

2021 年度

博士論文

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

Antimicrobial Activity of Vineyard-Habitat Wild Yeast for Grape
Gray Mold and Its Immunoregulatory Effects on Macrophage

21834102 HUDAGULA

指導教員 食品微生物管理学 教授 山口 昭弘

酪農学園大学大学院酪農学研究科

目次

緒論	1
第I章 ヴィンヤード野生酵母のブドウ灰色カビ病発生抑制試験	
緒言(I)	3
材料と方法(I)	4
1. 野生酵母株	4
2. <i>Botrytis cinerea</i> 胞子懸濁液	4
3. ブドウ果粒(<i>ex vivo</i>)における抗カビ試験	6
(1) ブドウ果粒の前処理	
(2) 野生酵母滴下試験	
(3) 野生酵母スプレイ試験	
(4) 判定基準	
4. ヴィンヤードフィールド(<i>in vivo</i>)における抗カビ試験	7
(1) 野生酵母の噴霧	
(2) ブドウ果房の収穫	
(3) 噴霧タンク内酵母の生存確認	
(4) 真菌分離	
(5) MALDI-TOF/MS による菌種同定	
(6) DNA 塩基配列解析による菌種同定	
(7) ARISA による微生物固有フラグメント解析	
結果(I)	14
1. ブドウ果粒(<i>ex vivo</i>)における抗カビ試験	14
(1) 野生酵母滴下試験	
(2) 野生酵母スプレイ試験	
2. ヴィンヤードフィールド(<i>in vivo</i>)における抗カビ試験	14
(1) 灰色カビ病罹患率	
(2) 噴霧タンク内酵母の生存確認	
(3) 自然発酵ワインの発酵経過	
(4) 自然発酵ワインの真菌分離培養	
(5) 自然発酵ワインの真菌叢 DNA 解析	

考察(I)	20
第II章 野生酵母のマクロファージに対する免疫制御作用	
緒言(II)	22
材料と方法(II)	25
1. 試料	25
2. 酵母試料液の調製	25
(1) ボイル抽出液	
(2) 粉碎ボイル抽出液	
(3) 生菌懸濁液	
3. マクロファージに対する免疫制御作用の評価	27
(1) 細胞継代培養	
(2) 試液調製	
(3) NO 産生抑制(抗炎症)作用の測定	
(4) NO 産生促進(免疫賦活)作用の測定	
(5) 細胞生存率の測定	
(6) 統計解析	
結果(II)	29
1. NO 産生抑制(抗炎症)作用	29
2. NO 産生促進(免疫賦活)作用	36
考察(II)	39
総括	40
要約	41
Summary	42
謝辞	44
引用文献	45

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

緒論

野生酵母は、土壌、空気や水中など自然界に幅広く分布し、樹木、葉、枝、樹液、花、花の蜜腺や果実などの植物体表面に普遍的に存在する¹⁾²⁾。酵母は、人類史上古くから利用されてきた微生物であり、日本の伝統食品である清酒をはじめ、パンやビール、ワイン、味噌、醤油など多くの発酵食品に、また現在では酵母エキスとして呈味を付加する目的で、あるいは燃料用バイオエタノールの生産などにも利用されている。その生息環境に順応して、芳香性や資化性などをもつ地域に特徴的な野生酵母が存在することも報告されている²⁾³⁾。また様々な未知の機能を有する新たな酵母も多数存在すると考えられることから、これらの有効利用に関する研究は無限の拡がりを含んでいる。近年、このように多様性を秘めた野生酵母を利用する発酵食品の開発が注目されており、地域特性を有する植物などから新規の有用な酵母を探索する試みが盛んに行われている⁴⁾。

世界の農業において、果樹や野菜を侵す灰色カビ病 (Gray mold disease) は、農作物の収量や商品価値を著しく低下させるため、重要な防除対象の一つとされている。灰色カビ病の原因は、植物に感染する糸状菌 *Botrytis cinerea* によるものである⁵⁾。その病徴は、茎、葉、花が褐色に腐敗したのち、灰色のカビに覆われるもので、発生適温は 25℃前後、湿度が高い場合に多く発生する。ブドウの場合、花穂と成熟期の果実に頻発するが若葉や幼房、未熟な果実に発生することもある。花穂では、はじめ穂軸や果梗の一部が淡褐色に腐敗し、次第に黒褐色に軟化していく。熟果が発病すると褐色に軟化して果皮のところどころに灰色のカビが密生する。一果粒が腐り始めると、どんどん侵され、果実の全面にカビが繁殖する⁶⁾。近年、農作物のリスク軽減を目指して、環境汚染や環境負荷を低減し、化学農薬の使用回数を減らす病原菌・害虫防除への取り組みがなされている。その中でも、自然界に存在する微生物を利用した防除、すなわち化学農薬に属さない微生物農薬が安全・安心な農業生産を行うための一手段として注目されてきている⁷⁾。現在、灰色カビ病の防除対策として *Bacillus* 属の細菌⁸⁾⁻¹⁰⁾やワイン酵母¹¹⁾⁻¹³⁾などを利用した微生物農薬が開発されている。微生物農薬が病原菌の生育を阻害する機序としては、競争（場所や栄養分の奪い合い）、拮抗作用、寄生、溶菌や抵抗性誘導などが明らかにされている¹⁴⁾¹⁵⁾。

本研究の第 I 章においては、これまでに実施したヴィンヤード野生酵母の寒天プレートを用いたブドウ灰色カビ病に対する *in vitro* 抗カビ試験において有効性が示されたことを受け¹⁶⁾、ブドウ果粒(*ex vivo*)および実際のヴィンヤードフィールド(*in vivo*)における抗カビ試験を実施し、野生酵母の灰色カビ病に対する微生物農薬としての実効性を検証することを目的した。

一方、微生物とヒトの健康との関わりについては古くから乳酸菌やビフィズス菌などを中心としたプロバイオティクス (probiotics) 研究が盛んである¹⁷⁾。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最近の研究で示されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。プロバイオティクスは、宿主に有用な効果を与える生きた微生物を指し、代表的なものとして発酵乳に含まれる前述の乳酸菌やビフィズス菌などの微生物が知られる¹⁷⁾。プロバイオティクスは主に宿主の常在菌叢のバランス改善を介して有益な作用をもたらすものとして、その健康効果が期待される発酵食品等に利用されてきた。近年では酵母の機能性成分であるβ-グルカン（パン酵母²¹⁾、黒酵母²²⁾）に関して、整腸作用だけではなく、免疫調整機能などの新たな機能が報じられている²³⁾。日常的な機能性多糖類の経口摂取あるいは腸内微生物の細胞壁成分などが全身性の細胞性免疫を増強し、感染症、炎症やがんの予防に寄与することが期待されている²⁴⁾。プロバイオティクスの機能性や効果の程度は菌種はもとより菌株によっても異なることから、その評価は菌株レベルで実施する必要がある。

本研究の第II章においては、第I章で微生物農薬としての有効性を検証したヴィンヤード野生酵母を用いて、マクロファージ細胞に対する免疫制御作用を評価し、これら酵母の健康増進効果を検証した。

第I章 ヴィンヤード野生酵母のブドウ灰色カビ病発生抑制試験

緒言(I)

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で発生する²⁵⁾。例年 5~6 月上旬に、暖雨が 4~5 日続くと灰色カビ病の発生が多くなり、ブドウ収穫量の損失をもたらす²⁵⁾²⁶⁾。灰色カビ病の防除剤として、現在までにペノミルなど多くの殺菌剤が開発されてきた。しかし、灰色カビ病の病原菌 *B. cinerea* は、ライフサイクルが特に短く、かつ孢子を大量に産生すること、また遺伝子の変異しやすく薬剤耐性株が出現しやすい病原菌としても知られている²⁷⁾²⁸⁾。さらに近年、有機栽培への関心が高まっている状況からも、病原菌および害虫に対する自然環境の微生物や天敵を利用した新たな生物的防除方法が注目されている。

細菌、酵母および糸状菌などの微生物は、野菜、果実に着生し、言わば天然の防腐剤として古くからパン、ビール、ワインなどの身近な発酵食品の製造に利用されてきた。このように有用性が高く伝統的に用いられてきた微生物はヒトに対する安全性が証明されており、消費者に安心して受け入れられるメリットがある⁹⁾。これまでに生物的防除剤として用いられてきた食品微生物は、トマト⁸⁾およびイチゴ⁹⁾の灰色カビ病やうどんこ病⁹⁾に対する納豆菌 (*Bacillus subtilis*) が知られている。またリンゴ¹³⁾やブドウ²⁶⁾の灰色カビ病に対するワイン酵母 (*Metschnikowia pulcherrima*) の利用可能性が示唆されている。

本研究の第 I 章では、寒天培地の *in vitro* カビ増殖抑制試験で *B. cinerea* に対する抗カビ作用を示した野生酵母株 (*Saccharomyces cerevisiae*) について¹⁶⁾、微生物農薬としての実効性を検証するためにブドウ果粒(*ex vivo*)およびヴィンヤードフィールド(*in vivo*)における抗カビ試験を行った。また、ヴィンヤード環境に順応した野生酵母をブドウ果実に高密度で着生させることにより、果実の病原菌増殖を抑制するとともに、自然発酵ワインにおけるアルコール産生を促進することで、より安全なワイン醸造を実現する野生酵母循環の構築を目指す背景がある (Fig. 1)。

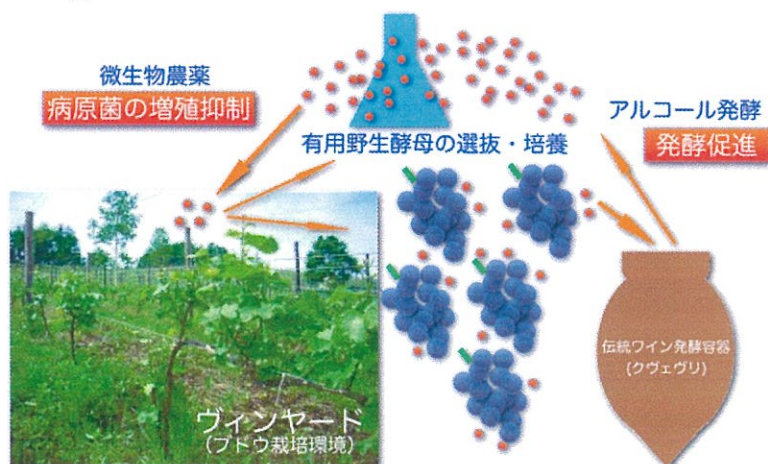


Fig. 1 ヴィンヤード酵母循環がもたらす自然発酵ワインの安全醸造

材料と方法(I)

1. 野生酵母株

ヴィンヤードおよび自然発酵ワイン沈殿物などから分離した酵母 55 株の *in vitro* 抗カビ試験において¹⁶⁾抗カビ作用の強さが異なる *Saccharomyces cerevisiae* の分離 5 株と市販 1 株、合計 6 株を *ex vivo* 試験に用いた(Table 1).

酵母の培養には汎用培地である YPD 培地 (1% 酵母エキス (BD), 2% ポリペプトン (日本製薬), 2% グルコース (富士フイルム和光純薬), 0.01% クロラムフェニコール (ナカライテスク) および 0.2% プロピオン酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬)を使用した (Table 2).

野生酵母の-80℃冷凍保存株を室温に戻した後、YPD 液体培地 30 mL に植菌し 25℃で 3~7 日間培養した。細胞計数盤 (ワンセルカウンター, バイオメディカルサイエンス) を用いて菌数を計測し、 1×10^8 cells/mL の酵母懸濁液となるよう培地を用いて希釈した²⁹⁾。

2. *Botrytis cinerea* 孢子懸濁液

ポテトデキストロース寒天培地 (PDA) (E-MF21, 栄研) (Table 3) 上の *B. cinerea* (NBRC5964 株, (独)製品評価技術基盤機構) を寒天培地ごと打ち抜いた 7 mm ϕ 菌糸体ディスクを新たな PDA 培地の中心に置き、25℃で 2 週間、孢子形成を認めるまで培養した¹⁶⁾³⁰⁾。寒天培地上の孢子に滅菌水 10 mL を加えコンラージ棒でこすり取り、50 mL チューブに回収した³¹⁾³²⁾。この操作を合計 2 回行った。超音波処理 (LEO-80, エンドレスプラネット) を 10 分間行った後、ガラスウールを詰めて乾熱滅菌 (SG62, Yamato) したガラスロートを用いてろ過した。得られたろ液を 7400 g, 10 min, 25℃の条件で遠心分離 (CR21F, Hitachi) 後、上清をデカンテーションにより除いた。滅菌水 20 mL を沈さに加え、分散後、遠心分離により孢子を集めた。再度、上清を除去した後、滅菌水を加えた。この遠心・デカンテーションによる洗浄を合計 3 回行った。最終的に滅菌水に孢子を分散させ、 1×10^6 cells/mL の孢子懸濁液を調製し 4℃で保存後、3 週間以内に使用した。

Table 1 *ex vivo* 抗カビ試験に用いた酵母株一覧

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 株	分離源	<i>in vitro</i> カビ増殖抑制作用
Kondo170908	KONDOヴィヤードワイン	強い
Kondo180303	KONDOヴィヤードワイン残さ	弱い
Kondo180304	KONDOヴィヤードワイン残さ	弱い
Kondo180305	KONDOヴィヤードワイン残さ	強い
Kondo180306	KONDOヴィヤードワイン残さ	強い
Pasteur Blanc	Fermentis	強い

Table 2 酵母の培養に用いたYPD培地

脱イオン水	200 mL
酵母エキス (212750, BD)	2.0 g
ポリペプトン (394-00115, 日本製薬)	4.0 g
グルコース (特級, 富士フィルム和光純薬)	4.0 g
クロラムフェニコール (08027-14, ナカライテスク)	0.02 g
プロピオン酸ナトリウム (198-03015, 富士フィルム和光純薬)	0.4 g
[寒天培地調製時アガロース (BA-10, 伊那食品)	4 g]

オートクレーブ121℃, 20 min 滅菌処理.

Table 3 *B. cinerea* の培養に用いたPDA培地

脱イオン水	1000 mL
ポテトデキストロース寒天培地 (栄研E-MF21)	39 g
クロラムフェニコール (08027-14, ナカライ)	100 mg

オートクレーブ121℃, 20 min 滅菌処理.

3. ブドウ果粒(*ex vivo*)における抗カビ試験

(1) ブドウ果粒の前処理

江別市内の小売店で2020年9月24日および10月20日に購入した市販のブドウ（ナイヤガラ）果房を用いた。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させた。

(2) 野生酵母滴下試験

エタノール処理により殺菌したブドウ果粒 ($n=3$) を12ウェルプレート (92012, TPP) の各ウェルに一粒ずつ置き、注射針 (NN-2238S, テルモ 22G \times 1 $\frac{1}{2}$ " , 0.70 \times 38 mm) で果粒表面の一箇所に傷をつた。まず、傷位置に酵母培養液 (1×10^8 cells/mL) 10 μ L をマイクロピペットで滴下し、安全キャビネット内で2時間送風乾燥させた。次に、*B. cinerea* 孢子懸濁液 (1×10^6 cells/mL) または滅菌生理食塩水 (陰性対照) 10 μ L を重ねて滴下し、25 $^{\circ}$ Cで3週間培養した (Fig. 2)。

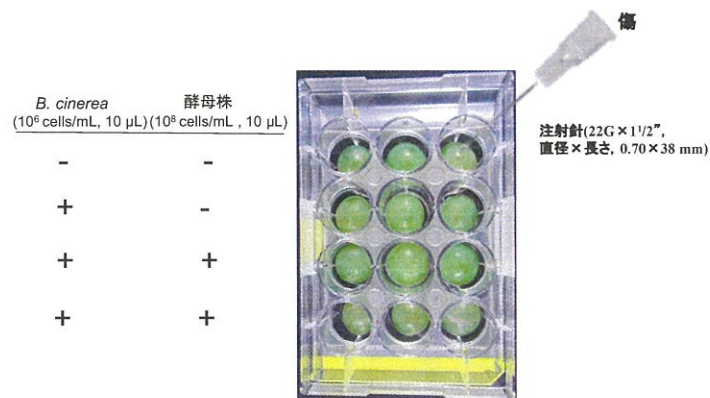


Fig. 2 酵母滴下試験方法

(3) 野生酵母スプレイ試験

エタノール処理により殺菌したブドウ果粒 ($n=3$) を用い、以下の2条件でスプレイ試験を行った。条件1 (先に傷) は、果粒をバランスディッシュ (CEN02-0279, 138 \times 138 \times 25 mm, BIO-BIK) 上に置き、注射針で傷をつけた後、簡易噴霧器 (関根金属) で酵母の培養液 500 μ L をスプレイし、安全キャビネット内で2時間送風乾燥させた。果粒を12ウェルプレートの各ウェルに移し、*B. cinerea* 孢子懸濁液または滅菌生理食塩水 10 μ L を重ねて滴下し、25 $^{\circ}$ Cで3週間培養した。条件2 (先に酵母) は、果粒に傷をつける前に酵母を先にスプレイした

後、傷をつけ、条件1と同様に処理した。簡易噴霧器の1回スプレイ量は蒸留水を4回スプレイした重量の平均値から求めた(Fig. 3)。

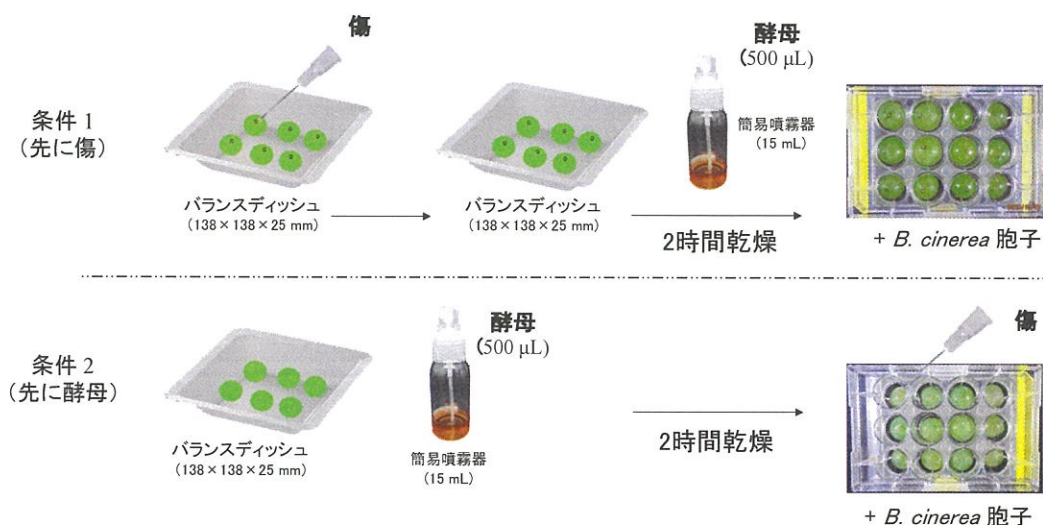


Fig. 3 酵母スプレイ試験方法

(4) 判定基準

抗カビ作用の判定基準は、ブドウ果粒における *B. cinerea* 菌糸体の増殖を、21 日間 3 粒すべてに認めない(+++), 果粒の 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。

4. ヴィンヤードフィールド(*in vivo*)における抗カビ試験

(1) 野生酵母の噴霧

これまで研究での *in vitro* カビ増殖抑制試験¹⁶⁾ およびブドウ果粒の *ex vivo* 抗カビ試験において最も作用が強かった分離酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Kondo170908) を用いた。YPD 培地(Table 2)から抗菌剤のクロラムフェニコールと抗カビ剤のプロピオン酸ナトリウムを除いた液体培地 2 L に酵母 1 次ストック 3 mL を植菌し、1 日 3~5 回混合しながら室温で 5 日間静置培養した (合計, 8 L)。

KONDO ヴィンヤード(岩見沢市)のピノ・ノワールの果房に対して、酵母培養液 (5.2×10^7 cells/mL) 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。隣列#15 の未処理 10 苗を対照区とした。噴霧作業は 3 回 (2019 年 9 月 9 日, 16 日および 23 日) 行い、

酵母培養液 8L のうち 6L を使用した。噴霧期間中に酵母培養液は室温で保存した。試験のタイムスケジュールを Fig. 4 に、作業の様子を Fig. 5 に示した。



Fig. 4 ヴィンヤードフィールド(*in vivo*)における抗カビ試験のタイムスケジュール



Fig. 5 ヴィンヤードフィールド(*in vivo*)における抗カビ試験作業

(2) ブドウ果房の収穫

試験区#16 および対照区#15 の果房を 2019 年 10 月 13 日に収穫し、重量を計測した。ピンセットで灰色カビ病に罹患した果粒を摘果後、罹患果粒および健全な果実の重量をそれぞれ計測し、灰色カビ病の罹患率を計算した (Fig. 5)。 χ^2 検定により罹患頻度を比較した。

(3) 噴霧タンク内酵母の生存確認

保存期間中の酵母の生存を確認するため、噴霧器 2 台の残液から一部を分取し、PDA 培地に画線した後、30 °C で 2 日間培養した。

(4) 真菌分離

収穫したピノ・ノワール果実を用いた自然発酵ワインの醸造において、発酵仕込み 7 日後に発酵液 40 mL を分取し -30 °C で保存した。発酵液を解凍し、十分ボルテックスした後、20 mL を分取し遠心分離 (9200 g, 10 min, 25 °C) した。上清をデカンテーションにより除去した。沈さに滅菌生理食塩水 20 mL を加え、ボルテックスにより良くかくはんした後、再度遠心分離し、上清を完全に除去した。沈さに滅菌生理食塩水 1 mL を加えかくはん後、懸濁液 0.5 mL を分取した。この懸濁液を滅菌生理食塩水で原液 $\sim 10^3$ 倍希釈し、YPD 寒天培地に各 0.2 mL を添加しコンラージ棒で塗抹後、25 °C で 7 日間培養した。寒天培地上のシングルコロニーを YPD 液体培地 3 mL に釣菌し、25 °C で 3 \sim 7 日間培養した後、MALDI-TOF/MS または rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列解析により菌種を同定した。

(5) MALDI-TOF/MS による菌種同定

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS) を用いてリボソームタンパク質を中心とした質量スペクトルのパターン解析により菌種を同定する BioTyper システム (Bruker) を用いた³³⁾³⁴⁾。

1) 試薬

マトリックス (HCCA portioned, 成分名: α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮, 8255344, Bruker) およびキャリブレーションスタンダード (Bacterial Test Standard (BTS), 8255344, Bruker) を調製した³⁵⁾。

ギ酸 (LC/MS 用, 富士フィルム和光純薬) 50 mL に蒸留水 21.4 mL を加え 70 % ギ酸溶液を調製した。アセトニトリル (HPLC 用, ナカライテスク) は、そのまま用いた。

2) タンパク質抽出

YPD 液体培地で酵母菌体の増殖が確認された培養液の一部を 1.5 mL チューブに分取し、遠心分離 (9200 g, 5 min, 25 °C) 後、上清をデカンテーションにより除去した。菌体沈さに注射用水 (大塚製薬) 300 μ L を加え、ボルテックスでかくはん後、99.5 % エタノール 900 μ L を加え、再度、良くかくはんした。遠心分離 (16000 g, 2 min, 25 °C) 後、上清を完全に除去した。沈殿に 70 % ギ酸溶液 20 μ L を加えてかくはん後、アセトニトリル 20 μ L を添加した。再度かくはん後の遠心 (16000 g, 2 min, 25 °C) 上清 10 μ L を 0.6 mL チューブに分取し、これをタンパク質抽出液とした。本抽出液は用時調製した。

3) MALDI-TOF/MS 測定

菌体のタンパク質抽出液 1 μL を Target Plate (MTP384 target plate polished steel BC, Bruker) のスポット位置に滴下し、安全キャビネット内で送風乾燥した。同じスポット上にマトリックス 1 μL を重ねて滴下し、再度乾燥させた後、MALDI-TOF/MS 測定を行った。測定は 1 試料につき 2 スポット調製し、各スポット 1 回ずつ測定した。測定機器は Autoflex、測定用ソフトウェアは Flex Control および MALDI Biotyper Real Time Classification (RTC)(以上、Bruker) を使用した。

(6) DNA 塩基配列解析による菌種同定

Biotyper の汎用データベースおよびハウスライブラリー¹⁶⁾に未記載の菌種については、以下の DNA 塩基配列解析により同定した。

1) DNA 抽出

YPD 液体培地 3 mL に 25 $^{\circ}\text{C}$ で 3~7 日間培養した菌体 0.1 g 程度を極小ガラスビーズ (BZ-01, 0.991~1.397 mm, アズワン) 300 mg およびガラスビーズ (BZ-5, 4.699~5.613 mm, アズワン) 2 個を含む 2 mL スクリューキャップチューブ (T-204, BM) に採り、0.2 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 800 μL を加え、細胞破碎装置 (BC-20, セントラル科学貿易) で破碎 (2000 r/min - 3 min) した後、遠心分離 (21000 g, 3 min, 25 $^{\circ}\text{C}$) により得られた上清 400 μL を自動核酸抽出装置 (magLEAD 12gC) にセットし、専用キット (magLEAD Consumable kit・Magtration Reagent MagDEA Dx SV, 以上 PSS) を用いて、50 μL の DNA 抽出液を得た。

2) PCR 増幅

真菌類 DNA 塩基配列解析用の ITS 領域に対するプライマー Fun-3 (Forward 5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT / Reverse 5'-CGTTCTTCATCGATG) または Fun-5 (Forward 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG / Reverse 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) を用いた³⁶⁾³⁷⁾。PCR 反応液の組成は、1 \times Ex Taq Buffer, 0.22 mmol/L dNTP Mixture, 0.03 U/ μL Ex Taq (以上、タカラバイオ)、各 0.56 $\mu\text{mol/L}$ Primer Mix (Forward+Reverse, ファスマック)となるよう、注射用水を用いて希釈調製した。この反応液 18 μL を 8 連チューブに分注後、DNA 抽出液 2 μL を加え転倒混和し、サーマルサイクラー (MiniAmp, ABI) を用いて PCR 増幅を行った。PCR 条件は、94 $^{\circ}\text{C}$ - 10 min の予備加熱後、94 $^{\circ}\text{C}$ - 0.5 min (熱変性)、55 $^{\circ}\text{C}$ - 0.5 min (アニーリング)、72 $^{\circ}\text{C}$ - 0.5 min (伸長) の工程を 30 サイクルとした。

3) アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅をアガロースゲル電気泳動により確認した。電気泳動は、2%アガロース \times 1 Tris Acetate EDTA Buffer (TAE) (ニッポンジーン)に 2.5 mg/mL エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を加えたゲルおよび 1 \times TAE, 2.5 mg/mL エチジウムブロマイドを混合した泳動液を用いた。泳動に用いる \times 6 Loading Buffer は、グリセリン 15 g, ブロモフェノールブルー 15 mg, 1.5 mol/L EDTA (ニッポンジーン) 3 mL に水を加えた後、全量 50 mL とした。PCR 産物 10 μL に \times 6 Loading Buffer 2 μL を混合したものと、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の 100 bp DNA Ladder (GeneDireX) をそれぞれ 10 μL ずつゲル内のウェルに滴下し、100 V で 25 分間、電気泳動

(Mupid-2 plus, Advance) を行った。泳動終了後、UV ゲル撮影装置 (FAS-201, 東洋紡) を用いて増幅バンドを確認した。

4) DNA 塩基配列解析

電気泳動で確認したバンドの濃さに基づき 10~50 倍に注射用水で希釈した PCR 産物 10 μ L および 1.61 pmol/ μ L forward または reverse プライマー 4 μ L を 8 連チューブに入れて転倒混和し、DNA 塩基配列解析をファスマックに依頼した。得られた塩基配列データを、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースの BLAST により同源性検索を行い菌種同定した。この際、97% 以上の一致率を示した場合、同種であると判断した³⁸⁾³⁹⁾。

(7) ARISA による微生物固有フラグメント解析

1) 試料

試験区#16 および対照区#15 のピノ・ノワール自然発酵ワインの沈殿物および噴霧に用いた分離野生酵母 *S. cerevisiae* (Kondo170908) 株の培養液を用いた。

2) DNA 抽出

酵母培養液およびワインの沈み懸濁液約 0.2 mL 程度を、上記 5.(6)1) で用いた極小ガラスビーズを含む 2 mL スクリューキャップチューブに加え、2% 臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB, 富士フイルム和光純薬)-TEN 緩衝液 800 μ L を加え、細胞破碎装置で破碎した後、沸騰水浴中で 10 分間ボイル処理を行った。遠心上清 (21000 g, 3 min, 25 $^{\circ}$ C) 600 μ L を 2 mL チューブに分取し、 CHCl_3 600 μ L を加え 15 秒間かくはんした。遠心分離 (21000 g - 3 min - 25 $^{\circ}$ C) により得られた上清 400 μ L ついて上記 (6)1) の自動核酸抽出操作にしたがい、50 μ L の DNA 抽出液を得た。

以下 PCR を阻害する植物成分を除くために DNA 抽出液を Ethachinmate (312-01791, ニッポンジーン) を用いて精製した。DNA 抽出液 40 μ L に注射用水 60 μ L, 3 mol/L 酢酸ナトリウム buffer 3.3 μ L および Ethachinmate 1 μ L を加えてかくはんし、2-Propanol 100 μ L を加えて混合後、遠心 (21000 g, 3 min, 25 $^{\circ}$ C) 上清を除去した。エタノール (70%) 200 μ L を加えて再度遠心 (21000 g, 3 min, 25 $^{\circ}$ C) し、上清を完全に除去した後、TE (pH 8.0) 40 μ L を加えてかくはん溶解し、スピンドウンしたものを DNA 精製液とした。

3) PCR 増幅およびアガロースゲル電気泳動

PCR 条件はアニーリング温度 55 $^{\circ}$ C および蛍光標識プライマーの使用以外は上記 (6)2) と同じ条件とし、PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動により確認した。

4) 固有フラグメント解析

ARISA 用蛍光標識の HEX-Fun-1 (Forward 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC/ Reverse HEX 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT) および HEX-Fun-2 (Forward 5'-TGACACACCGCCGT/ Reverse HEX 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT) プライマーを用いた⁴⁰⁾。これらの蛍光標識 PCR 産物 10 μ L について自動 DNA シーケンサによるフラグメント解析をファスマックに依頼した。固有フラグメント長による同定の際は、フラグメント長の $\pm 0.1\%$ の範囲内で

あれば同一の菌株の可能性があると判断した。複数のフラグメントピークが存在した場合、シグナル強度が最も高いものを主要ピークとした。

Table 4 遺伝子解析に用いたプライマー

Primer Mix	Target	Forward	Reverse	Annealing (°C)	用途	文献
Fun-3	ITS	ITS1F	ITS1R	55	DNA塩基配列解析	JP16改2011 ³⁶⁾
Fun-5	D1/D2	NL1	NL4	55	DNA塩基配列解析	食衛誌2014 ³⁷⁾
HEX-Fun-1	ITS	2234C	HEX 3126T	55	ARISA多型解析	食衛誌2016 ⁴⁰⁾
HEX-Fun-2	ITS	1406F	HEX 3126T	55	ARISA多型解析	食衛誌2016 ⁴⁰⁾

結果(I)

1. ブドウ果粒(*ex vivo*)における抗カビ試験

(1) 野生酵母滴下試験

酵母滴下試験におけるブドウ果粒(*ex vivo*)灰色カビ病抑制作用は、野生酵母 *S. cerevisiae* 5株のうち1株(Kondo170908)が強い抑制作用(+++), 2株(Kondo180305 およびKondo180304)がやや強い抑制作用(++), 1株(Kondo180303)が弱い抑制作用(+)を示し、1株(Kondo180306)は抑制作用(-)を認めなかった (Fig. 6). また市販酵母株 (Pasteur Blanc) には抑制作用を認めなかった.

(2) 野生酵母スプレー試験

酵母スプレー試験におけるブドウ果粒(*ex vivo*)灰色カビ病抑制作用は、用いた *S. cerevisiae* 2株とも条件1(先に傷)の場合に抑制作用を認めなかった. 一方、条件2(先に酵母)の場合、野生酵母 Kondo170908 が弱い抑制作用(+)を示し、市販酵母 Pasteur Blanc はやや強い抑制作用(++)を示した (Fig. 7).

2. ヴィンヤードフィールドにおける抗カビ試験

(1) 灰色カビ病罹患率

試験区の灰色カビ病罹患率は9.46%, 対照区は9.66%であり、対照区に比べ0.2%低値を示したが、統計的な有意差は認められなかった(Fig. 8).

(2) 噴霧タンク内酵母の生存確認

噴霧器内に残った野生酵母培養液を分取して、PDA培地で30°C, 2日間画線培養したところ、両方のタンクにおいて酵母コロニー (7.4×10^4 cells/mL) の増殖を認めたことから、1ヶ月以上室温放置しても酵母は生存していることを確認できた (Fig. 9).

(3) 自然発酵ワインの発酵経過

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、発泡がより強く発生している現象が確認できた (Fig. 10).

(4) 自然発酵ワインの真菌分離培養

発酵7日後のワイン試料から分離した総株数は12、この内8株は、MALDI-TOF/MSにより *Saccharomyces cerevisiae* と同定されたが、3株は Biotyper データベースに該当する菌種が存在せず、1株はシグナルが得られなかったため同定不能であった. 同定不能であったこれら4株を DNA 塩基配列解析により菌種同定したところ、すべて青カビ (*Penicillium gerundense*) であったことが確認できた. 最終的に、試験区#16からは酵母のみ5株、対照区#15からは酵母3株に加え青カビ4株が同定された (Fig. 11).

(5) 自然発酵ワインの真菌叢 DNA 解析

ARISA 解析で用いた3種の試料のうち、プライマー HEX-Fun-1 では、主要フラグメント長(bp)は試験区#16で822.30、対照区#15でも822.32 および噴霧した酵母 *S. cerevisiae*

(Kondo170908) 822.02 であり, これら主要フラグメント長に差を認めなかった (Fig. 12).

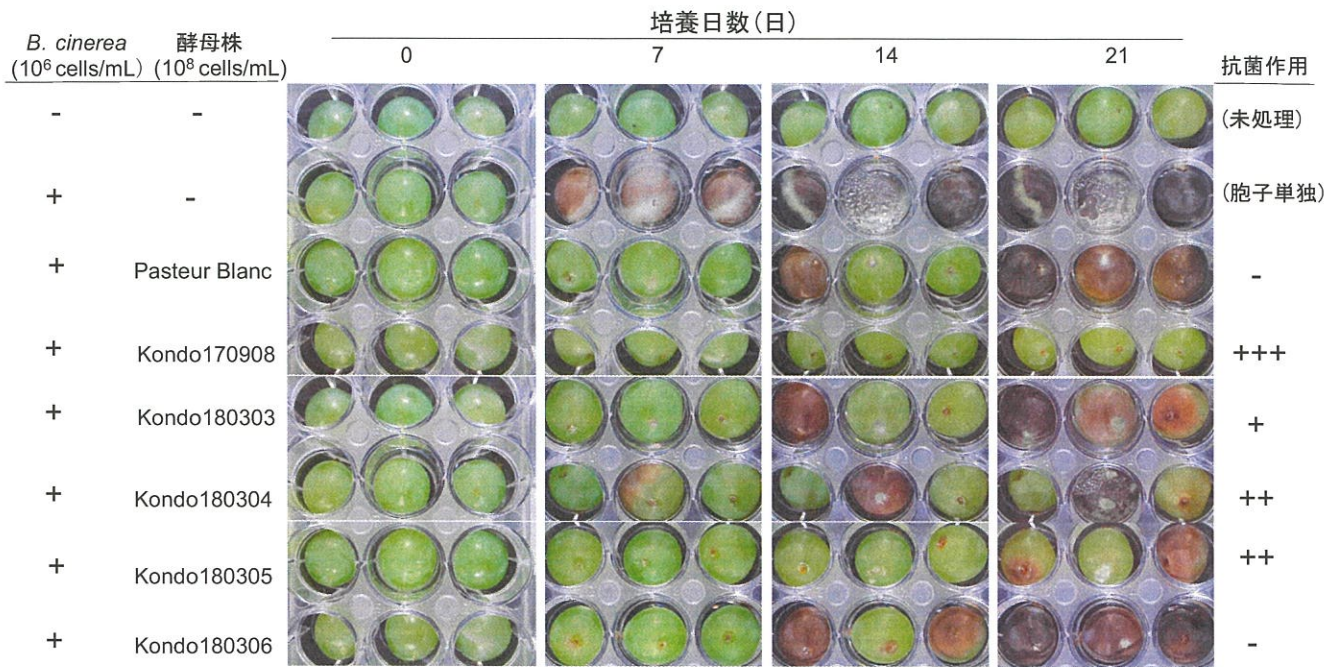


Fig. 6 ブドウ果粒(*ex vivo*)における酵母滴下抗カビ試験結果

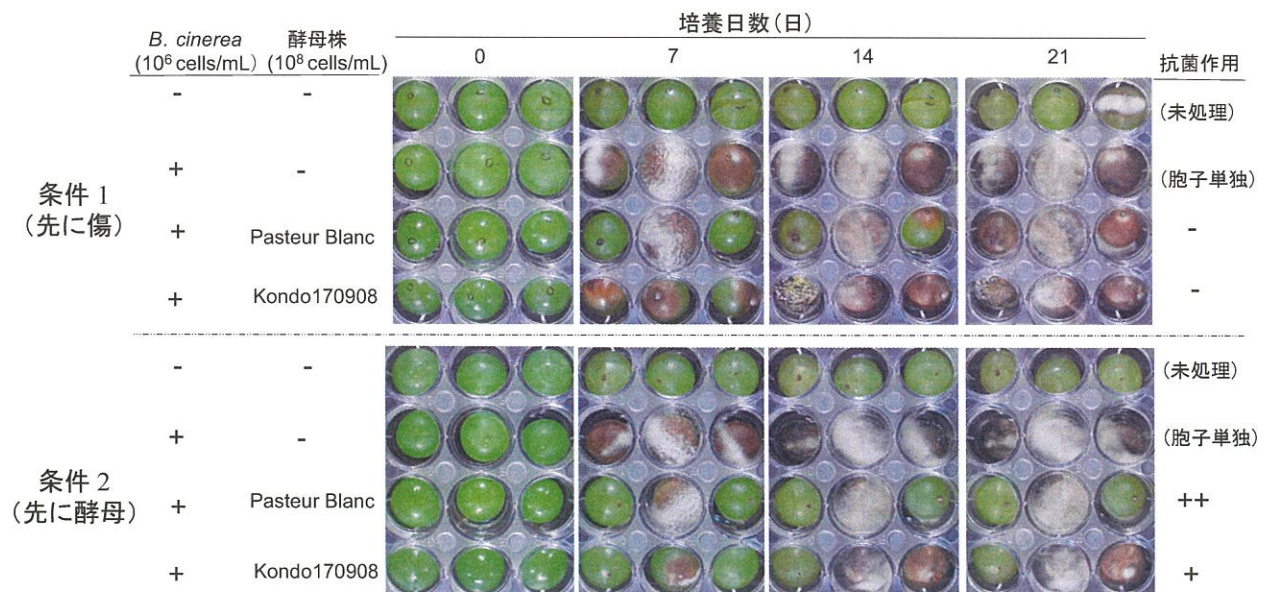


Fig. 7 ブドウ果粒(*ex vivo*)における酵母スプレー抗カビ試験結果

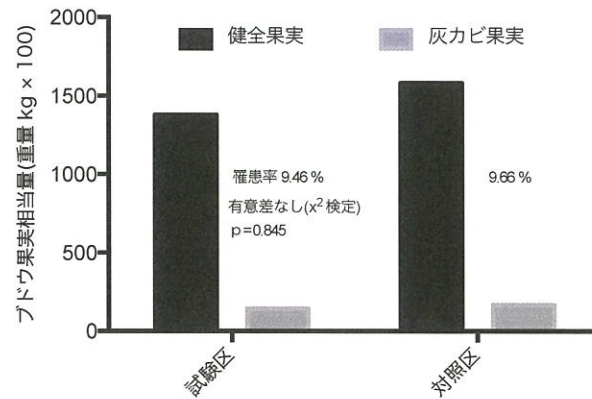


Fig. 8 野生酵母の抗灰色カビ病フィールド(*in vivo*)試験結果



Fig. 9 噴霧タンク内酵母の生存確認結果

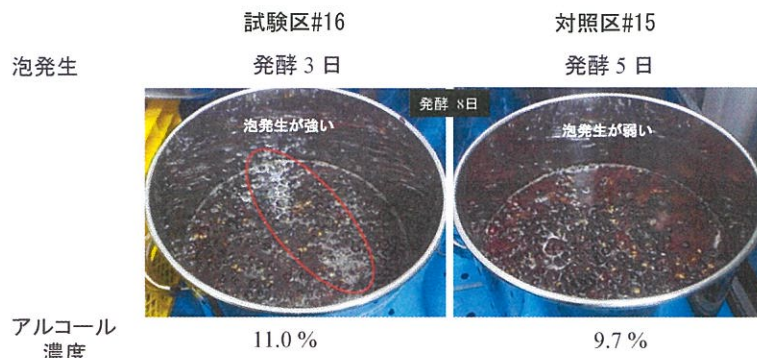
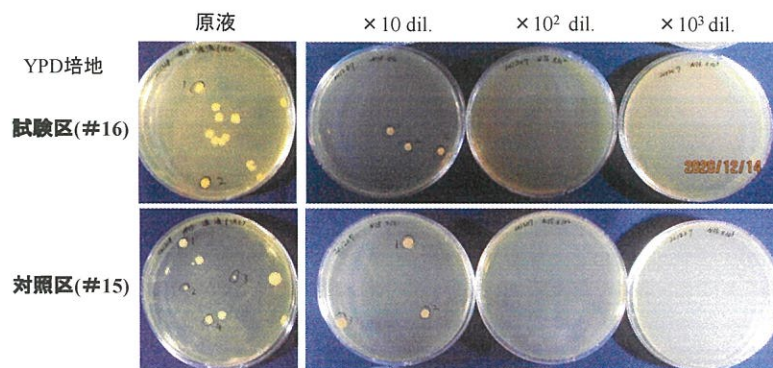


Fig. 10 自然発酵ワインの発酵経過比較



菌種	試験区#16	対照区#15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	3
<i>Penicillium gerundense</i>	0	4

Fig. 11 自然発酵ワインの真菌分離培養同定結果

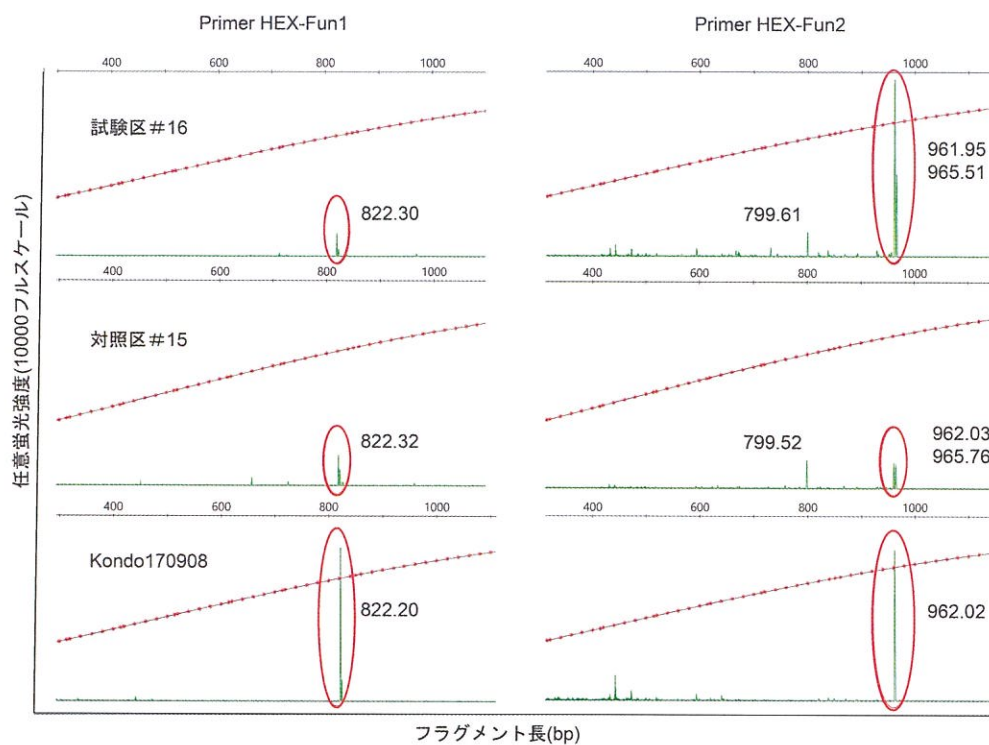


Fig. 12 自然発酵ワインの微生物叢解析(ARISA)結果

一方、プライマー HEX-Fun-2 ではフラグメント長(bp) は、試験区#16 で 799.61, 961.95 および 965.51 の複数のピークが出現し、対照区#15 でも 799.52, 962.03 および 965.76 と同様であった (Fig. 12), 噴霧した野生酵母 *S. cerevisiae* (Kondo170908) は 962.02bp の単一フラグメントを与え、試験区#16 および対照区#15 いずれにも存在することが確認できたが、ピークの高さ(蛍光強度)は試験区#16 の方が 8 倍大きかった。

考察(I)

ブドウ収穫後の品質管理において、灰色カビ病の原因となる *B. cinerea* の増殖を制御することは必須である⁵⁾。ブドウの表面には *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Torulasporea* sp., *Candida* sp. および *Zygosaccharomyces* sp. など数多くの酵母種が存在する⁴¹⁾。これらの酵母種は、ブドウの品質管理やワイン醸造において、それぞれ異なる重要性を持っている。一方、ヴィンヤード野生酵母の生物的防除の有用性に関する研究が年々増大している⁵⁾¹⁵⁾²⁶⁾²⁸⁾。これら酵母種の中でも、アルコール産生能に優れた *Saccharomyces cerevisiae* については、機能性やモデル生物としての様々な研究が行われている。最近、Nally ら²⁹⁾により *S. cerevisiae* が灰色カビ病の増殖を抑制することが報告された。ブドウの表面に存在する非 *Saccharomyces* 酵母に関しては、*Metschnikowia pulcherrima*¹³⁾ および *Hanseniaspora uvarum*⁴¹⁾などはワイン醸造学的に興味深い種であるとともに、主に場所や栄養分の競争に基づく拮抗的性質を持ち、人工的に接種された灰色カビ病の発生率を低下させることが確認されている。

このように *S. cerevisiae* は、真菌病原体の増殖を低減する生物的防除作用を示すことが広く知られつつある¹⁵⁾。酵母における拮抗活性現象は、*S. cerevisiae* で最初に発見されたものでタンパク質性の「キラー毒素」を分泌することにより、同じ種の感受性菌株の増殖を阻害することができる。この発見以来、酵母の微生物農薬研究における新しい試みが注目され実用化に向けての研究が行われてきた。この抗真菌活性は、酵母増殖に伴う複合的な要因；栄養源と空間の競合、揮発性の二次代謝産物（エタノール、酢酸エチル、炭酸ガスなど）および溶解酵素の生成などが寄与していると考えられている。また最近では、*S. cerevisiae* から抗真菌性ペプチドセクロピン A が分泌され、トマトの *Colletotrichum coccodes* およびリンゴの青カビ *P. expansum* の増殖が阻害されることが明らかとなった¹⁵⁾。

一般的に自然発酵ワインでは、発酵経過に伴い野生酵母の存在割合が異なり、極めて初期の段階では、*Kloeckera apiculata* や *Torulopsis stellate* などの増殖がみられ、2~3 日後に *Saccharomyces cerevisiae* が増殖し本格的なアルコール発酵が始まるといった酵母の菌叢交代現象がみられる^{42,43,25)}。本研究では、ヴィンヤード由来の野生酵母 *S. cerevisiae* 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ことを目指した。しかしブドウ果粒の *ex vivo* 試験により *B. cinerea* の増殖抑制効果が確認できたのに対し (Fig. 6, 7)、フィールドにおける *in vivo* 試験においてはわずかながら抑制傾向は認められるものの統計的な有意差は認められなかった (Fig. 8)。今回のフィールド試験では、ブドウ果実の登熟が始まった時期に、収穫までに計 3 回酵母を噴霧し、最後の噴霧から 20 日後に果実を収穫した (Fig. 4)。試験期間を通して、降雨の頻度も高く酵母の着生量に影響した可能性がある (Fig. 13)。また、酵母着生量の安定化のためには展着剤の併用⁴⁴⁾も必要と考えられる。

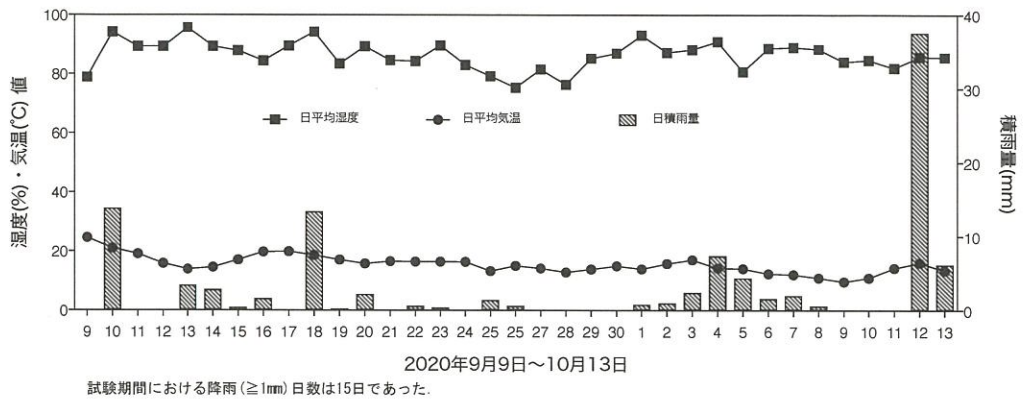


Fig. 13 酵母フィールド(*in vivo*)試験期間の岩見沢(上幌)の気象情報(日平均値)

収穫したピノ・ノワール果実を用いた自然発酵ワインにおいて発酵仕込み 3 日後に試験区#16 のタンクで発泡が認められたことからアルコール発酵が開始されたと判断した。これに遅れて 2 日後に対照区#15 で同様の現象が認められた。仕込みから 8 日後においても試験区#16 の方が発泡の強い様子が確認できた (Fig. 10)。また、試験区のアルコールの量は 11.0%，対照区は 9.7% であった。これらのことは、噴霧した酵母が果実に着生し酵母の密度を高めてアルコール発酵が促進されたものと考えられた。ARISA における DNA 菌叢解析でも、試験区#16 では、噴霧した野生酵母 *S. cerevisiae* Kondo170908 株のフラグメントが最も優位を占め、対照区より 8 倍存在量が多いことが確認できた (Fig. 12)。

自然発酵ワインの真菌培養結果において、試験区#16 では分離コロニーすべてが *S. cerevisiae* と同定されたのに対し、対照区#15 では *S. cerevisiae* に加え、青カビの *P. gerundense* が優勢に同定されたことから、試験区では噴霧した *S. cerevisiae* の酵母密度が高まり、カビの増殖を効果的に抑制していたと考えられる (Fig. 11)。

灰色カビ病の発生機序として、成熟果実が傷や烈果により果汁を流出させた場合に発生することは明らかであるが、開花期に柱頭などに *B. cinerea* の胞子が付着し、果実の成長時期は不顕性感染で経過し成熟期に菌体が果肉に拡がることも実験的に証明されている⁴⁵⁾。本研究のフィールド試験は、果実の成熟期に焦点をあてたものであったが、今季(2021年6月24日～7月15日)、開花期のブドウに対する酵母噴霧試験を実施し、*S. cerevisiae* のカビの増殖抑制効果を検証中である。

第II章 野生酵母のマクロファージに対する免疫制御作用

緒言(II)

プロバイオティクス (probiotics) は、宿主の健康に好影響を与える生きて微生物を指し²³⁾、代表的なものとして、これまでに乳酸菌 (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp.) とビフィズス菌 (*Bifidobacterium* sp.) が広く知られている。その他にも酵母 (*Saccharomyces* sp.) やプロピオン酸菌 (*Propionibacterium* sp.) も含め 195 種の有用菌が発酵食品をはじめとした種々の食品に利用されていることが、2012 年に国際酪農連盟から報告されている⁴⁶⁾。

プロバイオティクスの典型的な生理作用として、整腸効果⁴⁷⁾および免疫制御作用⁴⁸⁾などが挙げられる。最近の研究では乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* MG4559 や *Lactobacillus plantarum* MG5270 などが高い免疫制御作用を示すとして注目されている⁴⁹⁾。一方、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分かってきた²⁰⁾²¹⁾。

酵母は、自然界に普遍的に存在し、人類史上古くからお酒などの発酵食品に利用されてきた微生物である¹⁾³⁾。酵母の生菌または死菌を経口摂取することにより、酵母菌体およびその成分が腸管に接触または定着し、生体にさまざまな作用を及ぼすと考えられている²⁰⁾。例えば、清酒酵母による睡眠の質改善作用⁵⁰⁾、下痢の改善や腸管免疫応答の誘導²¹⁾などのプロバイオティクスとしての研究が報じられている (Fig. 14)。

しかしながら、これら酵母のプロバイオティクスとしての基礎研究は、ヒト腸管上皮細胞 Caco2 についてのものであり²¹⁾、マクロファージ細胞を用いた研究例の報告はない。その理由として、従来、マクロファージは腸管内腔表面には存在せず、食物との直接の相互作用はないと考えられてきた経緯がある。しかし、最近、マクロファージが腸内微生物が産生する乳酸やピルビン酸と結合して、腸管上皮から内腔側に突起を伸ばすことが報告された⁵¹⁾。

マクロファージは、自然免疫の中心的な役割を担う細胞でありグラム陰性菌の細胞膜成分であるリポ多糖体 (LPS) およびキノコや海藻の多糖体の刺激により活性化する⁵²⁾。LPS はマクロファージ上に発現する Toll-like receptor 4 (TLR 4) にリガンドとして結合し、核内転写因子 NF- κ B を活性化する。NF- κ B は核内に移行し、ターゲット DNA の転写調節領域に結合することにより TNF α やインターロイキン -1 β (IL-1 β) などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導する。マクロファージが産生した TNF α は、マクロファージの TNF レセプターを介して自己刺激する作用があり、これにより一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を促すことで、NO 産生が誘導される⁵³⁾。

NO は、腫瘍細胞や病原体に対する生体防御機構で重要な役割を果たしているが⁵⁴⁾、存在量が多すぎると炎症の悪化、発がんなどの原因となり、人体に対して有害に働くこともある。そのため、NO 産生量が抗進したマクロファージの NO 合成を制御することは、炎症を抑制することに有効であるとされ、食品分野においてもマクロファージの NO 合成阻害成分の

探索が積極的に行われている⁵⁵⁾。

本研究では、発酵食品に広く利用されている酵母について、学内植物材料や自然発酵ワイン沈殿物などから分離した野生酵母を中心に、免疫系の中心的役割を担う細胞であるマウスマクロファージ細胞 (RAW264) に対する制御作用を評価した (Fig. 15)。

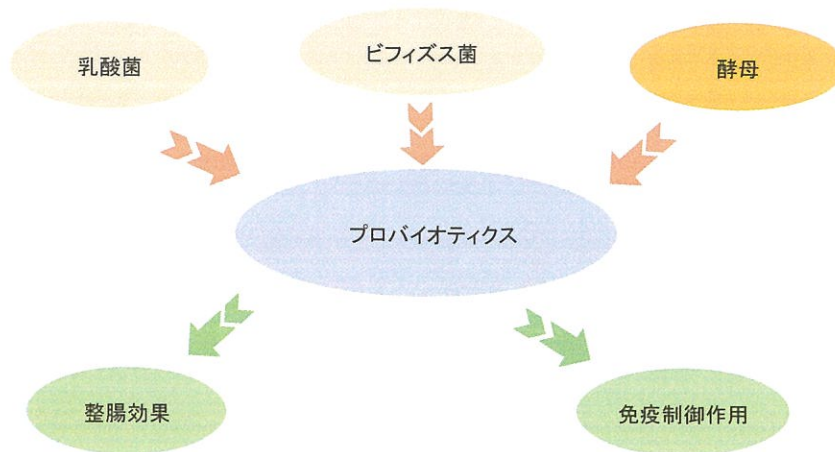


Fig. 14 酵母のプロバイオティクス機能性

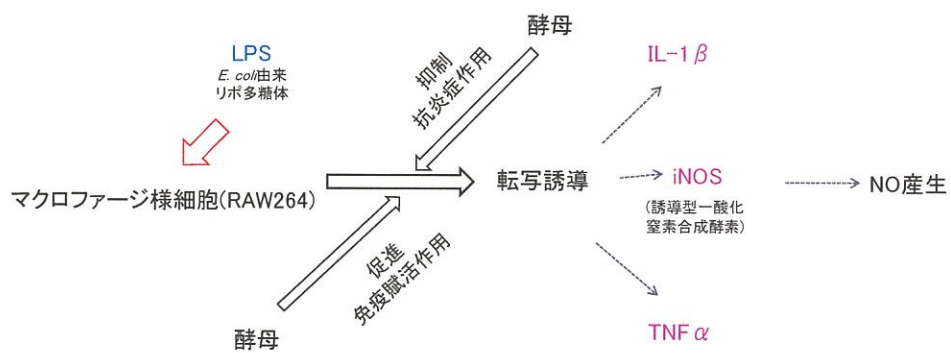


Fig. 15 マクロファージ細胞RAW264に対する免疫制御作用の評価

材料と方法(II)

1. 試料

学内植物材料や自然発酵ワイン沈殿物などから分離した *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* および *Candida krusei* など-80 °Cで保存した野生酵母 6 種 26 株を用いた (Table 5).

2. 酵母試料液の調製

保存酵母株を-80 °Cから室温に戻し, YPD 培地 30 mL に加え, 25 °Cで 4 日間, 静置増菌培養し, 以下の 3 条件で試料液を調製した(Fig. 16).

(1) ボイル抽出液

酵母培養液を遠心分離 (9200 g, 10 min, 25 °C) し, 集めた酵母菌体 (酵母の湿重量 1 g が 1.1×10^8 cells に相当する) に PBS 溶液(富士フィルム和光純薬) を 100 mg/mL となるように添加後, 懸濁液をオートクレーブで 100 °C, 10 分間加熱した. 再度, 遠心分離 (9200 g, 10 min, 25 °C) により得られた上清を [ボイル抽出液] とした.

(2) 粉碎ボイル抽出液

酵母菌体の PBS 懸濁液 (100 mg/mL) 1mL を, ガラスビーズを含むスクリーキャップチューブに入れ, 破碎装置を用いて 2000 r/min, 3 min 粉碎後, 沸とう水で 10 分間加熱した後, 上記 2(1)と同様に処理し, [粉碎ボイル抽出液] を得た.

(3) 生菌懸濁液

酵母培養液から上記 2(1)と同様に菌体を集め PBS の代わりに細胞培養用培地 (後述) を加え, [生菌懸濁液] 100 mg/mL を調製した.

1. 試料

学内植物材料や自然発酵ワイン沈殿物などから分離した *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* および *Candida krusei* など-80 °Cで保存した野生酵母6種26株を用いた (Table 5).

2. 酵母試料液の調製

保存酵母株を-80 °Cから室温に戻し, YPD 培地 30 mL に加え, 25 °Cで4日間, 静置増菌培養し, 以下の3条件で試料液を調製した(Fig. 16).

(1) ボイル抽出液

酵母培養液を遠心分離 (9200 g, 10 min, 25 °C) し, 集めた酵母菌体 (酵母の湿重量 1 g が 1.1×10^8 cells に相当する) に PBS 溶液(富士フィルム和光純薬) を 100 mg/mL となるように添加後, 懸濁液をオートクレーブで 100 °C, 10 分間加熱した. 再度, 遠心分離 (9200 g, 10 min, 25 °C) により得られた上清を [ボイル抽出液] とした.

(2) 粉碎ボイル抽出液

酵母菌体の PBS 懸濁液 (100 mg/mL) 1mL を, ガラスビーズを含むスクリーキャップチューブに入れ, 破碎装置を用いて 2000 r/min, 3 min 粉碎後, 沸とう水で 10 分間加熱した後, 上記 2(1)と同様に処理し, [粉碎ボイル抽出液] を得た.

(3) 生菌懸濁液

酵母培養液から上記 2(1)と同様に菌体を集め PBS の代わりに細胞培養用培地 (後述) を加え, [生菌懸濁液] 100 mg/mL を調製した.

Table 5 免疫制御作用に用いた酵母株一覧

酵母種名	酵母株名	分離源
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kondo170906, 170908, 170909	KONDOヴィヤードワイン液
	Kondo170907, 170910, 180301~180308	KONDOヴィヤードワイン残さ
	サクランボ180311, 180312	サクランボワイン
	Pasteur Red, Pasteur Blanc	Fermentis
	日清ドライイースト	日清フーズ
	とがち野酵母	日本甜菜製糖
<i>Kloeckera apiculata</i>		学内キャンベル
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>		花粉団子
<i>Torulaspora delbrueckii</i>		くわのみ果実
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		学内キャンベル
<i>Candida krusei</i>	①	学内キャンベル
<i>C. krusei</i>	1, 4	学内ピノ・ノワール

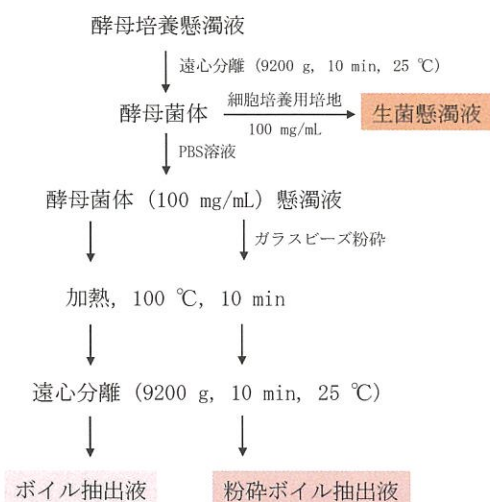


Fig. 16 酵母前処理3条件

3. マクロファージ細胞に対する免疫制御作用の評価

マクロファージ細胞の活性化指標である NO を測定した。RAW264 細胞を LPS により活性化し、試料溶液を加え 24 時間培養後の上清中の NO 産生量を、自然酸化物の NO₂ イオンとして Griess 試薬によるジアゾカップリング反応により比色定量した⁵⁶⁾。LPS で誘導された NO 産生を酵母試料液が抑制する作用を抗炎症作用として、反対に LPS なしで NO 産生を誘導する作用を免疫賦活作用として評価した。

(1) 細胞継代培養

マウスマクロファージ様細胞 RAW264 ((独)理化学研究所バイオリソースセンター) を 10 % 非働化ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco-Thermo Fisher Scientific) および 1 % ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich) を含む DMEM 培地(富士フィルム和光純薬)を用いて CO₂ インキュベータ (MCO-175, Sanyo) (37 °C, 5 % CO₂) 内で培養した。培養操作は安全キャビネット (MCV-13BSF, Sanyo) 内で無菌的に行い、75 cm² 培養フラスコの細胞増殖率が 80~90 % となったところで 0.25 % Trypsin-EDTA (富士フィルム和光純薬) を用いて細胞を剥がし、3、4 日毎に継代培養した。

(2) 試液調製

1) 1 mg/mL LPS 原液

E. coli 由来の LPS (127-05141, 富士フィルム和光純薬) 25 mg を 25 mL の蒸留水に溶解し、1.5 mL チューブに 1 mL ずつ分注後 -30 °C で保存した。用時、培養液で 1000 倍に希釈し 1 µg/mL の溶液を調製した。

2) 20 mmol/L ケルセチン原液

ケルセチン(Cayman Chemical) 60.4 mg を DMSO 1 mL に溶解し、エタノール 9 mL を加えて混合後、2 mL チューブに 1 mL ずつ分注し-30 °C で保存した。用時、培養液で 100 倍に希釈した。

3) 0.25 mol/L NO₂ イオン標準原液

NaNO₂ (富士フィルム和光純薬) 0.862 g を蒸留水に溶解し 50 mL とし、遮光瓶に入れ 4 °C で保存した。用時、蒸留水を用いて段階希釈し、25~100 µmol/L の標準溶液希釈系列を作成した。

4) Griess 試薬

0.1 % ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩(NED) (富士フィルム和光純薬)溶液; NED 200 mg を水 200 mL に溶かした。1 % スルファニルアミド(SUL)(富士フィルム和光純薬)溶液; SUL 2 g に 21.25 % H₃PO₄ (85 % 原液の 4 倍希釈液) 40 mL を加えて溶かし、蒸留水で全量を 200 mL とした。NED と SUL の 2 液はいずれも 4 °C で保存し、用時等量混合して Griess 試薬を調製した。

(3) NO 産生抑制(抗炎症)作用の測定

LPS 溶液(1 µg/mL) 10 µL を細胞培養用 96 ウェルマイクロプレートの列 2 から 12 の全ウェルにマルチチャンネルマイクロピペットを用いて分注した。その後、比較対照の培養液、

陽性対照の 200 $\mu\text{mol/L}$ ケルセチンおよび異なる濃度の酵母試料液をそれぞれ 50 μL ずつ分注した。次に 2×10^6 cells/mL 細胞懸濁液を列 2 から 12 の A から F に分注した。行 G および H には細胞懸濁液の代わりに培地 50 μL を分注して試料溶液の着色による影響を補正した。その後、 CO_2 インキュベータ内で 37°C , 24 時間培養した。

マクロファージから放出された一酸化窒素 (NO) の測定用に、培養上清 80 μL を 8 チャンネルマルチピペットで新たな 96 ウェルプレートに分取した。蒸留水および用時調製した NO_2 イオン標準液(25, 50 および 100 $\mu\text{mol/L}$)の順に列 1 の行 A から 2 ウェルずつ 80 μL 分注した。Griess 試薬を全ウェルに 80 μL 分注し、室温で 20 分間放置した後、550 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Emax, Molecular Devices) を用いて測定した。標準液の検量線から NO 産生量を算出し、比較対照に対する各試料の NO 産生率を求め NO 産生抑制作用を評価した。

(4) NO 産生促進(免疫賦活)作用の測定

上記の 3(3)NO 産生抑制(抗炎症)作用の測定操作における LPS の添加を比較対照ウェルのみとし、陽性対照にアラゲキクラゲ抽出液(100 mg/mL)⁵⁷⁾⁵⁸⁾ を用いる以外はすべて同様に操作し、各試料ウェルの NO 産生率を求め NO 産生促進作用を評価した。

(5) 細胞生存率の測定

ホルマンザン色素を産生するテトラゾリウム塩 WST-1 を用いて細胞代謝活性を測定し細胞生存率を求めた。

1) WST-1 試液

5.5 mmol/L WST-1 溶液： WST-1 (同仁化学研究所) 100 mg を PBS 27.9 mL に溶かした後、15 mL 遠心チューブに 0.9 mL ずつ分注し -30°C で保存した。

2 mmol/L 1-Methoxy PMS 溶液： 1-Methoxy PMS(同仁化学研究所) 67.2 mg を水 100 mL に溶かし 4°C で保存した。

用時、WST-1 溶液 0.9 mL に 1-Methoxy PMS 溶液 0.1 mL および PBS 10 mL を加え混合した。

2) WST-1 アッセイ

培養上清を除いた 96 ウェルプレート内の細胞に WST-1 試液 100 μL を加えた後、 37°C , 1 時間アルミブロック上でインキュベートした。450/650 nm における吸光度を測定し、NO 産生率と同様に、比較対照に対する各試料の細胞代謝活性を求めた。

(6) 統計解析

統計処理には、Prism 6 (Graph Pad Software) の Dunnett's 多重比較検定を用い、有意水準 0.05 % ($n = 6$) で評価した。免疫制御作用の測定結果は、すべて平均 + 標準偏差で示し、比較対照に対する有意差が認められた場合に(*)印を付した(Fig. 17~31)。

結果(II)

1. NO 産生抑制(抗炎症)作用

酵母 6 種 26 株(Table 5)について測定したところ, [ボイル抽出液] では, *Saccharomyces cerevisiae* (日清ドライイースト)に NO 産生を 30 % 未満に抑制する最も強い抗炎症作用が認められ, *S. cerevisiae* (Kondo180306), *Torulasporea delbrueckii* および *Candida krusei* (1)には 70 % 未満に抑制する弱い抗炎症作用が認められた(Fig. 17-19). [粉碎ボイル抽出液] では, *S. cerevisiae* (日清ドライイースト), *Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces japonicus*, *T. delbrueckii* および *Hanseniaspora uvarum* に 70 % 未満の弱い抗炎症作用が認められた(Fig. 20-22). 一方, [生菌懸濁液] には, より広汎な酵母株に抗炎症作用を認め 3 種 14 株が 30 % 未満に抑制する強い抗炎症作用を示した(Fig. 23-25, Table 6). また *S. cerevisiae* の異なる 4 株 (Pasteur Red, Pasteur Blanc, Kondo170909 および Kondo170910) は 70 %未満に抑制する弱い抗炎症作用を示した. [生菌懸濁液] の場合, 菌体量が 10 mg/mL ではほとんどの酵母株が強い細胞毒性を示し, 抗炎症作用の評価ができなかったため, [ボイル抽出液] および [粉碎ボイル抽出液]の菌体量 10 mg/mL より低い菌体量 4 mg/mL で測定を行った(Fig. 17-25).

一方, いずれの酵母試料においても細胞生存率については [ボイル抽出液] および [粉碎ボイル抽出液] では細胞毒性を認めず(>70%), [生菌懸濁液] では, 強い抗炎症作用が確認された *S. cerevisiae* 6 株 (とかち野酵母, Kondo180302~05 およびサクランボ 180311) が明らかな細胞生存率の低下(<30 %)を示した(Fig. 17-25). これら抗炎症作用を示した酵母株について Table 6 にまとめた.

以上の結果から酵母の抗炎症作用は, 酵母菌体成分によるものではなく生菌体としての存在が重要であることが確認された. このことをより詳細に検証するために以下の実験を行った. 生菌体懸濁液が強い抗炎症作用を示した *S. cerevisiae* 3 株(Kondo180302, Kondo 180306, サクランボ 180311) および *C. krusei* 1 株(4)について, 酵母の培養懸濁液の一部 (250 μ L) を分取し, 遠心分離により菌体と上清に分けた後, 菌体には PBS を加え PBS 懸濁液とした. 同一酵母株の培養懸濁液, PBS 懸濁液および培養上清の 3 条件について抗炎症作用を比較した. いずれの酵母株とも抗炎症作用は, 培養懸濁液>菌体懸濁液>培養上清の順に強く, やはり菌体が抗炎症作用の中心であることが確認された(Fig. 26).

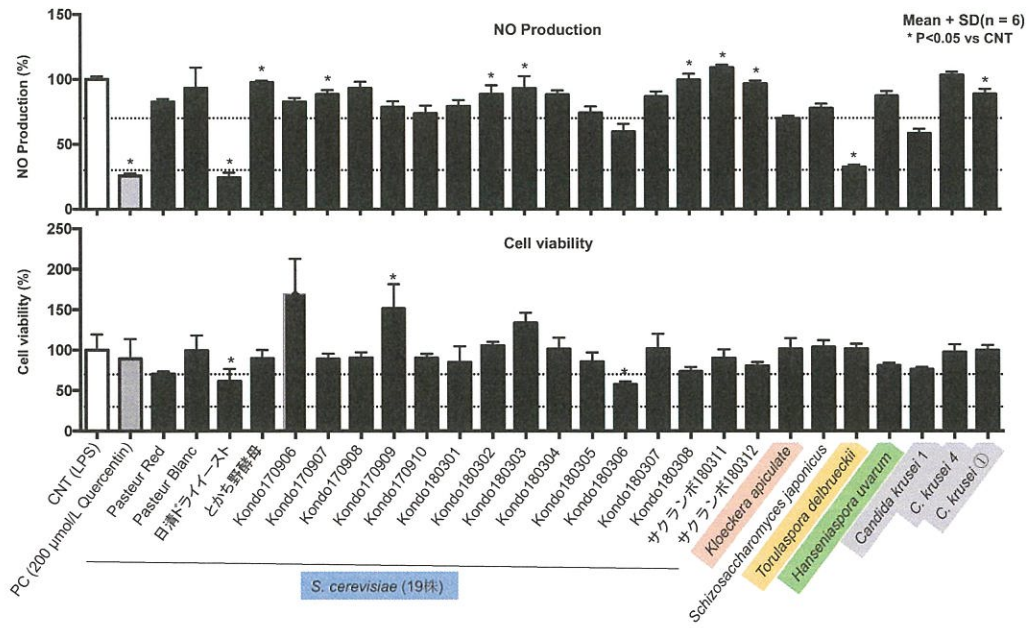


Fig. 17 酵母の抗炎症作用 - ポイル抽出液(菌体量 10 mg/mL)

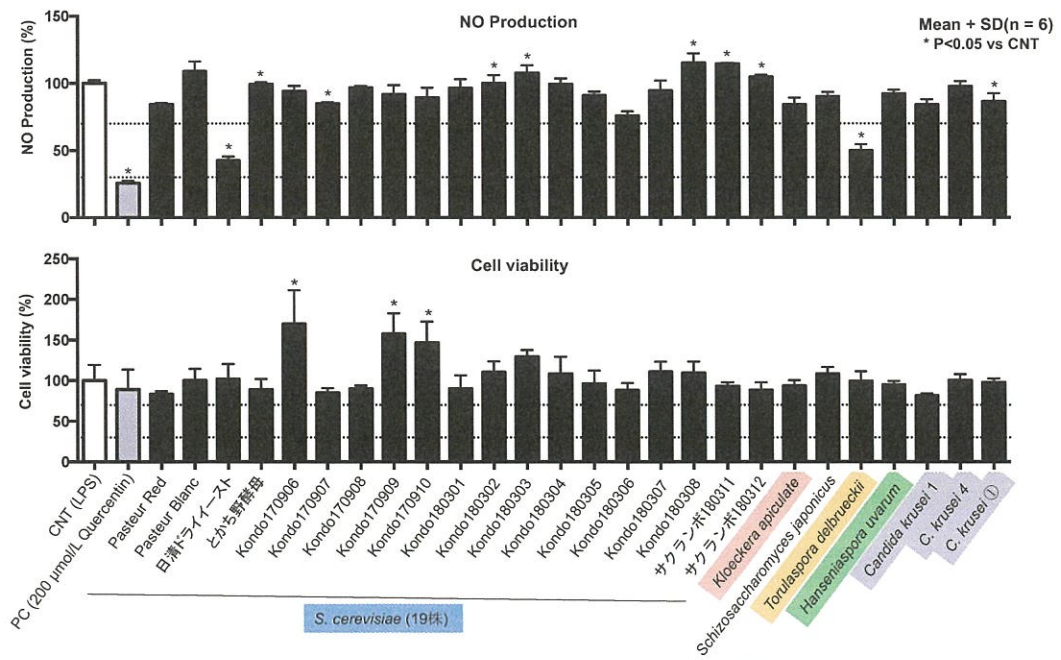


Fig. 18 酵母の抗炎症作用 - ポイル抽出液(菌体量 5 mg/mL)

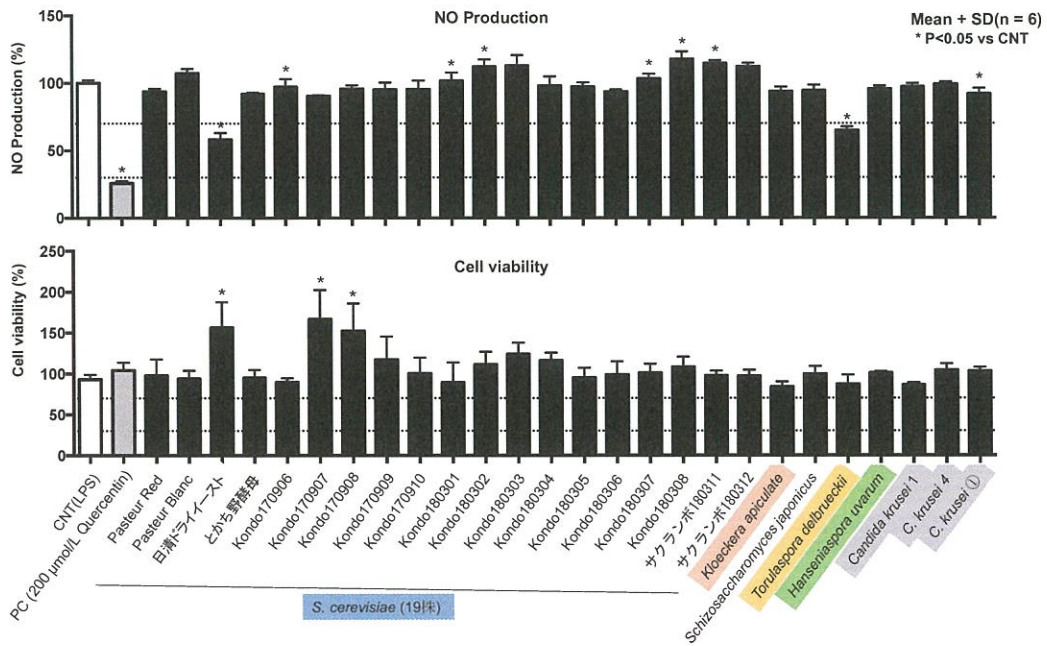


Fig. 19 酵母の抗炎症作用 - ボイル抽出液 (菌体量 2.5 mg/mL)

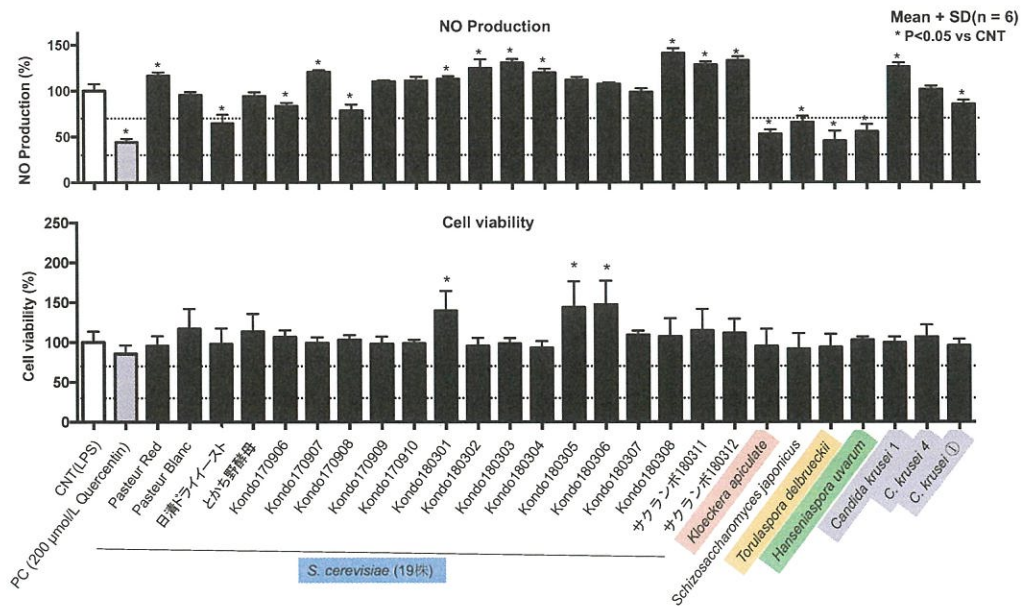


Fig. 20 酵母の抗炎症作用 - 粉碎ボイル抽出液 (菌体量 10 mg/mL)

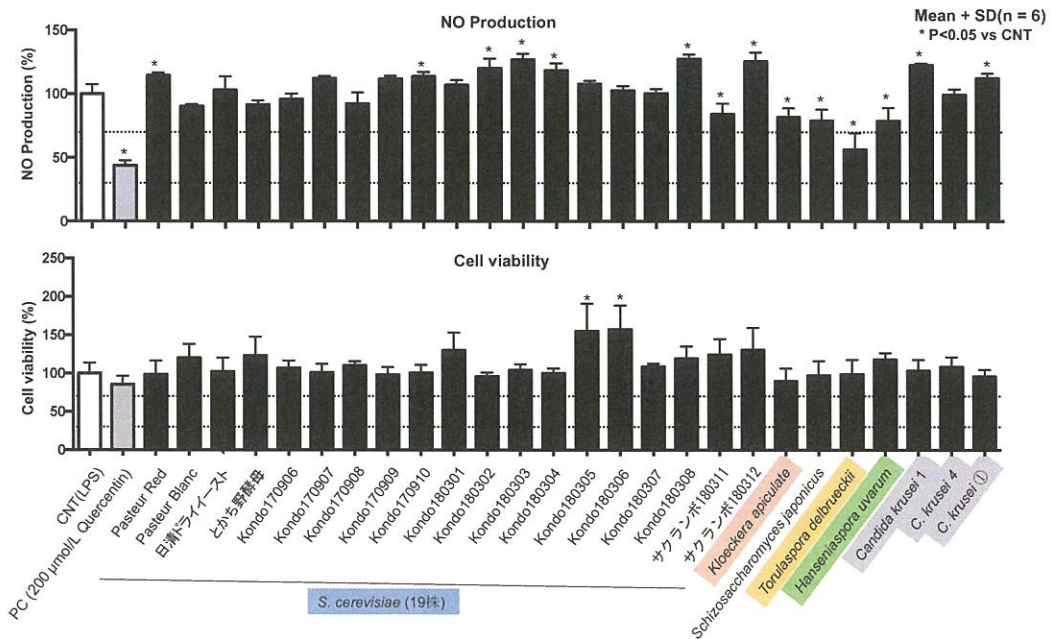


Fig. 21 酵母の抗炎症作用 - 粉砕ボイル抽出液(菌体量 5 mg/mL)

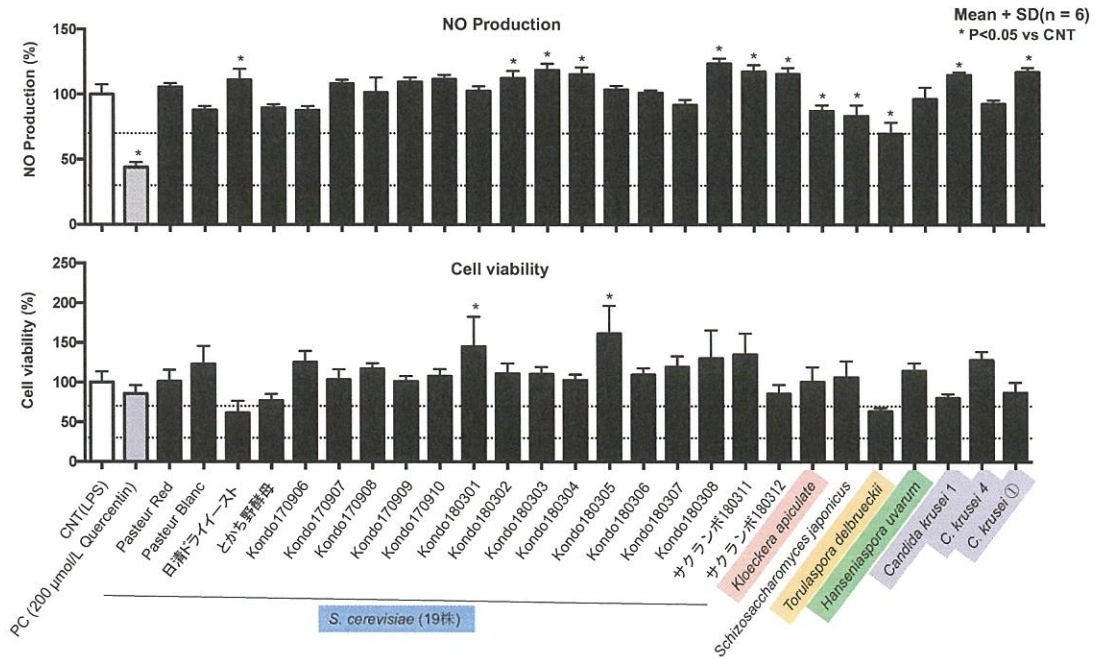


Fig. 22 酵母の抗炎症作用 - 粉砕ボイル抽出液(菌体量 2.5 mg/mL)

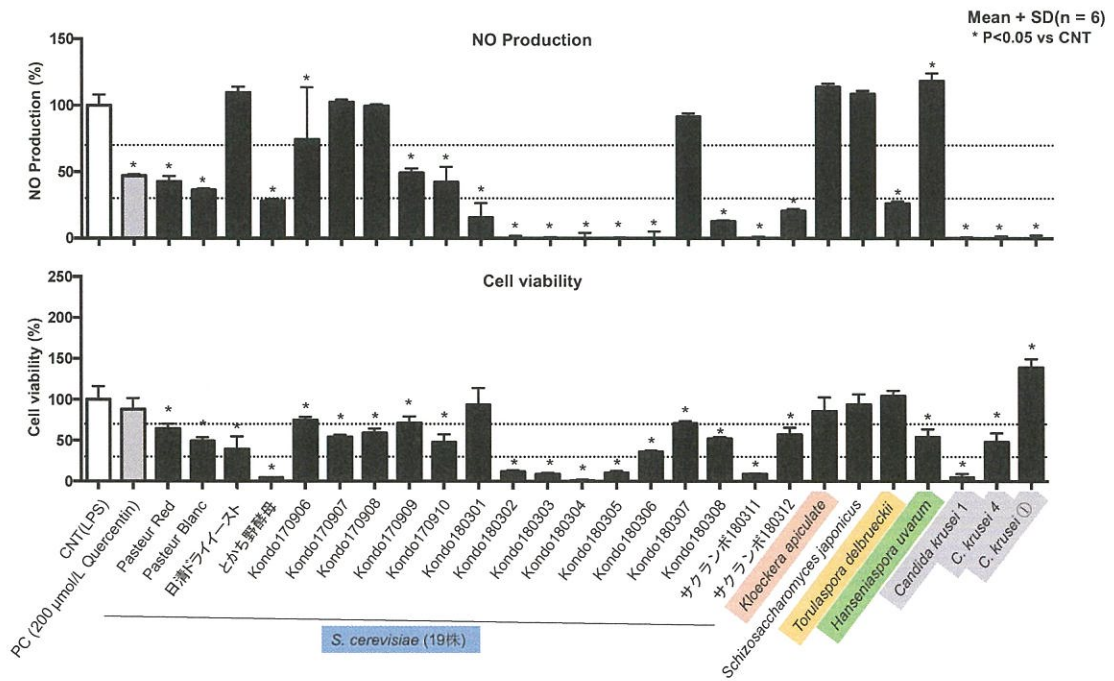


Fig. 23 酵母の抗炎症作用 - 生菌懸濁液 (菌体量 4 mg/mL)

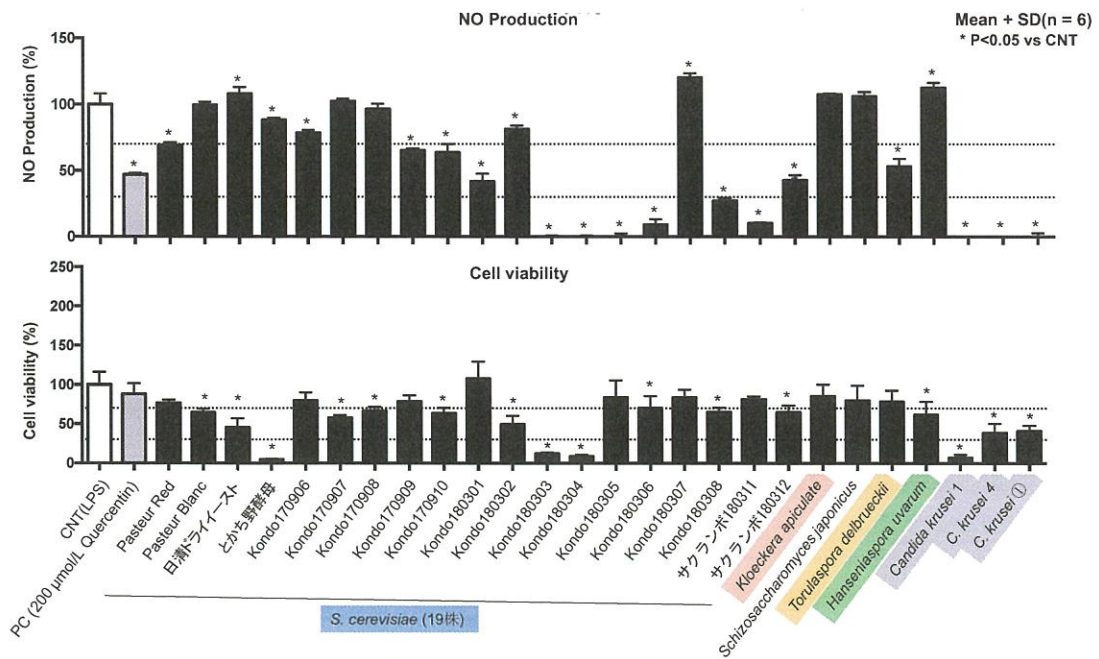


Fig. 24 酵母の抗炎症作用 - 生菌懸濁液 (菌体量 2 mg/mL)

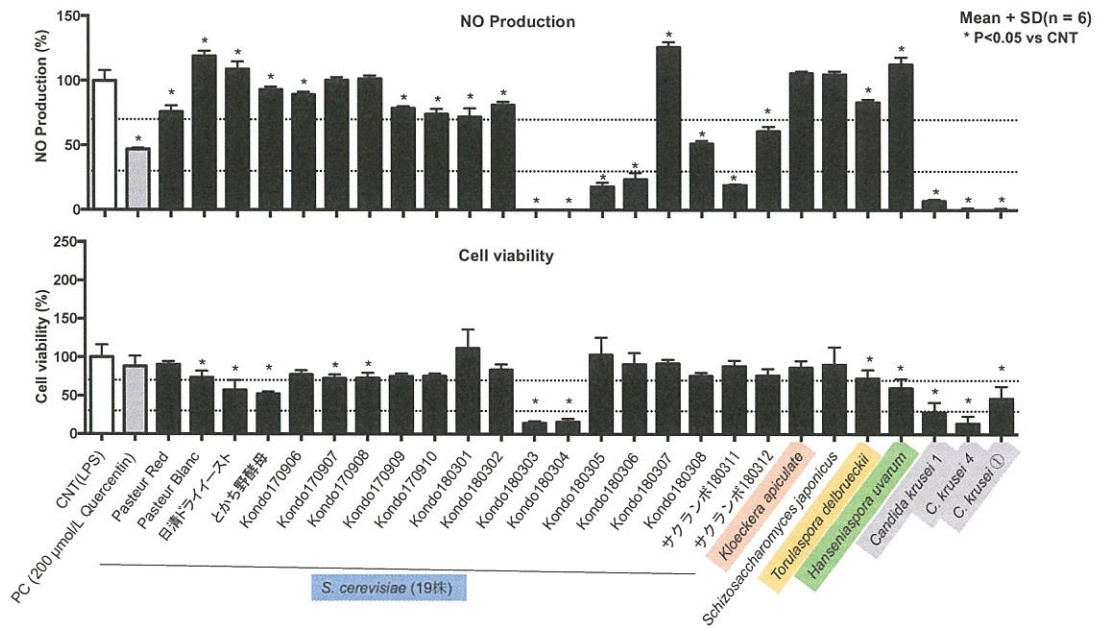


Fig. 25 酵母の抗炎症作用 – 生菌懸濁液(菌体量 1 mg/mL)

Table 6 抗炎症作用を示した野生酵母 (生菌懸濁液)

酵母種	抗炎症						細胞毒性					
	4 mg/mL		2 mg/mL		1 mg/mL		4 mg/mL		2 mg/mL		1 mg/mL	
	70<	30<	70<	30<	70<	30<	70<	30<	70<	30<	70<	30<
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
<i>Kloeckera apiculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Torulaspora delbrueckii</i> *	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-
<i>Candida krusei</i> *	-	3	-	3	-	3	2	-	3	-	1	2

*: 細胞毒性を示さずに、強い抗炎症作用を示した株。

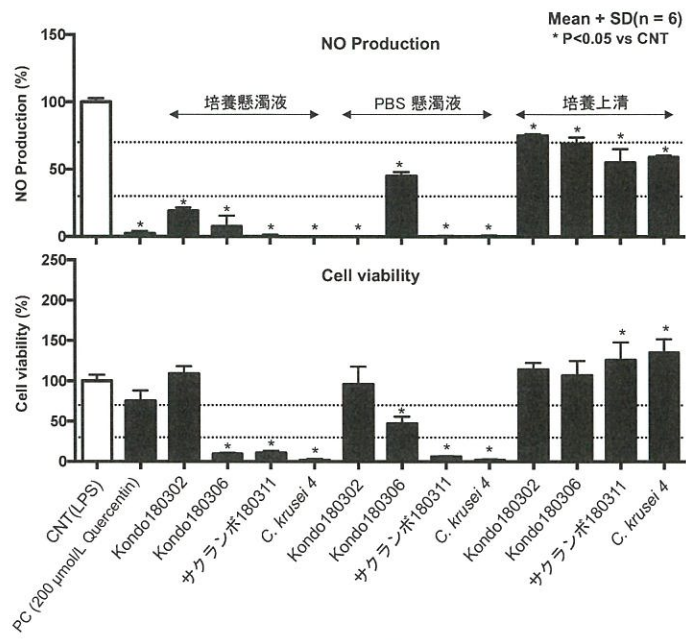


Fig. 26 酵母生菌体および培養液の抗炎症作用

2. NO 産生促進(免疫賦活)作用

マクロファージ免疫賦活作用の指標となる NO 産生促進作用はすべての酵母試料液において認められなかった(Fig. 27-31). またこのときの細胞生存率については *S. cerevisiae* Kondo180301 の生菌懸濁液試料でのみ<30 %を示した以外は明らかな影響は認められなかった(Fig. 31).

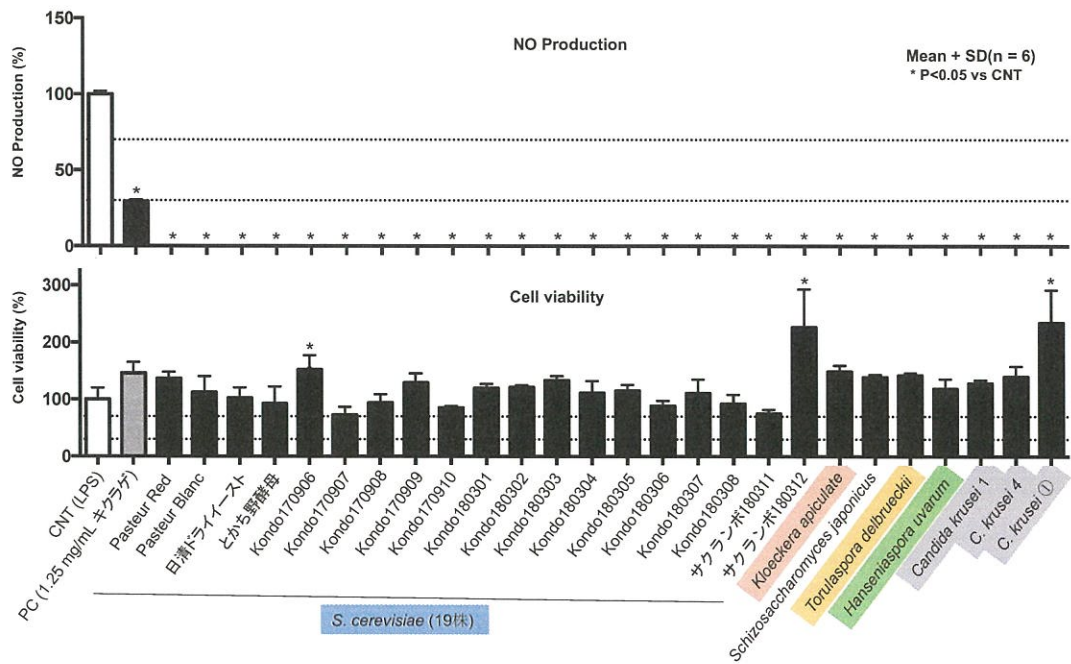


Fig. 27 酵母の免疫賦活作用 - ポイル抽出液(菌体量 10 mg/mL)

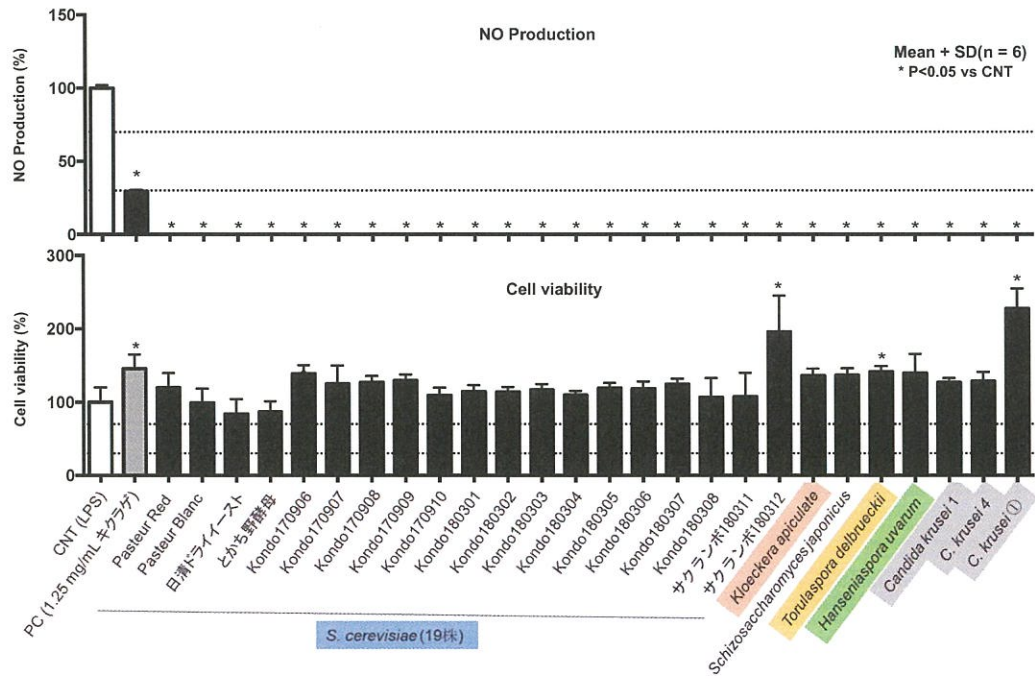


Fig. 28 酵母の免疫賦活作用 - ポイル抽出液(菌体量 5 mg/mL)

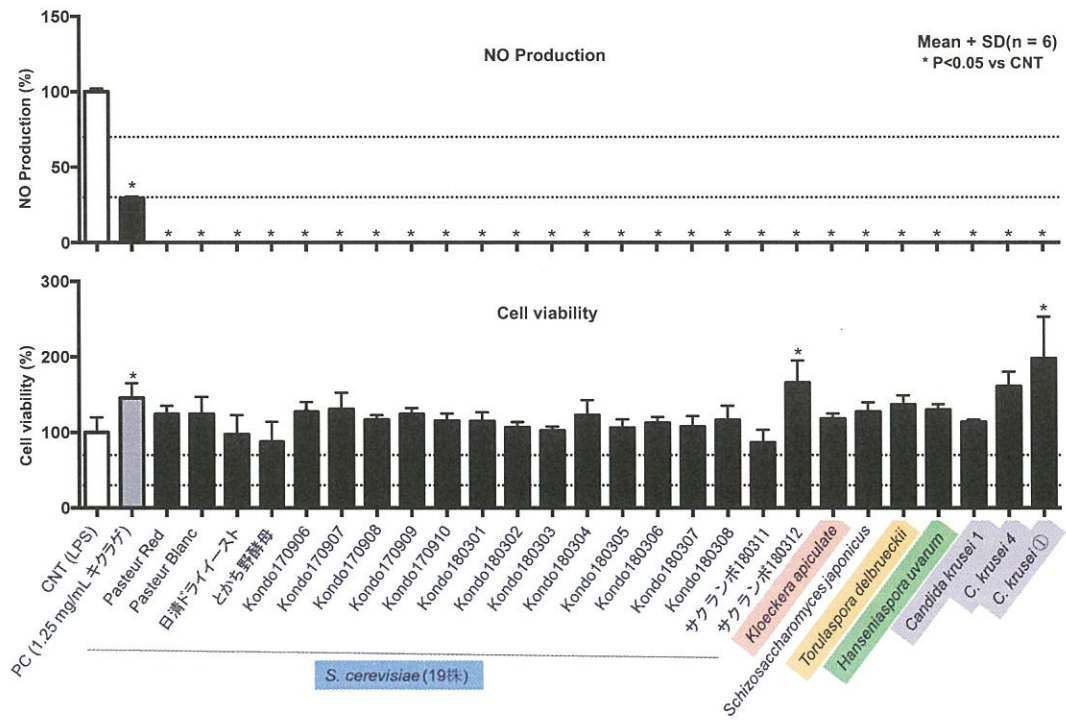


Fig. 29 酵母の免疫賦活作用 - ポイル抽出液(菌体量 2.5 mg/mL)

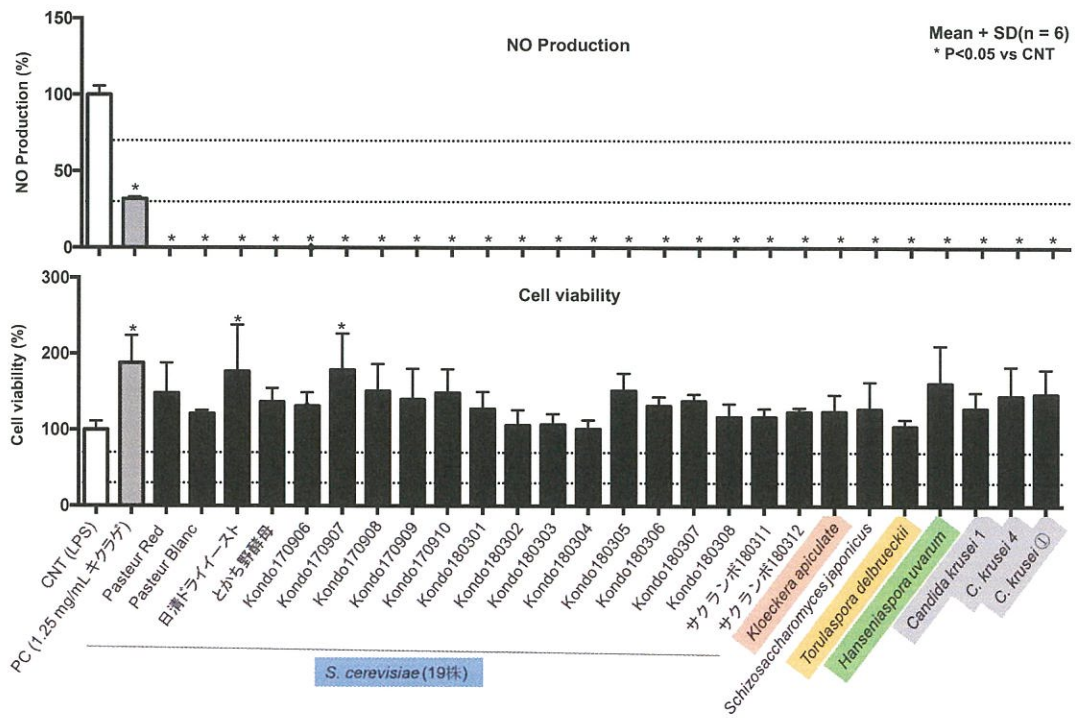


Fig. 30 酵母の免疫賦活作用 - 粉碎ボイル抽出液 (菌体量 10 mg/mL)

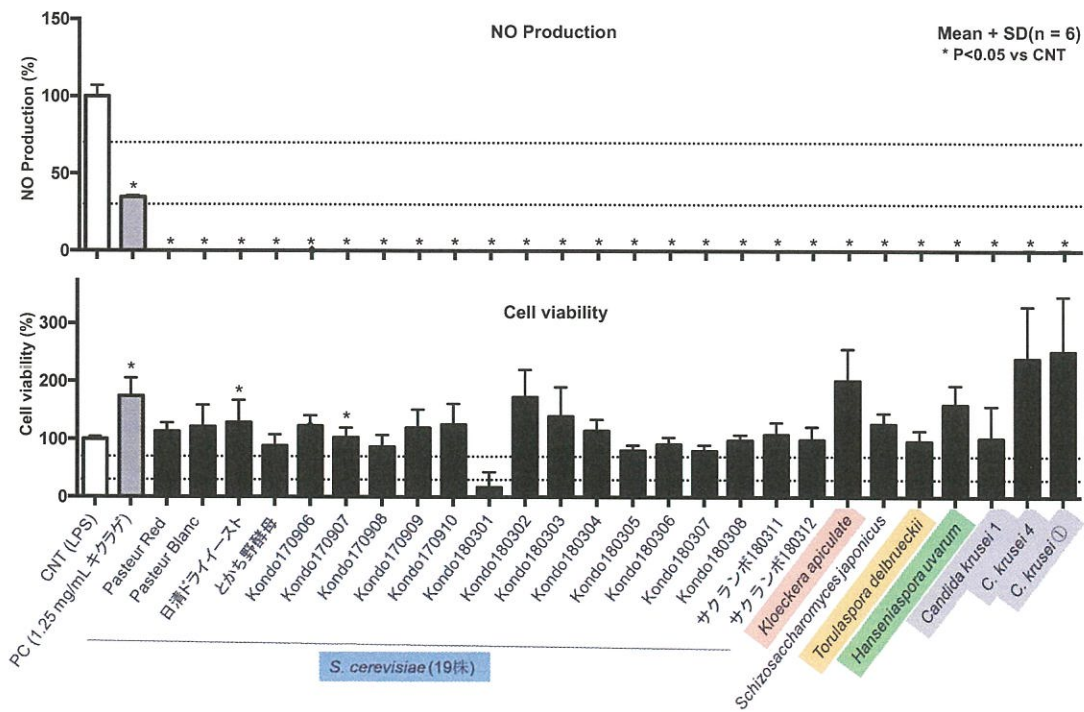


Fig. 31 酵母の免疫賦活作用 - 生菌懸濁液 (菌体量 4 mg/mL)

考察(II)

野生酵母のマクロファージ細胞に対する抗炎症作用は、酵母の前処理条件により大きく異なり、[ボイル抽出液] および [粉碎ボイル抽出液] とともに強い抗炎症作用(<30%)を示した酵母は、*S. cerevisiae* (日清ドライイースト)のみであった(Fig. 17-22)。これに対して [生菌懸濁液] の場合は、*S. cerevisiae* 6株(Kondo180302~06, サクランボ 180311) および *C. krusei* 2株が強い抗炎症作用を示した (Fig. 23-25)。生菌が強い抗炎症作用を示す背景には、マクロファージ細胞に対する毒性に関わる場合があり注意を要するが、これらの試料液の多くは細胞毒性を示さない菌体量まで希釈した条件においても、確実に抗炎症作用を示している。*S. cerevisiae* の Kondo180303, 180304 株および *C. krusei* 4, ①株は最も希釈した条件(1 mg/mL)でも細胞毒性(<30%)と強い抗炎症作用(<30%)を示しており、その作用の強さが注目される。これらの試料液もさらに希釈すれば細胞毒性を示さずに抗炎症作用を表す量が存在すると考えられる。酵母培養液について、菌体と遠心上清に分けて抗炎症作用を比較した結果からも生菌体そのものが抗炎症作用に深く関与することを確認できた(Fig. 26)。その一方で *S. cerevisiae* サクランボ 180311 株のように、一部の酵母には上清に抗炎症成分を分泌するものもあると考えられる。[ボイル抽出液] に強い抗炎症作用を認めた日清ドライイーストのように生菌には抗炎症作用がまったく認められない現象は例外的であり、菌体抽出成分の関与が示唆される。酵母6種26株の中では、*T. delbrueckii* はいずれの条件においても細胞毒性を認めない量で抗炎症作用を示しており、他の酵母種にはない特徴であった (Fig. 17-25)。

以上の結果より、多くの酵母株において生菌懸濁液がマクロファージ細胞に対して強い抗炎症作用を示すことが確認できたことから、酵母の生菌体が細胞性免疫の中心的な役割を担うマクロファージ細胞に接触することにより直接刺激する可能性、あるいは局所的に高濃度に存在する酵母代謝物がマクロファージに作用する可能性が示唆される。一方、 β -グルカンなどの酵母菌体成分がマクロファージを刺激し免疫賦活作用を示すことは広く知られているが、少なくとも本実験におけるボイル抽出液の条件では β -グルカンが溶出されないため、賦活作用は認めなかったと考えられる。例えばキノコの β -グルカンは、アルカリ条件下での加熱を必要とする⁵⁹⁾。

本研究により、酵母6種26株はマクロファージ細胞に対する抗炎症作用を有することから、有用なプロバイオティクスに成り得る可能性が示唆された。しかし、酵母の経口摂取による生体調節作用に関する研究は、乳酸菌などに比べ極めて限られており、胃液や消化液に対する耐性あるいは作用機序の詳細を明らかにするため、今後、さまざまな側面から酵母のプロバイオティクス作用について検証する必要がある。さらに多くの酵母株の機能性を探索することにより、より有用な株が見出されることが期待される。

総括

本論文の第I章では、ブドウ果粒の *ex vivo* 試験で野生酵母が灰色カビ病菌の *B. cinerea* に対して、増殖を抑制することを確認できた。実際のヴィンヤードにおけるフィールドの *in vivo* 試験では統計的な有意差は得られなかったものの灰色カビ罹患率の抑制傾向を示したことに加え、噴霧した酵母が着生したブドウ果実を原料とした自然発酵ワインの醸造においてアルコール発酵の促進作用と *Penicillium gerundense* のカビ増殖を抑制する効果を確認できた。野生酵母に関するこれらの新たな知見は、減農薬・有機栽培を目指すブドウ農家が利用できる実用的な微生物農薬としての可能性を開くものである。そのためには、酵母の噴霧量、時期や頻度に加え、生着率などの検証が必要と考えられる。

一方、第II章では、細胞性免疫の中心的な役割を担うマクロファージ細胞に対する野生酵母の免疫制御作用を検証したところ、多くの酵母で生菌体が直接、マクロファージに働き抗炎症作用を示す可能性が示された。したがって生体機能性に関する研究が盛んな乳酸菌に留らず、酵母についてもプロバイオティクスなどの健康増進作用の研究が今後、発展するものと期待される。

本研究では、野生酵母を中心に第I章では真菌類のカビに対する増殖阻害作用について、第II章では、哺乳類のマクロファージ細胞に対する抗炎症作用について検証した。いずれも生菌体としての酵母に備った生理活性に焦点をあてた研究であり、今後の酵母の新たな機能性食材としての利用促進に貢献できることを願うものである。

要約

自然発酵ワインから分離したヴィンヤード由来野生酵母について、ブドウ果粒(*ex vivo*)およびフィールド(*in vivo*)におけるブドウ灰色カビ病の原因菌 *Botrytis cinerea* に対する抗カビ試験を行い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測定し、健康増進作用の可能性についても併せて評価した。

ブドウ果粒(*ex vivo*)における灰色カビ病に対する増殖抑制試験では、野生酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 5 株のうち 3 株が強い抑制作用、1 株が弱い抑制作用を示し、1 株は抑制作用を認めなかった。このことから *S. cerevisiae* 株間で抗カビ作用の程度が著しく異なることが確認できた。フィールド(*in vivo*)試験には、ブドウ果粒(*ex vivo*)試験で強い抗カビ作用を認めた酵母株 *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。しかし、収穫したブドウ果実を原料に用いた自然発酵ワインは、酵母噴霧した試験区#16 のタンクが発酵仕込み 3 日後に先にアルコール発酵を始め、その後、2 日遅れて対照区#15 のアルコール発酵が始まった。仕込み 8 日後においても、試験区#16 の方は発泡が強く発生している現象が確認できた。したがって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た。発酵 7 日後のワインについて培養および DNA による微生物叢解析を行った。培養により、最終的に試験区#16 から *S. cerevisiae* 5 株のみが分離されたのに対して対照区#15 は *S. cerevisiae* 3 株、青カビの *Penicillium gerundense* 4 株が分離同定された。この結果から試験区では発酵開始時の酵母密度が高まり、カビの増殖を抑制したと考えられる。DNA 解析においても、試験区#16 では、噴霧した酵母由来フラグメント(962bp)の存在量が、対照区#15 に比べ 8 倍高いことが確認された。

マクロファージ細胞に対する免疫制御作用を酵母 6 種 26 株について評価したところ、菌体のボイル抽出液では、市販 *S. cerevisiae* 1 株のみが LPS で誘導された NO 産生を 30 % 未満に抑制する強い抗炎症作用を示したのみであった。これに対して生菌懸濁液では、3 種 14 株の酵母が同様の強い抗炎症作用を示した。LPS を除いた条件での NO 産生促進作用としての免疫賦活作用は酵母のボイル抽出液および生菌懸濁液のいずれの場合も認められなかった。

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*)試験結果からその効果が確認できた。フィールド(*in vivo*)試験においては *B. cinerea* に対する有効性を統計的には検証できなかったが、着生した酵母が自然発酵ワインにおける発酵能を高めカビの増殖を抑制する作用を示したことは、ワイン用ブドウの有機栽培における実用面での有効利用が考えられる。さらに、酵母生菌体のマクロファージ細胞に対する抗炎症作用は、酵母の新たなプロバイオティクスとしての可能性を開くものであり、今後の健康増進面の研究が期待される。

Summary

Vineyard-derived wild yeast isolated from naturally fermented wine was tested for antifungal activity against *Botrytis cinerea*; the causative fungus for grape gray mold disease, in grape berries (*ex vivo*) and fields (*in vivo*), as a microbial pesticide was verified. Furthermore, the immunoregulatory activity of these wild yeasts on mouse macrophage-like cells RAW264 was measured, to assess the possibility of health-promoting activity.

In a growth suppression test for *B. cinerea* in grape berries (*ex vivo*), 3 out of 5 wild yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains showed a strong inhibitory effect, 1 strain showed a strong inhibitory effect, and another 1 strain did not show an inhibitory effect. It was confirmed that the degree of antifungal activity differs greatly between the *S. cerevisiae* strains. For the field (*in vivo*) test, a yeast strain *S. cerevisiae* (Kondo170908), which was found to have a strong antifungal effect in the grape berries test, was used. As a result, the prevalence of *B. cinerea* in the test group was slightly lower than that in the control group, but no statistically significant difference was observed. However, in the naturally fermented wine using the harvested grapefruits, the tank of the test plot #16 sprayed with yeast started alcoholic fermentation 3 days after the initiation, and then the alcoholic fermentation of the control plot #15 started 2 days later. Even 8 days after the initiation, it was confirmed that the test plot #16 had strong foaming. Therefore, it was considered that the sprayed yeast settled on the fruits and promoted alcoholic fermentation. Culture and DNA-based microbiota analysis were performed on the wine sample obtained of 7 days after fermentation. By culturing, only *S. cerevisiae* 5 strains were finally isolated in the test plot #16, whereas *S. cerevisiae* 3 strains and *Penicillium gerundense* 4 strains were isolated and identified in Control plot #15. Therefore, it was considered that the yeast density at the start of fermentation increased in the test plot and suppressed the growth of mold. In DNA analysis, it was confirmed that the abundance of the sprayed yeast-derived fragment (962 bp) was 8 times higher in the test group #16 than in the control group #15.

When the immunoregulatory effect on macrophage cells was evaluated for 26 strains of 6 yeast species, only one commercially available *S. cerevisiae* strain showed an anti-inflammatory effect that suppresses LPS-induced NO production to 30% or less in the boiled extract of the yeast cells. In contrast, in the live yeast suspension, 14 strains of 3 species showed the same strong anti-inflammatory effect. No immunostimulatory activity as a NO production-promoting effect was observed in the case of the yeast boiled extract or the viable cell suspension under the conditions excluding LPS.

From the above results, the effect of the attempt to use the wild yeast isolated from the vineyard as a microbial pesticide against *B. cinerea* was confirmed from the results of the grape berries (*ex vivo*) test. Although the effectiveness against *B. cinerea* could not be statistically verified in the field (*in vivo*) test, the fact that the settled yeast increased the fermentability in naturally fermented wine and suppressed the growth of mold was shown in wine grapes. There is a possibility of practical use in

organic cultivation. Furthermore, the anti-inflammatory activity of live yeast cells on macrophage cells could be expanded the potential of yeast as a new probiotic, and expectations for its health-promoting effect could be increased in the near future.

謝辞

本研究の遂行にあたり、実験、データ解析および論文執筆のご指導を賜りました、酪農学園大学大学院酪農学研究科 山口昭弘教授、舩津保浩教授および大谷克城教授、ならびに4年にわたる共同研究にご協力いただき、貴重なご意見を賜りました、(㊦)栗澤ワインズ・KONDO ヴィンヤード 近藤良介氏に、深く謝意を表します。

最後に、本研究に際し、多方面で御協力頂きました、応用微生物学研究室 前野奈緒子氏、吉田訓子氏および研究室の皆様に、心より感謝します。

引用文献

- 1) 田村學造, 秋山裕一, 野白喜久雄, 小泉武夫 (1997). 酵母からのチャレンジ「応用酵母学」. 技報堂出版, 東京, pp.265.
- 2) 山本歩 (2010). 清酒醸造用野生酵母の桜花からの単離. 八戸工業高等専門学校紀要, **45**, 45–48.
- 3) Benito S. (2018). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 6775–6790.
- 4) 篠原隆 (1997). ワイン醸造環境における酵母相及び有用酵母株の選択育種. 日本ブドウ・ワイン学会誌, **8**(2), 119–126.
- 5) Pretscher, J., Fischkal, T., Branscheidt, S., Jäger, L., Kahl, S., Schlender, M., Thines, E. and Claus, H. (2018). Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. *Fermentation*, **4**(31), 1–17.
- 6) 農文協編 (2015). 果樹の病害虫診断事典. 第1版. 一般社団法人 農山漁村文化協会, 東京, pp. 病51.
- 7) 永山孝三, 渡辺哲, 熊倉和夫, 市川健, 牧野孝宏 (2007). イネ種子伝染性病害用微生物農薬トリコデルマ剤の開発. 日本農薬学会誌, **32**(2), 164–169.
- 8) 三澤知央, 野津あゆみ, 安岡眞二 (2014). トマト主要病害に対する微生物農薬の防除効果と同剤を活用した減化学合成農薬散布体系. 北海道立総合研究機構農試集報, **98**, 53–64.
- 9) Hashimoto, S., Kawamura, I., Nakajima, M. and Akutsu, K. (2012). Suppressive effects of some isolates of *Bacillus subtilis* var. natto against gray mold of strawberry. *J. Gen. Plant Pathol.*, **78**, 104–107 (橋本俊祐, 河村郁恵, 中島 雅己, 阿久津克己. 納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. natto) によるイチゴの灰色カビ病に対する抑制効果, 日本植物病理学会誌).
- 10) Shimura, Y., Agematsu, H., Takahashi, M., Kato, S., Sato, Y. and Matsuura, N., Inamoto, T (2020). Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* W-O-1A. *Akita Prefectural University web journal*, **8**, 62–68 (志村洋一郎, 上松仁, 高橋茉佑, 加藤蒼, 佐藤有里華, 松浦成美, 稲元民夫. *Bacillus amyloliquefaciens* W-O-1A 株の抗カビ活性に関する研究, 秋田県立大学ウェブジャーナル A)
- 11) Cao, J., Zhang, H., Yang, Q. and Rong, R. (2013). Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *Int. J. Food Microbiol.*, **162**, 167–173.
- 12) Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J. M. and Vinentini, I. (2017). Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Front Microbiol*, **3**, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02025>.
- 13) Gore-Lloyd, D., Sumann, I., Alexander O. Brachmann, A. O., Schneeberger, K., Ortiz-Merino, R. A., Moreno-Beltrán, M., Schläfli, M., Kirner, P., Kron, A. S., Rueda-Mejia, M. P., Somerville, V.,

- Kenneth H. Wolfe, K. H., Piel, J., Ahrens, C. H., Henk, D. and Freimoser, F. M. (2019). Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Mol. Microbiol.*, **112**(1), 317–332.
- 14) Hyakumachi, M., Takahashi, H., Matsubara, Y., Someya, N., Shimizu, M., Kobayashi, K. and Nishiguchi, M. (2014). Recent studies on biological control of plant diseases in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.*, **80**, 179–187 (百町満朗, 高橋英樹, 松原陽一, 染谷信孝, 清水将文, 小林括平, 西口正通. 最近のわが国における植物病害の生物防除研究, 日本植物病理学会誌).
- 15) Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B. and Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol.*, **35**, 154–173. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>.
- 16) Hudagula, Minami, N., Takahashi, S., Yoshida, K., Ryosuke Kondo, R., Yamaguchi, A. (2021) . Screening of wild yeast habitated in vineyard as a microbial pesticide candidate against grape gray Mold disease. *Nippon Shokuhin Kagaku kogaku Kaishi*, **68**(7), 328–338 (HUDAGULA, 南典子, 高橋宗一郎, 吉田訓子, 近藤良介, 山口昭弘. ブドウ灰色カビ病に対する微生物農薬としてのヴィンヤード野生酵母の探索, 食品科学工学会誌)
- 17) Maehata, H. and Murata, M. (2019). Immuno-modulating effects of *Lactobacillus paracasei* MCC1849 and application to food products. *Milk Science*, **68**(3), 180–187.
- 18) 三枝静江 (2012). 細胞培養系を用いた腸管における酵母の免疫応答刺激活性の解析. 東京農総研研報, **7**, 1–52.
- 19) 三枝静江, 細井知弘 (2005). 酵母が腸管上皮細胞の免疫応答に及ぼす作用. 日本醸造協会誌, **100**(8), 530–537.
- 20) 中川恭, 甲田哲之, 濱田弘一郎, 菅谷建作, 斎藤高雄 (2020). 乳酸菌 B240 の粘膜免疫サポート及び抗感染効果のコンディショニングフードとしての応用. 日本栄養・食糧学会誌, **73**(2), 55–60.
- 21) Hanai, M., Inaoka, A., Inoue, S. Kurosawa, A., Ksuya, K., Kansaki, K. and Esashi, T(deceased) (2013). Effect of baker's yeast-derived beta-glucan on defecation in female students. *Journal for the integrated study of dietary habits*, **24**(2), 98–104 (花井美保, 稲岡亜耶, 井上聖来, 黒澤明世, 糟谷健二, 神前健, 江指隆年(故人). パン酵母 β -グルカンの摂取が女子学生の排便状況に及ぼす影響, 日本食生活学会誌).
- 22) Suzuki, T., Nishikawa, K., Nakamura, S. and Suzuki, T. (2012). Research and development of β -1,3-1,6-glucan from black yeast for a functional food ingredient. *Journal of Applied Glycoscience*, **2**(1), 51–60 (鈴木利雄, 西川孝治, 中村誠司, 鈴木隆浩. 機能性食品素材に向けた黒酵母由来高純度 β -1,3-1,6-グルカンの開発, 応用糖質科学).
- 23) Souza, R. S., Diaz-Albiter, H. M., Dillon, V. M., Rod J. Dillon, R. J. and Genta, F. A. (2016). Digestion of yeasts and Beta-1,3-glucanases in mosquito larvae: physiological and biochemical considerations. *PLoS One.*, 1–16. DOI:10.1371/journal.pone.0151403

- 24) Tsuji, N., Huimin Yan., H. and Watanabe, Y. (2015). Gut to systemic immune-homeostasis mediated by innate signals. *The Japan Society for Clinical Immunology*, **38**(6), 448–456 (進典子, 閻会敏, 渡邊要平. 自然免疫シグナルによる腸管からの身体恒常性維持機構, 日本臨床免疫学会誌).
- 25) 小林和司 (2017). 「よくわかるブドウ栽培」, 第2版, 創森, 東京, pp.10.
- 26) Cabanas, C. M., Hernandez, A., Martinez, A., Tejero, P., Vazquez-Hernandez, M., Martin, A. and Ruiz-Moyano, S. (2020). Control of *Penicillium glabrum* by indigenous antagonistic yeast from vineyards. *Foods*, **9**, 1864-1886.
- 27) 木村教男, 岩橋福松. フェンピラザミンの作用特性と作用機作. 日本農薬学会誌, 2015, **40**(1), 1–6.
- 28) Chen, P. H., Chen, R. Y., and Chou, J. Y. (2018). Screening and evaluation of yeast antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*, **46**(1), 33–46 <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454013>
- 29) Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Munoz, C. J., Combina, M., Toro, M. E., Castellanos de Figueroa, L. I. and Vazquez, F. (2012). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticulture environments in Argentina. *Postharvest Biol. Technol.*, **64**, 40–48.
- 30) 高鳥浩介 (2009). カビ検査マニュアルカラー図譜. 第2版, テクノシステム, 東京, pp.320.
- 31) 高鳥浩介 (1988). わかりやすい真菌 (カビ) 検査法と汚染防止対策. 第2版, テクノシステム, 東京, pp.132–141.
- 32) Sholberg, P., Haag, P., Hocking, R. and Bedford, K. (2000). The use of vinegar vapor to reduce postharvest decay of harvested fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **35**(5), 898–903.
- 33) 大楠清文 (2012). 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. *モダンメディア*, **58**, 113–122.
- 34) Kobayashi, T., Nakamura, M., Uchiya, Y., and Yoshida S. (2002). Characterization of synthetic resins by MALDI-TOFMS. *DIC Technical Review*, **8**, 13–8 (小林恒夫, 仲村仁浩, 打矢裕己, 吉田聡. マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOFMS) 法による樹脂の構造解析, *DIC Technical Review*).
- 35) Sugawara, R., Yamada, S., Tu, Z., Sugawara, A., Hoshiba, T., Eisaka, S., Yamaguchi, A. (2016). Rapid and reliable species identification of wild mushrooms by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Analytica Chimica Acta*. **934**, 163–169.
- 36) 日本薬局法(JP16 改正) (2011). 遺伝子解析による微生物の迅速同定法. 2029–2031.
- 37) Imai, K., Yoneda, A., Osaka, I., Ishii, R. and Takano, M. (2014). Formation of trans - 1,3-pentadiene in off - flavor food. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*,

- 55, 210–215 (今井浩一, 米田 葵, 大坂郁恵, 石井里枝, 高野真理子. 異臭苦情食品から検出されたトランス-1,3-ペンタジエン発生要因の検討, 食品衛生学雑誌).
- 38) Narutaki, S., Takatori, K., Nishimura, H., Terashima, H., and Sakaki, T. (2002). Identification of fungi based on the nucleotide sequence homology of their internal spacer1 (ITS1) region. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, **56**, 90–98.
- 39) Masayama, A., Murakami, T., Sakuma, D., Ki, M., Yamano, T. and Shimizu, M. (2012). Discrimination of mushrooms causing food-poisoning incidents by using DNA sequence analysis. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **53**, 237–242 (昌山敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 紀雅美, 山野哲夫, 清水充. 食中毒原因究明のための遺伝子解析によるキノコ鑑別, 食品衛生学雑誌).
- 40) Sugawara, R., Yamada, S., Tu, Z. H., Sugawara, A., Hoshihara, T., Eisaka, S., and Yamaguchi, A. (2016). Identification of mushroom species by automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA) and its application to a suspected case of food poisoning with *Tricholoma ustale*. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, **57**, 37–45 (菅原諒太, 山田さゆみ, 涂志豪, 菅原明子, 干場敏博, 柴坂貞夫, 山口昭弘. 自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) によるキノコ種鑑別の検討とカキシメジによる食中毒疑い事例への適用の試み, 食品衛生学雑誌).
- 41) Simone, N. D., Pace, B., Grieco, F., Chimienti, M., Tyibilika, V., Santoro, V., Capozzi, V., Colelli, G., Spano, G. and Pasquale Russo, P. (2020). *Botrytis cinerea* and Table Grapes: A Review of the Main Physical, Chemical, and Bio-Based Control Treatments in Post-Harvest. *Foods*, **9**, 1138. doi:10.3390/foods9091138
- 42) 後藤昭二 (1985). ブドウ酒醸造微生物の進歩 (1). 日本醸造協会誌, **80** (6), 392–398.
- 43) 高橋宗一郎 (2021). 伝統容器クヴェヴリを用いた自然発酵ワインの醸造学的特性と品質管理. 博士論文.
- 44) Nagai, H., Miyake, N., Shinro Kato, S., Maekawa, D., noue, Y., and Takikawa, Y. (2020). Biological control of the bacterial spot of lettuce caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*, using a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain. *Ann. Rept. Kansai pl. prot.* **62**, 95–99 (*Xanthomonas* 属細菌によるレタス斑点細菌病の発病抑制, 関西病虫研報).
- 45) Keller, M., Viret, O., and Cole, F. M. (2003). *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology*, **93**(3), 316–322.
- 46) Kato-Kataoka, A. (2019). Relation between beneficial effects of probiotics and human gut microbiota. *The Intestinal Microbiology Society (IMS)*, **33**, 175–189 (加藤豪人. ヒトにおけるプロバイオティクスの有効性と腸内細菌叢との関わり, 腸内細菌学雑誌).
- 47) Ogata, T., Nakamura, T., Anjitsu, K., Yaeshima, T., Takahashi, S. Fukuwatari, Y., Ishibashi, N., Hayasawa, H., Fujisawa, T. and Iino, H. (1997). Effect of *bifidobacterium longum* BB536 administration on the intestinal environment, defecation frequency and fecal characteristics of

- human volunteers. *Bioscience microflora*, **16**(2), 53–58.
- 48) Iwabuchi, N. and Shimizu, K. (2010). Immuno-modulating effects of *bifidobacterium longum* BB536 and the mechanisms. *Milk Science*, **59**(3), 275–281.
- 49) Kang, C., Kim, J., Kim, H., Park, H. and Paek, N. (2021). Heat-killed lactic acid bacteria inhibit nitric oxide production via inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09781-9>.
- 50) Morita, N., Umemoto, E., Fujita, S., Hayashi, A., Kikuta, J., Kimura, I., Haneda, T., Imai, T., Inoue, A., Mimuro, H., Maeda, Y., Kayama, H., Okumura, R., Aoki, J., Okada, N., Kida, T., Ishii, M., Nabeshima, R. and Takeda, K. (2019). GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+cells by bacterial metabolites. *Nature*. 566, 110-114.
- 51) Monoi, N. and Sano, T. (2019). The sleep improving food material “Japanese Sake Yeast” and its application to “Foods with Function Claims”. *J. Oleo Sci.*, **19**(7), 291–297 (物井則幸, 佐野朋美. 清酒酵母による睡眠の質改善作用と機能性表示食品への応用, オレオサイエンス).
- 52) 伊藤実, 渡部俊弘, 丹羽光一 (2017). マクロファージの一酸化窒素産生に対するエミューオイルの効果. 東京農大農学集報, **61** (4), 142–146.
- 53) Murphy, K., Paul Travers, P. and Walport, M. (2010). Janeway’s 免疫生物学. 原書第7版, 南江堂, 東京. pp.10–11, **58**, 370.
- 54) Kido, T., Fukuda, K., Ogata, T., Ueki, T., Yamamoto, M. and Endo, T. (1994). Suppressive effect of an aqueous extract of *Seutella-riae radix* on the nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *J. Inflamm (Lond)*, **14**(3), 221–227 (木戸敏孝, 福田一典, 緒形孝弘, 植木俊之, 山本雅浩, 遠藤徹. LPS 刺激マクロファージの一酸化窒素産生に対する黄芩水エキスによる抑制効果と活性成分の検討, 日本炎症学会誌ジャーナル).
- 55) 青木玲二 (2007). マクロファージを用いた NO 産生の簡易評価. 日本食品科学工学会, 食品機能性評価マニュアル集第II集, 118–123.
- 56) 宝寄山裕直, 野田遊 (2003). マクロファージ系培養細胞を用いた鶏卵由来成分の免疫賦活機能評価法. 北海道立畜産試験場研究報告, **25**, 16–23.
- 57) Yamada, S., Tanaka, M., Miura, R., Takeuchi, C., Tu, Z., Hudagula, Matsuoka, K., Sugawara, R., Hoshiya, T. and Yamaguchi, A. (2019). Anti-Inflammatory and antimicrobial activities of aqueous extracts of wild mushrooms from Japan. *Int. J. Mushrooms*, **21**(5), 469–486.
- 58) Yamada, S., Tu, Z. H., Sugawara, R., Yamauchi, M., Yamada, M., Nagai, T., Koreeda, S., Watari, Y., Yagi, F., Yamaguchi, T. and Yamaguchi, A. (2016). Effects of cultivation of *Auricularia polytricha* (Cloud Ear Mushroom) by elaborate media including fermented bagasse and brown sugar shochu lees on *in vitro* functional properties. *Science Journal ROH*, (山田さゆみ, 塗志豪, 菅原諒太, 山内正仁, 山田正義, 永井武, 是枝清上, 渡慶彦, 八木史郎, 山口隆司, 山口昭弘. 発酵バガスおよび黒糖焼酎粕を含む培地で栽培によるアラゲキクラゲ (*Auricularia polytricha*) の *in vitro* 機能性への影響).

- 59) Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Mellinger, C. G., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. (2006). Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*, **67**, 2189-2196.

