

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏名	HUDAGULA
学位の種類	博士（食品栄養科学）
学位授与の条件	酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当
学位論文の題目	ヴィンヤード野生酵母の抗灰色カビ作用とマクロファージ免疫制御作用
審査委員	主査 教授 山口 昭弘（食品微生物管理学） 副査 教授 船津 保浩（食品加工特性学） 副査 教授 大谷 克城（健康栄養学）

## 学位論文要旨

### 【目的】

ブドウ灰色カビ病は *Botrytis cinerea* の感染により花穂と成熟期の果実に発生し、収穫量の損失をもたらす。対策として抗菌剤が用いられるものの効率の低さや薬剤耐性株の出現に加え、近年、有機栽培への関心が高まっている状況からも、新たな防除方法が求められている。自然発酵ワインの醸造においてブドウ果実に着生する野生酵母が重要な役割を担うが、酵母の中には抗カビ作用を示す種株が存在することも知られている。一方、最近の研究では酵母も、乳酸菌などと同様にプロバイオティクスとして、腸内環境を良好な状態に保つ上で重要な役割を果たしていることがわかってきた。本研究では、寒天培地を用いた *in vitro* 試験で *B. cinerea* に対する抗カビ作用を認めたブドウなどから分離した野生酵母について、ブドウ果粒 (*ex vivo*) およびフィールド (*in vivo*) における試験により微生物農薬としての有効性を検証した。さらに、これら野生酵母のマウスマクロファージ様細胞 RAW264 に対する免疫制御作用を評価し、機能性食材としての可能性についても調査した。

### 【方法】

本学キャンパス（江別市）のブドウ果実および KONDO ヴィンヤード（岩見沢市）の自然発酵ワイン沈殿物から分離した野生酵母ライブラリーの中から、*in vitro* 試験で *B. cinerea* に対する抗カビ作用を示した酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 6 株) を用いた。野生酵母保存株 (-80 °C 冷凍保存) を室温に戻した後、YPD 液体培地 30 mL に植菌し 25 °C で 3~7 日間培養した。これらの酵母培養液について、ブドウ果粒 (*ex vivo*) およびヴィンヤードフィールド (*in vivo*) 試験におけるブドウ灰色カビ病 (*B. cinerea*) に対する抗菌作用を評価した。

ブドウ果粒における *ex vivo* 試験では、 $1 \times 10^8$  cells/mL の酵母懸濁液を用いた。*B. cinerea* (NBRC5964 株)  $1 \times 10^6$  cells/mL の孢子懸濁液を調製し、4 °C で保存した。北海道産の市販ブドウ（ナイヤガラ）果粒を水道水で 6 回洗った後、70 %エタノールに 1 分間浸漬殺菌し、安全キャビネット内で送風乾燥した。殺菌したブドウ果粒 (n=3) を 12 ウェルプレートに入れ、表面の一部に注射針で傷を付けた後、野生酵母懸濁液 10  $\mu$ L を滴下し 2 時間乾燥させた。次いで *B. cinerea* 孢子懸濁液または滅菌生理食塩水各 10  $\mu$ L を滴下し、25°C で培養した。抗カビ作用の判定基準は、3 週間後にブドウ果粒における *B. cinerea* の増殖を、3 粒すべてに認めない(+++), 1 粒に認める(++), 2 粒に認める(+) および 3 粒すべてに認める(-) とした。

実際のヴィンヤードフィールドにおける *in vivo* 試験では、KONDO ヴィンヤードのピノ・ノワール果房に対して、酵母培養懸濁液を試験区#16 の 10 苗に手押し噴霧器を用いて噴霧 (5 mL/房) した。対照区#15 には隣接する未処理列の 10 苗を用いた。噴霧作業は、2020 年 9 月 9 日から 23 日の期間 1 週間毎に 3 回行った。最後の噴霧から 20 日後の 10 月 13 日に果房を収穫し、灰色カビ病に罹患した果粒を摘果し重量を測定した。試験区および対照区ともに灰色カビ病に罹患していない果実を原料とした自然発酵ワインの一部を分取し、微生物の分離培養同定 (MALDI-TOF/MS, DNA 塩基配列解析) および自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) による微生物叢解析により、噴霧した酵母の着生を確認した。

酵母のマクロファージ細胞に対する免疫制御作用は、酵母菌体の前処理が異なる 3 条件の試料液について評価した。酵母菌体 (100mg/mL) の PBS 懸濁液をオートクレーブで 100°C、10 分間加熱し、遠心分離 (9200g, 10 min, 20 °C) した後の上清を [ボイル抽出液] とした。酵母菌体懸濁液をガラスビーズ破砕後、沸とう水で 100°C、10 分間加熱した後、上記と同様に処理し [粉砕ボイル

抽出液]とした。また酵母菌体に細胞培養用培地を加えたものを[生菌懸濁液]とした。NO産生抑制(抗炎症)作用の評価は、RAW264細胞がリポ多糖体(LPS)により活性化し産生されるNOを試料液が抑制する作用として、24時間培養後の上清中の濃度をジアゾカップリング反応により比色定量した。NO産生抑制効果はコントロールに対して70%未満で弱い抗炎症作用、30%未満で強い抗炎症作用ありとした。抗炎症作用測定系からLPSを除いた条件下でNO産生を誘導する能力として免疫賦活作用を評価した。

#### 【結果】

ブドウ果粒(*ex vivo*)における灰色カビ病に対する増殖抑制作用は、酵母 *S. cerevisiae* 6株のうち、3株(Kondo170908, Kondo180305 および Kondo180304)が強い抑制作用(+++), 1株(Kondo180303)がやや強い抑制作用(++)を示し、2株(Kondo180306, Pasteur Blanc)は抑制作用(-)を認めなかった(Fig. 1)。

フィールド(*in vivo*)試験では、*in vitro*試験およびブドウ果粒における *ex vivo*試験において強い抗カビ作用が認められた酵母株 *S. cerevisiae* (Kondo170908)を用いた。その結果、試験区の灰色カビ病罹患率は、対照区に比べやや低値を示したが統計的な有意差は認められなかった(Fig. 2)。収穫したピノ・ノワール果実を用いた自然発酵ワインは、試験区#16のタンクが発酵仕込み3日後に先に発酵を始め、その2日遅れて対照区#15の発酵が始まった。仕込み8日後においても、試験区#16の方は、発泡がより多く認められている現象を確認できた(Fig. 3)。このことから、噴霧した酵母が果実に着生しアルコール発酵を促進したと考えられる。

発酵7日後のワインについて培養およびDNAには微生物叢解析を行った。培養では、最終的に試験区#16が *S. cerevisiae* 5株に対して対照区#15は *S. cerevisiae* 3株、青カビの *Penicillium gerundense* 4株が分離同定された(Table 1)。この結果から試験区の酵母密度が高まりアルコール発酵を促進したことで、生成した高濃度のアルコールによってカビの増殖が抑制されたと考えられる。

ARISA解析において、ITS領域のプライマーHEX-Fun-1では、試験区#16と対照区#15で酵母フラグメントに差を認めなかったが、他のITS領域プライマーHEX-Fun-2では、試験区#16のフラグメントパターンは、対照区#15に比べ、噴霧した酵母由来フラグメント(962 bp)の存在量が8倍多いことが確認できた(Fig. 4)。

免疫制御作用を酵母6種26株について測定したところ、[ボイル抽出液]で *S. cerevisiae* 2株、*Torulasporea delbrueckii* および *C. krusei* 1株、[粉碎ボイル抽出液]では *S. cerevisiae* 1株、*Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *T. delbrueckii*, および *Hanseniaspora uvarum* に抗炎症作用を認めた(Fig. 5)。一方、[生菌懸濁液]の場合 *S. cerevisiae* 14株、*T. delbrueckii* および *C. krusei* 3株に強い抗炎症作用を認めた。この場合では、生菌が直接マクロファージ細胞を刺激した可能性が考えられる。また、免疫賦活作用はボイル抽出液を用いて評価したが、すべての酵母において認められなかった。

以上の結果より、ヴィンヤードから分離した野生酵母をブドウ灰色カビ病に対して微生物農薬として使用する試みは、ブドウ果粒(*ex vivo*)試験結果から効果が確認できたものの、今回のフィールド(*in vivo*)試験においては有効性を検証できなかった。今後は、酵母の噴霧時期や噴霧頻度などについて検討を加える予定である。一方、着生した酵母が自然発酵ワインにおけるアルコール発酵能を高め、カビの増殖を抑制する作用が確認されたことは、実用面での有用性を示唆する。また、酵母生菌懸濁液のマクロファージ細胞に対する抗炎症作用は、酵母のプロバイオティクスとしての新たな健康増進作用の可能性を示したものである。

## 論文審査の要旨および結果

### 1. 論文評価点数

評価項目	主査（山口教授）	副査（舩津教授）	副査（大谷教授）
テーマのたて方	5	5	5
研究の背景	5	3	5
研究の方法	3	3	3
研究の結果	5	3	5
考察と結論	3	3	5
参考論文	5	5	5
合計	26	22	28

・各評価項目を5点、3点、1点で評価

・全ての審査委員が20点以上（30点満点）をつけたことをもって、本審査終了

### 2. 論文審査の要旨および結果

近年、北海道におけるワイン用ブドウ栽培が世界的にも注目される中、2018年からはワインとしては山梨に次いで全国2番目となる「GI(地理的表示)北海道制度」が運用されている。また、岩見沢をはじめ空知地域には、スターター酵母を用いないブドウ果実に着生する野生酵母を活かした自然発酵ワインの醸造を手掛けるワイナリーが集約している。これらのワイナリーのヴィンヤード(ブドウ畑)の多くは有機栽培を目指しているが、ブドウ果実の品質と収穫量に大きく影響する灰色カビの発生が毎年の大きな脅威となっている。

一方、トクホに加え2015年に始まった機能性表示食品制度の一定の拡がりもあり、食品が持つ健康の維持増進作用への注目が高まっている。古くから乳酸菌や納豆菌がプロバイオティクスとして整腸作用など様々な機能性を持つことが知られていたが、最近では酵母や糸状菌についても、腸内微生物叢の健全化や免疫機能の強化などの効果が報告されてきている。

本論文は、*in vitro* 試験で灰色カビの増殖を抑制することを見出したヴィンヤード野生酵母がブドウ顆粒および実際のブドウ畑において灰色カビ病の発生を防ぐ微生物農薬として利用できるか(第I章)、また、マクロファージ細胞に対する免疫制御作用を示す新たな機能性食材に成り得るか(第II章)についての研究成果をまとめたものである。

**I. 灰色カビ病に対する微生物農薬**としての可能性については、野生酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Kondo170908株)が、ブドウ顆粒に対する抗カビ試験で明らかに灰色カビ(*Botrytis cinerea*)増殖を抑制したが、果房への酵母噴霧を行ったヴィンヤード試験(KONDO ヴィンヤード: 試験区, 対照区の各10苗)における果実罹患率は試験区 9.46%に対して対照区 9.66%と低下傾向を示したものの統計的な有意差は得られなかった。これまで顆粒試験の報告はあるが、実際のヴィンヤードにおける酵母の抗灰色カビ検証試験は本研究が初めての試みである。現在、酵母噴霧時期を登熟期に開花期も加えたフィールド試験を実施中である。

**II. ヴィンヤード酵母の新規機能性食材**としての可能性については、マウスマクロファージ細胞RAW264におけるNO産生を指標として評価したところ、特定の酵母株(*S. cerevisiae* Kondo180301)

が生菌状態で細胞毒性を示さず強い抗炎症作用を持つことをはじめて明らかとした。このことは非熱処理自然発酵ワインが免疫機能を高める可能性があることを示唆するものである。

### 発表会質疑応答

Q1. フィールド試験で抗カビ作用が確認できなかった原因の1つとして酵母量はどう考えるか？

→ $10^7$ レベルの酵母液を噴霧したがさらに増やして $10^{8-9}$ レベルでの試験の可能性を検討する。

Q2. フィールド試験で噴霧した翌日にまとまった降雨があり酵母が流れ落ちているのでは？

→ヴィンヤードの繁忙時期と重なり酵母噴霧のタイミングを緻密にコントロールできていないため、確かに噴霧した酵母密度が降雨で低下した可能性はある。

Q3. フィールド試験の対照区でもブドウに着生する野生酵母の抗菌作用が効いていないのか？

→元々ブドウに着生する野生酵母の量は極めてわずかであり、抗カビ作用への影響はほとんどないと想定している。

Q4. 噴霧した酵母はブドウ顆粒上にどのような状態で存在するのか？また灰色カビの発生状況が試験区と対照区で差はないのか？

→*ex vivo* 試験でも顆粒の表面が濡れた状態であり酵母液に浸漬しているわけではない。灰色カビ罹患顆粒の発生状況は果房表面から奥深くまで実に多様であり、罹患顆粒を摘果する作業に追われていたこともあって発生状況を観察できていない。

Q5. 試験区のエタノール産生量が高い状況は、後のワイン醸造に悪影響を及ぼすことはないのか？

→スターター酵母を加えない自然発酵ワインの場合、アルコール産生が緩やかに進むため、他の汚染微生物の影響を受け易いことから、酵母密度上昇によるアルコール産生速度の亢進は安全醸造の上でも重要であり、最終的なワイン品質をむしろ高めるものと期待される。

上記の発表に関して、野生酵母の分離同定から様々な抗カビ作用の評価試験に加え、繊細な培養細胞系の評価試験まで、膨大な実験データの集積と、その取りまとめを確実に実施しており、質疑に対して、いずれも誠実かつ的確に応答できていたことから、博士の学位を授与するに十分であると審査委員一同が判断した。

### 3. 最終試験の結果

審査委員3名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2021年9月6日

審査員

主査 教授 山口 昭弘

副査 教授 船津 保浩

副査 教授 大谷 克城