トータル RNA の調製に際しては、712dR (712dR1, 712dR2, 712dR3) を、TYG-EC で一晩培養して活性化し、0.1% の培養液を新鮮な TYG-E に接種した。約 5 時間後、OD = 0.25 まで培養した細胞を集菌して RNA を抽出した。リアルタイム PCR には、500 ng のトータル RNA から調製

した cDNA を 1  $\mu$ l 用いた。野生株と派生株の遺伝子発現量を標準化するために、*tuf* の発現量の測定を同時に行った。*tuf* の値で標準化したデータを元に、各 *tnp* の発現量を野生株と派生株と比較した (Fig. 28)。すなわち、野生株 *L. lactis* NIAI712 の発現量を 1 とし、派生株の当該 *tnp* の発現量の相対値を算出してグラフに示した。*L. lactis* NIAI712 と  $\Delta$ pAG6 の比較では、*tnpS1* および *tnp982* のリアルタイム PCR の結果は、アレイ解析の結果と一致した。すなわち、 $\Delta$ pAG6 の *tnpS1* および *tnp982* 発現量は野生株よりも有意に低かった。しかし、712dR における *tnpS1* および *tnp982* 発現量は野生株の約 2 倍高かった。このことは、pAG6 の除去過程 (キューアリングプロセス) においては、*tnpS1* および *tnp982* の発現が高まり、Tnp 活性が高まることを示唆している。対照的に、*L. lactis* NIAI712 と  $\Delta$ pAG6 および 712dR の

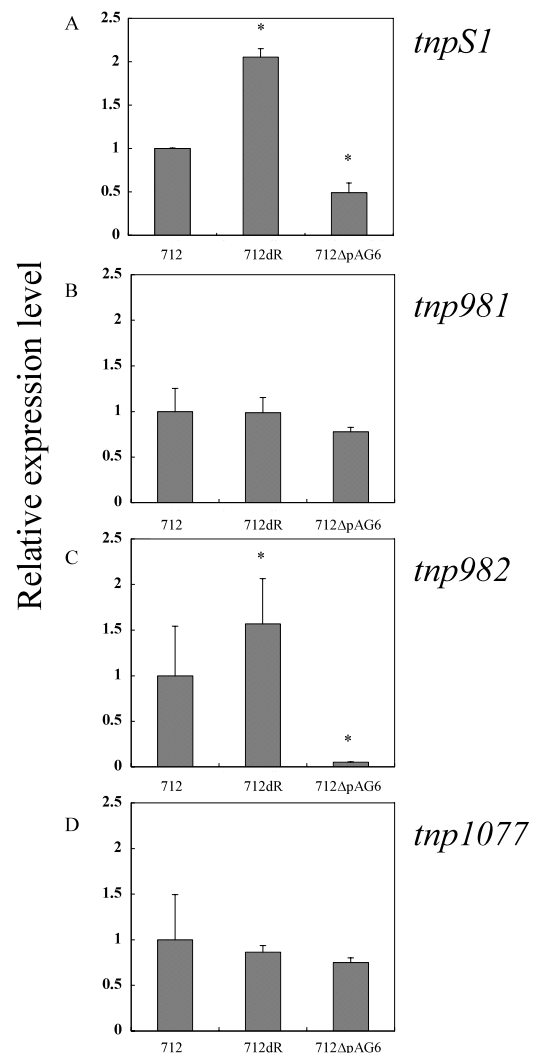


Fig. 28. Semiquantitative-realtime-PCR. Asterisks indicate significant difference from the wild type with  $P < 0.05$ .



比較では、*tnp1077* のリアルタイム PCR の結果に有意差はなかった。さらに、マイクロアレイ解析で有意差のなかった *tnp981* の発現量もリアルタイム PCR で比較した。*tnp981* の発現量は、リアルタイム PCR においても有意差がないことが確かめられた。この結果は、*IS1077* および *IS981* は、pAG6 の選択的除去に起因する一連の現象とは関係しないことを示唆している。

### 3. 考察

*L. lactis* プラスミドは多くの IS エlement を含み、プラスミド間、或はクロモゾームへの遺伝子転移に働き、進化に寄与している<sup>19, 54)</sup>。*L. lactis* NIAI712 が保有するプラスミド上の IS エlement を調べたところ、*opp-pepO* をコードする pAG3 には *IS982* が含まれていた。一方 *lac*-オペロンと *prtP/prtM* をコードする pLacPrt には *ISS1* と *IS1077* が含まれていた。最近 *L. lactis* NIAI712 に近縁なプラスミドフリー株 MG1363 の全ゲノムが公開されたが、それによると *IS982* と *ISS1* は、全ゲノム内に各々 2 コピーしかなく、9 コピーある *IS1077* のトランスポゼース遺伝子の全てがシュードジーンだった<sup>92)</sup>。本研究でも、*IS982* と *ISS1* はプラスミドとクロモゾームに 1 コピーずつ検出された。すなわち、*IS982* は pAG3 とクロモゾーム由来の 120 kb フラグメントに、*ISS1* は pLacPrt とクロモゾーム由来の 120 kb フラグメントにコードされていた。プラスミドフリー株 MG1363 でメジャーな IS エlement は *IS981* や *IS905* であり、ゲノム内に 100 コピー以上コードされている<sup>92)</sup>。対数増殖期の *L. lactis* NIAI712 においても、*IS982* と *ISS1* の転移酵素 *tnp982*、*tnpS1* の発現量は、コピー数の多い *IS981* や *IS905* の *tnp* の 1/100 以下だった。したがって、本研究で観察された、*opp-pepO* の消失を含む *L. lactis* NIAI712 ゲノム内再構成は、マイクロアレイ解析で変動のあった *tnp* の転写活性の上昇が引き金ではないかと予想した。すなわち、*opp-pepO* 近傍の IS エlement の転移活性が、宿主細胞内に pAG6 と競合プラスミドが共存する状態で活性化されると予想した。しかし第 1 章で pAG6 の除去に用いた pCvm6 は、宿主細胞内で pAG6 との共存が困難で、両プラスミドの保有を強制する TYL-EC 培地で培養すると、増殖速度が著しく低下した。さらに、TYL-E 培地で 1 回植え継ぐと pAG6 が 100% 除去されるため、両プラスミド共存株の遺伝子発現を解析する試験菌株として不都合だった（未発表）。そこで、宿主の増殖を抑制することなく、宿主内で pAG6 との共存状態を維持できる第 2 の競合プラス

ミド pAG6dR を作出した。*L. lactis* NIAI712 に pAG6dR を導入した派生株 712dR は、TYL-EC 培養で増殖抑制されず、TYL-E 培地の 5 回継代培養後においても、50% の菌が pAG6 を保持していた。親株 *L. lactis* NIAI712、pAG6/pAG6dR 共存株 712dR、および pAG6 除去株 ΔpAG6 の対数増殖期の細胞で、*tnp* の発現量を比較したところ、712dR 株の *tnp982* と *tnpS1* の発現量が有意に高かった。pAG6/pAG6dR 共存株 712dR では、*tnp982* と *tnpS1* の発現量が高まることから、*IS982* と *ISS1* の転移も活性化することが予想された。一方 *tnp981* と *tnp1077* の発現量に有意差は無く、pAG6 除去に伴うゲノム遺伝子の組み換え現象に、*IS981* と *IS1077* が関与する転移は無関係と考えられた。

本研究では、*L. lactis* NIAI712 の pAG6 が、共存する pAG3 やクロモゾームなど宿主のゲノム構造の安定化に働くことを示した。かつて親株 *L. lactis* NCD0712 から、プラスミドフリー株を含む様々なプラスミド除去株が得られているが、pAG6 と同じ大きさの pSH73 だけが除去された派生株は得られていない<sup>32)</sup>。*L. lactis* NIAI712 の以前の試験でも、変異剤処理や高温培養などの従来法では、pAG6 欠損株は得られなかった（未発表）。pAG6 の高い安定性の原因として、pAG6 のコピー数や、コードしている遺伝子産物の細胞内濃度が厳密に制御されない状態では、宿主の生育に不利な組み換えや不可欠なプラスミドの欠損頻度が上昇し、結果的に pAG6 欠損株が環境中で不利になると推定している。

pAG6 がコードしている遺伝子産物の中で特に着目しているのは HsdS (HsdS/pAG6) である。HsdS は、Type I 制限/修飾 (Type I-R/M) システムの認識サブユニットである。*L. lactis* は常にバクテリオファージの攻撃に曝されており、様々なファージ耐性機構を有している<sup>29)</sup>。制限/修飾システムは、自己と非自己の DNA を区別し、ファージ感染など外来遺伝子の侵入から宿主を防御するファージ耐性システムであり、*L. lactis* では Type I-R/M と Type II-R/M が報告されている<sup>29)</sup>。Type I-R/M は、制限サブユニット (HsdR)、修飾サブユニット (HsdM)、認識サブユニット (HsdS) から構成され、HsdR と HsdM はクロモゾームにコードされている。一方 HsdS 遺伝子は、 $\theta$ -プラスミドの複製モジュールを構成し、これまでに多くの相同性遺伝子が報告されている<sup>61, 67)</sup>。遺伝子のメチル化には、2 分子の HsdM と 1 分子の HsdS からなるメチル化コンプレックス ( $M_2S$ ) で機能し、DNA 切断には  $M_2SR_2$  で働く<sup>61)</sup>。複合酵素内の HsdS の種類によって認識配列が決定され、したがって

感受性ファージの種類にも影響する<sup>61)</sup>。Type I-R/Mの認識配列は単純なインバーテッドリピートではなく、これまでに *L. lactis* の Type I-R/M の認識配列が決定された報告はまだない。しかし HsdM および HsdR のアミノ酸配列の相同性から、アデニンメチラーゼ活性を持つと推定されており<sup>42)</sup>、異なる HsdS と結合することで異なる配列を認識し、メチル化あるいは切断する<sup>78)</sup>。細胞内で pAG6 がコードしている HsdS (HsdS/pAG6) の発現が不足し、メチル化酵素が十分に機能しない場合、メチル化されていない認識配列を含む pAG3 を切断酵素が分解し、結果 pAG6 & pAG3 欠損株の出現割合が増加するのかもしれない。また別の仮説も考えられる。すなわち、遺伝子のプロモーター領域近傍のメチル化状態は、遺伝子の転写活性に影響する<sup>14, 62)</sup>。これまで報告されている IS エLEMENT の *tnp* のプロモーター領域近傍には、しばしば DNA adenine methylase (DAM) の認識配列が含まれ、そのメチル化状態が *tnp* の発現量に影響し、転移活性を制御しているという報告がある<sup>73, 86)</sup>。*L. lactis* NIAI712 の場合、競合プラスミドの共存によって pAG6 複製が不安定になっている最中には、*tnp982* と *tnpS1* の発現量が増加した。細胞内で pAG6 を安定に保持することで、HsdS/pAG6 の認識配列を正常なメチル化状態に保ち、IS982 の転移活性を小さくし、IS982 をコードする pAG3 などのプラスミドの安定化に寄与する可能性も、今後の研究課題として興味深い。

## 総 括

乳製品製造に汎用されている *Lactococcus lactis* の遺伝子構成は、2 Mb 程度の小型の染色体と、複数のプラスミドを細胞内に保有することが特徴的である。各々のプラスミドは、宿主細胞の増殖と同調して、あるいは無関係に一定のコピー数を自己複製し、通常正確に次世代の細胞に分配される。*L. lactis* のプラスミドの特徴として、乳発酵に必要な不可欠な経済形質をコードすることが上げられる。現在迄に、ラクトース資化、プロテイナーゼ活性、クエン酸取込み、ファージ耐性、バクテリオシン生産、粘性物質生産などの形質に関与するプラスミドが確認されている。*L. lactis* の内在プラスミドの種類や組合せは菌株ごとに異なり、菌株特異的な表現型を決定する。*L. lactis* の分離源は乳製品、生乳、漬物、生草など多岐にわたり、プラスミド構成を変えながら生育環境に適応していると考えられる。中には細胞内に 10 種類程度のプラスミドを保有する株も多く、機能が特定されて

いないプラスミドも多く残されている。プラスミドの機能解析は、通常まずプラスミド除去株を作成し、除去株の表現形質と親株の表現形質を比較して研究の端緒とする。従って、対象とするプラスミドを選択的に除去することができれば、プラスミド上の遺伝子機能や関係する表現形質を効率良く推定することができる。また、必要不可欠なプラスミドを損なわずに、1 種類のプラスミドを除去する方法は、発酵産業に利用可能な実用菌株の改良にも利用できる。第 1 章では、宿主 DNA にランダムに作用する変異剤処理などを行わず、複数の内在プラスミドのうち 1 種類のプラスミドを選択的に除去し、親株と発酵特性の異なる新菌株を作成する方法を開発した。

*L. lactis* の内在プラスミドの殆どが、宿主域の狭い  $\theta$ -複製型プラスミドであることが知られている。そこで、*L. lactis* に広く分布している  $\theta$ -プラスミドを選択的に除去するために、任意の  $\theta$ -プラスミドの複製単位を *in vitro* で再構成し、不和合性プラスミド(競合プラスミド)を作成する方法を開発した。本法は、1) 複製単位の再構成に共通して用いることのできるプラスミドベクター (pDB1) の作成、2) 任意の *L. lactis*  $\theta$ -プラスミドの不和合性配列を増幅しうる PCR プライマーペア (VF3 - VF4) の設計、3) *in vitro* での不和合性プラスミドの再構成と、*L. lactis* wild type プラスミドの除去操作、からなる。本章では、考案した方法が、*L. lactis* subsp. *lactis* および subsp. *cremoris* の両亜種で使用可能であることを確認した。本法の利点は、以下の 3 点にまとめることができる。すなわち、1) 作出した変異株は外来遺伝子を保有せず、食品加工用のスターターに利用できる。2) 除去プラスミドを選択でき、利用目的に即したスターターの改良が可能である。3) 既存法では除去の難しい安定なプラスミドも選択的に除去でき、プラスミドの機能解析に応用できる。そこで第 2 章では、プラスミドの選択的除去を、乳業用乳酸菌の育種に応用した研究について記述し、第 3 章では本法を研究端緒とした *L. lactis* プラスミドの新機能の解析について記述した。

産業菌株において、安定した発酵性能と共に、発酵の効率性も重要な形質である。本研究では、*L. l. lactis* biovar diacetylactis DRC1 および diacetylactis のタイプストレインである *L. l. lactis* biovar diacetylactis 13675 において、宿主の増殖を抑制し、実質的に宿主の増殖速度を決定している 7.4 kb のプラスミド pDR1-1 を同定した。第 1 章に記述した方法で pDR1-1 を選択的に除去することで、親株より増殖の早い変異株を育種することができた。また産業菌株への利用例として、フレーバー変

異株の育種について第2章、第3節に記述した。すなわち、*L. l. lactis* biovar diacetylactis は、乳中のクエン酸を代謝し、ジアセチルを生成する。diacetylactis のジアセチルを生成能は、実際にはクエン酸透過性プラスミド pCit の有無で決定され、pCit を持たない菌株ではクエン酸リアーゼなどクエン酸の代謝に関係する遺伝子が正常であっても培地内のクエン酸を菌体内に取り込めないためジアセチルの生成も無い。ジアセチルは非常に強い臭いを有する化合物であり、微量でも発酵飲食品の香味品質に大きな影響を与える。発酵バター製造には必要なフレーバーとされているが、発酵乳製造には好まれない。特に我が国の場合、欧米に比べ、ジアセチルに対する馴染みのなさが指摘されてもいる。そこで本研究では *L. l. lactis* biovar diacetylactis N7 のクエン酸透過性プラスミドを選択的に除去し、ジアセチル生成能の無い変異株を育種した。N7 は胆汁酸耐性、コレステロール除去能などを有し、機能性発酵乳の製造が期待されている。*L. lactis* の CitP- プラスミドは、変異剤などで処理しても容易に欠損株を得られないことが知られている。本研究で考案したプラスミドの選択的除去法は、CitP- プラスミドの除去を容易にした。本法により乳発酵能を損なうこと無く種菌の発酵特性を変更でき、製品の風味改良に繋がる。

最後に第3章では、プラスミドの選択的除去によって、高頻度に出現する発酵遅延変異株を試験に用い、除去したプラスミドの機能解析を行った結果について詳述した。我々の研究室で継代し保存している *L. lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 は、5種類のプラスミドを有している。そのうち約9 kb のプラスミド pAG6 はコピー数も多く、非常に安定であるが故にプラスミド除去株が得られておらず、その機能は調べられていなかった。そこで第1章に記述した方法で pAG6 を選択的に除去すると、高頻度で発酵遅延株が出現した。pAG6 を除去して得られた発酵遅延変異株 712 Δ pAG6 では、乳糖資化、カゼイン分解および取込みなど、乳資化性遺伝子群の転写活性が著しく低下していた。さらに、712 Δ pAG6 のゲノム内には、pAG6 の除去に伴って、短期間のうちに遺伝子組み換えによる変異が起こることが明らかとなった。本研究ではこのゲノム変異によって、カゼイン分解物の取り込みに働く一連の遺伝子群 *opp-pepO* が、例外なく消失していることを突き止め、発酵遅延の主原因であると結論付けた。

pAG6 には、宿主 DNA のメチル化配列を決定する因子、すなわち Type I 制限/修飾サブユニット HsdS が

コードされていた。遺伝子プロモーター近傍の DNA のメチル化状態が、遺伝子の転写活性に影響することは周知の事実である。特に遺伝子のゲノム内転移を仲介するトランスポゾンの転移酵素遺伝子 *tnp* の転写減衰はよく知られている。それゆえ pAG6 の除去操作中、すなわち、pAG6 と競合プラスミドが同一細胞中に共存する状態で *tnp* の転写活性が上昇し、トランスポゾンが転移して *opp-pepO* 欠失が起こるのではないかと予想し、pAG6 / 競合プラスミド共存株での *tnp* 転写活性を解析した。その結果、競合プラスミドの共存によって pAG6 複製が不安定になっている最中には、*tnp982* と *tnpS1* の発現量が特異的に上昇することを明らかにした。宿主は細胞内で pAG6 を安定に保持することで、HsdS/pAG6 の認識配列を正常なメチル化状態に保ち、ゲノム内トランスポゾンなど可動性遺伝因子の転写活性を小さくし、ゲノム構造や菌株特異的なプラスミド構成を維持するのかもしれない。

*L. lactis* には多くの HsdS バリエーションが知られているが、宿主の遺伝子発現との関係を試験した例は全くない。しかしながら Type-II R/M では、認識配列のメチル化状態が自己遺伝子の転写活性を制御することが報告され、乳酸菌の制限/修飾システムの、ファージ耐性以外の働きが初めて明らかにされた<sup>14)</sup>。特に乳発酵に関与する遺伝子群の発現と HsdS が決定するメチル化状態の関係は興味深い。なぜなら本研究で作出した 712 Δ pAG6 株では、遺伝子が欠失していないにも関わらず、遺伝子発現が異なる多くの乳資化性遺伝子を確認したからである。712 Δ pAG6 の除去プラスミド pAG6 上には、HsdS と共にカドミウム耐性因子 *CadA / C* がコードされている。*cadA / C* をコードするプラスミドは、乳発酵スターターに用いる *Lactococcus* strain に広く分布している<sup>88)</sup>。著者らのスクリーニングでも、乳製品由来の *L. lactis* spp. *lactis* は全て pCad を保有していた(未発表)。*L. lactis* をグルコース添加培地で培養すると、容易にラクトース資化性プラスミドが欠落するように、不要なプラスミドはしばしば失われる。したがって乳製品から分離された菌株の全てがカドミウム耐性プラスミドを保有したことには、何か合理的な必然性があるだろう。一つの可能性として、pCad と共にコードされている *hsdS* (HsdS/pAG6?) に着目している。すなわち、HsdS/pAG6 が乳中での生育に有利なメチル化状態を作り出しているのではないかと仮説は飛躍しすぎているだろうか。この仮説を裏付けるプロテオーム解析結果が報告されている。INRA の Chich らは、

*L. lactis* NIAI712の近縁株 *L. lactis* NCDO763 をケミカリー・ディファインド培地 (CDM) で培養し、全菌体タンパク質を2次元電気泳動で分画することで、400 スポットを検出・解析できたと報告している。彼等はまた *L. lactis* NCDO763 を M17 培地、およびスキムミルク培地で培養し、培地特異的に発現する菌体タンパク質を探索した。その結果、CDM や M17 培地よりも、ミルク培地培養による菌体から、有意に発現量の大きいスポットとして HsdS が同定された。ある種の HsdS が、乳環境下で乳酸菌の生育に有利な遺伝子産物として発現が強化されているとしたら、*L. lactis* が保有する *hsdS* 遺伝子の種類は、フェージ耐性に影響するだけでなくミルク中での菌株の優位性にも影響するだろう。

*L. lactis* で頻繁に見つかる *hsdS* 遺伝子は、DNA 配列中の保存領域で容易に組み換えを起こし、新種の *hsdS* を生じさせる。機能的な新種の *hsdS* が、細胞内に生じた菌株のメチル化状態は、親株とは異なるだろう。著者は、プラスミド構成の違いなど保有遺伝子そのものの違いと共に、ゲノム遺伝子全体のメチル化状態の違いも、*L. lactis* の菌株特異性や環境適応進化の根源ではないかと考えている。本研究で作出したプラスミド変異株は、菌株特異的なメチル化状態を解析するのに相応しい実験材料であり、メチル化状態と宿主の遺伝子発現との関係は、今後の研究課題として大変興味深い。

## 謝 辞

本研究論文をまとめるにあたり、大学卒業以来終始ご指導とご高配を賜りました宇都宮大学農学部教授、東徳洋先生に深甚なる感謝の意を表します。また論文作成にあたり、きめ細かいご指導とご助言を頂きました東京農工大学共生科学技術研究院 高橋幸資教授、本論文の審査をお引き受け下さりました茨城大学農学部 米倉政実教授、宇都宮大学農学部 上田俊策教授、前田勇准教授に心より感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、格別のご理解とご鞭撻を頂きました畜産草地研究所、畜産物研究領域、新国佐幸研究管理監、大桃定洋元微生物利用研究室長に心より感謝申し上げます。また研究のご指導と貴重なご助言を頂きました畜産草地研究所畜産物品質チーム 野村将博士、畜産物機能研究チーム乳酸菌研究グループ 鈴木チセ博士、木元広実博士、北海道農業研究所業務1科長 岡本隆史博士、元加工第三研究室長 入江良三郎博士ならびに前微生物利用研究室長 藤田泰仁博士に心より御礼申し上げます。また九州大学内地

留学中に多大なるご指導とご高配を賜りました、崇城大学生物生命学部長 緒方靖哉教授、九州大学大学院農学研究院 園元謙二教授、土居克実講師、崇城大学生物生命学部助教 西山孝博士、農業生物資源研究所研究員 江口智子博士、に厚く御礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり、実験指導と貴重なご助言を賜りました食品総合研究所微生物利用研究領域 楠本憲一博士、乳酸菌ベクターと試験菌株を供与下さり、研究にご助言頂きました明治乳業(株)研究本部食機能科学研究所 佐々木隆博士に心より感謝申し上げます。また日々の温かい励ましやご助言ご協力頂きました畜産草地研究所畜産物研究分野の皆様、生物資源研究所 細江実佐博士に心よりお礼申し上げます。最後に、研究遂行に理解を示し、常に励まして頂いた両親、家事を分担頂いた夫 赤尾和志に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Alpert, C. A., Cruz-Le Cop, A.M., Malleret, C. and Zagorec, M. (2003). Characterization of a theta-type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low-copy-number vectors in lactobacilli, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5574-5584.
- 2) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- 3) Anderson, D. G. and McKay, L. L. (1983). Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 549-552.
- 4) Austin, S. and Nordstrom, K. (1990). Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids, *Cell*, 60, 351-354.
- 5) Benno, Y., He, F., Hosoda, M., Hashimoto, H., Kojima, T., amazaki, K., Uno, H., Mykkanen, H. and Salminen, S. (1996). Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects, *Nutr. Today*, 31 Supplement1, 12S.
- 6) Bhowmik, T. and Steele, J. L. (1994). Cloning, characterization and insertional inactivation of the *Lactobacillus helveticus* D(-) lactate dehydrogenase gene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 432-439.
- 7) Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarma, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

- IL1403, Genome Res., 11, 731-753.
- 8) Boucher, I., Emond, E., Parrot, M. and Moineau, S. (2001). DNA sequence analysis of three *Lactococcus lactis* plasmids encoding phage resistance mechanisms, J. Dairy Sci., 84, 1610-1620.
  - 9) Bourniquel, A. A. and Bickle, T. A. (2002). Complex restriction enzymes: NTP driven molecular motors, Biochimie., 84, 1047-1059.
  - 10) Caunt, P., Impoolsup, A. and Greenfield, P. F. (1989). The effect of oxygen limitation on stability of a recombinant plasmid in *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Letters, 11, 5-10.
  - 11) Cedar, H. (1988). DNA methylation and gene activity, Cell, 53, 3-4.
  - 12) Chattoraj, D. K. (2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical, Mol. Microbiol., 37, 467-476.
  - 13) Chopin, A., Chopin, M. C., Moillo-Batt, A. and Langella, P. (1984). Two plasmid determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*, Plasmid, 11, 260-263.
  - 14) Christensen, L. L. and Josephsen, J. (2004). The methyltransferase from the LlaDII restriction-modification system influences the level of expression of its own gene, J. Bacteriol., 186, 287-295.
  - 15) Collins, E. B. and Harvey, R. J. (1962). Failure in the production of citrate permease in *Streptococcus diacetylactis*, J. Dairy Sci., 45, 32-35.
  - 16) Corneau, N., Dube, C., LaPointe, G. and Emond, E. (2001). A coelectroporation method for the isolation of cryptic plasmids from *Lactococcus lactis*, Letters in Applied Microbiol., 33, 7-11.
  - 17) Cuozzo, S. A., Sesma, F., Palacios, J. M., de Ruiz Holgado, A. P. and Raya, R. R. (2000). Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705, FEMS Microbiol. Lett., 185, 157-161.
  - 18) Daming, R., Yinyu, W., Zilai, W., Jun, C., Hekui, L. and Jingy, Z. (2003). Complete DNA sequence and analysis of two cryptic plasmids isolated from *Lactobacillus plantarum*, Plasmid., 50, 70-73.
  - 19) Daveran-Mingot, M. L., Campo, N., Ritzenthaler, P. and Le Bourgeois, P. (1998). A natural large chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* is mediated by homologous recombination between two insertion sequences, J. Bacteriol., 180, 4834-4842.
  - 20) Davidson, B. E., Kordias, N., Dobos, M. and Hillier, A. J. (1996). Genomic organization of lactic acid bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek, 70, 161-183.
  - 21) Davis, M. A., Martin, K. A. and Austin, S. J. (1990). Specificity switching of the P1 plasmid centromere-like site, EMBO J., 9, 991-998.
  - 22) de Vos, W. M. (1987). Gene cloning and expression in lactic streptococci, FEMS Microbiol. Rev., 46, 281-295.
  - 23) de Vos, W. M., Underwood, H. M. and Davies, F. L. (1984). Plasmid encoded bacteriophage resistance in *Streptococcus cremoris* SK11, FEMS Microbiol. Lett., 23, 175-178.
  - 24) Diaz Ricci, J. C. and Hernández, M. E. (2000). Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism, Critical Reviews in Biotechnology, 20, 79-108.
  - 25) Efsthathiou, J. D. and McKay, L. L. (1976). Plasmids in *Streptococcus lactis*: Evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked, Appl. Environ. Microbiol., 32, 38-44.
  - 26) Emond, E., Lavallee, R., Drolet, G., Moineau, S. and Lapointe, G. (2001). Molecular characterization of theta replication plasmid and its use for development of a two-component food-grade cloning system for *Lactococcus lactis*, Appl. Environ. Microbiol., 67, 1700-1709.
  - 27) Ferretti, J. J. and Curtiss, R. III (1987). Streptococcal genetics. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
  - 28) Foley, S., Bron, S., Venema, G., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. (1996). Molecular analysis of the replication origin of the *Lactococcus lactis* Plasmid pCI305, Plasmid, 36, 125-141.
  - 29) Forde, A. and Fitzgerald, G. F. (1999). Bacteriophage defense systems in lactic acid bacteria.: Antonie van Leeuwenhoek, 76, 89-113.
  - 30) Fujita, Y. and Okamoto, T. (1999). Cloning and Identification of the Lactococcal A and M Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC1, Japan Agricultural Research Quarterly, 33, 133-137.
  - 31) Gasson, M. J. and Davies, F. L. (1980). High-Frequency

- conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation, *J. Bacteriol.*, 143, 1260-1264.
- 32) Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic *Streptococci* after protoplast-induced curing, *J. Bacteriol.*, 154, 1-9.
  - 33) Gravesen, A., Josephsen, J., vonWright, A. and Vogensen, F. K. (1995). Characterization of the replicon from the lactococcal theta-replicating plasmid pJW563, *Plasmid*, 34, 105-118.
  - 34) Gravesen, A., von Wright, A., Josephsen, J. and Vogensen, F. K. (1997). Replication regions of two pairs of incompatible lactococcal theta-replicating plasmids, *Plasmid*, 38, 115-127.
  - 35) Handa, N., Ichige, A., Kusano, K. and Kobayashi, I. (2000). Cellular responses to post-segregational killing by restriction-modification genes, *J. Bacteriol.*, 182, 2218-2229.
  - 36) Harington, A., Watson, T. G., Louw, M. E., Rodel, J. E. and Thomson, J. A. (1988). Stability during fermentation of a recombinant  $\alpha$ -amylase plasmid in *Bacillus subtilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 521-527.
  - 37) Hayes, F., Vos, P., Fitzgerald, G. F., de Vos, W. M. and Daly, C. (1991). Molecular organization of the minimal replicon of novel, narrow-host-range, lactococcal plasmid pCI305, *Plasmid*, 25, 16-26.
  - 38) Holo, H. and Nes, I. F. (1989). High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* growing with glycine in osmotically stabilized media, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3119-3123.
  - 39) Holt, J.G., Krieg, N. b., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1993). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed.
  - 40) Ito, Y., Sasaki, Y. and Sasaki, T. (1992). Novel plasmid pBUL1 derived from *Lactobacillus* and derivative thereof. U. S. Patent 5426047 (Oct. 22, 1992).
  - 41) Ivey, D. M., Guffanti, A. A., Shen, Z., Kudyan, N. and Krulwich, T. A. (1992). The *cadC* gene product of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 partially restores  $\text{Na}^+$  resistance to an *Escherichia coli* strain lacking an  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (*NhaA*), *J. Bacteriol.*, 174, 4878-4884.
  - 42) Janscak, P., Dryden, D. T. F. and Firman, K. (1998). Analysis of the subunit assembly of the type IC restriction-modification enzyme EcoR124I, *Nucleic Acid Res.*, 26, 4439-4445.
  - 43) Kempfer, G. M. and McKay, L. L. (1979). Characterization of plasmid DNA in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 316-323.
  - 44) Kempfer, G. M. and McKay, L. L. (1981). Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* SSP. *Diacetylactis*, *J. Dairy Sci.*, 64, 1527-1539.
  - 45) Kiewiet, R., Bron, S., de Jonge, K., Venema, G. and Seegers, J. F. M. L. (1993). Theta replication of the lactococcal plasmid pWV02, *Mol. Microbiol.*, 10, 319-327.
  - 46) Kimoto, H., Ohmomo, S. and Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by lactococci, *J. Dairy Sci.*, 85, 3182-3188.
  - 47) Kobayashi, I. (2001). Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution, *Nucleic Acid Res.*, 29, 3742-3756.
  - 48) Kobayashi, M., Nomura, M., Fujita, Y., Okamoto, T. and Ohmomo, S. (2002). Influence of lactococcal plasmid on the specific growth rate of host cells, *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 403-408.
  - 49) Kobayashi, M., Nomura, M. and Kimoto, H. (2007). Manipulation for plasmid elimination by transforming synthetic competitors diversifies *Lactococcus lactis* starters applicable to food products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2647-2654.
  - 50) Kojic, M., Strahinic, I. and Topisirovic, L. (2005). Proteinase PI and lactococcal A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50. *Can. J. Microbiol.*, 51, 305-314.
  - 51) Kok, J., van der Vossen, J. M. B. M. and Venema, G. (1984). Construction of plasmid cloning vector for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 726-731.
  - 52) Kunnimalaiyaan, M. and Vary, P. S. (2005). Molecular Characterization of plasmid pBM300 from *Bacillus megaterium* QM B1551, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3068-3076.
  - 53) Le Bourgeois, P., Daveran-Mingot, M. L. and

- Ritzenthaler, P. (2000). Genome plasticity among related *Lactococcus* strains: Identification of genetic events associated with macrorestriction polymorphisms, *J. Bacteriol.*, 182, 2481-2491.
- 54) Le Bourgeois, P., Lautier, M., van den Berghe, L., Gasson, M. J. and Ritzenthaler, P. (1995). Physical and genetic map of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 reveals a large genome inversion, *J. Bacteriol.*, 177, 2840-2850.
- 55) Lebrum, M., Audurier, A. and Cossart, P. (1994). Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium, *J. Bacteriol.*, 176, 3040-3048.
- 56) Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G. and Seegers, J. F. M. L. (1991). Nucleotide sequence and characterization of broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1, *Plasmid*, 26, 55-66.
- 57) Leenhouts, L., Bolhuis, A., Venema, G. and Kok, J. (1998). Construction of food-grade multiple-copy integration system for *Lactococcus lactis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 417-423.
- 58) Liu, C. Q., Leelawatcharamas, V., Harvey, M. L. and Dunn, N. W. (1996). Cloning vectors for lactococci based on plasmid encoding resistance to cadmium, *Curr. Microbiol.*, 33, 35-39.
- 59) Maeda, S. and Gasson, M. J. (1986). Cloning, expression and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho-beta-D-galactosidase, *J. Gen. Microbiol.*, 132, 331-340.
- 60) Mesas, J.M., Rodriguez M. C. and Alegre M. T. (2004). Plasmid curing of *Oenococcus oen.*, *Plasmid*, 51, 37-40.
- 61) Murray, N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines, *Microbiol. Mol. Biol. Revs.*, 64, 412-434.
- 62) Nagy, Z. and Chandler, M. (2004). Regulation of transposition in bacteria, *Research in Microbiology*, 155, 387-398.
- 63) Naito, T., Kusano, K. and Kobayashi, I. (1995). Selfish behavior of restriction-modification systems, *Science*, 267, 897-899.
- 64) Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H. and Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants, *J. Appl. Microbiol.*, 101, 396-405.
- 65) Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility, *Microbiol. Rev.*, 51, 381-395.
- 66) Nucifora, G., Chu, L., Misra, T. K. and Silver, S. (1989). Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 3544-3548.
- 67) O'Sullivan, D., Twomey, D. P., Coffey, A., Hill, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. (2000). Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.*, 36, 866-875.
- 68) Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria*, Copenhagen: HÆst and Son.
- 69) Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85, 2444-2448.
- 70) Pedersen, M., Arned, K. R. and Johansen, E. (1994). Genetic analysis of minimal replicon of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* citrate plasmid, *Mol. Gen. Genet.*, 244, 374-382.
- 71) Perdigon, G., Nader de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G. and Pesce de Ruiz Holgado, A. A. (1990). Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Res.*, 57(2), 255-264.
- 72) Rice, L. B. (2001). Emergence of vancomycin-resistant enterococci, *Emerging Infectious Diseases*, 7, 183-187.
- 73) Robert, D., Hoopes, B. C., McClure, W. R. and Kleckner, N. (1985). IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation, *Cell*, 43, 117-130.
- 74) Romero, D. A. and Klaenhammer, T. R. (1993). Transposable elements in Lactococci: a review, *J. Dairy Sci.*, 76, 1-19.
- 75) Sakamoto, I., Igarashi, M., Kimura, K., Takagi, A., Miwa, T. and Koga, Y. (2001). Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans, *J. Antimicrob. Chemother.*, 47(5), 709-710.
- 76) Salminen, S. and von Wright, A. (1998). *Lactic Acid Bacteria*: Marcel Dekker, Inc.
- 77) Sambrook, J., Fritsch, E. R. and Maniatis, T. (1989).

- Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. :Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Laboratory.
- 78) Schouler, C., Gautier, M., Ehrlich, S. D. and Chopin, M. C. (1998). Combinational variation of restriction-modification specificities in *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.*, 28, 169-178.
- 79) Seegers, J. F. M. L., van Sinderen, D. and Fitzgerald, G. F. (2000). Molecular characterization of the lactococcal plasmid pCIS3: natural stacking of specificity subunits of a type I restriction/modification system in a single lactococcal strain, *Microbiology*, 146, 435-443.
- 80) Seegers, J. F. M. L., Bron, S., Franke, C. M., Venema, G. and Kewiet, R. (1994). The majority of lactococcal plasmids carry a highly related replicon, *Microbiology*, 140, 1291-1300.
- 81) Sesma, A., Sundin, G. W. and Murillo, J. (1998). Closely related plasmid replicons coexisting in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* show a mosaic organization of replication region and altered incompatibility behavior, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3948-3953.
- 82) Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S. and Kaminogawa, S. (1998). *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 115(4), 278-287.
- 83) Siezen, R., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (2005). Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8371-8382.
- 84) Simon, D., Rouault, A. and Chopin, M. C. (1986). High-efficiency transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 394-395.
- 85) Sinha, R. P. (1989). A new simple method of curing plasmids in lactic streptococci (*Streptococcus cremoris*; *Streptococcus lactis*, plasmids), *FEMS Microbiol. Lett.*, 57, 349-352.
- 86) Spilemann-Ryser, J., Moser, M., Kast, P. and Weber, H. (1991). Factors determining the frequency of plasmid cointegrate formation mediated by insertion sequence IS3 from *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 226, 441-448.
- 87) Swartling, P.F. (1951). Biochemical and serological property of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 18, 256-267.
- 88) Trotter, M., Mills, S., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A. (2001). The use of cadmium resistance on the phage-resistance plasmid pNP40 facilitates selection for its horizontal transfer to industrial dairy starter lactococci, *Letters in Applied Microbiol.*, 33, 409-414.
- 89) Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G. and Haandrikman, A. (1993). Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.*, 175, 7523-7532.
- 90) von Wright, A., Tynkkynen, S. and Suominen, M. (1987). Cloning of a *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* chromosomal fragment associated with the ability to grow in milk, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1584-1588.
- 91) Waterbury, P. G. and Lane, M. J. (1987). Generation of lambda concatamers for use as pulsed field electrophoresis size markers, *Nucleic Acid Res.*, 15, 3930.
- 92) Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M. J., Kuipers, O. P., van Sinderen, D. and Kok, J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, *J. Bacteriol.*, 189, 3256-3270.
- 93) Yu, W., Gillies, K., Kondo, J. K., Broadbent, J. R. and McKay, L. L. (1996). Loss of plasmid-mediated oligopeptide transport system in lactococci: Another reason for slow milk coagulation, *Plasmid*, 35, 145-155.
- 94) 井上喬 (2001). ジアセチル発酵飲食製造のキーテクノロジー, 幸書房.
- 95) 木元広実 (2004). 新しいプロバイオティック食品開発への取り組み, 畜産技術, 4月号, 21p.
- 96) 乳酸菌の科学と技術(1996). 乳酸菌研究集談会編, 学会出版センター.
- 97) 藤田泰仁 (1997). 乳業用乳酸球菌のプラスミドに関する研究, 博士論文 (北海道大学).



# New methods for selective plasmid elimination from *Lactococcus lactis* and characterization of the genetic variability of variants derived from Lactococcal starter for milk fermentation

Miho KOBAYASHI

Animal Products Research Team

## Summary

### Chapter 1. Manipulation for selective Plasmid Elimination from *Lactococcus lactis*

Strains of lactococcal bacteria are used as starters in the fermentation of dairy products. Such strains generally carry a number of plasmids, varying in size from approximately 2 kb to 80 kb. Some plasmids encode properties essential to the manufacture of dairy products such as lactose fermentation, proteolysis, diacetyl production, and phage resistance, and others encode nonessential or unknown properties. Plasmid elimination is a fundamental technique for investigating the diverse properties of encoding plasmids. It is currently performed by culturing with a mutagenic chemical such as acridine orange, culturing in unbuffered medium, exposing cells to elevated growth temperatures, regenerating bacterial protoplasts, or a composite of these methods. With these methods, plasmids cannot be chosen for elimination, and the simultaneous loss of more than one plasmid is frequent. In addition, the resulting variants that have lost co-existing essential plasmids are ineffective as starters.

This study was designed selectively to eliminate a  $\theta$ -plasmid from *Lactococcus lactis* strains by transforming synthetic competitors. A shuttle vector for *Escherichia coli* and *L. lactis*, pDB1, was constructed by ligating a partial replicon of pDR1-1B, which is a 7.3 kb  $\theta$ -plasmid in *L. lactis* DRC1, with an erythromycin resistance gene into pBluescript II KS<sup>+</sup>. This versatile vector was used to construct competitors to common lactococcal  $\theta$ -plasmids. pDB1 contains the 5' half of the replication origin and the 3' region of *repB* of pDR1-1B, but lacks the 1.1-kb region normally found between these two segments. A set of primers, Pv3 and Pv4, was designed to amplify the 1.1-kb middle parts of the general  $\theta$ -replicons of lactococcal plasmids. When the PCR products were cloned into the *Nru* I and *Xho* I sites of pDB1, synthetic replicons were constructed and replication activity was restored. A number of  $\theta$ -plasmids in *L. lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* were eliminated selectively by transforming the synthetic competitors. These competitors were easily eliminated by subculture for a short time in the absence of selection. The resulting variants contained no exogenous DNA and are suitable for food products, since part of the phenotype was altered without altering other plasmids indispensable for fermentation.

### Chapter 2. Breeding of new *Lactococcus lactis* starters by plasmid elimination

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DRC1 carries more than 6 plasmids, including a 7.4 kb cryptic plasmid, which was designated as pDR1-1. pDR1-1 was found to significantly affect the specific growth rate of the host cells because of its limiting effect on growth. When pDR1-1 was eliminated by an unstable competitor to pDR1-1, as described in chapter 1, the resulting variant, *L. lactis* DRC1 $\Delta$ pDR1-1, grew more efficiently than the DRC1 wild type. In addition, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis N7 carried an 8.3-kb plasmid, which was expected to be the citrate permease plasmid (CitP-plasmid). When the 8.3-kb plasmid was eliminated, the variant, *L. lactis* N7 $\Delta$ pCit, lost the ability to metabolize citrate and to produce the aromatic compound diacetyl from citrate. Diacetyl produces a buttery flavor in

fermented dairy products, but this aroma is undesirable for yoghurt. Therefore, selective elimination of CitP-plasmid may serve to breed a variant preferable for yoghurt starter. Neither *L. lactis* DRC1 $\Delta$ pDR1-1 nor *L. lactis* N7 $\Delta$ pCit contained exogenous DNA, making both suitable for food products.

### **Chapter 3. Characterization of a cryptic plasmid that contributes to the stable maintenance of host genome in *Lactococcus lactis***

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIAI712 carries five different plasmids, including an 8.7-kb plasmid designated pAG6. pAG6 encodes a subunit of a type-I restriction and modification system (HsdS), as well as proteins involved in cadmium resistance (CadA and CadC). When we eliminated pAG6 by inserting a competitor into strain NIAI712, the resulting  $\Delta$ pAG6 variants showed a slow-milk-coagulation phenotype, even though the cells retained their lactose fermentation and proteolysis activities. Pulsed-field gel electrophoresis followed by Southern hybridization analysis showed that chromosomal rearrangements as well as co-elimination of the 50-kb plasmid pAG3, which carried an oligopeptide transport system gene cluster (*opp*-cluster), occurred consistently in the genome of  $\Delta$ pAG6 variants. These results suggest that the stable maintenance of pAG6 prevents destabilization of a co-existing plasmid and constant genome rearrangement of chromosome. In  $\Delta$ pAG6 variants, transposases of IS982 and ISS1 were expressed at lower levels than in the parent NIAI712 strain. The expression of these transposases increased in an intermediate variant containing both pAG6 and competitor. Therefore, the frequency of chromosomal rearrangements and loss of pAG3 in association with the IS982 and ISS1 elements may increase during the process of pAG6 elimination.

Out of the entire sequence of pAG6, we have focused on the function of HsdS as a factor that serves in stable maintenance of the host genome. HsdS is part of multi-functional complexes, i.e. Type-I R/M systems composed of three different subunits, HsdS, HsdM, and HsdR. This complex is active in an N-6 adenine-specific DNA methylase, a DNA-dependent ATPase, a DNA translocase, and a restriction endonuclease. Since HsdS is responsible for the recognition of a specific DNA sequence, the restriction and methylation sites in the genomes would be altered by the elimination of HsdS/pAG6. We therefore expected that the restriction complex with HsdS/pAG6 would cleave pAG3 and part of the host chromosome, or that the gene transpositions regulated by IS982 or ISS1 would be promoted by aberrant transcription of the *tnp* genes following the methylation changes near the promoter regions.

Key words : Lactic acid bacteria, plasmid, growth rate, milk fermentation

# 家畜排泄物処理における大腸菌の制御に関する研究

花島 大

<sup>1)</sup> 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター

## 要 約

家畜排泄物は主として堆肥化、液肥化を経て循環利用されているが、食の安心・安全に対する消費者の関心は高く、有機肥料の生産段階においてもこれまで以上に衛生的な処理が望まれている。一般的に堆肥化過程で発生する高温は有害微生物の低減に効果があることが知られているが、牛糞のような高水分堆肥原料の堆肥化に際し、オガクズや稲ワラ等の水分調整材の使用が十分でない場合には、適正な堆肥化プロセスが進行しない事例も見受けられる。そこで本研究では、温度が上昇しにくい高水分の堆肥原料中での有害微生物の低減化を促進させる方法として、家畜糞と食品副産物等の有機廃棄物との混合堆肥化を検討した。また近年、堆肥化過程で一度は低減した有害微生物が、水分や温度など適当な生育条件が整うことで再増殖するという現象が問題となっている。堆肥の安全性を考える上でこのような堆肥の流通は好ましくないことから、再増殖を起こす可能性のある堆肥の類型化を行った。液肥化処理についてはそもそも研究蓄積が少なく、処理過程の有害微生物の動態や死滅機構は十分に明らかになっていない。そこで通気処理過程における糞便汚染指標微生物である大腸菌の消長についての知見を得るとともに、大腸菌数の推移に影響を与えると予測される物理化学的、生物的パラメータの推移を解析し、それらの関連性について検討を行った。

その結果、高水分牛糞に対する有機廃棄物の添加は、無添加の原料に比べ大幅に温度上昇を促進し、55℃を超える高温を維持することで、大腸菌数を激減させることが明らかとなった。この温度上昇は主として添加廃棄物中の易分解性有機物量に依存し、堆肥温度と易分解性有機物量の指標である BOD (Biochemical Oxygen Demand) 値の間には正の相関が認められた。また大腸菌の再増殖は、高温期の、または高温期が終了直後の堆肥サンプルにおいて顕著に認められることから、再増殖のリスクは有機物分解が十分に進行していない堆肥において特に高いことが明らかとなった。液肥化過程において大腸菌は、初期の段階で大幅に減少していた。堆肥化とは異なりこの低減機構は温度によるものではなく、大腸菌低減時に著しく優占する未培養の *Bacillus* 属細菌など共存する微生物群との競合、または有機成分の分解と代謝産物の生成に起因する液中の物理化学的変化が大腸菌の生存に影響を及ぼしているものと考えられた。以上から、堆肥については高温処理の徹底、および十分な腐熟期間の保持が、液肥については、温度以外の生物的、物理化学的要因による大腸菌低減のメカニズムの解明が衛生的な処理の確立に対して重要であると考えられた。

**キーワード：**堆肥、液肥、大腸菌、再増殖

## 第1章 序論

### 1. 研究の背景

#### (1) 家畜排泄物処理問題の現状

従来の「大量生産・大量消費・大量廃棄型社会」の反省から、我が国においては物質の効率的な利用やリサイクルの推進を通じ、より環境への負荷が少ない「循環型

社会」を構築することが急務となっている。このような状況の中、地球温暖化防止、循環型社会形成、戦略的産業育成、農山漁村活性化等の観点から、バイオマスの利活用推進に関する具体的取り組みや行動計画を取りまとめた「バイオマス・ニッポン総合戦略」が、平成14年12月に閣議決定された。このバイオマス・ニッポン総合戦略では、「再生可能な、生物由来の有機性資源で化

石資源を除いたもの」をバイオマスと定義しており、代表的なバイオマスとして家畜排泄物、下水汚泥、食品廃棄物、木質残材、そして農作物非食用部等が挙げられている。平成18年度の段階でそれらの総量は20,840万トンにも及び(図1)、このうち全体の42%(約8,700万トン)を占める家畜排泄物は、最も豊富なバイオマス資源となっている<sup>7)</sup>。またこの内訳を見ると乳牛、肉牛そして豚の順に排出量が多く、乳牛と肉牛で全体の60%を、また豚で25%を占めていることがわかる(図1)<sup>10)</sup>。

家畜排泄物は古くから肥料の原料として、また近年においてはバイオガスの原料として利用されてきたが、排泄物特有の強い臭気や汚物感などはしばしば周辺住民の苦情の原因となってきた。また図2に示すように乳牛、肉牛、養豚を営む農家戸数は、平成2年度以降減少傾向にある一方で(図2A)、一戸当たりの飼養頭数は増加傾向にある(図2B)。これは経営の大規模化と集約化が進行していることとともに、大量の排泄物が特定の地域に蓄積している状況を示している<sup>25)</sup>。

このような状況を打開するため、家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律(家畜排せつ物法:平成11年施行)が制定され、家畜排せつ物の適正管理と循環利用が推進されてきた。しかし排泄物の局在化が進行している昨今では、生産された有機肥料等が地域内ですべて利用されるかという疑問が残る。特に九州南部の宮崎、鹿児島両県では、排出される家畜糞尿に含まれる窒素量を県内の耕地面積で除した場合、その値

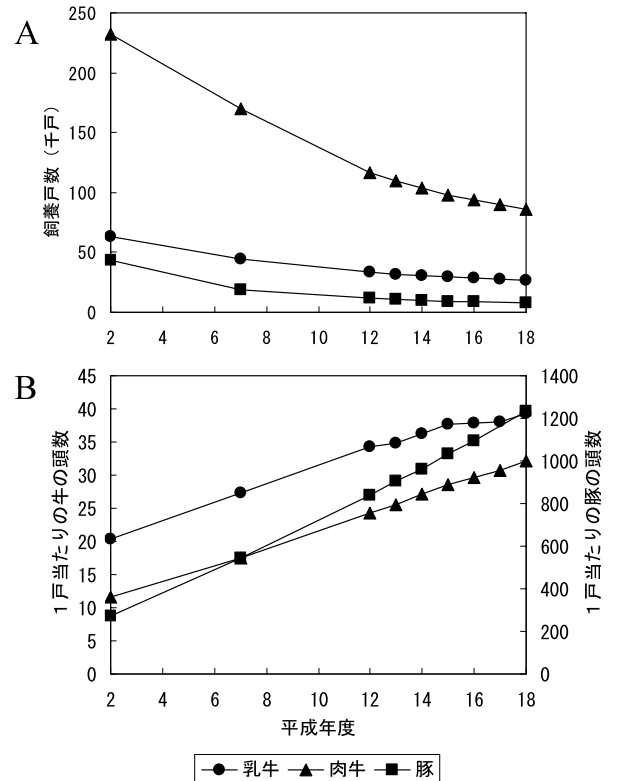


図2. 乳牛、肉牛および養豚経営における(A)畜産農家の年次推移および(B)1戸当たりの飼養頭数の推移  
\*畜産統計より作図

は250 kg/ha以上となり、全国平均の約2倍を超える集積が起きていることが報告されている<sup>10)</sup>。地域外を含めた有機肥料の円滑な流通を促進するためには、有機肥

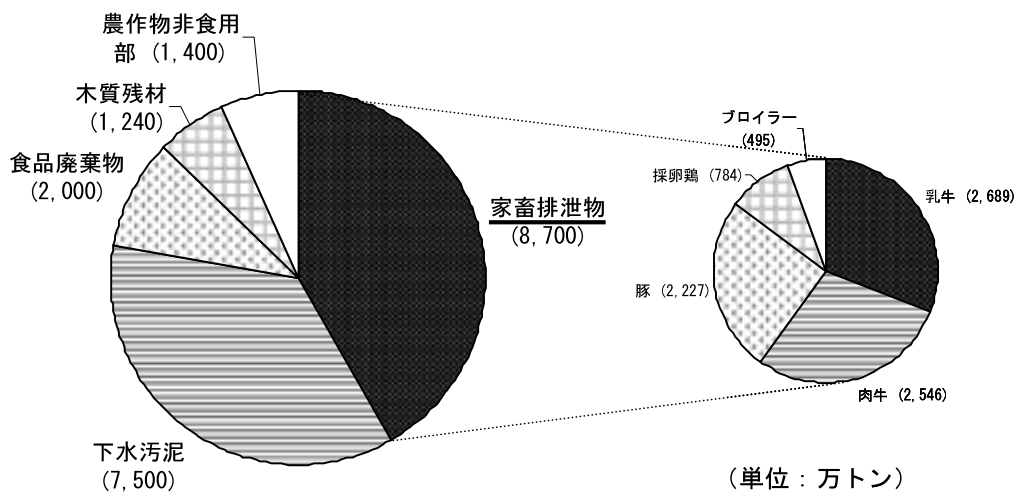


図1. 平成18年度におけるバイオマスの内訳と家畜排泄物の排出量  
\*農林水産省:食料・農業・農村白書および畜産統計より作図。

料品質の向上、肥効成分などの表示、流通システムの整備、そして有機肥料の安全性の確保が必要であることは言うまでもない。

## (2) 衛生的な堆肥化処理、液肥化処理の必要性

有機肥料の利用を阻害する要因として、成分が安定していないこと、塩類の蓄積、重金属の蓄積、外来雑草の種子、有害微生物による汚染などが挙げられる。堆肥の臭いや色などとは異なり、いずれも利用者である耕種農家が感覚的に判断しにくい項目でもある。

食の安全性に対する消費者の意識は非常に高い。1996年に大阪の堺市で起きた病原性大腸菌 O157：H7 による集団感染では、3 名もの尊い命が奪われ、感染源とされたカイワレ大根の売上げが大幅に減少した。その他でも牛海綿状脳症（BSE）の発生に端を発した米国産牛肉離れ、ノロウイルスの流行による牡蠣の売上げの低迷、農薬や薬剤の残留による輸入農林水産物の買い控えなど、食の安心・安全を脅かす事件とその風評被害が関連業界に及ぼす打撃は無視できない状況にある。

それでは家畜排泄物を原料とした堆肥をはじめとした有機肥料には、潜在的にどのようなリスクがあるのだろうか。表 1 に平成 14 年から 18 年までの、細菌に由来する食中毒の年次別発生件数を示した。

これら食中毒菌のうち、群を抜いて発生件数の多いカ

ンピロバクター・ジェジュニ/コリ、サルモネラ属菌、そして病原大腸菌やウエルシュ菌については家畜消化管に由来することが知られており<sup>16, 24, 30)</sup>、畜産物を介した食中毒が毎年発生している。家畜排泄物を原料とした有機肥料は、栽培時、そして収穫時に最終生産物である野菜や果実等と接触する可能性があり、可能な限りその製造過程でのリスクの低減が求められる。

それでは家畜排泄物処理過程で、これら有害微生物をどこまで低減させればよいのだろうか。畜産経営において家畜排泄物処理は非採算部門であり、可能な限り低コストでの処理を求められていること、また最終的に有機肥料としての利用を考えると、薬剤や抗生物質の使用による有害微生物の制御法を適用することは難しい。従って処理コストが許す範囲でリスクを低減させるスタンスが、最も現実的な選択肢であると考えられる。我が国においては肥料取締法において亜鉛、カドミウム等の重金属汚染に関する上限値は存在するが、有害微生物に関連した規制は現在のところ存在しない。よってここでは、諸外国におけるこれら有害微生物の堆肥品質基準値について紹介する。

アメリカ合衆国環境保護局（United States Environmental Protection Agency：USEPA）が 1994 年に策定した 40 CFR Part 503 Rule<sup>94)</sup> は、バイオマスの堆肥化、特に下水汚泥を対象とした堆肥の基準として、しばしば有機

表 1. 細菌性食中毒の発生件数の推移

	14 年度	15 年度	16 年度	17 年度	18 年度
細菌（総数）	1,377	1,110	1,152	1,065	774
サルモネラ属菌	465	350	225	144	124
ブドウ球菌	72	59	55	63	61
ボツリヌス菌	0	0	0	0	1
腸炎ビブリオ	229	108	205	113	71
病原大腸菌	97	47	45	49	43
ウエルシュ菌	37	34	28	27	35
セレウス菌	7	12	25	16	18
エルシニア・エンテロコリチカ	8	0	1	0	0
カンピロバクター・ジェジュニ/コリ	447	491	558	645	416
ナグビブリオ	2	2	0	0	0
コレラ菌	2	0	0	0	0
赤痢菌	2	1	1	0	1
チフス菌	0	0	0	0	0
パラチフス A 菌	0	0	0	0	0
その他細菌	9	6	9	8	4

\* 厚生労働省統計より抜粋

肥料の安全性を議論する上で引用される。表2に示したように、Class Aの基準を満たす堆肥は、大腸菌群として1,000 MPN/g-dry weight以下であること、またはサルモネラ属菌として3 MPN/4g-dry weightであると記されている。また2005年にイギリスにおいて示された British Standards Institution's Publicly Available Specification for Composted Materials (BSI PAS 100) では、堆肥の満たすべき基準として、大腸菌として1,000 CFU/g-fresh mass以下であること、またはサルモネラ属菌として absent/25g-fresh massであることが定義されている<sup>81)</sup>。米国および英国のガイドラインには、ともにこの基準を達成するため、堆肥の製造過程における処理方法、到達温度、処理期間についての詳細な記載が盛り込まれている。堆肥の評価に特定の微生物(糞便汚染指標微生物やサルモネラ菌等)の菌数を用いている国は、他にはカナダ、イタリアおよびオーストリアなどがある<sup>18)</sup>。いずれの国においても、すべての有害微生物を検出、計数するのではなくサルモネラ菌または環境中における糞便汚染指標微生物(大腸菌や、大腸菌群、腸球菌)の菌数を有害微生物に関するリスクとして評価している。

液肥は堆肥と比較してハンドリングが悪いこと、また単位体積当たりの重量が重いことから運搬に適しておらず、有機肥料としての市場性は薄い。従って液肥の利用は自家消費または近隣農家に限られるため、品質に関する基準は特に存在しない。畜舎近くの貯留タンクに蓄積された糞尿が、直接農地に散布される事例も見受けられるが、糞尿中に含まれる有機酸、硫黄化合物および窒素化合物は強烈な臭気物質であるため、事前に通気処理やメタン発酵処理などを行い、十分に臭気を低減させてから散布を実施することが奨励されている。しかし液状糞

尿は比熱の高い水分を多く含むため、堆肥に比べて温度が上昇しにくい。よって一般的には、高温曝露による有害微生物の死滅は期待できず、堆肥とは異なる有害微生物の低減化手法が求められる。また液状である液肥は周辺の水路、河川への流入、降雨等により容易に圃場から流出する可能性もあることから、徹底した有害微生物の低減化が望まれる。

## 2. 既往の研究

### (1) 堆肥化処理に関する研究

堆肥処理過程において発生する高温は、有害微生物の死滅に効果があることが知られている<sup>18)</sup>。Golueke et al.<sup>22)</sup>が示した有害微生物、雑草種子それぞれの死滅温度を表3に示す。堆肥化に用いる原料や処理方式によって異なるが、通常温度は70℃近くまで上昇する。よって理論上、表3に示した有害微生物群は死滅すると考えられるが、堆積物全体に均一な高温を曝露することは難しい。また堆肥化の適切な進行の為に、水分調整、通気(酸素供給)等が必要とされるが、何らかの原因で堆肥化が適正に進行しなかった場合には、温度が十分に上昇しない可能性も考えられる。よって前述の40 CFR Part 503 Rule および BSI PAS 100 では、より確実な処理過程でのリスク低減を目指し、処理温度およびその持続時間等のプロセスについても詳細な規定を提示している<sup>81,94)</sup>。また近年では、一度検出限界以下まで低下した有害微生物が堆肥中で再増殖(Regrowth)する現象が問題となっており、その要因の解析が進められている<sup>5,89,100)</sup>。

### (2) 液肥化処理に関する研究

一般的には、液状の化学肥料や肥効成分を豊富に含んだ液状肥料を液肥と称するが、本論では農地散布を目的

表2. 米国および英国における堆肥中の有害微生物の基準

Organization	Regulation	Requirements
USEPA <sup>1</sup>	40 CFR Part 503 Rule	Class A: < 1 × 10 <sup>3</sup> MPN/g-total solids (dry-weight basis) as coliform or < 3 MPN/4g- total solids as <i>Salmonella</i> sp.
		Class B: < 2 × 10 <sup>6</sup> CFU or MPN/g-total solid as coliform
BSI <sup>2</sup>	BSI PAS 100	< 1 × 10 <sup>3</sup> CFU/g-fresh mass as <i>Escherichia coli</i> or Absent/25g-fresh mass as <i>Salmonella</i> sp.

<sup>1</sup> United States Environmental Protection Agency

<sup>2</sup> British Standards Institution

表 3. 各種病原性微生物の死滅温度

Organisms	Thermal deathpoint	
	Temperature (°C)	Exposure time in minutes
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	55 – 60	30
<i>Salmonella</i> spp.	56	60
	60	15
<i>Shigella</i> spp.	55	60
<i>Escherichia coli</i>	55	15 – 20
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	10
<i>Streptococcus pyogenes</i>	54	10
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. <i>hominis</i>	66	15 – 20
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	55	45
<i>Brucella abortus/suis</i>	61	3

\*Golueke (1977) より抜粋

として家畜糞尿液状物を通気処理して得られた液状有機肥料を液肥と定義する。液肥化処理については、堆肥化処理と比較して単位体積当たりの基質となる有機物含量が低いこと、またその対象が液体であることから、比熱の高い水の温度を上昇させるために多大なる熱量を必要とする。よって堆肥化処理よりも温度が上昇しにくい傾向にある。一部の処理装置においては、通気システムを構築する通気ポンプや液分の攪拌装置の廃熱が伝導することにより液温が高温に達する場合もあるが、一般的な処理プロセスは中温域で推移する<sup>6,7)</sup>。貯留状態にある糞尿中の指標微生物を含む有害微生物は、長期間にわたり生存することが知られている<sup>1,2,16,36,49)</sup>。しかし55℃を超える高温域での液肥化処理過程では、堆肥化処理同様にその高温による有害微生物の低減作用が報告されている<sup>44)</sup>。その一方で、中温域の処理過程におけるサルモネラ菌数の低減<sup>34)</sup>や大腸菌群数の低減<sup>64)</sup>等も報告されており、温度以外のファクターが有害微生物の消長に影響を及ぼす可能性も否定できない。

### 3. 研究の目的

本研究では、固形の家畜排泄物を扱う堆肥化処理、および液状物を扱う液肥化処理過程における有害微生物の低減化の促進を目的としている。適切に管理された堆肥化処理の温度は70℃近くまで上昇し、多くの有害微生物を死滅させるレベルまで達する。しかしながら日本国内においては、堆肥化進行の重要なファクターである水分を調整するのに必要なオガクズやワラなどの水分調整

材の安定した調達が困難、または購入は可能であっても価格が高いなどの問題があるため、適正な堆肥化処理が行われていない事例も見受けられる。特に比較的高水分である牛糞（約85%前後）の堆肥化において、水分調整材の必要性は高い。牛をはじめとする反芻動物は、病原性大腸菌（O157, O26, O111等）の主たる保菌動物と考えられており<sup>30)</sup>、その排泄物処理過程でのリスク低減は重要な課題となっている。

よって本研究では、まず温度が上昇しにくい高水分の堆肥原料中での有害微生物の低減化を促進させる方法として、家畜糞と食品副産物等の有機廃棄物との混合堆肥化を検討した。平成15年に施行された食品循環資源の再生利用等の促進に関する法律（食品リサイクル法）では、食品廃棄物の飼料や肥料等の原材料としての再生利用が目標として掲げられており、従来、焼却または投棄されていた廃棄物の有効利用について様々な方法が模索されている。将来的な有機廃棄物の循環利用を促進する一形態として、また有害微生物を積極的に低減させる手法として両者の混合処理を試みた。

また近年、堆肥化過程で一度は低下した有害微生物が、水分や温度など適当な生育条件が揃うことで、再び堆肥中で増殖するという現象が問題となっている。堆肥化過程における有害微生物の低減に加え、堆肥中での再増殖の抑制も良質堆肥の持ちうる重要な要素と考えられたため、本件についても検討を行った。

液肥化処理については、堆肥化処理と比較してそもそも研究蓄積が少ない。一部、通気処理過程で有害微生物

数が低下した事例が報告されているが、その事象の再現性や死滅機構は明らかになっていない。そこで、通気処理過程における大腸菌の消長についての知見を得るとともに、大腸菌数の推移に影響を与えられとされる物理化学的パラメータや微生物群集の推移を解析し、それらの関連性について検討した。

全章を通じて、排泄物処理過程の衛生的な指標は大腸菌数が用いられている。これは、①糞便中にほぼ安定した個体数( $10^6 \sim 10^7$  CFU/g-wet)で排出されていること、②サルモネラ菌等の有害微生物の動態を代表する菌であること<sup>55, 68, 73)</sup>、③国内外での環境関連法規の規制対象となっていることによる。

#### 4. 本研究の構成

本研究は堆肥化処理を論じた2～4章、および液肥化処理を論じた5章、全体を総括した第6章を含む全6章から構成されている。以下に第2章から第6章までの検討課題と方法を述べる。

第2章では、水分が高く適度な堆肥化が進行しにくい牛糞堆肥化過程の温度上昇、および大腸菌死滅を促進するため、小型堆肥化リアクターを用いた牛糞と各種有機廃棄物等との混合堆肥化を試み、その効果を明らかにする。

第3章では、第2章で検討した混合堆肥化処理において添加効果の認められた有機廃棄物である豆腐粕を用い、パイロット・スケールでの堆積型堆肥化処理における温度上昇効果の検証を行う。

第4章では、堆肥化ステージおよび牛糞堆肥に対する有機廃棄物の混合の有無が、堆肥中での大腸菌の増殖に与える影響を明らかにするため、堆肥に人為的に接種した大腸菌の増減を評価するアッセイを実施し、堆肥中での大腸菌の増殖(再増殖)に影響を与える要因について検討を行う。

第5章では、野菜や花卉など商品作物に利用されることが多い豚糞尿の液肥について、その処理過程における大腸菌の消長、臭気成分等の環境負荷物質の推移、pHや酸化還元電位等の物理化学的パラメータ、および非培養法による微生物群集の推移について解析を行い、相互の関連性について検討を行う。

第6章では、本研究での成果をまとめるとともに、より衛生的な家畜排泄物処理に関する今後の課題について述べる。

## 第2章 高水分堆肥原料に対する各種有機廃棄物の混合が大腸菌数低減に及ぼす影響

### 1. 緒言

家畜排泄物の処理は世界各国で問題となっており、我が国全体においても1年間に発生する推計8,700万トンの家畜排泄物の処理の為に様々な取り組みがなされている。

堆肥化処理は有機廃棄物を循環利用するために経験的に行われてきた方法であり、有機物の分解過程で悪臭は大幅に低減され、廃棄物自体の乾燥も進むことからハンドリング性の向上とともに運搬も容易となる利点がある。また適切な堆肥化処理は、微生物活性によって発生した高温により、病原微生物や雑草の種子を大幅に低減させる効果がある<sup>22)</sup>。家畜排泄物はウイルス、細菌、または原虫等に由来する人畜共通の有害微生物に汚染されている例が報告されていることから、未処理の家畜排泄物を圃場等に散布することは人間に対する衛生的なりすくとなりうる。

特に搾乳牛は病原性大腸菌 O157:H7 の主要な保菌動物と目されていること<sup>30)</sup>、また O157:H7 は動物の生体内よりも糞中で、また糞に汚染された物体中でより長く生存することが知られていることから、それらが家畜に対する O157:H7 の再感染源となっている可能性が指摘されている<sup>49)</sup>。Wang et al.<sup>96)</sup> は牛糞中で O157:H7 が 5°C で 70 日、22°C で 56 日、37°C で 49 日間生存していたことを報告している。それ故、堆肥化過程での徹底した有害微生物の低減化が望まれている。しかしながら、牛糞は水分が 80 - 85% と比較的高く、また鶏や豚など穀物を給与されている家畜の糞に比べて繊維主体の飼料を給与されている為に、微生物群の基質となる易分解性有機物の含有量が少ない。よって有害微生物の死滅温度まで堆肥温度を上昇させるためには、適切な堆肥原料の水分調整が必要となる。我が国においてはオガクズ、稲ワラ、樹皮および籾殻などが水分調整材として一般的に用いられているが、すべての地域で年間を通じての安定的な供給が必ずしも保証されている訳ではない。十分量の水分調整材が確保できない場合には、堆肥原料が高水分のまま堆肥化処理を余儀なくされる事例も見受けられる。そこで本研究では高水分の堆肥化過程における大腸菌の低減化を促進するため、有機廃棄物の混合による堆肥化プロセスの改善を試みた。

本実験では、最初に水分の異なる堆肥材料に対して易分解性有機物の添加を行い、各水分レベルにおける易分



解性有機物の温度上昇，および大腸菌数の低減効果を検討した。その後，種々の有機廃棄物と牛糞の混合堆肥化試験を行い，その際の温度上昇と大腸菌数低減効果について検討を行った。

## 2. 実験方法

### (1) 堆肥原料の性状

搾乳牛の糞は畜産草地研究所（つくば市）の搾乳牛舎から採取した。粗飼料と市販の濃厚飼料を給与している舎内の牛群より，ワラやオガクズなどの敷料が混入していない状態で糞を採取した。水分調整材として 8 mm 径のメッシュを通過した細断稲ワラを用い，目的の水分に調整するために適量を牛糞に添加後，混合した。

### (2) 小型堆肥化リアクターおよび運転条件

堆肥化は，図 3 に示した有効容積 12 L の保温式の小型堆肥化リアクター<sup>26, 29, 52)</sup>を用いて行った。温度測定のための熱電対を，容器の堆肥原料充填部の底から 7.5 cm の中心部に設置した。通気は，堆肥原料の底部から 0.4 L/min の割合で連続的に行った。一連の試験は，これらの堆肥化リアクター計 4 台を用い，25℃の恒温室内で実施した。

### (3) 分析および大腸菌の計数

#### 1) 水分

堆肥の水分は適量を 105℃で 24 時間乾燥させた後，デシケータ内で 30 分放冷後に測定した。

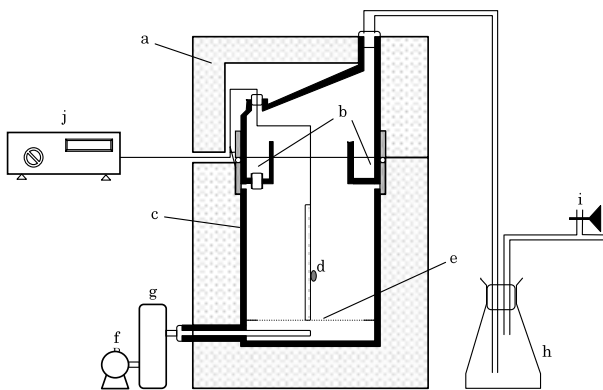


図 3. 堆肥化リアクターの概要

Schematic diagram of composting reactor.  
a, insulation material (Styrofoam); b, trap for accumulated water; c, cylinder (PVC); d, thermocouple; e, stainless-steel mesh; f, aeration pump; g, flow meter; h, flask for cooling outlet gas; i, gas sampling port; j, recorder.

#### 2) 堆肥温度

小型堆肥化リアクター内に設置した熱電対により，データロガー（サーモダック EF MODEL 5020A，江藤電気）を用いて 2 時間毎の連続測定を行った。

#### 3) アンモニア態窒素

アンモニア態窒素は，堆肥サンプルと 2M KCl 溶液を 1 : 9 (w/v) で混合し，30 分の振盪後，得られた濾紙濾過液を Bremner 法<sup>4)</sup>によって分析した。

#### 4) 生物化学的酸素要求量 (Biochemical oxygen demand : BOD)

堆肥の BOD は，堆肥適量（堆肥化ステージによって異なる）を 300ml の蒸留水に懸濁し，クーロメーター（大倉理研）により 5 日間の培養を行って測定した。

#### 5) 大腸菌の計数

大腸菌数の測定は，堆肥と生理食塩水を 1 : 9 (w/v) で混合した後に，氷冷下で 10,000 rpm，5 分のもめグナイズを行い，その希釈系列（1 : 9）についてクロモカルトコリフォーム寒天 (Merck) を用いた希釈平板法にて大腸菌数を計数した。培養は 37℃，24 時間で行い，特異酵素基質である salmon-galactoside が  $\beta$ -D-galactodidase によって分解される際に発する赤色と，X-glucuronide が  $\beta$ -D-glucuronidase によって分解される際に発する青色の両者が混合した際に呈する紫～濃青色のコロニーをもって大腸菌と判定した。

### (4) 水分の異なる堆肥原料に対するポリペプトン混合試験

堆肥原料の様々な水分レベルを設定するため，採取した水分 84% の牛糞に対し，水分 12% の稲ワラの添加量を変えることで 71%，74% そして 78% の 3 段階の牛糞と稲ワラの混合物を作成した。それぞれの水分レベルの堆肥原料を無添加区（対照区）とした。これら無添加の堆肥原料に対し，易分解性有機物としてポリペプトン（ダイゴ）を乾物当たり 4% の割合で添加した区を設定した。それぞれ湿重で 4kg を堆肥化装置に充填し，連続通気を行った。堆肥は 7 日後に装置から取り出し，手で入念に混合を行った後に再び装置に充填した。その後，更に 5 日間通気を行い 12 日が経過した時点で堆肥化試験を終了した。初発，堆肥混合時，そして堆肥化終了時のサンプルを分析に供試した。

それぞれの水分レベルにおける添加区，無添加区の比較は，2 連の堆肥化試験によって行った。各水分レベルの実験は，異なる日に，異なるロットの牛糞を用いて行った。

## (5) 高水分堆肥原料に対する各種有機廃棄物の混合試験

牛糞と細断稲ワラを6.5:3.5の割合で混合し、この有機物を添加していない牛糞・稲ワラ混合物を無添加区(対照区)とした。この牛糞・稲ワラ混合物の乾物量の17%を、豆腐粕、米ぬか、油かす、生鶏糞、乾燥鶏糞、および2種類の人工生ゴミなどの計7種類の有機廃棄物で置換した混合物を処理区として設定した。2種類の人工生ゴミ組成については、清掃局に持ち込まれる生ゴミの組成に関する報告書<sup>53)</sup>をもとに作成した。供試した生ゴミの組成を表4に示す。混合物の水分は蒸留水を添加することにより78%に調整した。この一連の試験には4台の堆肥化装置を用い、無添加の対照区と各種有機廃棄物を混合した3種類の添加区を配置した(表5)。

## 3. 結果および考察

## (1) 堆肥原料の水分と易分解性有機物の混合が堆肥化過程の温度上昇に及ぼす影響

通気開始後から堆肥温度は上昇を始め、いずれの堆肥においても2日目から4日目にかけて最高温度を記録した。その後、7日目に堆肥温度は30℃近くまで低下したため、装置から堆肥を取り出し、十分に攪拌した後にサンプルを採取し、再び装置内に充填した。しかし再充填後の堆肥においては、顕著な温度上昇が認められなかったため、温度上昇に対するポリペプトン添加効果の比較は、堆肥化開始から7日間のデータについて行うこととした。各水分レベルにおける無添加区、およびポリペプトン添加区の7日間の堆肥温度を図4に示した。温度推移は、2連で実施した繰り返し間で非常に近似していた。初発の堆肥原料の乾物量、平均最高温度、病原性微生物の低減に有効と言われる55℃以上の温度の持続時間<sup>94)</sup>、堆肥化開始前および7日経過後の大腸菌数を表6に示した。

表4. 生ゴミAおよびBの組成(湿重%)

Constituents of garbage A and B (% of wet weight basis)

	Garbage A	Garbage B
Rice	20	20
Cabbage	30	30
Apple	15	15
Banana skin	15	15
Grilled fish	10	0
Tea leaves	5	0
Coffee grounds	5	0
Grilled beef	0	10
Salad oil	0	10

\* 京都市清掃局「家庭ごみ細組成調査報告書」(1996年8月)を参考に組成を決定した。

表5. 3回の堆肥化試験の実験区分

Allocation of three runs of composting trials.

	Composter1	Composter 2	Composter 3	Composter 4
Run 1	Control 1	Tofu residue 1	Rice bran 1	Dried chicken feces
Run 2	Control 2	Tofu residue 2	Rice bran 2	Raw chicken feces
Run 3	Control 3	Rapeseed meal	Garbage A	Garbage B

いずれの水分レベルにおいても、ポリペプトン添加区の温度は無添加区と比較して高い値を示した。各水分レベルにおける無添加区とポリペプトン添加区との最高温度、および55℃以上の温度の持続時間を比較すると、71%水分で2.3℃、17時間、74%水分で7.0℃、30時間、そして78%で9.2℃、51時間となり、高水分レベルになるほどポリペプトン添加による温度上昇効果が高い傾向にあった。更に、この温度上昇は大腸菌数の低減と高い相関が認められた。United States Environmental Protection Agency (USEPA) は病原性微生物を除去する指標として55℃以上の温度への到達と、55℃以上の温

表6. ポリペプトンの添加が堆肥温度および大腸菌の低減に及ぼす影響

Effect of polypepton addition on the temperature and the elimination of *E. coli*.

Moisture content (%)	Maximum temperature (°C)		Duration55 <sup>a</sup> (h)		Number of <i>E. coli</i> (CFU/g-wet)			
	Control	Polypepton	Control	Polypepton	day 0		day 7	
71	68.4	70.7	52	69	1.6×10 <sup>7</sup>	1.0×10 <sup>7</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>
74 <sup>b</sup>	60.0	67.0	38	68	1.1×10 <sup>6</sup>	9.5×10 <sup>5</sup>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>
78	53.5	62.7	0	51	1.6×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	<10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Duration of the temperatures above 55°C.

<sup>b</sup> Due to a trouble inside the composter, the data in one of the duplicates of a control (non-addition) treatment containing 74% moisture was omitted from Table 6.

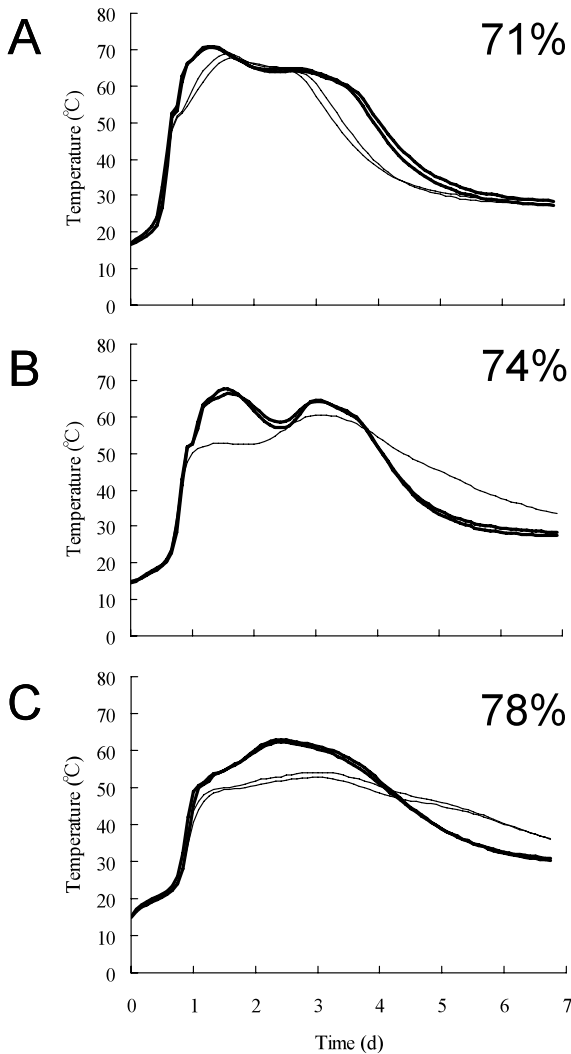


図4. 71%(A)、74%(B)、および78%水分(C)に調整した堆肥原料に、ポリペプトンを添加、または添加しない場合の堆肥温度の推移

Changes in temperature during composting process at (A) 71%, (B) 74% and (C) 78% moisture content level with or without polypepton addition.

Data of duplicate results are shown. Thin and thick line show a time course of control (non-addition) and treatment (polypepton-addition), respectively. Due to a trouble inside the reactor, the data in one of the duplicates of a control (non-addition) containing 74% moisture was omitted.

度を3日間以上継続させることを示している<sup>94)</sup>。堆肥化7日後の大腸菌数は、78%水分における無添加区を除き、すべての区において $10^3$  CFU/gまで低下していた。78%水分の無添加区では、最高温度は55℃には到達せず(図4)、大腸菌数も1オーダー減少したのみであった。このようにポリペプトン添加は、特に高水分条件において大腸菌数の低減を促進するレベルまで温度を上昇させる効果が顕著であった。ポリペプトンは栄養培地成分として汎用されており、微生物群がポリペプトンを基

質として利用することで代謝活性が高まり、堆肥の温度上昇に影響を及ぼしたと考えられた。

## (2) 高水分堆肥原料に対する各種有機廃棄物の混合が温度上昇および大腸菌数の低減に及ぼす影響

前項で示されたように、温度上昇に対するポリペプトン添加の効果は、水分が78%の時に最も顕著であった。そこで高水分条件(78%)における種々の有機廃棄物の添加効果について検証を行った。

すべての堆肥化試験において通気直後から温度は上昇しはじめ、堆肥化開始後1-4日目の間に最高温度を記録した。開始後7日目に温度が40℃近くまで低下したため、堆肥化装置から堆肥を取り出し十分に攪拌した後、再び堆肥化装置内に充填した。攪拌後もすべての区で顕著な温度上昇が認められなかったため、堆肥化試験は12日間を終了した。温度上昇の一例としてRun3における温度推移を図5に示す。

有機廃棄物の添加による温度上昇効果は、生鶏糞および乾燥鶏糞添加区を除くすべての区において認められた。最高温度、55℃以上の持続時間、0、7および12日目における大腸菌数の推移を表7に示した。有機廃棄物を添加しない対照区の最高温度は、いずれも55℃には到達せず、44.6-51.5℃の範囲であった。一般的に高水分の牛糞の堆肥化では、乾燥処理や適当な水分調整材との混合をしない限り高温処理は難しいことが指摘されている<sup>91)</sup>。そのため牛糞を原料として高温堆肥化処理

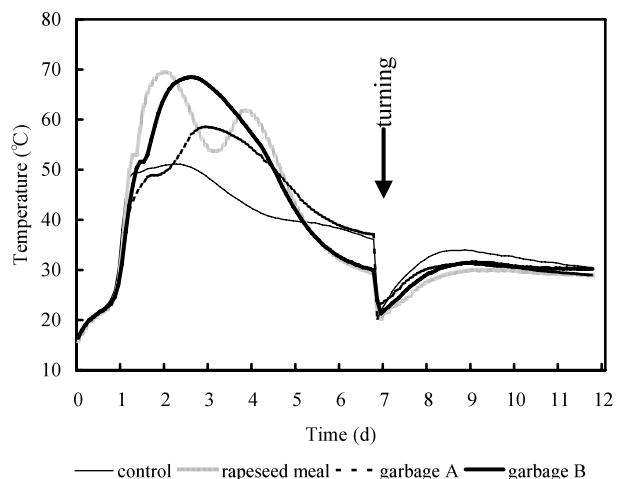


図5. Run3の堆肥温度の推移

Time courses of temperature of Run 3.

Arrow indicates turning of the composting materials. Thin, shaded, dotted and thick line show a time course of control (non-addition), rapeseed meal, garbage A and garbage B addition, respectively.

を実現させるためには、本試験で設定した78%という水分は高すぎると考えられた。しかしながら豆腐粕、米ぬか、油かす、生ゴミAおよび生ゴミBの混合は、温度上昇を促進し、それぞれ65.7 (n=2), 60.0 (n=2), 69.5, 58.6そして68.5℃の最高温度を記録した。また生ゴミAと生ゴミBの比較では、10%のサラダ油を含む生ゴミBの方がより高い最高温度を示すとともに、55℃以上の高温域の持続時間も長い傾向にあった(表7)。

USEPAが定めた堆肥の製造管理要件である Process to Further Reduce Pathogens (PFRP)によれば、堆肥の温度を少なくとも55℃以上に保ち、3日以上持続させる処理が求められている<sup>94)</sup>。Run2における米ぬかの混合試験では、最高温度は55.4℃、55℃以上の高温持続時間は18時間であり、7日後の大腸菌数は $4.4 \times 10^6$  CFU/g-wetから検出限界以下( $< 10^2$ )まで減少していた。一方でRun1における乾燥鶏糞添加区では最高温度は52.5℃と55℃に満たず、大腸菌数の減少も認められなかった(表7)。最高温度が55℃に達しなかった対照区については7日目においても大腸菌数は減少せず、堆肥化開始前の大腸菌数とほぼ同様かそれ以上の値を示した。特にRun1とRun3の12日目の大腸菌数は $10^7$  CFU/g-wet以上であり、堆肥化開始前の大腸菌数よりも明らかに増加していた。一方で生鶏糞および乾燥鶏糞添加区を除く有機廃棄物を添加した処理では、7日間の堆肥化処理期間で、初発の $10^6$ から $10^2$  CFU/g-wet程度

までの顕著な大腸菌数の低減が認められており、その後も12日目まで低い菌数で推移した。これらの結果から大腸菌数低減に対しては、堆肥化初期段階における高温曝露が非常に重要であることが明らかとなった。

生鶏糞添加区の最高温度は42.2℃であったが、大腸菌数は $4.7 \times 10^6$ から $2.0 \times 10^3$  CFU/g-wetにまで低下していた。Taylor et al.<sup>93)</sup>は、石灰を添加した生の汚泥を土壤に施用し、その後の大腸菌群数をモニタリングしたところ、大腸菌群数はアンモニア態窒素濃度と負の相関があったことを報告している。0日目における生鶏糞添加区のアンモニア態窒素濃度は、他の処理区が0.79 - 1.50 mg-N/乾物gの範囲であったのに対し、2.57 mg-N/乾物gであり、7日目においても他の処理区が0.14 - 3.62 mg-N/乾物gの範囲であったのに対し、5.51 mg-N/乾物gと、いずれのサンプル採取日においても最も高い値を示していた。よって生鶏糞添加区において認められた大腸菌数の低下は、生鶏糞の分解過程で生成したアンモニアが、大腸菌の生存に影響を及ぼした可能性もあると考えられた。また生鶏糞を添加した堆肥には粘性があり、開始後7日目に行った堆肥の攪拌時には、硫化水素のような嫌気分解時に生成する臭気の発生が認められた。嫌気分解時に発生する低級脂肪酸等の有機酸は大腸菌の生存に阻害的に働くことが知られており<sup>31)</sup>、アンモニアもしくは嫌気的条件下で生成した分解産物が大腸菌の低減に寄与した可能性も考えられた。温度に依存しない大腸菌の死滅機構は未知の部分が多く、今後更なる

表7. 最高温度、55℃以上の持続時間、BODおよび大腸菌数の推移  
Maximum temperature, duration of temperatures above 55°C, BOD, and changes in the number of *E. coli*.

No.	organic waste	TEMP <sub>max</sub> <sup>a</sup> (°C)	Duration55 <sup>b</sup> (h)	BOD (O <sub>2</sub> mg/g DM)	Number of <i>E. coli</i> (CFU/g-wet)			
					day 0	day 7	day 12	
Run 1	1	control 1	51.5	0	92.9	$9.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$
	2	tofu residue 1	67.9	70	206.0	$2.6 \times 10^6$	$< 10^2$	$2.1 \times 10^3$
	3	rice bran 1	64.6	60	223.6	$8.3 \times 10^5$	$< 10^2$	$< 10^2$
	4	dried chicken feces	52.5	0	117.0	$4.5 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$2.9 \times 10^7$
Run 2	5	control 2	44.6	0	81.1	$9.4 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$
	6	tofu residue 2	63.4	56	166.2	$1.0 \times 10^7$	$< 10^2$	$< 10^2$
	7	rice bran 2	55.4	18	185.0	$4.4 \times 10^6$	$< 10^2$	$< 10^3$
	8	raw chicken feces	42.2	0	124.3	$4.7 \times 10^6$	$2.0 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$
Run 3	9	control 3	51.1	0	111.2	$1.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$2.6 \times 10^7$
	10	rapeseed meal	69.5	58	174.0	$1.0 \times 10^6$	$< 10^2$	$< 10^2$
	11	garbage A	58.6	32	179.8	$1.1 \times 10^6$	$< 10^2$	$< 10^2$
	12	garbage B	68.5	58	219.7	$1.2 \times 10^6$	$< 10^2$	$< 10^2$

<sup>a</sup> Maximum temperature.

<sup>b</sup> Duration of the temperatures above 55°C.

研究が期待される。

(3) 堆肥の温度と大腸菌数低減との相関

ポリペプトン添加試験, および有機廃棄物添加試験の計 23 回の堆肥化試験結果をもとに, 堆肥化開始後 7 日目の大腸菌数と堆肥の最高温度, および 55°C 以上の持続時間との相関を図 6 に示した。PFRP に規定されている堆肥温度の下限値である 55°C を境界として, 大腸菌数は  $10^3$  CFU/g-wet 以下にまで低下していた (図 6A)。また 55°C 以上の高温曝露の経験がない堆肥については,  $10^3$  CFU/g-wet 以上の大腸菌の残存が認められたが, 最低 18 時間以上の曝露により, 大腸菌数は  $10^3$

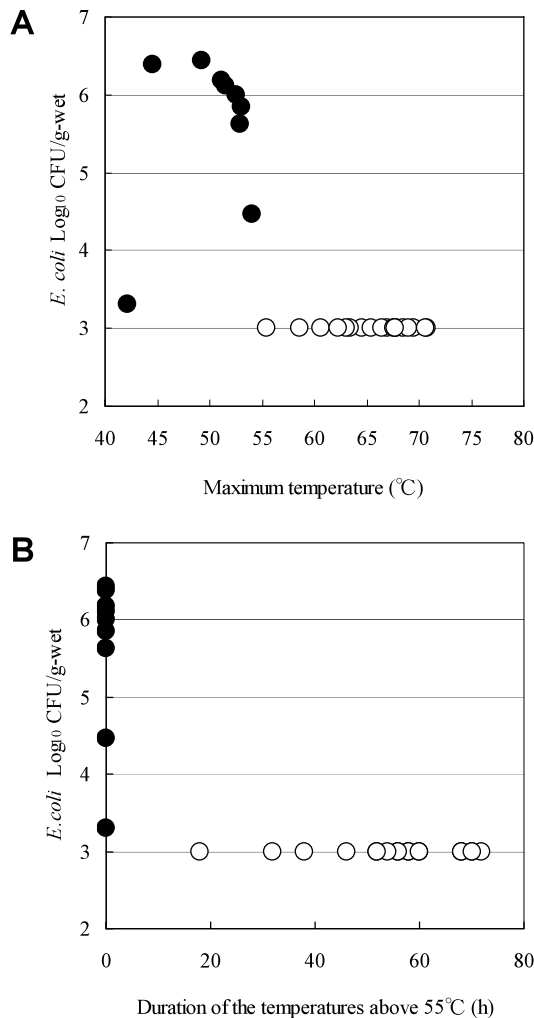


図 6. 堆肥化 7 日目の大腸菌数と最高温度 (A), および 55°C 以上の持続時間 (B) との関係

Relationships between the numbers of *E. coli* on day 7 and (A) maximum temperatures or (B) duration of the temperatures above 55°C. Open circles show the numbers of *E. coli* below  $10^3$  CFU/g-wet.

CFU/g-wet 以下にまで低下していた (図 6B)。

(4) 堆肥の温度上昇と原料の Biochemical Oxygen Demand (BOD) の相関

有機廃棄物添加区において認められた温度上昇は, 有機廃棄物中に含まれる基質の添加によって増大した微生物活性に起因すると考えられた。そこで易分解性基質の指標として, 堆肥原料中の BOD 値を測定した。堆肥原料の BOD 値, 最高温度, 55°C 以上の高温持続時間を表 7 に示した。対照区の平均 BOD は  $95.1 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$  ( $n=3$ ) であり, 有機廃棄物を添加した堆肥原料の値は, それよりも高い  $117.0 - 223.6 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$  の範囲であった。また原料の BOD 値が  $166.2 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$  以上の場合には, 7 日目において顕著な大腸菌数の低下が認められた。BOD 値と堆肥の最高温度の間には, 図 7 に示したように正の相関が認められた ( $r=0.832$ )。特に豆腐粕, 米ぬか, および生ゴミ B を添加した堆肥原料の BOD 値は,  $200 \text{ O}_2 \text{ mg/g-dry matter}$  以上の高い値であった。家畜の飼料としても利用されるこれらの有機廃棄物については, 日本標準飼料成分表<sup>7)</sup>にその栄養的価値が記載されており, 乾燥豆腐粕および米ぬかはそれぞれ 13.1 および 18.5% の粗脂肪を含有しているとの報告がある。また生ゴミ B についても全重量の 10% のサラダ油が含まれている。油脂成分は BOD 値も高いことから, これらの成分が温度上

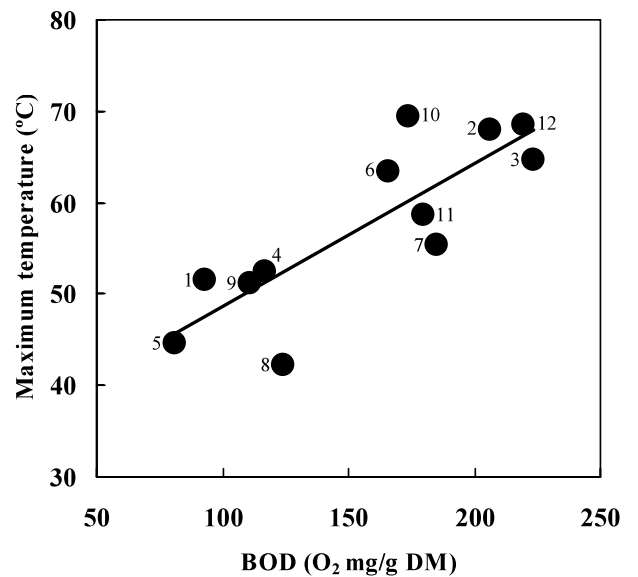


図 7. 最高温度と堆肥の BOD 値との相関

Relationships between maximum temperature and BOD value of compost mass. Numbers attached to circle correspond to those in Table 7.

昇に大きく影響を及ぼしているものと考えられた。油かすを添加した堆肥原料の BOD 値は、174.0 O<sub>2</sub> mg/g-dry matter に過ぎなかったが、添加処理区の中で最も高い 69.5°C の最高温度を記録した。Imbeah et al.<sup>42)</sup> は堆肥中の空隙の確保は、好気性菌の代謝による熱生産を行う上で必要な酸素を行き渡らせるのに効果があることを報告している。よってこの温度上昇は、BOD 源の供給に加え、粒状の油かすの混合により堆肥中に適当な空隙が形成された結果であると考えられた。

#### 4. 要約

本試験では水分調整材が不足しがちな国内の状況を踏まえ、高水分の状態ながらも衛生的な条件を満たしうる堆肥化プロセスの確立を目的として、牛糞と有機廃棄物との混合堆肥化処理について検討を行った。水分が異なる堆肥原料に、培地成分として用いられる易分解性基質であるポリペプトンを添加し、堆肥の温度上昇に対する効果を測定した。その結果、水分が高くなるほど堆肥の温度上昇は抑制される一方で、ポリペプトンの添加は温度上昇を促進し、その効果は水分の高い堆肥原料において特に顕著であることが明らかとなった。高水分堆肥原料に対する易分解性有機物の添加効果が明らかになったところで、実際の有機廃棄物と牛糞の混合堆肥化試験を行った。高水分牛糞に対する豆腐粕、米ぬか、油かす、および生ゴミの混合は、無添加の原料に比べ大幅に温度上昇を促進し、55°C を超える高温を維持することで、大腸菌数を大幅に低減させることが明らかとなった。この温度上昇は主として添加物中の易分解性有機物量に依存し、堆肥温度と BOD 値の間には正の相関が認められた。また、有機廃棄物を添加した堆肥原料の BOD 値が 166.2 O<sub>2</sub> mg/g-dry matter 以上の時、顕著な大腸菌数の低減が認められた。家畜糞と有機廃棄物の混合堆肥化処理は、有機資源の循環の上でも、また堆肥化プロセスの改善の意味でも有効な手段と考えられる。

本試験は実験室レベルの小型リアクターを用いて行われたが、次章ではパイロット・スケールの堆積型堆肥化における有機廃棄物の添加効果を検証する。

### 第3章 豆腐粕の混合が牛糞の堆積型堆肥化過程の温度上昇に及ぼす影響

#### 1. 緒言

我が国の集約的な畜産業の発展によってもたらされた局地的な排泄物の蓄積は、深刻な環境汚染問題を引き起

こしている<sup>25)</sup>。このような環境問題に対応するため、家畜排泄物の管理の適正化および利用の促進を目的として、1999年から新しい法律が施行された。また家畜排泄物に加え、各地域で発生する食品副産物等の有機廃棄物の循環利用も国策として推進されている。中でも水分が低く、臭いが少なく、スラリー状の糞尿に比べて市場価値が高い有機肥料を生産する堆肥化処理は、有機廃棄物の循環利用の最も現実的な手段となっている。

畜産業全体で排出される糞尿量に対する乳牛の割合は、2006年において31%を占めており畜種別で最も割合が高い。乳牛糞は水分が80 - 85%と比較的高く、穀物を主として給与されている鶏や豚の糞に比較して易分解性有機物含量が少ない。それ故、高水分の乳牛糞を用いて堆肥化を行う場合には、適当な水分調整材（ワラやオガクズなど）の添加を行わない限り、高温域に達するまでの温度上昇は期待できない<sup>91)</sup>。

乳牛は病原性大腸菌 O157 : H7 の主要な保菌動物と考えられており<sup>30)</sup>、乳牛糞の堆肥化過程で高温域の堆肥化を実践し、有害微生物を低減させることは以前にも増して重要になってきている。米国環境保護庁（USEPA）の 40 CFR part 503 に記されている堆肥化プロセスの実施要項は、病原性微生物の低減や媒介物の制御の徹底を目的として定められた。このプロセス実施要項には様々な種類の堆肥化処理法に対し、堆肥化過程での温度とその持続時間についての基準が設けられている。これらの基準を満たす為には、高水分である乳牛糞の水分を調整し、堆積物中に空隙をもたらすような水分調整材の添加、もしくは第2章で議論された易分解性有機物の添加が有効な選択肢となりうる。

豆腐は我が国において人気のある食材であり、その副産物である豆腐粕は以前から家畜の飼料として用いられてきた。しかしながら、近年は安価な輸入飼料がそれにとって替わり、豆腐製造業界はその処理について対応を求められている。Nakasaki et al.<sup>67)</sup> は、この豆腐粕を堆肥原料として様々な菌の接種を行い、その温度上昇を観察した。その結果、豆腐粕は堆肥化することにより速やかに温度が高温域にまで達したことから、分解性の高い有機廃棄物であると考えられた。また第2章で示された BOD 値のように豆腐粕は相当量の易分解性有機物を含有していると考えられ、実規模の堆肥化においても豆腐粕を混合し堆肥化することで、良好な処理プロセスの進行が期待された。そこで本研究では乳牛糞に対する豆腐粕添加の効果、特に添加量と温度上昇の相関を明らかにするために、小型堆肥化リアクターを用いた試験を実施す

るとともに、堆積型堆肥における部位別温度上昇に対する添加効果を明らかにするために、パイロット・スケールでの静置堆積型堆肥化試験を行った。

## 2. 実験方法

### (1) 豆腐粕の混合割合を変化させた場合の牛糞堆肥化試験（小型堆肥化リアクター試験）

搾乳牛の糞は、農林水産省畜産試験場（つくば市）の搾乳牛舎から採取した。粗飼料と市販の濃厚飼料を給与している舎内の牛群より、ワラやオガクズなどの敷料が混入していない状態で糞を採取した。新鮮牛糞と 8mm の篩を通過した細断ワラを、71%の水分になるように湿重量比で 8.3 : 1.7 の割合で混合した。この乳牛糞と細断ワラの混合物に対し、乾燥豆腐粕（水分 14%、ケルダール窒素分（Kj-N）5%）を全乾物当たり 0%（対照区）、6%（6TR）そして 11%（11TR）となるように混合した。それぞれの混合物の初発水分、および Kj-N を表 8 に示す。小型堆肥化リアクターは、第 2 章で用いたものを使用した。それぞれ 4 kg の堆肥原料を、20 cm の堆積高になるようにリアクターに充填した。温度測定のための熱電対はリアクター中心部の、堆肥原料充填物の底から 7.5 cm の位置に設置した。通気はそれぞれのリアクターに対し、0.4 L/min の割合で連続的に行った。小型リアクターを用いたすべての堆肥化試験は、25℃の恒温条件下で行った。堆肥化期間中のサンプリングは、堆肥温度が 30℃ 近くまで低下した際にリアクターから堆肥を取り出し、手で十分に攪拌した後に行った。攪拌後は再び堆肥をリアクター内に充填し、通気を再開した。堆肥化処理は堆肥の攪拌処理後に、堆肥温度のピークが認められた後に終了した。初発、中間の堆肥攪拌時、堆肥化終了時のサンプルについて水分、および生物化学的酸素要求量（BOD）の測定を行った。この一連の試験は異なるロットの乳牛群の糞を用い、同一条件下で 3 回行った（Run 1 - 3）。この 3 回の試験期間中、牛糞を採取する個体、

表 8. 堆肥原料の水分とケルダール窒素量

Moiture content (%) and Kj-N (%) in the initial composting material mass.		
	Moisture (%) ±SD	Kj-N (%) ±SD
Control	71.7±0.9	1.4±0.1
6TR	70.3±0.8	1.6±0.1
11TR	69.4±0.1	1.9±0.1

\*Control, 6TR, 11TR: 0, 6 and 11% tofu residue addition treatment, respectively.

およびその飼養管理は一定の条件下で行った。

### (2) 静置堆積型堆肥化処理における豆腐粕の混合試験（パイロット・スケール試験）

乳牛糞とワラの混合物に対し、豆腐粕を添加、または添加しない原料を用いた堆積堆肥化試験を実施した。堆肥原料は、牛糞尿混合物のスクリュープレスによる固液分離処理によって得られた固形物を主とし、それに新鮮乳牛糞および細断ワラを湿重量比で 7.2 : 3.5 : 1 の割合で混合したものをを用いた。この混合物に対し、豆腐粕を乾物重当たり 0%（対照区）および 15%（添加区）混合し、水道水を添加することで水分 78% の高水分原料を調製した。鉄製フレームと 5 cm 厚の強化発泡スチロールで組み立てた枠に、1.0 × 0.8 × 0.75（縦×横×高さ）（単位：m）となるように上記堆肥原料を充填・堆積した。堆肥の底部には、ポリエステル製の不織布で表面をカバーした工業用排水シートを設置し、堆積物に対する底部からの受動通気が促進される設計とした<sup>92)</sup>。堆肥原料は、それぞれ 220 kg をフレーム内に充填した。堆積物中の温度測定位置は計 9 箇所とし、堆積物の中心、および中心から左に 40 cm、右に 40 cm の位置に、堆肥底部から 10 cm、40 cm および 55 cm の高さとなるように、ステンレス製の棒に熱電対を固定したものを挿入した。（図 8）。

### (3) 分析および統計解析

#### 1) 水分、堆肥温度、生物化学的酸素要求量

第 2 章と同様の手法で測定した。

#### 2) ケルダール窒素（Kjeldahl-nitrogen : Kj-N）

Kj-N は、堆肥現物 5 g 程度を Bremner et al. の方法<sup>4)</sup>により測定した。

#### 3) 統計解析

堆肥温度に対する豆腐粕添加の効果は、豆腐粕添加割合を処理、繰り返し試験をブロックとした乱塊法により分析した。平均値間の差は、Tukey の多重検定により解析した。すべての統計解析は、SAS の GLM プロシジャを用いて行った<sup>82)</sup>。

## 3. 結果および考察

### (1) 豆腐粕混合割合が堆肥の温度上昇および有機物分解に及ぼす影響（小型堆肥化リアクター試験）

いずれの添加割合の堆肥においても通気開始後から温度は上昇し、2 日以内に最高温度を記録した。7 日目にすべての堆肥において温度が 30℃ 以下に低下したた

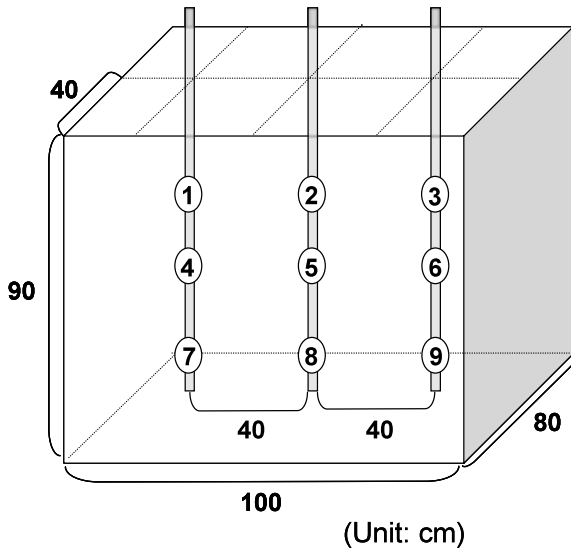


図8. 本研究で用いた静置型堆積堆肥の概要

A Schematic diagram of the static compost pile used in this study. The numbers of the thermocouples and their locations are corresponded to Fig. 10.

め、堆肥の攪拌を行った。いずれの堆肥も攪拌後に温度上昇のピークを示したが、11TR以外の堆肥の最高温度は50℃に達しなかった。その後の温度推移から、更なる温度上昇が期待できないと判断したため、豆腐粕混合割合が異なる堆肥における温度上昇効果の比較は、この温度上昇が最も顕著な12日間のデータを用いて行うこととした。

豆腐粕添加による温度上昇の評価は、(i) 最高温度 ( $TEMP_{max}$ )、(ii) 堆肥温度が55℃に達するまでに要する時間 ( $TIME_{55℃}$ )、(iii) 55℃以上の持続時間 ( $Duration_{55℃}$ ) の3つのパラメータによって行った (表9)。

堆肥の最高温度は、豆腐粕添加割合が多いほど高い傾向にあったが、有意な差は認められなかった。 $TIME_{55℃}$  は豆腐粕添加割合が多くなるほど短縮される傾向にあり、対照区と11TRの間に有意差 ( $p<0.05$ ) が認められた。USEPA は“A process to further reduce pathogens (PFRP)” に定められる堆肥製造管理要項の中で、堆肥中の病原微生物の死滅を徹底させるために、55℃以上の堆肥温度を少なくとも3日以上継続させて管理することを推奨している<sup>94)</sup>。本堆肥化条件では、豆腐粕添加割合は堆肥の最高温度に対して有意な影響を与えなかったが、 $Duration_{55℃}$  は添加割合が高まるほど延長される傾向にあり、対照区と11TRの間に有意差が認められた ( $p<0.05$ )。

温度上昇に差異をもたらした要因として、豆腐粕中の

表9. 温度上昇に対する豆腐粕添加の効果  
Effect of tofu residue addition on temperature rise.

	$TEMP_{max}^a$ (°C)	$TIME_{55℃}^b$ (h)	$Duration_{55℃}^c$ (h)
Control	65.9 ± 0.9 <sup>d</sup>	38.7 ± 7.6 <sup>d</sup>	55.3 ± 4.6 <sup>d</sup>
6TR	68.1 ± 1.7 <sup>d</sup>	32.0 ± 4.0 <sup>de</sup>	72.7 ± 8.3 <sup>de</sup>
11TR	68.6 ± 2.6 <sup>d</sup>	26.0 ± 2.0 <sup>e</sup>	89.3 ± 22.1 <sup>e</sup>

\*Control, 6TR, 11TR: 0, 6 and 11% tofu residue addition treatment, respectively.

<sup>a</sup>Maximum temperature.

<sup>b</sup>Time required for temperature to reach 55℃.

<sup>c</sup>Duration of the temperatures above 55℃.

<sup>d,e</sup>Means in same row with different superscript letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

易分解性有機物が寄与した可能性が考えられた。豆腐粕添加割合の異なる混合物について、BOD値の経時変化を測定した結果を表10に示す。

混合物のBOD値は、対照区が  $97.6 ± 16.6$ 、6TRが  $126.6 ± 11.7$ 、11TRが  $183.5 ± 18.9$  O<sub>2</sub> mg/g-dry matter と、添加割合が多くなるほど高くなる傾向にあった。しかしながら堆肥化の進行に伴ってBOD値は低下し、12日目にはいずれの区も  $15.8 - 31.6$  O<sub>2</sub> mg/g-dry matter の範囲であった。Fernandes et al.<sup>20)</sup> は農業廃棄物と脂肪分を多く含んだ都市ゴミの混合堆肥化において、初発の脂肪含有量が堆肥の高温持続時間に影響を与えるが、その際の最高温度に大きな違いは認められないことを報告している。脂肪分、豆腐粕はともにBOD値が高い物質であり、豆腐粕によって持ち込まれた易分解性有機物は、堆肥化過程で分解され、その結果BOD量に比例した熱産生量をもたらされたと考えられた。

## (2) 豆腐粕添加が静置堆積型堆肥の部位別温度上昇に及ぼす影響

パイロット・スケールの堆積型堆肥試験は、平均外気温が4.1℃であった冬期に行った。高水分にもかかわらず

表10. 堆肥化過程におけるBOD値 (O<sub>2</sub> mg/g-dry matter) の推移

Changes in BOD (O<sub>2</sub> mg/g-dry matter) during the composting process.

	Control	6TR	11TR
Day 0	97.6 ± 16.6	126.6 ± 11.7	183.5 ± 18.9
Day 7	49.1 ± 11.8	54.2 ± 14.3	70.4 ± 5.2
Day 12	15.8 ± 1.1	28.2 ± 4.7	31.6 ± 2.1

\*Control, 6TR, 11TR: 0, 6 and 11% tofu residue addition treatment, respectively.



ず、対照区、豆腐粕添加区とも堆積直後から温度上昇が始まり、2-3日以内に最高温度に達した。堆肥化試験は、開始後21日目で堆積物の中心部（底部から40 cmの部位）の温度がほぼ外気温と同程度に低下したため、その時点で終了した。図9に堆積型堆肥化試験の典型的な温度推移として対照区、および豆腐粕添加区の中心部の温度推移を示した。また図10に対照区、豆腐粕添加区の堆積物中それぞれ9箇所の最高温度、および55℃以上の高温持続時間を示した。堆積物中の部位によって温度推移が異なっており、中心部よりも周辺部の方が温度は低い傾向にあった。最高温度はいずれの部位においても豆腐粕添加区の方が対照区よりも高く、中心部から離れた部位においてその差は顕著であった。また堆積物中の最高温度は両区とも中心部で記録されていたが（それぞれ77.3、80.0℃）、それらの温度差は周辺部の同部位の温度差よりも小さかった。堆積物の9箇所（対照区については55℃に達しなかった箇所を除く8箇所）における $\text{TIME}_{55^\circ\text{C}}$ の平均値を比較したところ、無添加区の37.9時間と比較して豆腐粕添加区では32.6時間と高温に達するまでの所要時間が短い傾向にあった。

高水分でかつ、厳寒期に行われたパイロット・スケール堆積型堆肥化試験では、小型堆肥化リアクター試験と比較して豆腐粕混合による温度上昇の効果が顕著に認められた。両区の $\text{Duration}_{55^\circ\text{C}}$ の比較では、対照区では堆積物中9箇所の温度のうち4箇所がPFRPの基準を満

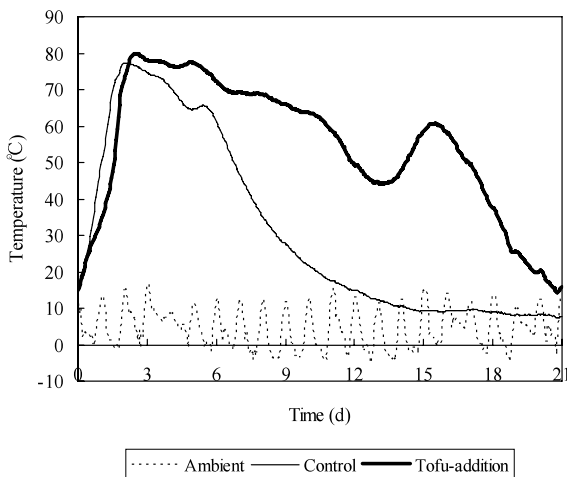


図9. 外気温および豆腐粕を添加した、または添加しない堆肥の中心温度の推移

Time courses of temperature of the center of the control pile, tofu residue addition pile and ambient during the composting process. Dotted, thin and thick line show a time course of ambient, control and tofu-addition treatment, respectively.

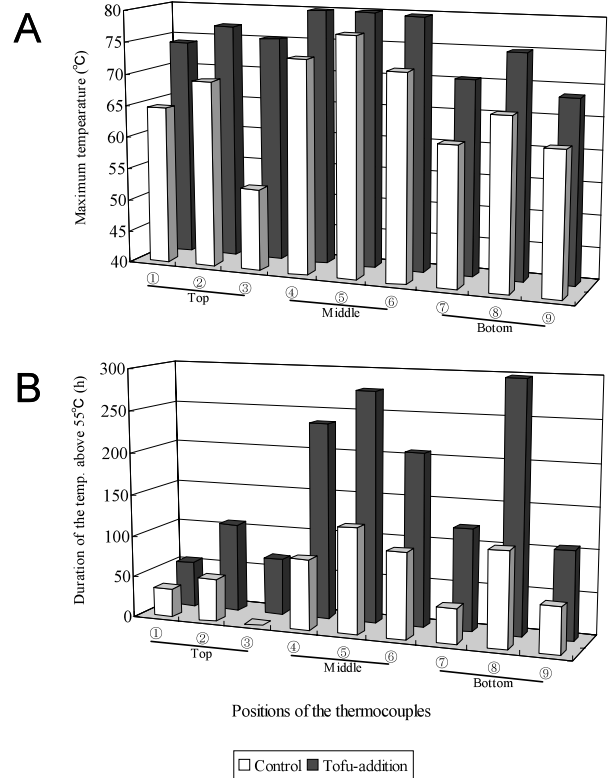


図10. 豆腐粕を添加した、または添加しない堆積堆肥の9箇所の最高温度 (A)、および55℃以上の持続時間 (B) の比較

Comparison of (A) the maximum temperature and (B) the duration of the temperature above 55°C ( $\text{Duration}_{55^\circ\text{C}}$ ) of 9 locations in control and tofu residue addition pile. The numbers of the positions are corresponded to Fig. 8. Open and shaded column show a value of control (non-addition) and tofu-addition treatment, respectively.

たしていたのみであったが、豆腐粕添加区では7箇所が55℃以上の温度を3日以上持続していた。更に、豆腐粕添加区の $\text{Duration}_{55^\circ\text{C}}$ はいずれの部位においても対照区の約2倍程度の値を示していた。今回の堆肥化試験は、高水分、低温環境という堆肥化に適さない条件であったが、豆腐粕添加は対照区に比較して大幅に温度上昇を促進するとともに、PFRPの要項を堆肥中の大部分の部位で満たしていた。今回の試験は堆肥の攪拌を行わない静置状態で行ったが、適切な間隔で攪拌を行うことで堆肥全体を高温に曝露できるような処理が期待できると考えられた。

#### 4. 要約

本章では断熱型の小型堆肥化リアクター（有効容積12 L）、および受動通気によるパイロット・スケールの堆積型堆肥化装置を用い、牛糞と細断ワラの混合物に豆

腐粕を混合した場合の温度上昇および有機物分解特性について検証を行った。小型堆肥化リアクターでの試験では、乾物当たり11%の豆腐粕の添加は、無添加の堆肥と比較して最高温度には差が認められなかったものの、高温域に達するまでに要する時間を短縮し、55℃以上の高温持続時間を有意に延長させることが明らかとなった。また堆肥中のBOD値の測定から、豆腐粕の添加により堆肥原料中の易分解性有機物量が大幅に増加する一方で、12日間の堆肥化期間中にそれらの大部分は分解されることが示された。この豆腐粕の温度上昇効果は、パイロット・スケールの堆積型堆肥化において更に顕著であり、堆積堆肥中のいずれの部位でも対照区よりも高い最高温度、および約2倍の55℃以上の高温持続時間が認められた。よって牛糞に対する豆腐粕の混合は、堆積物全体に高温状態を作り出すことが明らかとなった。

しかし現実には堆肥全体を完全に高温曝露し、大腸菌数をゼロにまで低減化させることは困難である。USEPAの40 CFR Part 503 Rule<sup>94)</sup>においても、“Class A”堆肥の大腸菌群数を $10^3$  CFU/g以下と定義しており、完全な死滅というよりは病原菌リスクの低下に主眼を置いていることが分かる。しかし近年、一度堆肥中で低減した有害微生物が、適当な水分と温度条件を付与されることで再増殖(Regrowth)する現象が問題となっている。本章で検証を行った豆腐粕添加は温度上昇という点では有用であるが、基質に富んだその性状は有害微生物の再増殖を促す可能性がある。よって次章では、牛糞と豆腐粕の混合堆肥化過程での様々な堆肥化ステージにおける大腸菌のRegrowthのリスク評価を行う。

#### 第4章 堆肥化ステージの異なる堆肥中における接種大腸菌の増殖

##### 1. 緒言

環境に優しい持続的農業の活性化の視点から、食品リサイクル法等の有機廃棄物の循環利用に関する法律が制定され、各地で有機資源循環利用の機運が高まっている。堆肥化処理は、家畜排泄物の循環利用の為に普遍的に行われている方法であり、臭気が軽減し乾燥が進んだ堆肥は、有機肥料として流通されている。また近年、牛舎で使用するオガクズやワラ等の敷料の不足から、堆肥をその代替として利用する事例も見受けられる。

乳牛は病原性大腸菌O157:H7の主たる保菌動物であると考えられている<sup>30)</sup>。またO157:H7は牛糞中で長時間生存し続けることが知られており<sup>1,2,16,36,49)</sup>、排泄物

処理過程での大幅な低減が望まれている。牛糞は比較的水分が高く、オガクズやワラなどの適切な水分調整材の混合を行わない限り、堆肥化過程で病原性微生物の死滅温度までの高温を実現することは難しい。しかし第2,3章で示されたように、易分解性有機物を多く含む有機廃棄物を混合することで、高水分条件でも温度が上昇し、大腸菌の死滅を促進できることが明らかとなった。しかし一方で易分解性有機物が未分解のまま残存した場合には、それらが有害微生物の基質となる可能性もある。たとえ見かけ上乾燥していたとしても、散布された圃場で降雨等の要因により適当な水分と温度条件が与えられた場合、残存した、または外部からの汚染により付着した有害微生物が、堆肥中で増殖する可能性がある。また敷料として利用された場合でも、尿や糞の汚染によりその中で有害微生物が増殖する状況は好ましくない。特に大腸菌は、乳牛における乳房炎の原因菌として頻繁に分離されており、疾病のリスクを増大させる可能性がある<sup>38,83)</sup>。一方で堆肥には、外来の微生物に対する拮抗作用があるという報告もあり、Millner et al.<sup>63)</sup>は堆肥中の拮抗微生物群の作用により、堆肥中のサルモネラ菌の増殖が抑制されることを報告している。

堆肥の利用に関してはいくつかの品質評価基準が設けられているが、実際の農業現場では、取り扱いや運搬の容易さを考えて堆肥の乾燥状態が目が向けられがちである。しかし本来は、適当な堆肥化期間を経て生産された腐熟の進行した堆肥の利用が望ましい。そこで本試験では、堆肥化期間の異なる堆肥に人為的に大腸菌を接種し、そこでの増殖を測定することで、堆肥中での大腸菌の動態を把握すると共に、拮抗作用の有無についても検証を行った。供試堆肥としては、第3章の実験で用いた堆肥を利用し、牛糞・ワラ堆肥とそれに豆腐粕を添加した堆肥中での大腸菌の増殖について比較を行った。

##### 2. 実験方法

###### (1) 供試堆肥およびサンプリング

実験には、第3章で実施したパイロット・スケールの堆積型堆肥の対照区(牛糞・ワラ堆肥)、および豆腐粕添加区(牛糞・ワラ・豆腐粕混合堆肥)の2種類の堆肥を用いた。400gの堆肥原料を入れたナイロン・メッシュ袋に熱電対を括りつけ、それぞれ4つずつを対照区、または豆腐粕添加区の堆積堆肥の中心部近くの底部から40cmの高さのところに配置した。堆肥温度の推移は、1時間毎に連続的に記録した。ナイロン・メッシュ袋は、堆積堆肥から経時的に1つずつ取り出し、回

収した堆肥はすぐにアルミ製のトレイ上に広げ風乾させた。水分が20%以下になったところで、トレイから滅菌ビニール袋に移し、実験に供試するまで室温で保存した。また本試験とは別に、他の牛糞堆肥化試験で得た対照区と同一原料組成の堆肥を、開口したビニール袋に室温条件で190日間および360日間保存しておいた堆肥サンプル（それぞれA190およびA360）についても実験に供試した。

## (2) 大腸菌の接種

接種には、家畜衛生試験場（現：動物衛生研究所）中澤宗生博士から供与いただいた大腸菌 O157:H37 CE273 株（子牛の糞便より分離。非病原性株）を用いた。本菌株を Nutrient Broth (Difco Laboratories) 100 ml に1白金耳接種し、37°Cで18時間、150 rpmの振盪培養を行った。菌体は遠心分離（7,000 × g, 10 min）にてペレットとし、0.1 M Phosphate-buffered saline (PBS) にて2度の洗浄、遠心分離を繰り返し、最終的に PBS に懸濁させた。菌体濃度は吸光度 (O.D.<sub>600</sub>) の測定により、おおよそ  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL となるように PBS で適宜希釈し調製した。

## (3) 大腸菌接種堆肥の培養

大腸菌接種培養試験に供試した風乾堆肥サンプルは、事前に0.5 cmの篩を通過したサイズのものをを用いた。接種前に風乾堆肥サンプルに存在する大腸菌、および大腸菌以外の大腸菌群の計数を行った。生牛糞とほぼ同様の大腸菌数である  $10^7$  CFU/g-dry weight の大腸菌 CE273 株を、乾物ベースで15 gの堆肥に接種し、水分約50%となるように滅菌蒸留水を添加した。大腸菌を接種した堆肥サンプルは、滅菌ビニール袋中で十分に攪拌後、100 ml容の滅菌三角フラスコに充填した。通気性のあるスポンジ製の栓をした接種堆肥を充填したフラスコとともに、水を入れたビーカーをプラスチック製の箱の中に収め、30°Cで5日間培養を行った。大腸菌および大腸菌以外の大腸菌群の測定は、培養前後に一度ずつ行った。すべての培養試験は1堆肥サンプルあたり3連で行った。

## (4) 分析および大腸菌の計数

### 1) 水分、アンモニア態窒素

第2章と同様の手法で測定した。

### 2) 大腸菌の計数

測定は1希釈段階につき3枚のプレートを使用し

た。大腸菌に加え、 $\beta$ -D-galactosidase の作用により salmon-galactoside が分解されて生じる赤色コロニーを、大腸菌以外の大腸菌群として計数した。本来、大腸菌は大腸菌群に分類されるが、ここでは大腸菌以外の大腸菌群の計数を大腸菌群数として表示した。

## (5) 統計解析

初発の大腸菌数に対する大腸菌の増殖割合 (%) に対する堆肥化ステージの影響は、1元配置分散分析によって検定し、平均値の差を Tukey の多重検定によって解析した。すべての解析は SAS の GLM プロシジャを用いて行った<sup>82)</sup>。

## 3. 結果

### (1) 堆肥化過程の温度推移

堆肥化期間の平均外気温は4.1°Cであった。堆肥サンプルの温度履歴は図11に示した。対照区（無添加区）、および豆腐粕区の堆肥原料（0日目サンプル）、7、13、22および41日目の堆肥サンプルをそれぞれ C0、C7、C13、C22、C41 および T0、T7、T13、T22、T41 とした。それぞれの堆肥における最高温度は2日目に記録され、対照区で73.7°C、豆腐粕区で78.2°Cであった。対照区の温度は徐々に低下し、13日目に10°C以下になったのに対し、豆腐粕区では高温期間が持続し、22日目になって10°C以下にまで低下した。その後の温度は10°C以下で推移し、それ以上の温度上昇が期待できないと判断したため41日目に堆肥化処理を終了した。

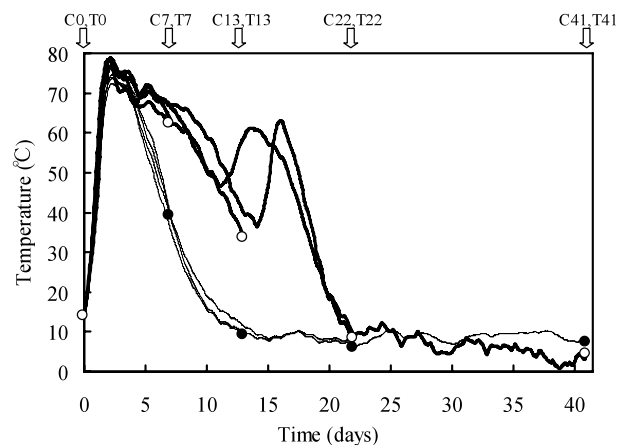


図11. 堆積堆肥の中心部付近の温度推移とサンプル採取時期

Temperature records at nearly mid-depth of the center in static piles and the time schedule for compost sample collection. Thin line: temperature in control pile; thick line: temperature in pile containing tofu residue. Circles show the temperatures at sample collection.

## (2) 供試堆肥中の大腸菌および大腸菌群数

堆肥化開始前の堆肥原料中の大腸菌, および大腸菌群数は, とともに  $10^7$  CFU/g-dry matter のオーダーであった。堆肥化の進行に従って堆肥温度は上昇し, いずれの区においても大腸菌および大腸菌群数は  $< 10^2$  CFU/g-dry matter まで低下した。しかしながら風乾処理により, いずれの堆肥サンプルにおいても再増殖が認められた。大腸菌接種試験に用いた接種前の堆肥サンプル中の大腸菌, および大腸菌群数を表 11 に示す。いずれのサンプルにおいても大腸菌数は  $10^5$  CFU/g-dry matter 以下であったが, 大腸菌群数はそれよりも高い傾向にあった。堆肥化終了後から 190 日および 360 日経過した堆肥サンプル (それぞれ A190 および A360) については, 大腸菌および大腸菌群とも検出限界 ( $< 10^2$  CFU/g-dry matter) 以下であった。

## (3) 異なる堆肥化ステージの堆肥中における大腸菌の増殖

大腸菌を接種した後の堆肥サンプル中の大腸菌数の平均は,  $2.3 \times 10^7$  CFU/g-dry matter (範囲:  $1.8 - 2.8 \times 10^7$  CFU/g-dry matter) であり, これは新鮮牛糞で検出される大腸菌数とほぼ等しかった。接種大腸菌の増殖割合は, 培養前の大腸菌数に対する百分率として示した。

堆肥化ステージの異なる堆肥サンプルにおける大腸菌数の増殖割合を図 12 に示した。1000% を超える高い増殖は, 対照区においては C7 および C13 で, 豆腐粕区においては T0, T7, および T13 で認められた。特に堆肥化初期 (0 - 13 日目) の堆肥サンプルにおいて, 豆腐粕区は対照区よりも増殖割合が高い傾向にあった。また最も高い増殖割合は対照区, 豆腐粕区ともに 7 日目の堆肥サンプル (C7 および T7) において認められた。2 つの日数の経過した堆肥 A190 および A360 の増殖割合は, それぞれ 275% と 265% であり, これらと 13 日目以降の対照区および豆腐粕区における堆肥サンプルとの間に有意差は認められなかった。C22 は唯一, 大腸菌数が低下した堆肥サンプルであった。

## 4. 考察

接種試験の結果, C22 の堆肥サンプルを除いたすべての堆肥サンプルにおいて大腸菌数は増加傾向にあり, 接種菌に対する明確な堆肥の拮抗作用は認められなかった。大腸菌の増殖割合は, 13 日目の堆肥サンプルを境にそれ以前の堆肥はそれ以後よりも高い傾向にあった。Russ and Yanko<sup>80)</sup> は, 汚泥堆肥中のサルモネラ菌の増殖について, 炭素窒素比 (C/N) がサルモネラ菌の増殖能に影響を与えていることを報告している。堆肥化プロセ

表 11. 風乾堆肥中, および培養前後の大腸菌および大腸菌群数の変化  
Numbers of *E. coli* and coliforms in the air-dried compost and their populations before and after incubation.

Compost Samples <sup>1</sup>	After Air-Drying		Inoculation of <i>E. coli</i> <sup>2</sup>	After Incubation	
	<i>E. coli</i> (CFU/g DM)	Coliforms <sup>3</sup> (CFU/g DM)	<i>E. coli</i> (CFU/g DM)	<i>E. coli</i> (CFU/g DM)	Coliforms (CFU/g DM)
C0	$7.8 \times 10^5$	$< 10^4$	Average: $2.3 \times 10^7$	$7.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$
C7	$< 10^4$	$1.7 \times 10^5$	Range: $1.8$ to $2.8 \times 10^7$	$3.7 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$
C13	$< 10^4$	$5.6 \times 10^7$	"	$3.1 \times 10^8$	$7.4 \times 10^8$
C22	$< 10^4$	$2.3 \times 10^8$	"	$8.3 \times 10^6$	$1.1 \times 10^9$
C41	$< 10^4$	$1.0 \times 10^7$	"	$2.9 \times 10^7$	$7.2 \times 10^7$
A190	$< 10^2$ *	$< 10^2$	"	$5.7 \times 10^7$	$< 10^5$
A360	$< 10^2$	$< 10^2$	"	$6.0 \times 10^7$	$< 10^5$
T0	$7.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4$	"	$4.1 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$
T7	$5.5 \times 10^4$	$3.2 \times 10^5$	"	$5.6 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$
T13	$< 10^4$	$1.3 \times 10^7$	"	$2.5 \times 10^8$	$9.3 \times 10^7$
T22	$2.2 \times 10^4$	$5.2 \times 10^6$	"	$1.5 \times 10^8$	$9.6 \times 10^7$
T41	$< 10^4$	$2.9 \times 10^6$	"	$3.7 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$

<sup>1</sup> C = control; T = tofu residue; numbers = age (d) of sample collected; A190 and A360: compost samples derived from another composting run, which had been composted and kept in plastic bags for 190 or 360 d, respectively.

<sup>2</sup> Quantity of *E. coli* inoculated into each air-dried compost sample.

<sup>3</sup> The numbers of coliforms except *E. coli* are shown.

\* Below limit of detection.

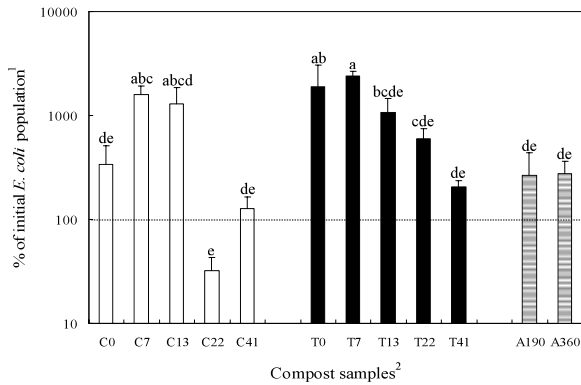


図 12. 古堆肥、および豆腐粕を添加した、または添加しない採取時期の異なる堆肥中における大腸菌の増殖の比較

Comparison of *E. coli* growth in compost samples of different stages with and without the addition of tofu residue, and aged compost samples.

<sup>1</sup> % of initial *E. coli* population calculated as [*E. coli* counts after 5 days incubation]/[*E. coli* counts before incubation] × 100.

<sup>2</sup> C = control; T = tofu residue; numbers = age (d) of sample collected; A190 and A360: compost samples derived from another composting run, which had been composted and kept in plastic bags for 190 or 360 d, respectively.

\* abcde: Means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Bars show standard deviation.

スに進行によって C/N が低下することは一般的に知られており<sup>18)</sup>、堆肥化日数とそれに伴う有機物分解の進行が、病原性微生物の増殖に与える一つの大きな要因として考えられた。

10 倍以上 (>1000%) の大腸菌の増殖を示した堆肥サンプルは、主として堆肥温度が高温期、または高温期を過ぎた直後に採取されたものであった。特に、いずれの区においても、7 日目に採取した堆肥サンプル (C7 および T7) で最も高い増殖が認められた。Mathur et al.<sup>59)</sup> は、堆肥化経過日数が異なる数種類の堆肥サンプルの湯抽出液について、生物化学的酸素要求量 (BOD)、および可溶性有機炭素 (DOC) を測定している。DOC については、堆肥化での分解が始まるとともに増加し、高温期が終了すると低下すること、また BOD 値については堆肥化後期の抽出液と比較して、初発、高温期および高温期が終了した直後の抽出物の値が高いことを報告している。また Soares et al.<sup>89)</sup> は、数種類の堆肥サンプル中における大腸菌群の増殖を測定し、非常に乾燥した堆肥において高い増殖が認められたことを報告している。彼等はこの現象を、堆肥化が低水分条件で進行したために分解が進む前に堆肥が乾燥し、有機物の多くが未分解のまま残存したことが大腸菌の増殖に寄与したのではないかと考察している。我々の堆肥化初期の堆肥サンプルに

おいて認められた大腸菌の増殖は、堆肥化過程で生成された大腸菌にとって利用性の高い低分子化した有機物、または堆肥サンプルの風乾過程で死滅した微生物群の遺体を利用することにより生じたものと考えられた。

豆腐粕混合は、高温堆肥化を促進し大腸菌数を大幅に低下させるが、一方で大腸菌の増殖を促進する傾向にあった。これは 0 日目において、C0 よりも有意に高い T0 の増殖割合によって裏付けられる。大豆ミールの酵素分解物は、しばしば大腸菌を含めた腸内細菌群の増菌培地 (Tryptic Soy Broth 等) の含有成分として用いられている。恐らく豆腐粕中に残存した利用可能な栄養成分が、大腸菌の増殖を促進したものと考えられた。

しかしながら堆肥化後日数が経過したサンプルにおいては、対照区、豆腐粕区の増殖割合の差は小さくなり、最終的に堆肥化終了から半年以上日数が経過した A190、A360 堆肥サンプルと同様の値となった。Hanajima et al.<sup>29)</sup> は、豆腐粕の添加により堆肥中の BOD 値は上昇する一方で、12 日間の堆肥化処理により、その値は無添加の堆肥と同様の値まで低下することを報告している。豆腐粕中の添加によって得られた易分解性有機物は、1, 2 週間の高温堆肥化過程においてその大部分が分解されると考えられた。

唯一、C22 の堆肥サンプルにおいて大腸菌数の減少が認められた。この理由は明らかでないが、生物的な拮抗が大腸菌の増殖に影響を与えた可能性がある。Millner et al.<sup>63)</sup> は大腸菌群の単独の存在、または代謝活性のある細菌群と放線菌の存在が、堆肥中でのサルモネラ菌の死滅を引き起こしたことを報告している。Golueke<sup>23)</sup> も接種した病原性微生物よりも堆肥中の土着の微生物群の方が、基質の競合において有利であることを指摘している。実際に C22 サンプル中の大腸菌群数は接種前 ( $2.3 \times 10^8$  CFU/g-dry matter)、接種後 ( $1.1 \times 10^9$  CFU/g-dry matter) とともに、すべての堆肥サンプル中で最も高い値を示していた。それ故、高い菌数で共存した大腸菌群が、接種大腸菌の増殖に影響を与えた可能性も考えられた。

本研究の結果は、堆肥化の高温期、または高温期が終わった直後の堆肥サンプルが仮に大腸菌に汚染され、適当な水分条件、温度条件が与えられた場合には、大腸菌の大幅な増殖が起きうることを示唆している。実際の現場では、高温多湿な夏季における汚染堆肥の施肥において注意が必要であると考えられた。また堆肥の敷料利用に関して Smith et al.<sup>87)</sup> は、大腸菌群に起因する牛の乳房炎の発生は夏に最大となり、それは敷料中に存在する

多数の大腸菌群への曝露が原因であると報告している。よって堆肥の敷料利用に際して環境性乳房炎の発生を抑制する為には、たとえ見かけ上堆肥が乾燥していたとしても、堆肥化初期、または分解が十分に進んでいない堆肥を、敷料として利用することは好ましくないと考えられる。

## 5. 要約

近年、堆肥における有害微生物の再増殖 (Regrowth) が問題となっている。また酪農経営においては、オガクズ等の敷料の高騰から堆肥をその代替として使用する事例も見受けられる。乳牛は病原性大腸菌 O157:H7 の主要な保菌動物とされており、非病原性大腸菌についても乳房炎の原因菌とされていることから、圃場に施用した、もしくは敷料として散布した堆肥中での大腸菌の増殖は好ましくない。堆肥化過程では堆肥の物理性、化学成分、そして微生物叢が大きく変化していく。有害微生物の堆肥中での増殖は、これら堆肥性状の変遷と関連が深いと予想される。そこで堆肥化開始後から 0, 7, 13, 22, 41, 190 および 360 日目に採取した堆肥に、人為的に大腸菌を接種することで、それぞれの堆肥における大腸菌の増殖リスクを検討した。堆肥サンプルは牛糞堆肥化過程、および牛糞と豆腐粕の混合堆肥化過程から経時的に採取し、直ちに風乾したものを供試した。堆肥を水分 50% に調整し、大腸菌を接種した後に 30℃ の条件で 5 日間の培養を行った。培養前後のサンプルについて、希釈平板法により大腸菌の計数を行った。その結果、ほとんどの堆肥中で大腸菌は増殖し、特に高温期 (7 日目) の、または高温期が終了した直後の堆肥サンプルにおいて、最も高い増殖が認められることが明らかとなった。しかしながら堆肥化開始後 13 日以上経過した堆肥サンプルと、190 日以上経過した堆肥サンプルの間には、有意な差は認められなかった。豆腐粕混合堆肥の経過日数 13 日以前の堆肥では、同時期の無添加の牛糞堆肥と比較して高い大腸菌の増殖割合が認められた。よって豆腐粕の混合は、堆肥温度を大幅に上昇させ大腸菌の死滅を促進する一方で、分解が進行しなかった場合には、適当な水分や温度条件が与えられることで大腸菌の増殖を促進する可能性があることが示された。しかしながら十分な堆肥化期間を経ることで、その増殖は無添加の堆肥と同程度になることが明らかとなった。

## 第5章 豚糞尿通気処理過程における大腸菌の消長、物理化学的パラメータおよび微生物群集の推移

### 1. 緒言

家畜排泄物は、貴重な有機資源として古くから農業生産の肥料として用いられてきた。しかし糞尿液状物が直接農地に散布された場合には、悪臭は大気中に拡散し、しばしば近隣住民からの苦情を受けることになる。特に豚糞尿は低級脂肪酸 (VFAs)、インドール、フェノール、アンモニア、揮発性アミン、揮発性硫黄化合物等の様々な臭気物質を含む、臭気の強い有機廃棄物のうちの 1 つであることが知られている<sup>103)</sup>。また豚糞尿は家畜および人間に危害を及ぼす *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* 等の有害微生物に汚染されている可能性もある<sup>24)</sup>。

酪農経営においては排出された糞尿は未処理のまま、もしくは堆肥化、液肥化等の処理がなされた後に自らが管理する農地に散布され、自給飼料を生産する為の肥料として用いられる。しかしながら養豚経営では、農地を持たない経営体が大部分を占めるため、糞尿は浄化処理後に河川へ放流、または野菜や花卉をはじめとした商品作物を栽培する農地に散布されることが多い。よって家畜糞尿を有機肥料として使用する場合には、事前に臭気や有害微生物等の環境リスクをできる限り低減させる処理を行うことが奨励されている。

我が国において、有機肥料生産を目的とした家畜排泄物の処理に対して最も汎用されている方法は好氣的処理である。豚糞尿の好氣処理の主眼は、臭気の低減、堆肥有機成分の安定化、そして有害微生物の低減に置かれている。これまで多くの手法やシステムが環境負荷低減を目的に開発されており<sup>19, 44, 101)</sup>、様々な処理システムが豚糞尿の好氣的処理の実験に適用されてきた<sup>3, 44, 45, 68, 75)</sup>。このような処理システムにおいて、通気手法の違いは処理温度に大きな影響を与える。一般的に豚糞尿の通気処理過程は中温域で進行するが、高温域での処理を可能とした装置では有害微生物の大幅な低減が実現できる<sup>44)</sup>。一方で、アンモニア揮散量が増加することが知られている<sup>75)</sup>。しかしながら、中温処理過程においてもサルモネラ菌の低減<sup>34, 84)</sup>、および大腸菌群<sup>64, 84)</sup>の低減も報告されており、熱以外の有害微生物低減機構の存在も示唆されている。また、Hissett et al.<sup>37)</sup> は 5℃ から 50℃ とした処理温度の中で、35℃ から 40℃ の中温域で微生物の呼吸活性が最も高くなると報告している。恐らく通気処理過程では、通気に

より生じた微生物群の活性が、糞尿中の環境に大きな変化をもたらしていることが考えられる。

これまでの家畜糞尿の通気処理における微生物学的な研究は、培養的手法によるものが中心であった<sup>9,41)</sup>。また豚の消化管内容物サンプルからクローン化された 16S rRNA 遺伝子の 59%は、これまで培養法によって分離された菌の配列と 95%以下の相同性であったことが報告されている<sup>77)</sup>。よって従来の培養法に依存したアプローチでは、豚糞尿中の微生物群集を十分に評価できない可能性がある。よって本研究では 16S rRNA 遺伝子を介した解析、ここでは PCR-DGGE 法およびクローンライブラリー法を用い、通気処理プロセスにおいて重要なパラメータである悪臭の推移、有機成分の分解、および糞便汚染指標微生物等の動態と、その時の微生物群集の特徴づけを行うことを目的とした。

## 2. 実験方法

### (1) 供試豚糞尿試料

新鮮豚糞は、2002年11月から2003年8月にかけて畜産草地研究所内（つくば市）の肥育豚舎内で採取した。豚糞と蒸留水を1:14（豚糞については乾物重）の割合で混合し、0.5 mm のメッシュで濾過することで、処理過程では分解されない大きさの浮遊物質を除去した。この懸濁液に尿の代替として3L当たり6gの尿素を溶解し、豚糞尿を作成した。

### (2) 小型液肥化リアクターおよび運転条件

回分式の液肥化処理は、泡切り羽を装備した5L容のジャーファーマンター（TJM-502WS, 高崎科学）に3Lの豚糞尿を充填して行った（図13）。液温は40℃に制御し、250 rpm の割合で連続攪拌した。通気はジャーファーマンターの底部からセラミック製散気管（1.2 cm i.d. × 5.5 cm）を通じて50 ml-air/min/L-slurry の割合で連続的に6日間行った。この通気量は日本国内で一般的に行われている通気量のほぼ平均値に相当する<sup>43)</sup>。糞尿のORPとpHは、30分毎にデータロガー（サーモダック EF, Model 5020A, 江藤電気）により連続的に測定した。リアクター内のサンプルはシリンジを介して経時的に採取した。回分式通気処理試験は計3回実施した。

### (3) 化学分析および大腸菌の計数

#### 1) 化学的酸素要求量（Chemical oxygen demand : COD<sub>Cr</sub>）

COD<sub>Cr</sub> は Hach 社が供給する試薬および反応試験管を

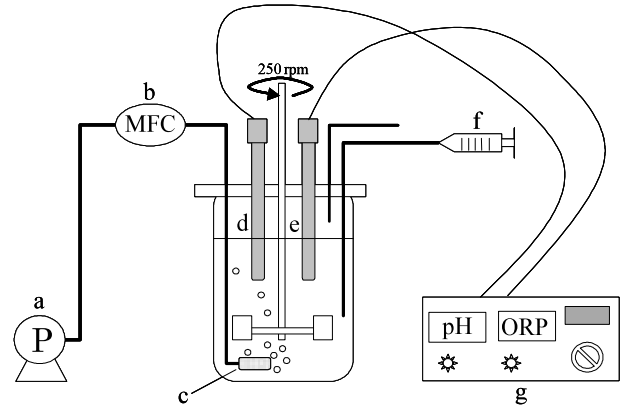


図 13. 液肥化リアクターの概要

Schematic diagram of liquid composting reactor.

a, aeration pump; b, mass flow meter; c, ceramic diffuser; d, pH sensor; e, ORP meter; f, sampling syringe; g, recorder.

用い、糞尿サンプルと反応後に比色法によって測定した。

#### 2) 全窒素

ケルダール窒素（Kj-N）は、ケルダール法によって測定した<sup>4)</sup>。全窒素（TN）は、Kj-Nと亜硝酸態および硝酸態窒素の合計値として算出した。

以下に挙げる化学分析は、糞尿サンプルを遠心し（20,000 × g, 10 min）、その遠心上清を分析サンプルとして用いた。

#### 3) アンモニア態窒素（NH<sub>4</sub>-N）および亜硝酸態、硝酸態窒素

NH<sub>4</sub>-Nおよび亜硝酸態、硝酸態窒素は比色法（Aquatec 5400 analyzer, Tecator）を用いて測定した。糞尿サンプルの全窒素に対するアンモニア濃度の推移を把握するため、1日目から最終日のサンプルについてNH<sub>4</sub>-N/TNの算出を行った。これら値の最小有意差検定は、SASのGLMプロシジャ<sup>82)</sup>を用いて算出した。

#### 4) 遠心上清の全炭素

豚糞尿の遠心上清の全炭素（Total organic carbon）（TOC<sub>S</sub>）は、TOCアナライザー（TOC-500, 島津製作所）によって測定した。

#### 5) 低級脂肪酸類（Volatile fatty acids : VFAs）

低級脂肪酸類（Volatile fatty acids : VFAs）（C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub>）は、キャピラリー電気泳動（HP3DCE system, Agilent Technologies）を用いて測定した。

#### 6) 大腸菌の計数

大腸菌数の測定は滅菌生理食塩水により豚糞尿の希釈系列（1:9）を作成し、クロモカルトコロフォーム寒天

(Merck) 上に表面塗沫する希釈平板法により行った。

また大腸菌数が低い場合 ( $<10^3$  CFU/mL) には、希釈平板法に加え、LMX broth (Merck) を用いた Most probable number method (MPN 法) を併用し計数を行った。

#### (4) 核酸抽出および PCR 条件

##### 1) 核酸抽出

0.5ml の豚糞尿を遠心 (20,000 × g, 4℃, 5 min) して得られたペレットは、500 μl の extraction buffer (100 mM Tris-HCl at pH9.0 and 40 mM EDTA) に懸濁され、抽出に供するまで -20℃ の冷凍庫に保存された。ゲノム DNA はこの凍結サンプルよりベンジルクロライド法<sup>102)</sup>により抽出し、PCR のテンプレートとした。

##### 2) PCR 条件

PCR は、真正細菌 16S rRNA 遺伝子の可変領域 3 (*E. coli* 16S rDNA の 341 番目から 534 番目塩基対まで) を標的とした以下のプライマーを用いた<sup>65)</sup>。

357f-GC : 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

(下線部は GC クランプを示す)

517r : 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

PCR 増幅は AmpliTaq Gold (PE Applied Biosystems) により、サーマルサイクラー (TaKaRa Thermal Cycler MP; TaKaRa Biomedicals) を用いた。温度サイクルは、以下に示す条件で行った。

95℃, 10 分, 1 サイクル

93℃, 60 秒 → 48℃, 60 秒 → 72℃, 60 秒 25 サイクル

72℃, 5 分, 1 サイクル

PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動で確認を行い、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて濃縮を行った。

##### (5) PCR-DGGE

DGGE は DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) を用いて行った。使用したゲルにはポリアクリルアミド濃度勾配 (6 - 12%) と変性剤濃度勾配 (25 - 50%, ただし 7M 尿素 - 40% (v/v) ホルムアミドを 100% とする) の 2 つの濃度勾配が形成されており、PCR 産物をこのゲルに直接アプライした後に、0.5 ×

TAE buffer (20 mM Tris-acetate [pH 7.4], 10 mM acetate, 0.5 mM Na<sub>2</sub>EDTA) 中で 200V の一定電圧で 61℃, 5 時間の電気泳動を行った。この二つの勾配を持つ Double gradient ゲルは、変性剤濃度勾配に加え、ポリアクリルアミド濃度の違いによる第 2 の勾配を導入することで個々のバンドの分離を改善する効果があることが報告されている<sup>13,32)</sup>。

電気泳動後、ゲルを 1 万倍希釈した SYBR Green I (Molecular Probes) にて 30 分間染色し、トランスイルミネーター上にゲルを移し、UV 照射下で電気泳動像を撮影した (Gel Print 2000i, Genetics Solutions)。

電気泳動像から興味の対象となるバンドを選択し、トランスイルミネーター上にて切り出しを行った。切り出したバンドを含むゲルより、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を溶出させた。更に溶出 DNA を用いて再度 PCR-DGGE を行い、切り出したバンドが単一になるまで操作を繰り返した。尚、5 回の切り出しを経て単一にならなかったバンドについては、下記のシーケンスを行わなかった。

##### (6) Sequencing

単一になったバンド DNA を用いて、Sequence 反応を行った。反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、反応条件は本キットのマニュアルに従った。Sequence 反応の際のプライマーは、前述の 357f-GC の GC クランプ部を除いた配列をもつ 357f および 517r を用いた。Sequence は、ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems) にて行った。得られた遺伝子配列と相同性をもつ配列について、WEB 上のデータベースより BLAST プログラムを用いて検索を行った。

##### (7) DGGE バンドパターンの統計解析

取り込まれた DGGE ゲルイメージを Luminous Imager (アイシン・コスモス研究所) で読み込み、バンド強度を数値化した。それぞれのバンドの強度は、 $P_i$  に変換された。ここで  $P_i$  は以下のように定義される<sup>17)</sup>。

$$P_i = n_i/N$$

$P_i$  : importance probability of the band in a gel lane

$n_i$  : band intensity of individual bands

$N$  : sum of the intensities of the bands in the lane



それぞれのレーンに対応するバンドが存在しない場合には、0の数値を入力した。これらの数値から、SASのPRINCOMPプロシジャ<sup>82)</sup>を用いて主成分分析(Principal component analysis: PCA)を行い、DGGEバンドパターンの遷移について可視化を試みた。

#### (8) 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリー解析

クローニングに供する真正細菌の16S rRNA遺伝子の増幅は、以下のプライマーセット<sup>54)</sup>を用いて行った。

27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492r: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'

温度サイクルは以下に示す条件で行った。

95℃, 10分, 1サイクル

93℃, 60秒 → 48℃, 60秒 → 72℃, 60秒 15サイクル

72℃, 5分, 1サイクル

反応後にPCR産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認を行い、適切に増幅されたバンド(～1.5kb)を切り出し精製した。精製されたPCR産物は、pGEM-T Easy vector (Promega)にライゲーション後、*E. coli* JM109株に形質転換を行い、IPTG (0.5 mM), X-gal (100 µg/mL) およびアンピシリン (100 µg/mL) を含むLB寒天培地に塗抹し、37℃で一晩培養した。寒天培地上に出現した白色コロニーを単離し、LB brothで培養後に菌体を得た。菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドの抽出を行った。Day 0, 2, 4, 6サンプルからランダムに取得されたクローン化されたDNA断片をSequenceのテンプレートとして使用した。Sequenceには、以下のプライマーセットを用いた。

27f: 前述

907r: 5' -CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'

それぞれ得られた配列については、Ribosomal Database Project II (RDP-II)<sup>11)</sup>のRDP classifierを用いて系統学的な分類を行った。配列のキメラ構造は、5'末端側配列、3'末端側配列および全体配列の系統学的分類に斉一性が認められるか否かをチェックすることにより行った<sup>35, 58)</sup>。99%以上の相同性を持つ配列同士は、同一の配列と定義し、以降の系統解析にはOperational taxonomic unit (OTU)として扱った。系統

樹は、MEGA version 3.1<sup>50)</sup>を用いて作成した。1300塩基以上の16S rRNAのリファレンス配列を含む系統樹は、neighbor-joining法を用いて作成した。ブートストラップ値は1000回とした。

本研究で得られた塩基配列は以下のアクセッション・ナンバーでDDBJ/EMBL/GenBankデータベースに登録した。DGGEゲルから切り出されたDNA断片については、AB331442-AB331452を、微生物群集の16S rRNA遺伝子OTUsのPSM-1からPSM-62については、AB331453-AB331514を参照されたい。

### 3. 結果

#### (1) 液肥化過程における物理化学的パラメータの推移と大腸菌の消長

物理化学的パラメータの推移、および糞便汚染微生物の指標として測定した大腸菌数の推移は、3回の試験の平均値として示した。ORPについては、測定間隔が30分と短く、またその変化も急激であり、数値の平均化になじまないことから代表的な推移を示した。

##### 1) pHの推移

pHは初発の7.1から実験開始1日目で8.3まで急上昇し、以後6日目に8.6に達するまで穏やかに上昇した(データ未掲載)。このpHの上昇は、アンモニア濃度の上昇と連続通気によるCO<sub>2</sub>のストリップング<sup>28, 90, 95)</sup>によるものと考えられた。開始1日後のアンモニア濃度の上昇は、添加した尿素的の分解に起因するものであり、1日目のアンモニア濃度である1,110 mg/Lは、最初に含まれていたアンモニア濃度と添加した尿素(2 g/L)のほぼ全量が、アンモニアに分解された濃度を合算した値に相当していた(図14C)。

##### 2) COD<sub>Cr</sub>およびTOC<sub>s</sub>の推移

6日間の通気処理過程で初発COD<sub>Cr</sub>の約60%が分解されていたことから、有機物の活発な分解が進行していたと考えられた(図14B)。TOC<sub>s</sub>は開始後1日目に増加が認められたが、2日目以降から実験終了時まで一貫して減少傾向にあった(図14B)。

##### 3) 大腸菌数の推移

大腸菌数は、初発の10<sup>7</sup> CFU/mLから1日目には速やかに10<sup>2</sup> CFU/mLまで低下し、10<sup>3</sup> CFU/mL以下の低い菌数で試験終了時まで推移した(図14D)。

##### 4) ORPとアンモニア濃度およびVFA濃度の推移

ORPは、連続通気条件下ながら開始後12時間には-350 mVまで値が低下した(図14A)。この-350 mV程

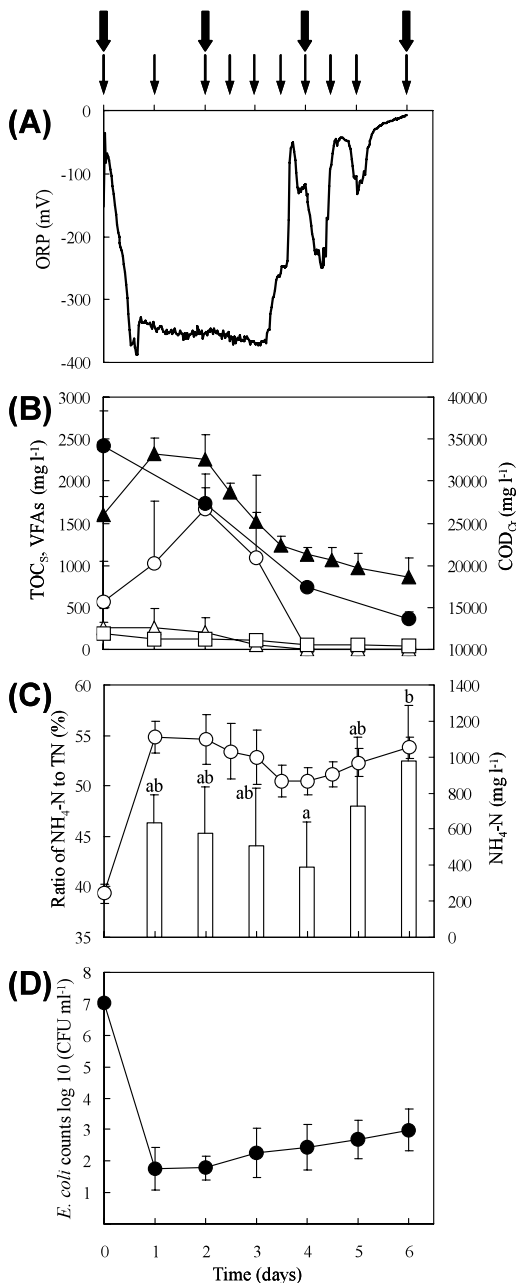


図 14. (A) 酸化還元電位, (B) 上清 TOC, VFA および COD<sub>Cr</sub>, (C) アンモニア態窒素およびアンモニア/全窒素比, および (D) 大腸菌数の推移

Time courses of (A) oxidation-reduction potential (ORP) (B) supernatant TOC (TOC<sub>s</sub>) and COD<sub>Cr</sub>, and volatile fatty acids: closed triangles and circles represent the values of TOC<sub>s</sub> and COD<sub>Cr</sub>, respectively, while open circles, triangles and squares represent the values of acetic acid, propionic acid and butyric acid (C) NH<sub>4</sub>-N in the pig slurry and the ratio of NH<sub>4</sub>-N to total nitrogen. Ratio of NH<sub>4</sub>-N to TN was statistically compared for the samples after day 1 when added urea was hydrolyzed: open circles and columns represent the values of ammonia concentrations and ratio of ammonia to total nitrogen, respectively, and (D) the number of *E. coli*. Thin arrows indicate the samples used for DGGE analysis (Fig. 15A). Bold arrows indicate the samples used for PCA (Fig. 15B) and clone library analysis. The error bars indicate standard deviations of the mean (n = 3). Only for ORP is a typical time course shown. <sup>ab</sup>: Means indicated with different letters are significantly different (p < 0.05).

度の低い ORP 値は 3 日目まで続き, この期間には豚糞尿中で主要な VFA である酢酸濃度, および TOC<sub>s</sub> の増加が認められた (図 14B)。しかしながら 4 日目には, 酢酸を含む VFAs のほとんどが消失していた。

3 日目以降, ORP 値は -250 から -50 mV の間で変動しながら上昇し, 6 日目には -7 mV まで上昇した。この時期には TOC<sub>s</sub> の分解速度は鈍化しており, アンモニア濃度の再上昇も認められた。Fig. 14C に 1 日目 (この時点でほとんどの添加尿素がアンモニアに分解されている) 以降の, 全窒素に対するアンモニア濃度の比率 (NH<sub>4</sub>-N/TN: %) を示した。NH<sub>4</sub>-N/TN は 4 日目に最も低く, 6 日目には有意に (p < 0.05) に増加していた。処理期間中, 亜硝酸態および硝酸態窒素は検出されなかった。

## (2) PCR-DGGE 解析

3 回の液肥化試験のうち, 典型的な DGGE バンドパターンのプロファイルを図 14A に示した。物理化学的パラメータの推移と同様に, 微生物群集も開始 1 日後には顕著な変化が認められた。2 日目と 4 日目のバンドパターンにおいては, 顕著な変化は認められないが, その後 6 日目には再び大きなバンドパターンの変化が認められた。これらバンドパターンの経時的な推移は, 主成分分析の結果に明確に表れた (図 14B)。2 日目と 4 日目の座標は近接しているが, 0 日目および 6 日目の座標は大きく異なっていた。更に, 主成分分析の結果は, 3 回の繰り返し試験のバンドパターンの推移が互いに近似していることを示していた。

DGGE ゲルから重要と思われるバンドを切り出し, 精製した後に DNA 断片の塩基配列を調べた。BLAST 検索によるそれぞれの DNA 断片の Closest Relative の一覧を表 12 に示した。0 日目の微生物群集は, 消化管微生物の配列<sup>56)</sup> に高い相同性をもつ band 1, 2 のようなバンドの存在によって特徴づけられていた。液肥化開始後 1 日目には, Bacilli に分類される band 3, 4, 5 の配列が認められるとともに, 0 日目で認められた Clostridia に分類される band 1 の共存も認められた (図 15A)。2 日目には Bacteroidetes に分類される band 6 のようなバンドも認められた。DGGE ゲル上のバンドの中では, band 3 が処理期間を通じて特に強い強度で認められた。

4.5 日目には Bacteroidetes に分類される band 7, 8, Flavobacteria に分類される band 9, および Clostridia に分類される band 10 が明確なバンドとして認められた。これらのバンドは band 8 を除き, 微弱なバンド強度な

がらも 3.5 または 4 日目頃から認められていたバンドである。これらバンドパターンの変化は, band 1, 3, 4 および 6 のバンド強度の低下に付随して起こっていた。

### (3) 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリー解析

Day 0 (n=47 クローン), Day 2 (n=48 クローン),

Day 4 (n=50 クローン), Day 6 (n=48 クローン) のクローンライブラリーの比較を行った。Day 0 クローンライブラリーでは 22 の OTU が得られ, 豚糞尿中の微生物群集の高い多様性を示していた。クローンの大部分は, Clostridia (21/47) および Bacteroidetes (23/47) であった (図 16)。大部分の OTU は, PSM-28,

表 12. DGGE ゲルから得られた DNA 断片の配列に近縁な種とその相同性  
Sequence similarities between DNA fragments recovered from DGGE gel and their closest relatives.

Band Number <sup>a</sup>	Closest relative			
	Organisms	Class <sup>b</sup>	Similarity <sup>c</sup> (%)	Accession No.
1	Uncultured bacterium clone p-956-s962-5	Clostridia	100	AF371797
2	Uncultured bacterium p-2513-18B5	Clostridia	100	AF371834
3	<i>Bacillus</i> sp. STB9	Bacilli	96	AY603079
4	Bacterium K2-24	Bacilli	96	AY345429
5	<i>Bacillus</i> sp. STB9	Bacilli	96	AY603079
6	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> strain BN3	Bacteroidetes	93	AY570690
7	<i>Bacteroides</i> sp. 22C	Bacteroidetes	92	AY554420
8	<i>Chitinophaga</i> sp. Gsoil 052	Bacteroidetes	90	AB245374
9	<i>Flavobacterium terrae</i> strain R2A1-13	Flavobacteria	93	EF117329
10	Sulfate-reducing bacterium RA50E1	Clostridia	89	AY548776
11	<i>Aequorivita antarctica</i> isolate S4-8	Flavobacteria	96	AY771732

<sup>a</sup> Band numbers refer to Fig. 15A.

<sup>b</sup> The sequence of closest relatives were phylogenetically classified using the RDP classifier of the Ribosomal Database Project II

<sup>c</sup> Percentage similarity to the closest relative according to the BLAST search.

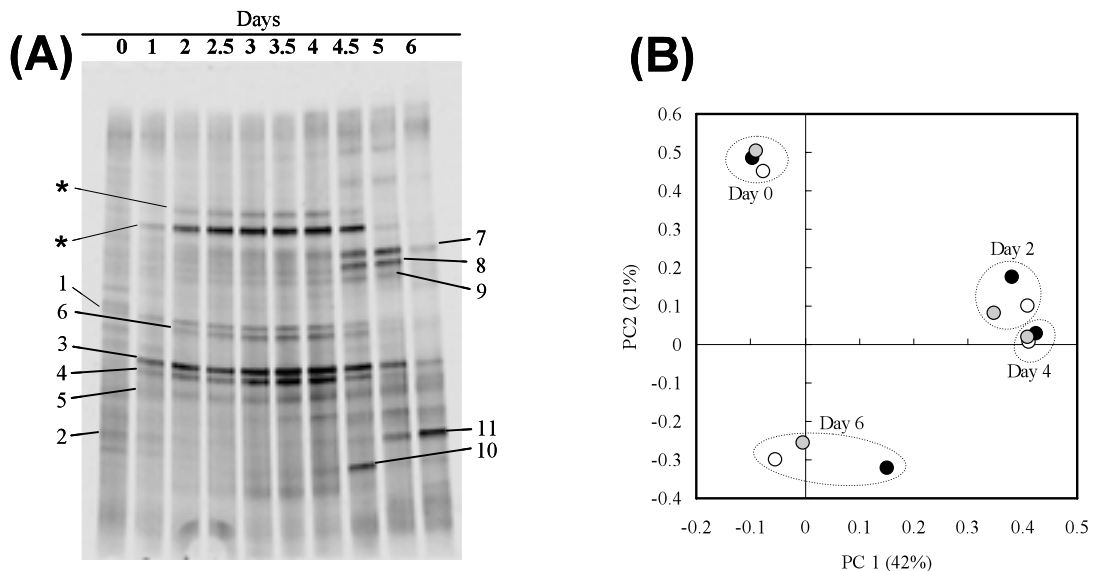


図 15. 豚ふん尿液肥化過程の微生物群集の DGGE プロファイル (A) と主成分分析による群集の推移の解析 (B)

(A) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of PCR-amplified 16S rRNA gene extracted from aerated pig manure slurry microflora. The numbered bands refer to those in Table 12. \*: These bands are supposed to be a heteroduplex that was derived from the sequences represented by bands 3, 4 and 5, because the re-amplified fragments recovered from these bands showed bands 3, 4 and 5 on the DGGE gel. (B) Scatter plot of the results from the PCA of the DGGE profiles of three runs. Open, closed and shaded circles represent the plots of three independent runs. Open circles correspond to the run of the DGGE profile shown in (A).

-12, -13, -16, -17, -26 (EF529620, AY028442, AB064923, AY239461, AB238927, X94967) のように動物の糞便, またはルーメンに由来する配列と相性が高かったが, 口腔 (PSM-11) (AY005061), または水田 (PSM-34) (Y15986) に由来する配列も認められた (表 13)。

Day 2 クローンライブラリーは 9 つの OTU から構成されており, Day 0 と比較して特定の細菌が集積したことを示していた (図 16)。Day 2 ライブラリーでは, *Bacillus* に分類されるクローンの顕著な増加が認められた (図 16, 表 13)。この優占の OTU である PSM-1 (21/48), および PSM-2 (9/48) は, DGGE ゲルでの band 3, 5 (PSM-1), および band 4 (PSM-2) に対応していた。PSM-1 と -2 は *Bacillus* に属し, 系統的に近似していた (similarity 98.3-98.7%)。またこれらと 97% 以上の相性をもつ Closest relative は, データベース上に認められなかった。Day 2 ライブラリーで Clostridia は Bacilli に次いで 2 番目に多いクローンであったが, Day 0 ライブラリーと同一の OTU は認められなかった (図 17)。

Day 2 と同様の構成は, Day 4 ライブラリーにおいても認められた。Day 4 ライブラリーにおいてはより多くの *Bacillus* に属する OTU の集積が認められ, Day 2 と同様に多数の PSM-1 (28/50) および -2 (12/50) が認められた (図 16, 表 13)。また Day 4 ライブラリーは,

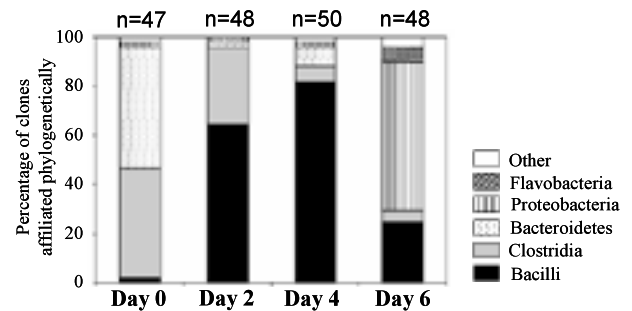


図 16. 0, 2, 4, 6 日サンプルから得られた 16S rRNA 遺伝子の系統的分類

Relative proportions of 16S rRNA gene sequences recovered from day 0, 2, 4 and 6 samples. "Other" represents Sphingobacteria, Mollicutes or unclassified bacteria combined. The number above the bar indicates the total number of clones obtained in this study.

表 13. 0, 2, 4, 6 日目のクローンライブラリーのうち全クローンの 5% 以上の割合を占めた OTU とその近縁種

The commonly isolated OTUs (>5% in total clones) from day 0, 2, 4 and 6 clone libraries.

Clone library	OTUs	% of Total	Class <sup>a</sup>	Corresponded DGGE band <sup>b</sup>	Best match in GeneBank	% similarity <sup>c</sup>
Day 0	PSM-28	10.6	Clostridia		EF529620	93
	PSM-16	8.5	Bacteroidetes		AY239461	87
	PSM-17	8.5	Bacteroidetes		AY862593	90
	PSM-11	6.4	Bacteroidetes		AY005061	90
	PSM-12	6.4	Bacteroidetes		AY028442	93
	PSM-13	6.4	Bacteroidetes		<i>Prevotella copri</i>	93
	PSM-37	6.4	Clostridia		Y15986	89
Day 2	PSM-1	43.8	Bacilli	Band 3, 5	AM690038	95
	PSM-2	18.8	Bacilli	Band 4	DQ448750	94
	PSM-34	14.6	Clostridia		AF443595	98
	PSM-36	8.3	Clostridia		<i>Oscillibacter valericigenes</i>	93
Day 4	PSM-1	56.0	Bacilli	Band 3, 5	AM690038	95
	PSM-2	24.0	Bacilli	Band 4	DQ448750	94
Day 6	PSM-1	10.4	Bacilli	Band 3, 5	AM690038	95
	PSM-56	10.4	$\beta$ -proteobacteria		EF095770	96
	PSM-49	8.3	$\alpha$ -proteobacteria		AJ565420	91
	PSM-50	8.3	$\alpha$ -proteobacteria		AJ565420	91
	PSM-62	8.3	$\gamma$ -proteobacteria		AM400231	96
	PSM-48	6.3	Flavobacteria		<i>Aequorivita antarctica</i>	93

<sup>a</sup> The sequences of OTUs were phylogenetically classified using the RDP classifier of the Ribosomal Database Project II.

<sup>b</sup> Band numbers refer to Fig. 15A and Table 12.

<sup>c</sup> Percentage similarity to the closest relative according to the BLAST search.

Bacteroidetes のクローンの増加によっても特徴づけられた。しかし Day 4 ライブラリーの Bacteroidetes に分類された4つの OTU のうち3つは、Day 0 ライブラリーの Bacteroidetes と異なるクラスターを形成していた(図

17)。

Day 6 では、Proteobacteria に属するクローンが最も多くなり、以下 Bacilli, Flavobacteria がこれに次いだ(図 16)。しかしながら、DGGE プロファイルにお

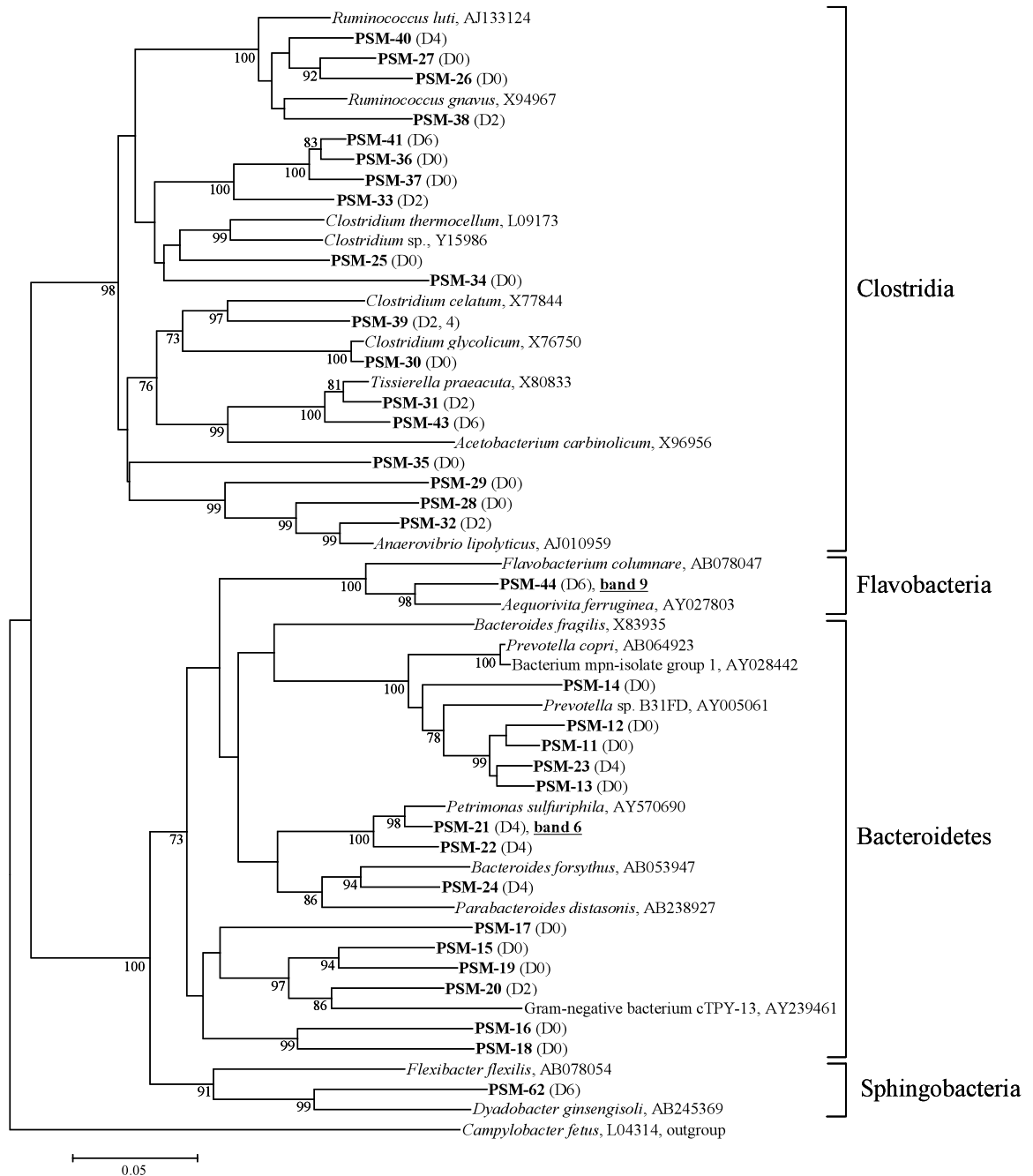


図 17. 0, 2, 4, 6 日目のクローンライブラリーから得られた Clostridia, Bacteroidetes, Flavobacteria および Sphingobacteria に属するクローンの系統樹

Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method showing the phylogenetic relationships among the clones from the aerated pig slurry samples on day 0, 2, 4 and 6 within the classes Clostridia, Bacteroidetes, Flavobacteria and Sphingobacteria. Bootstrap values are shown for each node that had >70% support in a bootstrap analysis of 1000 replicates. Sequences obtained in the present study are in boldface, followed by the clone library from which the individual 16S rRNA clone sequences came. *Campylobacter fetus* in the  $\epsilon$ -proteobacteria served as the outgroup organism. The scale bar represents 5% sequence divergence. DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers of reference sequences are given.

いても認められたように、band 3 および 5 に対応する PSM-1 (5/48) は依然として検出された (図 18, 表 13)。Proteobacteria に属するクローンのいくつかは、水圏に由来する微生物群の配列と高い相同性を示した。例えば canal water (PSM-45, -46) (AJ565420), および lake water (PSM-57) (AM400231) (図 18) がそれに該当する。また DGGE ゲルでの band 9 に対応する PSM-44 は Flavobacteria に属し、その配列は seawater (AY027803) に由来する微生物の配列と高い相同性を示した。

#### 4. 考察

本研究で実施した液肥化処理過程では  $COD_{Cr}$  の減少に示されるように、豚糞尿の有機成分は効果的に安定化されていた。また臭気成分である VFAs 濃度は、4 日の処理期間で嗅覚的に受容できる濃度  $0.23 \text{ kg/m}^3$ <sup>97)</sup> にまで低下していた。もう一つの臭気物質であるアンモニアは、4 日目までは低下していたが、通気処理を継続することで再上昇することが明らかになった。また糞便汚染の指標微生物である大腸菌は、処理終了時に  $10^3$  CFU/mL 以下まで低減化されていた。この菌数は、40 CFR part 503 regulation<sup>94)</sup> の“Class A”の基準に相当する値である。

連続通気運転にも拘わらず処理の初日から ORP は、 $-350 \text{ mV}$  近くまで急速に低下した。この低い ORP 値は、溶存酸素を消費する好気性菌の旺盛な呼吸によるものと考えられた。実際に PCR-DGGE およびクローンライブラリー解析では、この ORP が低い時期に *Bacillus* に属する細菌の優占が認められた。またこの時期には、有機物の可溶化と無機化が同時に進行しており、特に酢酸濃度は 2 日目に最高値となり 4 日目に消失していた。

*Bacillus* 属の細菌は様々な環境に遍在し、酢酸やプロピオン酸などの低分子の有機酸を含む種々の基質を好氣的に資化できることが知られている<sup>88)</sup>。これまでに中温域の豚糞尿の液肥化処理サンプルからは *B. thuringiensis*<sup>57)</sup> が、高温域のサンプルから *B. licheniformis*<sup>3)</sup>, および *B. thermocloacae*<sup>45)</sup> が単離またはその近縁種のクローンとして得られているが、本実験で得られた OTU PSM-1, -2 の配列との相同性はいずれも 96% 以下であった。Nakamura et al.<sup>66)</sup> は、生ゴミ処理過程で優占となる新規に単離された Bacillaceae に属する株について生理・生化学性状の解析を行い、それらが有機廃棄物の分解を担っている可能性があることを報告している。堆肥化と同様に液状物の通気処理も世界で広く行われている手法であるが、これらのプロセスは未だに有機廃棄物

分解の重要な役割を果たしている未培養の菌種<sup>33)</sup> を多く含んでいる可能性があると考えられる。低 ORP の時期には Bacilli に加え、有機酸産生菌として知られている Clostridia および Bacteroidetes<sup>12, 85)</sup> も検出された。Leung と Topp<sup>57)</sup> は、*Clostridium* sp. が豚糞尿の凝集物中で生存することを報告している。また好気性菌の呼吸によって造りだされた低 ORP 状態は、好気性菌とともに嫌気性菌の増殖をも可能にしたと考えられた。豚糞尿の有機成分の可溶化および無機化は、好気性菌と嫌気性菌が優占種として共存した状態で進行したのと考えられた。

ORP 値は 3 日目から上昇し始め、4 日目には VFAs の消失と  $TOC_s$  分解速度の鈍化が認められた。この ORP の上昇は、基質を酸化するために必要な酸素要求量が減少したことによると考えられた。大部分の分解可能な炭素源が消失した後、Bacilli のバンド強度が低下していく一方で、Bacteroidetes のバンド (band 7, 8, 9 および 11) が認められた。Bacteroidetes に属する菌のいくつかは、下水処理プラントの好気プロセスに常在し、有機物分解を担っている。それらの多くはタンパク質、キチン質、デンプン、またはセルロースなど多様な高分子化合物を分解できることが知られている<sup>78)</sup>。band 10 の DNA 断片は、4.5 日目に一時的に検出されたが、5 日目には認められなかった。この菌種は微生物群集の新しいメンバーとして増殖したが、直ちに死滅したのと考えられた。4 から 6 日目に認められた ORP の変動は、アンモニア濃度の上昇を伴っていることから、新たに生じた微生物群集が死菌を分解する際に要した酸素消費の変化に起因するものと考えられた。

Day 6 のクローンライブラリーにおいては、Proteobacteria が最も優占であり、次いで Bacilli, Flavobacteria の順であった。ライブラリーで優占であった Proteobacteria, および Flavobacteria の配列は、豚糞尿と比較して相対的に汚染度の低い水圏の細菌群の配列との相同性が高かった。それ故、6 日目に認められた微生物群集の明確な変化は、糞尿の有機成分の安定化と大いに関連があるものと考えられた。

窒素成分の変遷に目を向けると、アンモニア濃度は 1 日目で降徐々に低下し、4 日目に最も低い濃度を示した (図 14C)。このアンモニア濃度の低下は、 $NH_4\text{-N}/\text{TN}$  の比率としても 4 日目に最小となり、以後増加していくことから、アンモニアの揮散によるものではなく一時的な有機化によるものと考えられた。

豚糞尿におけるアンモニアの貯蔵形態として、*Bacillus* 株を用いる研究が試みられている<sup>39, 51, 76</sup>。これらの報告のうち、Hoppensack et al.<sup>39)</sup> は液状糞尿の TN のうちの 28% が菌体バイオマスとして、また 0.1% がポ

リグルタミン酸 (PGA) の産生に用いられたことを示している。本研究で検出された *Bacillus* が PGA を産生するかどうかは明らかでないが、炭素源の好氣的な分解と  $\text{NH}_4\text{-N/TN}$  の低下、および炭素源の枯渇と  $\text{NH}_4\text{-N/TN}$

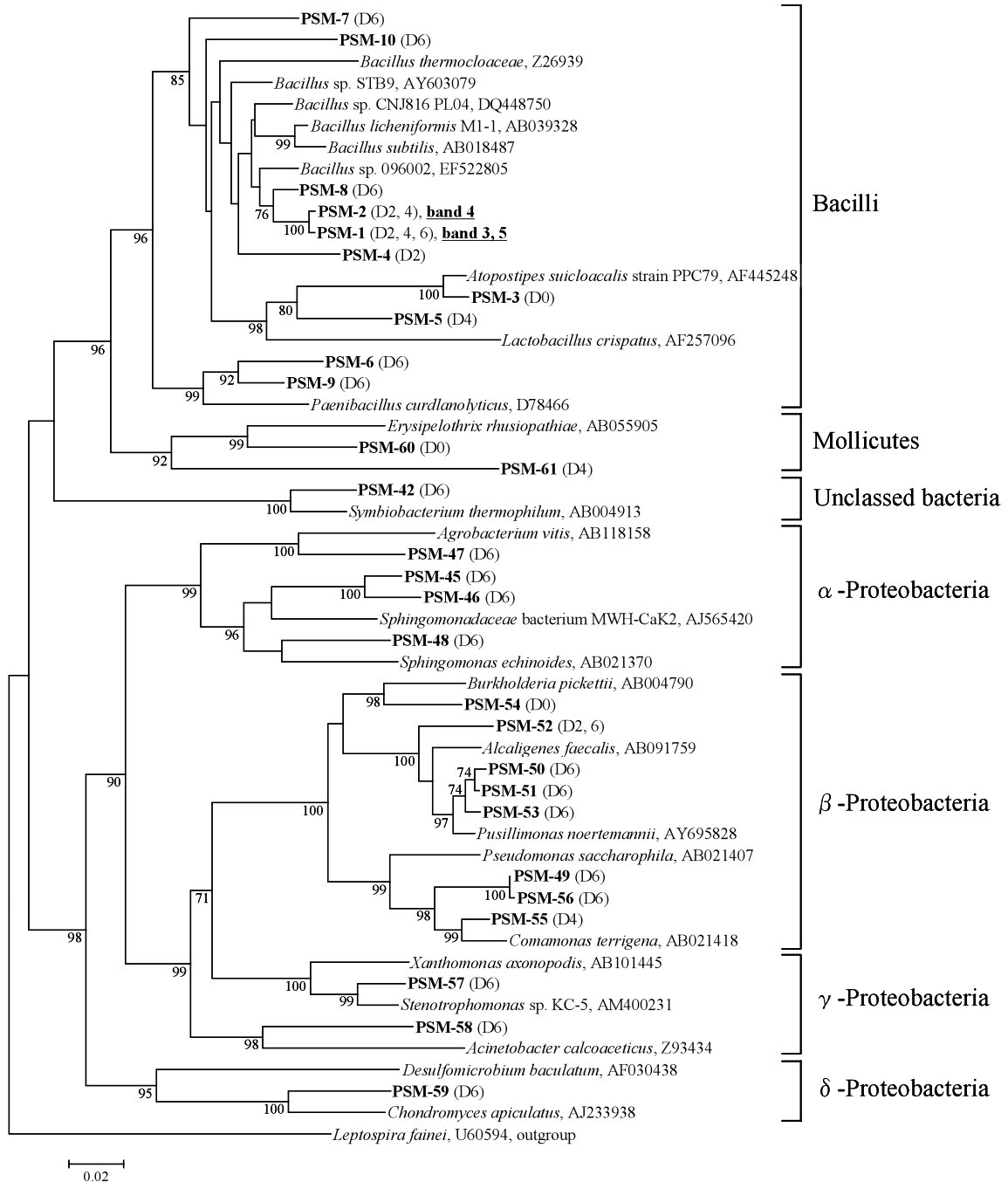


図 18. 0, 2, 4, 6 日目のクローンライブラリーから得られた Bacilli,  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria,  $\gamma$ -proteobacteria,  $\delta$ -proteobacteria, Mollicutes および Unclassed に属するクローンの系統樹

Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method showing the phylogenetic relationships among the clones from the aerated pig slurry samples on day 0, 2, 4 and 6 within the classes Bacilli,  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria,  $\gamma$ -proteobacteria,  $\delta$ -proteobacteria, Mollicutes and Unclassed. Bootstrap values are shown for each node that had >70% support in a bootstrap analysis of 1000 replicates. Sequences obtained in the present study are in boldface, followed by the clone library from which the individual 16S rRNA clone sequences came. *Leptospira fainei* in the *Spirochaetes* served as the outgroup organism. The scale bar represents 2% sequence divergence. DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers of reference sequences are given.

の上昇は、*Bacillus* を優占した群集の推移と関連が深いと推察されることから、この時期の群集が糞尿中の適当な炭素源を用いて、アンモニアをバイオマスに変換していたものと考えられた。VFA の消失と  $\text{TOC}_s$  の分解速度の鈍化の後に、 $\text{NH}_4\text{-N}/\text{TN}$  は有意に増加した (図 14) が、この比率の増加は炭素源の欠乏によって死滅した菌体の分解に起因するアンモニア生成によるものと考えられた。

糞便汚染の衛生的な指標として培養法による大腸菌のモニタリングを行った。大腸菌数は至適生育温度に近く ( $40^\circ\text{C}$ )、低 ORP 値 ( $\sim -350\text{ mV}$ ) 条件であったのにも拘わらず、通気開始後直ちに  $10^3\text{ CFU/mL}$  以下にまで低下した。

Diez-Gonzalez et al.<sup>15)</sup> は、静置した牛糞尿中で認められる大腸菌の死滅は、炭酸塩とアルカリ条件の協同効果による非生物的な要因に起因するものだとしている。本実験では、添加した尿素が 1 日以内に分解されることから、 $\text{CO}_2$  とアンモニアが生成されることで pH および炭酸塩濃度の上昇が起きると考えられた。しかしながら本実験は連続通気を行っており、産生された  $\text{CO}_2$  は随時ストリップングされる状況にあった。また Harris et al.<sup>31)</sup> は、VFAs が豚糞尿中の大腸菌を失活させることを報告しているが、その効果が認められる pH は 4.3 であり、その pH が 6.8 にまで上昇した場合には、低減効果は認められないとしている。本試験では、通気処理の初期に大幅な VFAs 濃度の上昇が認められたものの、期間を通じて pH はアルカリ側で推移していた。

Munch et al.<sup>64)</sup> は、豚糞尿および牛糞尿に対する通気処理は、大腸菌群数を大幅に低減させることを報告している。本研究の微生物群集の推移のデータは、通気処理によりたった 1 日で群集が大きく変化すること、また豚糞尿に由来する消化管微生物が大幅に減少することなどが認められている。共存微生物群による生物学的有害微生物の抑制は、これまでにいくつか報告されており<sup>40, 86)</sup>、通気処理によって優占となった *Bacilli-Clostridia-Bacteroidetes* を主体とする菌叢が、大腸菌を含む消化管由来の微生物群の排除に作用した可能性も考えられる。

本研究では、消化管由来微生物群集が通気処理により急激に *Bacillus* 属優占の群集に変化すると共に、その過程で VFA やアンモニア濃度の減少、および大腸菌数の大幅な低下が起こることが示された。通気条件下における ORP 値は、*Bacillus* をはじめとした好気性菌の呼吸の影響を受けるとともに、アンモニアの同化を伴う易分解性炭素源の分解とも関連が深かった。よって ORP 値

を読み取ることで処理過程の進行をモニタリングすることが可能であり、低級脂肪酸やアンモニアのような臭気物質が低下する時期を検出することで、プロセス管理上、有用な情報を得ることができると考えられた。

本研究で検出された *Bacillus* のうち、PSM-1 および -2 の *Bacillus* 株は、通気処理プロセスにおいて重要な役割を担っている可能性がある。新種の可能性もあるこの 2 つの *Bacillus* 株については、処理過程におけるそれらの代謝活性および他の菌群に対する影響 (大腸菌の抑制に働く作用など) などに注目しつつ、更なる研究が必要である。

## 5. 要約

豚糞尿には低級脂肪酸をはじめとした強烈な臭気物質が含まれており、有機肥料として圃場に散布する際には、通気処理により臭気を大幅に低減させるとともに有機成分を安定化させることが奨励されている。この液肥化プロセスは、通気処理によって新たに生じた微生物群の活性によって進行すると考えられる。そこで本研究では環境負荷物質として重要な臭気物質、および糞便汚染指標微生物である大腸菌の消長を測定するとともに、処理過程における微生物群集の変遷を非培養的手法により解析した。豚糞尿の ORP は連続通気であるのにも拘わらず 1 日目に  $-350\text{ mV}$  近くまで低下したことから、好気性菌群による活発な溶存酸素の消費が起こっていたと考えられた。この ORP が低い環境では *Bacilli*, *Clostridia*, および *Bacteroidetes* が優占となっており、特に *Bacillus* は 2 日目のクローンライブラリーで全クローンの 65% を占めていた。この ORP が低く、*Bacillus* が優占していた環境下では、臭気物質である低級脂肪酸およびアンモニア濃度が低下するとともに、大腸菌数が大幅に低下していた。低級脂肪酸が消失し、糞尿中の可溶性炭素成分の分解が鈍化した 4 日目前後を境に、ORP 値は上昇し、 $-250$  から  $-50\text{ mV}$  の値を上下しつつ 6 日目に  $-7\text{ mV}$  まで上昇した。この ORP 値の変動は可溶性炭素成分の消失に伴う好氣的代謝活性の減退と、飢餓により生じた死菌を新たに基質として分解する際に要した酸素消費によるものと考えられた。糞尿中の有機成分の安定化と ORP 値の上昇に伴い、微生物群集は *Bacillus* から *Proteobacteria* を優占とする菌叢へと遷移した。通気処理によって生じた 2 つの未培養の菌種を含む *Bacillus* が優占する過程で、豚糞尿の主要な臭気成分である低級脂肪酸の分解とアンモニアの有機化が進行するとともに、大腸菌数も大幅に低下し、豚糞尿の有機



成分も安定化していった。

## 第6章 総括

本研究において、堆肥化および液肥化処理過程における糞便汚染の衛生的指標である大腸菌数の消長、および死滅を促進する諸条件に関する様々な知見が得られた。

第2章においては、水分調整材の不足に起因する不適切な堆肥化処理と、それに付随した大腸菌の残存に対し、食品廃棄物等の各種有機廃棄物の混合による処理プロセスの改善を試みた。実際の有機廃棄物の利用に先立ち、培地成分として用いられるポリペプトンを水分の異なる堆肥原料に添加して、その温度上昇効果を検討した。通常、適正な堆肥化のためには70%以下の水分が推奨されている<sup>9)</sup>が、本試験ではこの適正水分よりも高い水分で堆肥化を実施した。その結果、原料水分が高ければ高いほど堆肥の温度上昇は抑制され、最も水分が多い78%の堆肥化条件では、最高温度は53.5℃までにしか達せず、更に大腸菌数もほとんど低下しないことを明らかにした。一方でポリペプトンを添加した堆肥は、いずれの水分においても無添加の堆肥よりも高い温度で推移し、78%の水分において最高温度は62.7℃に達し、大腸菌数も大幅に低下することが明らかとなった。適正水分の上限近い71%の水分条件では、ポリペプトンの添加の有無に関わらず最高温度や大腸菌の低減効果もほぼ同程度であったことから、添加効果は特に高水分原料に対して有効であることが示された。この結果を受け、単独では温度上昇が期待できない高水分(78%)の牛糞-細断稲ワラ混合物を対照として、各種有機廃棄物との混合堆肥化試験を行った。その結果、ポリペプトン添加試験同様に、無添加では大腸菌数を低下させる程の温度上昇は認められなかったが、食品副産物や食品残渣である豆腐粕、米ぬか、油かす、および生ゴミとの混合により堆肥温度は上昇し、大腸菌数も大幅に低下することが明らかとなった。堆肥化過程における温度上昇は酸素消費量と相関が認められることから<sup>18,21)</sup>、有機廃棄物の混合に伴う微生物活性の増大が温度上昇に寄与していると考えられた。有機廃棄物の混合により、微生物群が利用可能な基質量が増加したと考えられたため、それぞれの混合物の生物化学的酸素要求量(BOD)と、堆肥の最高温度との相関を検討した。その結果、両者の間には正の相関が認められ、BOD値が166.2 O<sub>2</sub> mg/g-dry matter以上の時に、大幅な温度上昇と顕著な大腸菌数の低下が認められることが明らかとなった。

それでは本実験よりも更に高い水分の原料においても、BOD値を高めること(基質量を増やすこと)で、高温堆肥化が実現できるのであろうか。有機廃棄物の好氣的分解では、微生物群に対する酸素供給が不可欠である。本試験では細断ワラという堆積物中に空隙を維持するのに適した水分調整材を利用したため、比較的酸素(空気)の浸透は確保されていたと考えられる。しかし今回の試験よりも更に材料の水分が高い状態では、材料の泥濘化を招き、好氣的な分解が阻害される恐れがある。更に嫌気部分で生成する有機酸等によるpHの低下は、堆肥化過程の遅延を起こすことが知られている<sup>21)</sup>。また本試験における米ぬかと油かすの混合堆肥化試験の比較においても、BOD値の比較では、油かすよりも米ぬかの値の方が高い一方で、温度上昇効果は米ぬかの方が低いという結果が得られている。この差異は、顆粒状の油かすと泥濘化を起こしやすい米ぬかの物理性の違いが影響していたものと考えられた。よって高水分材料に対する有機廃棄物の混合は、温度上昇およびそれに付随した大腸菌の低減化に効果的に働くが、堆積物中の通気性の確保も重要な条件であると考えられた。

小型堆肥化リアクターを用いた第2章での結果から、堆肥化処理における有機廃棄物の混合効果が明らかとなった。しかし有機廃棄物の混合は、堆肥化過程で分解されるべき有機物負荷量を高めることであり、成分の安定化、すなわち堆肥の腐熟に要する時間が延長される可能性があった。また最も現場で一般的な堆肥化手法である堆積型堆肥化処理を考えた場合には、強制通気でないことによる通気性の悪化、自重による堆積物底部の圧密化、堆積物の各部位の温度差等が生じる可能性があったため、小型堆肥化リアクターで得られた結果がそのまま反映されるか否かは明らかでなかった。そこで第3章では第2章の試験で混合効果が認められた豆腐粕について、小型堆肥化リアクターを用いて豆腐粕混合堆肥の分解特性を測定するとともに、パイロット・スケールでの堆積型堆肥化処理を実施し、堆積物の各部位の温度上昇効果について検討した。

豆腐粕の混合割合を変えた堆肥化試験において、混合割合の増加は最高温度に対してではなく、高温(>55℃)持続時間の延長に効果的に働くことが明らかとなった。またこの際、堆肥有機成分の安定化の指標であるBOD値は、豆腐粕の混合により著しく増加するものの、12日間の堆肥化で無添加と同程度まで低下していた。パイロット・スケールでの静置堆積型堆肥化では、混合の有無に関わらずいずれの堆積物においても中心部と周辺

部では温度推移は異なり、周辺部の方が低い傾向にあった。また両者の最高温度を比較すると、すべての部位において添加区の方が高い傾向にあった。堆肥化過程での大腸菌群の死滅を徹底する為に定められた USEPA の“A process to further reduce pathogens (PFRP)”の基準によれば、55℃以上の堆肥温度を少なくとも3日以上継続させるとある。この基準を満たす部位は、無添加で9つの温度測定部位のうち4箇所ではなかったが、豆腐粕添加においては7箇所であった。このように豆腐粕添加は最高温度を上昇させるだけでなく、大腸菌の死滅に必要な高温持続時間を堆積物中の広範囲な部位で実現することが明らかとなった。今回は静置状態での堆積堆肥化を行ったが、適度な切り返し(攪拌)を行うことで、より多くの部分が高温に曝露され、徹底した大腸菌の死滅が期待できると考えられる。

堆肥化過程での有害微生物の低減以外にも、完成した堆肥中での有害微生物の再増殖が近年問題となっている。処理プロセスの厳密な管理が難しい堆肥化処理では、有害微生物を完全に排除することは難しい。有害微生物が残存する堆肥に、または外的要因で堆肥が汚染された時に、適当な温度と水分条件が与えられることで大幅に有害微生物が増殖することが報告されており<sup>27,40,80,100)</sup>、Soares et al.<sup>89)</sup>は堆肥中の未分解の物質が大腸菌群の再増殖に影響を与えると推察している。一方で、Sidhu et al.<sup>86)</sup>は、堆肥化過程で出現する微生物群集が有害微生物の増殖を抑制することを報告している。一般に堆肥化の進行に伴い、有機物の減少、物理性の変化、温度の変化が起こり、それに従って微生物群集も遷移していく。これら物理的、化学的および生物学的な変化は複雑に絡み合い、有害微生物の再増殖に影響を及ぼしているものと考えられた。

近年、牛舎の床に散布するオガクズ等の敷料は不足する傾向にあり、その代替物として乾燥した堆肥を用いる事例が見受けられる。有機肥料として施用した堆肥中での有害微生物の増殖は勿論のこと、敷料として利用した牛床での有害微生物の再増殖も乳牛の疾病防止の観点から好ましいものではない。有機廃棄物の添加によって増加した易分解性有機物は、堆肥中での有害微生物の増殖を促進する可能性がある。そこで第3章で作成した堆積型堆肥の様々な堆肥化ステージにおいて採取した堆肥サンプルを用い、人為的に接種した大腸菌の増減を測定することで、堆肥における増殖リスクの評価を行った。その結果、ほとんどの堆肥で大腸菌は増殖し、無添加および豆腐粕添加ともに堆肥温度が高温期にあった堆肥にお

いて最も増殖割合が高いことが明らかとなった。当初は易分解性有機物量が多く残存している0日目の堆肥が、最も増殖割合が高いと予想していたが、有機物の低分子化が進行した高温期(7日目)の堆肥の方が、大腸菌にとって利用しやすい形態の基質を豊富に含んでいたものと考えられた。堆肥化開始後13日を経過した堆肥では、190日以上堆肥化を行った堆肥の増殖割合と有意差は認められなかった。また無添加および豆腐粕添加の0日目の堆肥サンプル間の比較からも分かるように、豆腐粕を添加した堆肥では、大腸菌の増殖は有意に高かった。これは豆腐粕に含まれる基質により、大腸菌の増殖が促進されたものと考えられた。しかしながら日数を経る毎にその増殖割合も低下することから、分解が十分に進んだ豆腐粕混合堆肥の再増殖リスクは、190日以上堆肥化を行った堆肥と同程度になると考えられる。以上から有機廃棄物を混合した堆肥、または高温期にある堆肥は、大腸菌の増殖ポテンシャルを有するが、処理期間に十分な攪拌と有機物の分解を進行させることで、再増殖リスクの少ない堆肥を生産することが可能となると考えられた。

第2章から4章までは堆肥化処理を対象とし、2,3章の結果から、堆肥化過程の大腸菌の死滅は堆肥温度に依存していること、その境界温度は55℃前後であること、有機廃棄物の混合によってもたらされる易分解性有機物の増加は、微生物群を活性化し、温度上昇を促進することが明らかとなった。この温度上昇効果は水分が高い時に特に顕著であり、高水分原料の温度上昇を補完する有機廃棄物の混合処理は、衛生的な面からも、また有機資源循環の視点からも有効な処理と考えられた。また第4章では堆肥中での有害微生物の再増殖リスクの評価を行い、増殖リスクが高い堆肥化ステージの特定と、十分な堆肥化期間を確保し有機物の分解を徹底することで、増殖リスクを低減させることが可能であることを数値的に示すことができた。有機質堆肥の腐熟の観点から、十分な堆肥化期間の確保の必要性はこれまでも言われていたが、有害微生物の増殖リスクについても同様のことが確認されたことは、堆肥の製造管理上意義がある。

家畜糞尿の液状物に対して通気を行う液肥化処理は、一般的に堆肥化過程ほどの温度上昇が期待できない。というのも液状糞尿は、糞と比較して単位体積当たりの有機物量(基質量)が少ない一方で、比熱の高い水分を多く含んでいるからである。一部、通気装置や循環装置からの機械廃熱の伝導により、55℃以上の温度を実現する

装置の報告も見受けられるが<sup>44,75)</sup>、大部分の通気処理過程は中温域で推移する<sup>7)</sup>。よって高温処理が可能な堆肥化処理と比較して、液肥化処理における大腸菌の低減は困難であると予想された。しかし中温域の液肥化過程における有害微生物<sup>34)</sup>、または大腸菌群<sup>64)</sup>の低減は以前から報告されており、その低減化機構についても非生物学的な<sup>15,31,74)</sup>、または生物学的な要因<sup>40,86)</sup>の諸説が混在している。そこで本研究では、通気処理過程における大腸菌の消長とともに、その生存に影響を与えると予想された物理化学的パラメータ、有機物量（基質量）そして生物学的な要因として微生物群集の測定を行った。通気処理過程では、未培養の微生物を含む群集が急激に遷移していくことが予想されたため、微生物群集の解析は、細菌の16S rRNA 遺伝子を標的とした非培養的手法によって行った。

豚糞尿への通気処理は、物理化学的パラメータおよび微生物群集の構成に大きな変化をもたらしていた。通気処理開始前には、消化管に由来すると考えられる微生物群が大部分を占めたが、2日目には *Bacilli-Clostridia-Bacteroidetes* が優占となり、特に *Bacillus* は2日目のクローンライブラリーにおいて全クローンの65%を占める程の優占状態であった。またORP値は1日目には-350 mV 近くまで低下し、連続通気条件にも拘わらず液中が還元的状態になっていることを示していた。このORPの低下は、*Bacillus* をはじめとする好気性菌が、急激に酸素を消費していることに起因するものと考えられた。この *Bacillus* の優占は、有機物分解の進行、悪臭であるVFAおよびアンモニアの低下、そして大腸菌数の顕著な低下等と同時期に起こっていた。通気条件下において *Bacillus* を含む好気性菌群は、VFAを含めた有機物を基質として利用する際に酸素を消費し、同時にアンモニアを同化したものと考えられた。またこの急激な物理的、化学的な性状の変化、および微生物群集の変遷の中で、大腸菌数は初発の $10^7$  CFU/mL から1日後には $10^2$  CFU/mL まで減少し、処理最終日の6日目まで $10^3$  CFU/mL 以下の低い菌数で推移した。この大腸菌数は、水質汚濁防止法の河川への放流基準値である3,000個/cm<sup>3</sup>を下回る値であった。これまでに大腸菌数の死滅機構については、大きく分けて非生物学的、および生物学的要因の2つの説が報告されている。Diez-Gonzalez et al.<sup>15)</sup> は、静置牛糞尿中の大腸菌の死滅は、尿中の尿素の分解によって生成したアンモニアによるアルカリ(pH: 8.5)と、CO<sub>2</sub>の生成による炭酸塩の蓄積(100 mM)の協同効果によって起こると報告している。本研究

においても大腸菌数が大幅に低減する1日目には、アンモニア濃度の上昇、およびpHの上昇(～8.3)が認められた。本研究では液中の炭酸塩濃度は測定していないが、Diez-Gonzalez et al.の実験条件と異なり我々の実験では連続通気と攪拌を行っているため、CO<sub>2</sub>のストリッピングが生じやすい状況にあった。また液肥化後期にpHは約8.6程度まで上昇したが、逆に大腸菌数は微増傾向にあり、高pHと大腸菌低減効果との相関は明確ではなかった。生物学的な要因としては、Sidhu et al.<sup>86)</sup>が滅菌、および非滅菌堆肥に接種したサルモネラ菌の消長の比較から、堆肥中の土着の微生物群によるサルモネラ菌の拮抗作用の存在を報告している。Millner et al.<sup>63)</sup>は、堆肥中の大腸菌群、または代謝活性がある微生物群や放線菌が、サルモネラの死滅を促進したと報告している。この現象については第4章の堆肥への大腸菌接種試験において、有意差は認められないものの、大腸菌群数が最も多い堆肥においてのみ(図12: C22-compost) 接種大腸菌の減少が認められたという結果が得られている。クローンライブラリー解析では、0日目と2日目のライブラリーに同一のクローンが認められなかったことから、通気処理により0日目の消化管由来の微生物群集が積極的に排除されたと考えられた。

活性汚泥処理を行っている汚水中での原虫による細菌の捕食は一般的な事象であるが、検鏡観察では原生動物の存在は認められなかった。本実験は6日間のバッチ式処理であり、大腸菌の減少に影響を与えるほどの原生動物の増殖は起こらなかったものと思われた。

液肥化過程の初期には、通気条件下ながら旺盛な酸素消費が起こることで還元的な状態になり、嫌気性菌と考えられる *Clostridia* や *Bacteroidetes* と *Bacillus* の共存が認められた。しかし有機物の分解が進行するとORPは上昇し、微生物群集も *Bacillus* の優占の群集から *Proteobacteria* を中心とした、比較的有機物負荷が少なく、溶存酸素の高い環境に適した水圏微生物群と高い相同性がある群集へと遷移していった。このように通気処理過程にある微生物群集は、基質の減少やそれに伴うORPの変化などの液中環境の変化と相互に作用を及ぼしつつ遷移していったものと考えられ、微生物生態学的にも非常に興味深い現象であると思われた。またORPの推移をモニタリングすることで、VFAおよびアンモニアなどの悪臭物質の減少、および易分解性有機物の量を検知できる可能性が示され、技術的にも応用可能な現象を明らかにしたことは非常に意義がある。

本研究では大腸菌死滅機構の解明までは至らなかった

が、物理化学的パラメータ、および微生物群集の同時測定を実施したことで、大腸菌低減に影響を及ぼす可能性のある各種パラメータの変動を把握するとともに、通気処理で優占となる主として2種類の未培養の *Bacillus* 属の細菌の存在を明らかにすることができた。これら細菌は、処理プロセスの優占菌というだけでなく、大腸菌を含む有害微生物の低減等にも作用している可能性もあり、これらの機能解析や通気処理過程での役割を解明することで、より安全で効率的なプロセスの構築に資する技術が開発される可能性がある。

本研究では、堆肥化および液肥化処理過程において、糞便汚染の衛生的指標である大腸菌の消長、および死滅を促進する諸条件について検討を行った。本来、大腸菌は糞便汚染の指標微生物の位置付けだが、近年では O157, O111, O26 をはじめとした病原性株による疾病も発生していることから、処理過程での低減化の重要性は増してきている。また病原性微生物とは別に、近年、家畜に投与した抗生物質や合成抗菌剤に耐性を持つ薬剤耐性菌の存在が問題となっている。牛群における多剤耐性大腸菌の存在も報告されており<sup>46-48)</sup>、耐性遺伝子をもった菌が排泄物等を介して土壌や河川などの環境中に放出された場合、それら耐性遺伝子が他の菌に伝達されることが指摘されている<sup>8, 62, 70)</sup>。これら耐性菌の存在は人間や家畜の投薬治療に対する脅威となるため、排泄物処理過程における腸内細菌群の低減は、これまで以上に重要性を増すと考えられる。

畜体に由来する大腸菌以外の有害微生物では、同じ腸内細菌科に属し、温血動物の消化管内で増殖するサルモネラ菌の環境中での動態が注目されている<sup>98)</sup>。環境中での大腸菌とサルモネラ菌の動態の比較から、大腸菌数の測定はサルモネラ菌のリスクを評価する上での指標になりうるという報告<sup>55, 68, 73)</sup>がある一方で、10℃以下の河口水中<sup>79)</sup>、または塩分の高い水中(brackish water)<sup>60)</sup>では、サルモネラ菌の生存性の方が高いことが報告されている。またサルモネラ菌はハエの体内で4週間程度生存することが知られており<sup>61)</sup>、鳥やハエはサルモネラ菌が環境中に拡散する際にベクターとして機能すると考えられている<sup>14)</sup>。生体外に糞とともに排出された大腸菌は、温度や豊富な栄養分等の条件が揃いやすい熱帯地域を除き、環境中では一時的な再増殖はあるものの最終的には減少の一途をたどる一方で、サルモネラ菌は環境中に放出された後も少ない菌数ながらも生存を続け、ホストとなる動物体内で再び増殖すると考えられている<sup>98)</sup>。しかし、堆肥化過程における高温曝露のように物理的に菌を

死滅させるプロセスは、菌種に関わらず画一的に作用すると考えられる。表3に示したように大腸菌とサルモネラ菌の死滅温度は、55～60℃とほぼ同程度であることから、堆肥化過程の大腸菌数の減少は、サルモネラ菌の動態をも含めた指標になると考えられる。また USEPA の調査において、365 サンプルの堆肥中のサルモネラ菌を測定した結果、165 サンプルが汚染されていたが、サルモネラ菌が検出されなかった86 サンプルは、すべて大腸菌群数が1,000 MPN/g 以下であったことが報告されている<sup>99)</sup>。これは大腸菌群数が1,000 MPN/g 以下に低下した堆肥では、サルモネラ菌が検出される確率が極めて低いことを示している。一方で液肥中のサルモネラ菌の残存については、液中環境において大腸菌より高い生存性のデータが示されていることから<sup>60, 79)</sup>、更なる検証が必要であると考えられる。

堆肥化過程における有害微生物の制御については、堆肥全体の高温曝露を基本とし、堆肥原料単体での温度上昇が期待できない場合には、本研究で効果の認められた易分解性有機物を豊富に含む有機廃棄物の添加や、通気性を改善する副資材の添加により温度上昇を促進することが現実的であると考えられる。また堆肥中での有害微生物の再増殖については、本研究で明らかとなった基質の残存がその一因と考えられる。現在の堆肥の評価方法は、コマツナ種子の発芽試験による植物への生育障害に対する評価が一般的であるが、今後は有害微生物の再増殖リスクの評価についても、堆肥の品質の新たな評価軸として開発する必要があると考えられる。

糞尿液状物の液肥化過程では、通気開始から1日の処理で4オーダー程度の大腸菌の減少が認められた。この大腸菌数の減少は、通気による急速な有機物分解の進行とそれを担う微生物群集の増殖時期と時を同じくすることから、共存微生物群による拮抗作用がその一因と考えられた。そこで基質の競合による影響を明らかにするため、同一の処理条件にある2つの液状糞尿のうち1つにグルコースを添加したところ、大腸菌は $10^{10}$  CFU/mL 程度まで増加することを確認した(データ未掲載)。次に通気処理過程で優占となる *Bacillus* の増殖を抑制するため、グラム陽性菌に抗菌スペクトルをもつバンコマイシンを添加したところ、大腸菌は $10^8$  CFU/mL 近くまで増加するとともに通気処理期間中も $10^4$  CFU/mL を超える菌数で推移した。この時、DGGE プロファイルには *Bacillus* (OTU PSM-1 および -2) に由来するバンドは確認されず、優占種である *Bacillus* を含むグラム陽性菌を抑制することで、大腸菌の生存性が高まることが示さ

れた（データ未掲載）。大腸菌数は基質の添加により、また共存するグラム陽性菌を抑制することにより増加することから、基質の競合を介した共存微生物群との競合が大腸菌の消長に影響を及ぼしている可能性も考えられた。いずれにせよ1日で大腸菌数を4オーダー低減化させる現象は、有用な有害微生物の制御法になりうると考えられた。微生物間の拮抗作用を利用した有害微生物の制御は、薬剤の使用と異なり、環境に優しく、コストの安い手法であると考えられる。この機構解明によって得られる低減効果の増強、または既報の生物的・非生物的な低減効果との組合せ等により、これまで以上に有効な有害微生物の制御手法の確立が期待される。

本研究では有機肥料の循環利用の障壁となりうる有害微生物の低減について、他産業に由来する有機廃棄物の統合処理を行うことでその達成を試みた。有機廃棄物との混合処理の主眼は有害微生物の低減化にあったが、温度上昇が見込める有機廃棄物を無差別に利用すればいいというものでもない。堆肥利用に関する問題点として「堆肥成分の不安定」が挙げられており、堆肥の温度上昇を期待して様々な有機廃棄物を無秩序に混合した場合、大腸菌数の低減は達成できても肥料成分の変動が起きることにより、耕種農家での利用性が低下することが危惧される。せっかく作られた有機質肥料も利用されなければリサイクルの意味を持たない。有機廃棄物のリサイクルが浸透するためには、安定した量と質で供給される有機廃棄物同士の適切な組合せと、安定した品質を産出できる堆肥化システムが必要となる。処理のための処理ではなく、確固としたリサイクルのシナリオに立った視点が必要である。そのためには処理の連携、肥料の運搬、利用先の確保など循環型社会を構築する上で必要な社会的なインフラの整備も必要と考えられる。こと環境問題に関しては、テクノロジーと社会システムが両輪となって取り組むべき事柄であると考えられる。

## 謝 辞

本論文は、著者が農林水産省畜産試験場（現独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所）に赴任後、行った研究の成果を学位論文として取り纏めたものである。本研究を遂行するにあたり、多くの方々からの御指導、御助言、御支援、激励のお言葉を頂き、ここにその感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、東京大学の五十嵐泰夫教授には本論文の取り纏めの機会と適切な指導を賜りまし

た。研究のみならず農業、食品産業そしてエネルギー問題までを大局的に見据えるその視点は大いに勉強になりました。石井正治准教授には、微生物学の面からの数々のご助言を、そして情熱的な激励を頂きました。石井正治准教授との交流の中で、教科書には載っていない大切な事柄を勉強させて頂きました。春田 伸助教（現首都大学東京准教授）には、微生物群集の解析の詳細なご指導、ご教示を賜るとともに、長時間におよぶディスカッションにもお付き合い頂きました。

畜産草地研究所の羽賀清典研究管理監には、研究全般にわたり物心両面のご指導と便宜を賜りました。このような形で研究を継続し取り纏めることが出来たのは、羽賀清典研究管理監の日々のご理解とご鞭撻がなければ到底なし得なかったものであります。黒田和孝主任研究員には、研究室の同僚として数多くの示唆に富んだご助言を頂きました。

元東京農工大学の野附 巖教授、東京農工大学の鎌田寿彦教授には著者が畜産環境問題に関わるきっかけと親身なご指導を賜りました。

動物衛生研究所の中澤宗生疫学研究チーム長には、菌株を譲渡して頂くとともに病原性微生物についてのご教示を賜りました。林 孝室長（現中央農業研究センター 上席研究員）には統計学についてご指導を頂きました。桃木徳博室長（現台湾国食糧肥料技術センター 副所長）には研究が育つのをあたたかく見守って頂きました。三上栄一博士には環境微生物について示唆に富んだご意見を頂きました。

畜産草地研究所の代永道裕上席研究員、田中康男チーム長、鈴木一好上席研究員、長田 隆上席研究員、和木美代子主任研究員、福本泰之主任研究員、荻野暁史研究員、横山 浩研究員、安田知子研究員には日常の研究活動において多くの協力と便宜を図って頂きました。

東京大学応用微生物学研究室では新井博之助教、青島美穂博士の研究に真摯に取り組む姿勢に刺激を受けました。応用微生物学研究室における複雑微生物群グループゼミで席を同じくした中村浩平氏、加藤創一郎氏、佐々木建吾氏、堀知行氏には、数々の批判とご助言を頂きました。

ここに記して深く感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Avery, L. M., Killham, K. and Jones, D. L. (2005). Survival of *E. coli* O157 : H7 in organic wastes

- destined for land application, J. Appl. Microbiol., 98, 814-822.
- 2) Bach, S. J., Stanford, K. and McAllister, T. A. (2005). Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 in feces from corn- and barley-fed steers, FEMS Microbiol. Lett., 252, 25-33.
  - 3) Beaudet, R., Gagnon, C., Bisailon, J. G. and Ishaque, M. (1990). Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste, Appl. Environ. Microbiol., 56, 971-976.
  - 4) Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. In : Methods of Soil Analysis, 1149-1178. American Society Agron. Inc.
  - 5) Burge, W. D., Enkiri, N. K. and Hussong, D. (1987). *Salmonella* regrowth in compost as influenced by substrate (*Salmonella* regrowth in compost). Microbial Ecology, 14, 243-253.
  - 6) Burton, C. H. and Sneath, R. W. (1995). Continuous Farm Scale Aeration Plant for Reducing Offensive Odors from Piggery Slurry - Control and Optimization of the Process, Journal of Agricultural Engineering Research, 60, 271-279.
  - 7) Burton, C. H. and Turner, C. (2003). Manure management treatment strategies for sustainable agriculture. Editions Quae.
  - 8) Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R. I. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities, Appl. Environ. Microbiol., 67, 1494-1502.
  - 9) Chikh, G., Pourquie, J., Kaiser, P. and Davila, A. M. (1997). Characterization of the bacterial flora isolated from a pilot-scale lagoon processing swine manure. Can. J. Microbiol., 43, 1079-1083.
  - 10) 畜産企画課畜産環境・経営安定対策室 農林水産省生産局畜産部 (2007). 畜産環境をめぐる情勢, 2007年8月.
  - 11) Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M. and Tiedje, J. M. (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II) : sequences and tools for high-throughput rRNA analysis, Nucleic Acids Res., 33, D294-296.
  - 12) Cotta, M. A., Whitehead, T. R. and Zeltwanger, R. L. (2003). Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits, Environmental Microbiology, 5, 737-745.
  - 13) Cremonesi, L., Firpo, S., Ferrari, M., Righetti, P. G. and Gelfi, C. (1997). Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations, Biotechniques, 22, 326-330.
  - 14) Davies, R. H. and Wray, C. (1995). Observations on disinfection regimens used on *Salmonella enteritidis* infected poultry units, Poult Sci., 74, 638-647.
  - 15) Diez-Gonzalez, F., Jarvis, G. N., Adamovich, D. A. and Russell, J. B. (2000). Use of carbonate and alkali to eliminate *Escherichia coli* from dairy cattle manure, Environmental Science & Technology, 34, 1275-1279.
  - 16) Duffy, G. (2003). Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries, J. Appl. Microbiol., 94, Supplement 1, 94-103.
  - 17) Eichner, C. A., Erb, R. W., Timmis, K. N. and Wagner-Dobler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community, Appl. Environ. Microbiol., 65, 102-109.
  - 18) Epstein, E. (1997). The Science of Composting, CRC Press.
  - 19) Evans, M. R., Deans, E. A., Hissett, R., Smith, M. P. W., Svoboda, I. F. and Thacker, F. E. (1983). The Effect of Temperature and Residence Time on Aerobic Treatment of Piggery Slurry - Degradation of Carbonaceous Compounds, Agricultural Wastes, 5, 25-36.
  - 20) Fernandes, F., Viel, M., Sayag, D. and Andre, L. (1988). Microbial breakdown of fats through in-vessel co-composting of agricultural and urban wastes, Biological Wastes, 26, 33-48.
  - 21) 藤田賢二 (1993). コンポスト化技術, 技報堂出版, 東京.
  - 22) Golueke, C. G. (1977). Biological reclamation of solid wastes.
  - 23) Golueke, C. G. (1983). Epidemiological aspects of sludge handling and management, BioCycle, 24, 50-58.
  - 24) Guan, T. Y. and Holley, R. A. (2003). Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness—a review, J. Environ. Qual., 32,

- 383-392.
- 25) Haga, K. (1998). Animal waste problems and their solution from the technological point of view in Japan, *JARQ*, 32, 203-210.
- 26) Hanajima, D., Kuroda, K., Fukumoto, Y. and Haga, K. (2006). Effect of addition of organic waste on reduction of *Escherichia coli* during cattle feces composting under high-moisture condition, *Bioresource Technology*, 97, 1626-1630.
- 27) Hanajima, D., Kuroda, K., Fukumoto, Y. and Haga, K. (2004). Growth of seeded *Escherichia coli* in rewetted cattle waste compost of different stages, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17, 278-282.
- 28) Hanajima, D., Kuroda, Y. Fukumoto, T. Yasuda, K. Suzuki, and Haga, K. (2007). Effect of aeration on phytotoxicity reduction in anaerobic digestion liquor of swine manure. *Animal Science Journal*, 78, 433-439.
- 29) Hanajima, D., Kuroda, K. and Haga, K. (2001). Enhancement of the thermophilic stage in cattle waste composting by addition of tofu residue, *Bioresource Technology*, 78, 213-216.
- 30) Hancock, D. D., Besser, T. E., Kinsel, M. L., Tarr, P. I., Rice, D. H. and Paros, M. G. (1994). The prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy and beef cattle in Washington State, *Epidemiol. Infect.*, 113, 199-207.
- 31) Harris, I., Henry, D. P. and Frost, A. (2001). The effect of volatile fatty acids in acidified fermented piggery effluent on shiga-toxigenic and non-toxic resident strains of *Escherichia coli*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 415-419.
- 32) Haruta, S., Kondo, M., Nakamura, K., Aiba, H., Ueno, S., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2002). Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 224-231.
- 33) Haruta, S., Nakayama, T., Nakamura, K., Hemmi, H., Ishii, M., Igarashi, Y. and Nishino, T. (2005). Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes of garbage, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 1-11.
- 34) Heinonen-Tanski, H., Niskanen, E. M., Salmela, P. and Lanki, E. (1998). *Salmonella* in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperatures, *J. Appl. Microbiol.*, 85, 277-281.
- 35) Hengstmann, U., Chin, K. J., Janssen, P. H. and Liesack, W. (1999). Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5050-5058.
- 36) Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. and Cliver, D. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry, *FEMS Microbiol. Lett.*, 178, 251-257.
- 37) Hissett, R., Deans, E. A. and Evans, M. R. (1982). Oxygen consumption during batch aeration of piggery slurry at temperatures between 5 and 50 deg C, *Agricultural Wastes*, 4, 477-487.
- 38) Hogan, J. S., Smith, K. L., Hoblet, K. H., Schoenberger, P. S., Todhunter, D. A., Hueston, W. D., Pritchard, D. E., Bowman, G. L., Heider, L. E., Brockett, B. L. and et al. (1989). Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds, *J. Dairy Sci.*, 72, 1547-1556.
- 39) Hoppensack, A., Oppermann-Sanio, F. B. and Steinbuchel, A. (2003). Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*, *FEMS Microbiology Letters*, 218, 39-45.
- 40) Hussong, D., Burge, W. D. and Enkiri, N. K. (1985). Occurrence, Growth, and Suppression of *Salmonellae* in Composted Sewage-Sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 887-893.
- 41) Iannotti, E. L., Fischer, J. R. and Sievers, D. M. (1982). Characterization of Bacteria from a Swine Manure Digester, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 136-143.
- 42) Imbeah, M. (1998). Composting piggery waste : a review, *Bioresource Technology*, 63, 197-203.
- 43) Japan Livestock Industry Association (JLIA). (1989). Facility of liquid composting, Report of animal waste treatment technology (In Japanese).
- 44) Juteau, P., Tremblay, D., Ould-Moulaye, C. B., Bisailon, J. G. and Beaudet, R. (2004). Swine waste treatment by self-heating aerobic thermophilic bioreactors, *Water*

- Research, 38, 539-546.
- 45) Juteau, P., Tremblay, D., Villemur, R., Bisaillon, J. G. and Beaudet, R. (2004). Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 115-122.
- 46) Khachatryan, A. R., Besser, T. E., Hancock, D. D. and Call, D. R. (2006). Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycin-sulfa-tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm, *Appl. Environ Microbiol.*, 72, 4583-4588.
- 47) Khachatryan, A. R., Hancock, D. D., Besser, T. E. and Call, D. R. (2006). Antimicrobial drug resistance genes do not convey a secondary fitness advantage to calf-adapted *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 443-448.
- 48) Khachatryan, A. R., Hancock, D. D., Besser, T. E. and Call, D. R. (2004). Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 752-757.
- 49) Kudva, I. T., Blanch, K. and Hovde, C. J. (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157 : H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3166-3174.
- 50) Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004). MEGA3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Brief Bioinform.*, 5, 150-63.
- 51) Kuroda, K., Hanajima, D., Fukumoto, Y., Suzuki, K., Kawamoto, S., Shima, J. and Haga, K. (2004). Isolation of thermophilic ammonium-tolerant bacterium and its application to reduce ammonia emission during composting of animal wastes, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68, 286-292.
- 52) Kuroda, K., Osada, T., Yonaga, M., Kanematu, A., Nitta, T., Mouri, S. and Kojima, T. (1996). Emissions of malodorous compounds and greenhouse gases from composting swine feces, *Bioresource Technology*, 56, 265-271.
- 53) 京都市清掃局 (1996). 家庭ごみ細組成調査報告書, 1996年8月.
- 54) Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, In : *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115-175. Chichester.
- 55) Lau, M. M. and Ingham, S. C. (2001). Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil, *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 131-136.
- 56) Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M. and Moller, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria : the pig gastrointestinal tract microbiota revisited, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 673-690.
- 57) Leung, K. and Topp, E. (2001). Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage : molecular analysis using DGGE/PCR of 16 S rDNA, *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 169-177.
- 58) Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. and Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis, *Electrophoresis*, 19, 554-568.
- 59) Mathur, S. P., Dinell, H., Owen, G., Schnitzer, M. and Dugan, J. (1993). Determination of compost biomaturity. II. Optical density of water extracts of composts as a reflection of their maturity, *Biological Agriculture and Horticulture*, 10, 87-108.
- 60) Mezrioui, N., Baleux, B. and Troussellier, M. (1995). A Microcosm Study of the Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* in Brackish-Water, *Water Research*, 29, 459-465.
- 61) Mian, L. S., Maag, H. and Tacal, J. V. (2002). Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California, *J. Vector. Ecol.*, 27, 82-85.
- 62) Miller, R. V. (1998). Bacterial gene swapping in nature, *Sci. American magazine*, 278, 66-71.
- 63) Millner, P. D., Powers, K. E., Enkiri, N. K. and Burge, W. D. (1987). Microbially mediated growth suppression and death of *Salmonella* in composted sewage sludge, *Microbial Ecology*, 14, 255-265.
- 64) Munch, B., Larsen, H. E. and Aalbaek, B. (1987). Experimental Studies on the Survival of Pathogenic and Indicator Bacteria in Aerated and Non-Aerated Cattle and Pig Slurry, *Biological Wastes*, 22, 49-65.
- 65) Muyzer, G., Dewaal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis



- of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal RNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- 66) Nakamura, K., Haruta, S., Nguyen, H. L., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2004). Enzyme production-based approach for determining the functions of microorganisms within a community, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3329-3337.
- 67) Nakasaki, K., Watanabe, A., Kitano, M. and Kobuta, H. (1992). Effect of seeding on thermophilic composting of tofu refuse, *Journal of Environmental Quality*, 21, 715-719.
- 68) Natvig, E. E., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Cooperband, L. R. and Roper, T. R. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2737-2744.
- 69) Ndegwa, P. M., Zhu, J. and Luo, A. (2003). Effects of bioreactor temperature and time on odor-related parameters in aerated swine manure slurries, *Environmental Technology*, 24, 1007-1016.
- 70) Nikolich, M. P., Hong, G., Shoemaker, N. B. and Salyers, A. A. (1994). Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3255-3260.
- 71) 農林水産技術会議事務局編 (1995) . 日本標準飼料成分表, 74-90.
- 72) 農林水産省 (2007) . 食料・農業・農村白書, 平成18年度版 .
- 73) Ogden, L. D., Fenlon, D. R., Vinten, A. J. A. and Lewis, D. (2001). The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water, *Int J. Food Microbiol.*, 66, 111-117.
- 74) Park, G. W. and Diez-Gonzalez, F. (2003). Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella Typhimurium* DT104 from cattle manure, *J. Appl. Microbiol.*, 94, 675-685.
- 75) Park, K. J., Zhu, J. and Zhang, Z. (2005). Influence of aeration rate and liquid temperature on ammonia emission rate and manure degradation in batch aerobic treatment, *Transactions of the ASAE*, 48, 321-330.
- 76) Potter, M., Oppermann-Sanio, F. B. and Steinbuchel, A. (2001). Cultivation of bacteria producing polyamino acids with liquid manure as carbon and nitrogen source, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 617-622.
- 77) Pryde, S. E., Richardson, A. J., Stewart, C. S. and Flint, H. J. (1999). Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 5372-5377.
- 78) Reichenbach, H. (1981). *The Order Cytophagales*, Springer, Berlin.
- 79) Rhodes, M. W. and Kator, H. (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2902-2907.
- 80) Russ, C. F. and Yanko, W. A. (1981). Factors affecting *Salmonellae* repopulation in composted sludges, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 597-602.
- 81) Russell, S., and Best, L. (Jun 2006). *Setting The Standards For Compost*, BioCycle, 47, 4 pgs.
- 82) SAS Institute Inc. (1988). *SAS/STAT User's Guides Release 6.03 Edition*, Cary, NC.
- 83) Schukken, Y. H., Grommers, F. J., Van de Geer, D., Erb, H. N. and Brand, A. (1990). Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. 1. Data and risk factors for all cases, *J. Dairy. Sci.*, 73, 3463-3471.
- 84) Semenov, A. V., van Bruggen, A. H., van Overbeek, L., Termorshuizen, A. J. and M. Semenov, A. M. (2007). Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60, 419-28.
- 85) Shah, H. N. (1992). *The Genus Bacteroides and Related Taxa*, Springer, Berlin.
- 86) Sidhu, J., Gibbs, R. A., Ho, G. E. and Unkovich, I. (2001). The role of indigenous microorganisms in suppression of *Salmonella* regrowth in composted biosolids, *Water Research*, 35, 913-920.
- 87) Smith, K. L., Todhunter, D. A. and Schoenberger, P. S. (1985). Environmental mastitis : cause, prevalence, prevention, *J. Dairy. Sci.*, 68, 1531-53.
- 88) Sneath, P. H. A. (1986). *Endospore-forming Gram-*

- positive rods and cocci. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1104-1139, Williams & Wilkins.
- 89) Soares, H., Cárdenas, B., Weir, D. and Switzenbaun, M. (1995). Evaluating pathogen regrowth in biosolids compost, *BioCycle*, 36, 70-72.
- 90) Suzuki, K., Tanaka, Y., Osada, T. and Waki, M. (2002). Removal of phosphate, magnesium and calcium from swine wastewater through crystallization enhanced by aeration, *Water Res.*, 36, 2991-2998.
- 91) Taiganides, E. P. (1977). *Animal waste*, Applied Science Publishers, London.
- 92) Tanaka, Y. (1998). Possibility of Passive Aeration Composting Using Soil Draining Material, *Anim. Sci. Technol.*, 69, 1106-1110.
- 93) Taylor, J. M., Epstein, E., Burge, W. D., Chaney, R. L., Menzies, J. D. and Sikora, L. J. (1978). Chemical and biological phenomena observed with sewage sludges in simulated soil trenches, *Journal of Environmental Quality*, 7, 477-482.
- 94) USEPA. (1994). A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule, EPA/832/R-93/003. Washington, DC.
- 95) van Rensburg, P., Musvoto, E. V., Wentzel, M. C. and Ekama, G. A. (2003). Modelling multiple mineral precipitation in anaerobic digester liquor, *Water Res.*, 37, 3087-3097.
- 96) Wang, G., Zhao, T. and Doyle, M. P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in bovine feces, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2567-2570.
- 97) Williams, A. G., Shaw, M., Selviah, C. M. and Cumby, R. J. (1989). The Oxygen Requirements for Deodorizing and Stabilizing Pig Slurry by Aerobic Treatment, *Journal of Agricultural Engineering Research*, 43, 291-311.
- 98) Winfield, M. D. and Groisman, E. A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3687-3694.
- 99) Yanko, W. A. (1988). Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. Prepared for U. S. Environmental Protection Agency Health Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, by Los Angeles County Sanitation Districts, San Jose Creek Water Quality Laboratory, Whittier, CA. Rept. No. EPA/600/1-87/014. (NTIS PB88-154273/AS).
- 100) Zaleski, K. J., Josephson, K. L., Gerba, C. P. and Pepper, I. L. (2005). Potential regrowth and recolonization of Salmonellae and indicators in biosolids and biosolid-amended soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3701-3708.
- 101) Zhang, Z. J. and Zhu, J. (2006). Characteristics of solids, BOD<sub>5</sub> and VFAs in liquid swine manure treated by short-term low-intensity aeration for long-term storage, *Bioresource Technology*, 97, 140-149.
- 102) Zhu, H., Qu, F. and Zhu, L. H. (1993). Isolation of Genomic DNAs from Plants, Fungi and Bacteria Using Benzyl-Chloride, *Nucleic Acids Research*, 21, 5279-5280.
- 103) Zhu, J. (2000). A review of microbiology in swine manure odor control, *Agriculture Ecosystems & Environment*, 78, 93-106.

## Studies on the control of the *Escherichia coli* population during animal waste treatment

Dai Hanajima

<sup>1)</sup> National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

### Summary

Animal waste is utilized as an organic fertilizer after it is subjected to composting or the liquid composting process. Food security and safety are a great concern for consumers; therefore, effective treatments are required to ensure organic fertilizer hygiene. It is well known that proper composting effectively destroys pathogens in animal waste through the high temperature achieved by the process. In Japan, sawdust or rice straw is normally used as a bulking agent for moisture adjustment, though a constant supply of these bulking agents cannot be expected. In case of a shortage of bulking agents, composting with high moisture content materials such as cattle feces is inevitably carried out under inappropriate conditions. In this study, to ensure pathogen reduction during composting of cattle feces, I investigated co-composting with a variety of organic wastes. In addition, recently, the regrowth of pathogens in finished compost when appropriate temperature and moisture conditions are provided is becoming an issue, even though the pathogen population decreases to a low level during the composting process. Since the use of such compost which allows the pathogen regrowth is unfavorable, I evaluated the *E. coli* regrowth potential in various types of compost. There are few reports on the dynamics of pathogens and the mechanisms of their reduction during the liquid composting of animal waste. In this study, the relationship between the dynamics of the *E. coli* population and the biological and physicochemical factors that may affect *E. coli* survival was investigated.

The results showed that the addition of organic wastes to high moisture content cattle feces significantly increased heat generation compared to the treatment wherein organic wastes were not added, and the maximum temperatures of more than 55°C remarkably reduced the *E. coli* population. This temperature increase depends on the amount of easily digestible organic carbon present in organic wastes, and we observed a positive correlation between the maximum temperatures and the values of biochemical oxygen demand (BOD), an indicator of easily digestible organic carbon. Significant *E. coli* regrowth was observed in the compost samples collected during or immediately after the thermophilic phase. Therefore, the risk of regrowth is considered to be the highest in immature compost. During the liquid composting process, the *E. coli* population significantly decreased during the initial phase of the process. However, the *E. coli* reduction was not due to high temperatures; therefore, the mechanism for *E. coli* reduction is different between the solid and liquid composting processes. It is speculated that the reduction of the *E. coli* population may be due to the competition with *Bacillus*, which was found to be predominant during the *E. coli* decreasing phase, and/or the changes in physicochemical factors induced by the degradation of organic substances and the production of metabolites during the process. These results indicate that thermophilic and curing stages are important for *E. coli* elimination during solid composting. Further investigation is required for the elucidation of the mechanism for *E. coli* reduction during liquid composting process.

Key words: Compost, *E. coli*, Regrowth, Liquid compost



編集委員会事務局  
企画管理部情報広報課  
早川忠志  
岡田明子  
那須企画管理室連絡調整チーム  
折原孝志

本研究報告から転載、複製を行う場合は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の許可を得て下さい。

平成21年3月 印刷  
平成21年3月 発行

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

## 畜産草地研究所

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2  
TEL 029-838-8600(代)  
FAX 029-838-8606

印刷所 株コームラ

別紙様式

## 著作物利用許諾書

平成 年 月 日

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構  
理事長 殿

著作者氏名

印

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構刊行物著作権取扱規程第3条の規定に基づき、畜産草地研究所研究報告第9号の私が有する著作権については、研究機構に対して下記の利用許諾を行うこととします。

### 記

- 1 刊行すること
- 2 翻訳すること
- 3 CDを作成し、及び配布すること
- 4 インターネットで公開すること
- 5 その他著作権法上認められる一切の著作物としての利用
- 6 第三者に対してこれら一切の利用の許諾を行うこと

# 畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料投稿規定

13畜草B第43号  
平成13年4月1日

(目的)

第1条 畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料への投稿については、この規定の定めるところによる。

(投稿者の資格)

第2条 投稿者は原則として、畜産草地研究所職員（以下、「職員」という。）及び流動研究員、依頼研究員、日本学術振興会特別研究員、日本学術振興会外国人特別研究員等（以下、「他の職員」という。）とする。

- 1 職員が投稿する内容は、主として畜産草地研究所で行った研究とする。
- 2 他の職員が投稿する内容は、畜産草地研究所で行った研究とする。

(投稿原稿の内容)

第3条 投稿原稿の内容は次のとおりとする。

- 1 畜産草地研究所研究報告（Bulletin of National Institute of Livestock and Grassland Science/  
略誌名：Bull. Natl. Inst. Livest. Grassl. Sci.）
  - (1) 原著論文：畜産草地研究所（以下、「当研究所」という。）において行った試験研究及び当研究所以外の者に委託して行った試験研究の成果に関わる論文とする。
  - (2) 短 報：(1) 以外の研究の予報、速報などの短報とする。
  - (3) 技術論文：新しい技術や技術の組立、実証などを主体とする報告。
  - (4) 総 説：畜産草地研究に関わるものとする。総説は投稿のほか、編集委員会が依頼したものを含む。
  - (5) 学位取得論文：当研究所において主として行った試験研究による学位取得論文とする。
- 2 畜産草地研究所研究資料（Memoirs of National Institute of Livestock and Grassland Science/  
略誌名：Mem. Natl. Inst. Livest. Grassl. Sci.）
  - (1) 調査資料・技術資料・研究資料：当研究所において行った試験研究及び当研究所が当研究所以外のものに委託して行った試験研究のうち、学術的・産業的に有用な未発表の資料とする。

(著作権の帰属及び利用の許諾の取扱い)

第4条 掲載された論文の著作権は、著述した者に帰属し、別紙様式により独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構に対して無償にて利用の許諾が行われるものとする。

(原稿の執筆)

第5条 原稿の執筆にあたっては、別に定める畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料執筆要領に基づくものとする。使用する言語は日本語または英語とする。

(原稿の提出)

第6条 次の手続きにより原稿及び原稿提出票を事務局に提出する。

- 1 職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究チーム長及び担当する研究管理監等の校閲を受ける。
- 2 他の職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究チーム長及び研究チームを担当する研究管理監等の校閲を受ける。

(受付)

第7条 原稿及び原稿提出票を事務局が受け取った日を受付日とする。

受理日は編集委員会の審査の結果、掲載が妥当と認められた日とする。

(審査)

第8条 編集委員会は次の手続きにより論文を審査する。

ただし、学位取得論文については審査を省略することができる。

- 1 編集委員会は論文の内容により審査員正副をそれぞれ1名決定し、論文審査を依頼する。審査員は所内及び所外の研究者等とし、その氏名は公表しない。
- 2 審査員は論文審査票により審査を行う。また必要に応じて指摘事項を書き出し提出する。
- 3 事務局は審査員と著者の間のやり取りの対応にあたる。
- 4 編集委員会は審査員の審査結果を参考にして掲載の可否を判断する。審査の内容によっては著者に原稿の訂正を求めることができる。
- 5 著者は審査結果を受領後、編集委員会が指定する期日までに修正原稿を事務局に提出する。

(校正)

第9条 著者による校正は原則として初校のみとする。

校正は誤植の訂正程度にとどめる。やむを得ず大きな変更等を行う場合には編集委員会の承認を得なければならない。

(別刷り)

第10条 別刷りは次のとおりとする。

- 1 100部とし、筆頭著者が代表で受け取る。
- 2 別刷りの追加を希望する場合は研究チーム負担で印刷する。

附 則

この規定は、平成14年4月1日から施行する。

附 則

この規定は、平成15年10月1日から施行する。

附 則

この規定は、平成18年4月1日から施行する。

