

2017年度 生物工学技術賞 受賞

好熱性微生物を活用した未利用バイオマス資源からの
高機能性発酵製品の製造と学術的解明

宮本 浩邦^{1,2,3,4*}・宮本 久⁵・田代 幸寛⁶・酒井 謙二⁶・児玉 浩明^{1,3}

Studies on highly functional fermented-products made from
unutilized biomass resources by thermophilic bacteria

Hirokuni Miyamoto^{1,2,3,4*}, Hisashi Miyamoto⁵, Yukihiko Tashiro⁶, Kenji Sakai⁶, Hiroaki Kodama^{1,3} (¹Graduate School of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Chiba 271-8510, ²Laboratory for Intestinal Ecosystem, RIKEN IMS, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 271-8501, ³Sermas Co., Ltd., 2-8-8 Ichikawaminami, Ichikawa-city, Chiba 272-0033, ⁴Japan Eco-science Co., Ltd. (Nikkan Kagaku), 11-1 Shiomigaoka-chou, Chiba, 260-0034, ⁵Miroku Co. Ltd., 706-27 Oowaza Iwaya, Kitsuki, Oita 873-0021, ⁶Laboratory of Soil and Environmental Microbiology, Division of Systems Bioengineering, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School of Bioresources and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan) *Seibutsu-kogaku* **96**: 56-63, 2016.



はじめに

自然環境では、微生物-植物-動物がさまざまな形で共生関係にあり、一つひとつの生命の営みとともに、生態系全体を支えている。たとえば、土壌には、1グラムあたり数十億個を超える細菌が存在しており^{1,2}、その種類は100万種を超えるといわれている³。このような土壌において植物は生育し、根圏微生物、ならびに植物の体内や体外に生息する微生物群（エンドファイト、エピファイト）をも抱え⁴、植物体としては、微生物-植物の共生系を形成している。動物も同様のことがいえる。近年、進展している腸内細菌の研究においては、ヒトの腸内に生息している微生物群、いわゆる腸内フローラを形成する細菌群が、数百種類の細菌からなり、ヒトの細胞数37兆個⁵よりも多く、少なくとも40兆個以上が共

生している可能性があることが明らかになっている⁴。Lederbergは、これらの宿主と細菌の共生する様を捉えて、「superorganism」として表現している⁶。和訳するならば、「超生命体」であり、植物も動物も同じ見方として捉えることができる。一方、Wallらは、土壌の微生物群の多様性が、ヒトの健康に有益であることを提唱しているが⁶、動植物が「超生命体」であると捉えた時には、自然界の微生物の様相とその相互作用のあり方がいかに重要であるかが推察される。

人類が自然界の微生物を利用してきた歴史における代表的な事例として、酵母、乳酸菌、枯草菌（納豆菌）に代表される常温領域で活動する中温菌を活用した発酵食品があげられる。これらの中温菌に関わる研究については、多くの研究者による国内外の研究成果が集積し、今なおさまざまな研究開発が進められている（図1a）。一

著者紹介 ¹千葉大学, ²理化学研究所, ³(株)サーマス, ⁴日環科学(株), ⁵(株)三六九, ⁶九州大学
*連絡先 E-mail: h-miyamoto@faculty.chiba-u.jp, hirokuni.miyamoto@riken.jp, h-miyamoto@sermas.co.jp

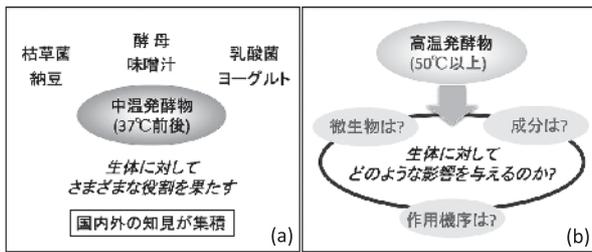


図1. 中温発酵物と高温発酵物について

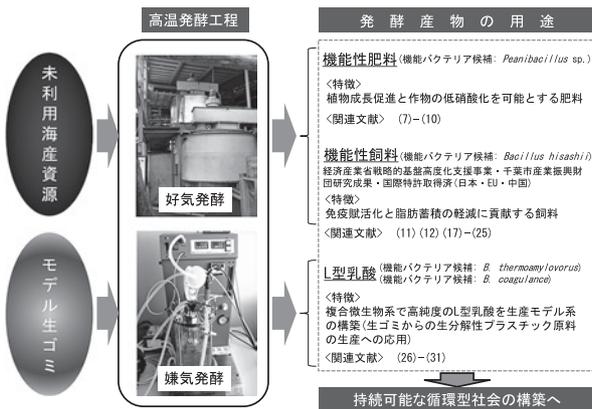


図2. 本研究の概要

方、これらの中温菌以外にも、環境中にはさまざまな微生物が存在している。それらの環境微生物自体の単一菌としての機能、あるいはその機能分子の利用研究は数多くあるが、それら環境微生物群の生態系における役割を探り、かつ産業に役立てた研究成果は意外に少ない。その中で、筆者らが取り組んできた研究は、50°C以上の高い温度領域で活動する極限環境微生物の一つである好熱性微生物群集が、動植物にどのような影響を与えるのか、その作用機序の解明であった(図1b)。20年以上に及ぶ研究開発の結果、動植物の健全化の管理に役立つ機能性肥・飼料、ならびに環境負荷の少ない生分解性プラスチックの製造に関わる新しい基幹技術の開発に至った(図2)。

研究の着手段階

1980年代より、植物の成長に寄与する堆肥の生産をするために、独自のfed-batch式の閉鎖系発酵槽で連続発酵する技術開発を進めた。原材料としては、未利用の海産資源、特に食用にならずに、漁港などで廃棄される小魚や甲殻類などを活用した。当初は、ヒーターによって加熱可能な発酵槽において発酵試験を実施したが、原材料の配合率などの調整によってヒーターをつけずに微生物自体の発熱によって速やかに70–80°Cの発酵温度となることが明らかになった。そこで発酵工程に貢献す

る微生物を評価するために、微生物の単離試験が始まった。原材料の一部となっている甲殻類に着目し、甲殻類が持つキチン質を分解する菌を採取することが最初の研究のターゲットとなった。キチン質としてコロイダルキチンを添加した選択培地を活用し、発酵物から耐熱性キチン分解酵素を有する好熱性細菌*Bacillus* sp. CH-4株、ならびにMH-1株を単離することに成功し、これらの菌群が産生する複数種の耐熱性キチン分解酵素の同定に成功した^{7,8)}。CH-4株が産生するキチン分解酵素は、至適温度が75°Cのエキソキチナーゼであり、キチンオリゴマーを還元末端から加水分解すると同時に、*N*-アセチルガラクトサミニドも加水分解することから、β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼに属する酵素であった⁷⁾。MH-1株が産生するキチン分解酵素は、3種類のエンドキチナーゼ(L, M, S)であり、これらの質量は、71, 62, 53 kDaで、それぞれの至適温度は75, 65, 75°Cであった。これらの酵素群は、基質認識が異なっていたが、*n* = 2~3のキチンオリゴマーを生成する性質を有していた⁸⁾。2000年に入り、これらの発酵物の発酵工程を当時最新の複合微生物の評価法であったPCR-DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)法などを用いて検証し(図3)、発酵工程から管理したうえで安定な菌叢となるように発酵物を調製し、そのうえで動植物に与える影響に関する研究を進めた。また、併せて動物の腸内で有効な機能を有する発酵物中の機能性乳酸菌、特に腸内と同じ嫌気条件下で生育できる菌を見いだすためにMRS培地を用いた試験を実施し、*B. coagulans*の近縁株を単離同定した。さらに、まだ培養できない未知の菌群を含めた好熱性複合菌をAmerican Type Culture Collection(ATCC)に国際寄託し(寄託番号PTA-1773)、特許申請をしたうえで、これらの安定な高温発酵物の菌叢の詳細な解析を進めた。その結果、発酵物は*B. thermocloacae*と*B. thermoamylovorans*などを中心とした好熱性芽胞菌群で構成されていることが明らかとなった⁹⁾。

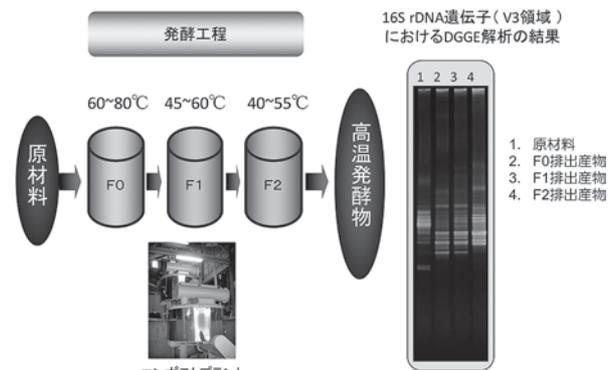


図3. 好気性高温発酵工程における菌叢変化

高機能肥料化とその作用機序の解明

これらの好気下で高温発酵した発酵物は、植物の成長に寄与する肥料として活用できることが植物生育試験の結果、明らかとなっていた。そこで、発酵物に含まれている植物成長促進根圏微生物 (plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR) の単離が進められた。その中で、植物病原性糸状菌である *Fusarium* 属菌に対して静菌作用を有する *Bacillus* sp. NP-1 株の単離に成功した (図4a)。 *Bacillus* sp. NP-1 株は、*B. subtilis* と *B. polyfermenticus* の近縁種であり、抗菌物質候補として環状リポペチドを生産していることが明らかになった⁹⁾。また、あらかじめ当該菌溶液を pH あるいは温度を変えてから静菌効果を調べた結果、pH に対して安定性が高く (図4b)、pH 12 では阻止円の形成における力価は約40%低くなるものの、pH 2 では、約20%が落ちる程度で、基本的に酸にもアルカリにも強い傾向を示した。同様に温度に対しても安定性が高く、121°C 条件下においても約20%力価が落ちる程度であった。さらに、当該高温発酵物の土壌への施用は、作物を成長させるにもかかわらず作物中の硝酸濃度を低減化させる傾向があった (図5a, b)。一般

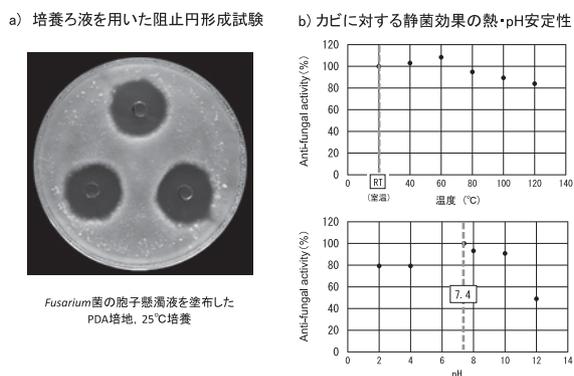


図4. 抗カビ活性物質とその安定性の評価

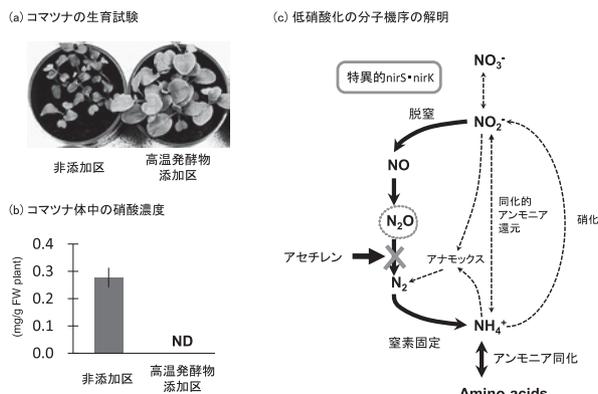


図5. 高温発酵物の施用による作物の低硝酸化と成長促進

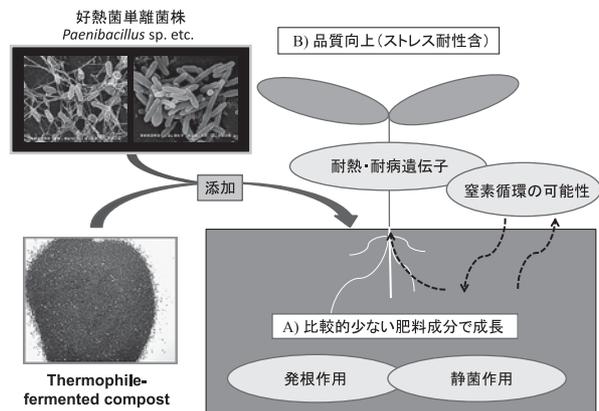


図6. 好熱菌を含む高温発酵物が植物の生育に与える影響評価 (概念図)

的に、窒素系化学肥料を用いて作物が成長する際には、作物中の硝酸濃度が増えるため、高温発酵物に特徴的な作用機序の解明が求められた。さまざまな窒素制御の過程を調べた結果、土壌中の脱窒反応が特徴的であることが明らかになった。すなわち、 N_2O (一酸化二窒素) $\rightarrow N_2$ (窒素) の反応をブロックするアセチレンを用いて土壌からの脱窒過程を調べた結果 (アセチレンブロック法)、当該高温発酵物の施用により土壌からの脱窒反応が促進し、それによって作物体に吸収される窒素化合物の量が減少し、結果として過剰な硝酸が蓄積しないことが証明された。また、この過程では、脱窒に関わる遺伝子群のうち、亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase) の一つである *nirS* と *niK* の遺伝子配列において、特徴的な遺伝子断片がPCR-DGGE法によって検出されたため、これらの亜硝酸還元酵素が脱窒反応に関与していることが示唆された¹⁰⁾。このように植物体中の硝酸濃度の調節機構の一部は明らかになったものの、脱窒反応だけでは、高温発酵物が作物の成長を促進する機能とは相反するデータであるため、植物の成長に寄与する微生物の単離が進められた。その結果、窒素固定遺伝子を有する複数種の *Paenibacillus* sp. を単離することに成功し、国際特許申請を実施した (PCT/JP2013/67907)。以上の結果から、当該高温発酵物の土壌への施用によって、図5cの太字実線で示したようなアンモニア同化反応が進み、植物が成長しうることが示唆された。さらに、DNAマイクロアレイの解析データなどから、図6で示したようないくつかの作用によって、植物の生育が制御されている可能性が示唆されており、現在、これらの仮説を含めて当該高温発酵物の機能について詳細な解析を進めている。

高機能飼料化とその作用機序の解明

好気高温発酵物を豚や採卵鶏に与えると、これらの排

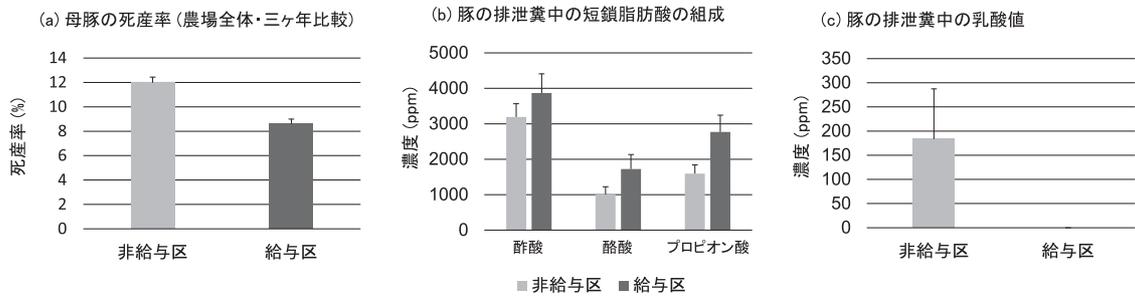


図7. 好熱菌を含む高温発酵物が豚の出産数，死産数，ならびに排泄糞中の短鎖脂肪酸，乳酸の組成に与える影響評価

排泄物の臭気が軽減するとともに，豚舎内での豚の落ち着き度合いや鶏卵の状態が改善する傾向があることが確認されていた。そこで，当該発酵物を液状にし，飲水添加によって豚に継続的に給与する試験が合計6か年の間，2か所の農場において実施された¹¹⁾。発酵液を継続給与した農場の疫学調査では，母豚1頭あたりの出産数は約12頭で，非給与区と給与区は同程度であった。しかしながら，死産率は約30%減少した(図7a) ($p < 0.0001$)。この時，同じ母豚の糞中の有機酸組成を解析した結果，酢酸，酪酸，プロピオン酸などの短鎖脂肪酸は，有意差はないものの，給与後に増加傾向が確認された(図7b)¹²⁾。近年，酢酸や酪酸は，腸内の生体防御機能を担う主要な分子であることが明らかになっており，興味深い知見である^{13,14)}。さらに，有機酸組成の特徴としては，排泄糞中の乳酸濃度が有意に低くなった(図7c)。このような傾向は，採卵鶏においても確認されている。図8に示したように，産卵率が改善するとともに，鶏の老齢化に伴って増加する卵の肥大化が抑制される傾向が確認された。そして，これらの鶏の排泄物の有機酸組成を調べた結果，豚同様に高温発酵物溶液を給与した鶏の排泄糞中の乳酸濃度が減少していた。健康な動物の排泄糞中の乳酸濃度は低レベルか，検出されないことが知られている^{15,16)}。このような時には，乳酸を酢酸や酪酸などの有用な有機酸に変換可能な乳酸資化菌が機能しうる¹²⁾。そこで，豚においては乳酸資化菌の機能を探索することを目的として，乳酸資化菌の一つである *Megasphaera elsdenii* の選択培地の構築を進めた¹⁷⁾。その結果，豚において特徴的な *M. elsdenii* の単離にすでに成功している。さらに，一般的に用いられている抗生物質，乳酸菌，酵母，枯草菌に対する上乗せ効果も確認されている。これらの成果を踏まえて，高温発酵物の給与後の家畜・家禽類に認められる飼育成績や環境負荷低減(糞臭の軽減と堆肥の発酵促進)と宿主側の腸内フローラとの関係がさらに明らかになると思われる(図9)。

高温発酵物が動物に与える影響については，げっ歯類を用いたモデル動物を用いた研究も並行して進められて

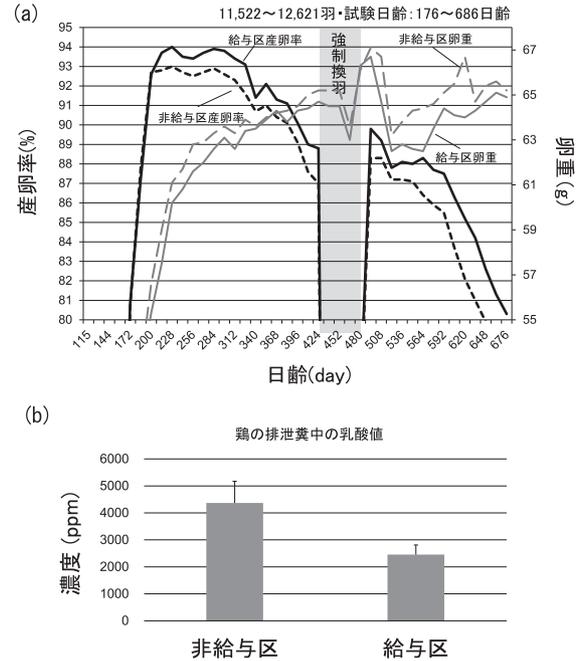


図8. (a) 高温発酵物溶液が採卵鶏の飼育成績，(b) 高温発酵物溶液が採卵鶏の排泄糞中の乳酸値に与える影響評価。

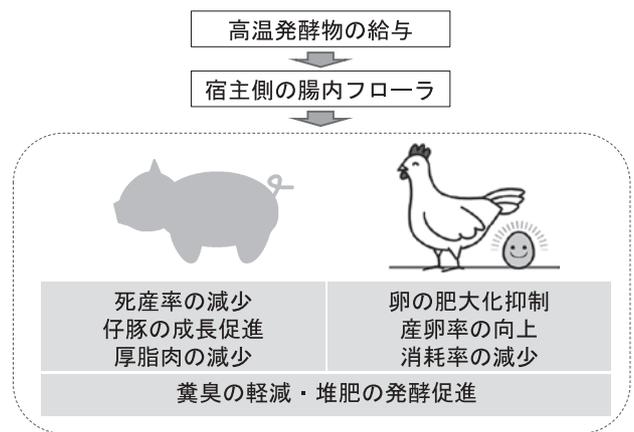


図9. 高温発酵物が家畜・家禽類の腸内フローラと飼育成績に与える影響評価

きた。マウスやラットを用いた試験では，高温発酵物給与後の腸内フローラや腸管の発現遺伝子，ならびにタン

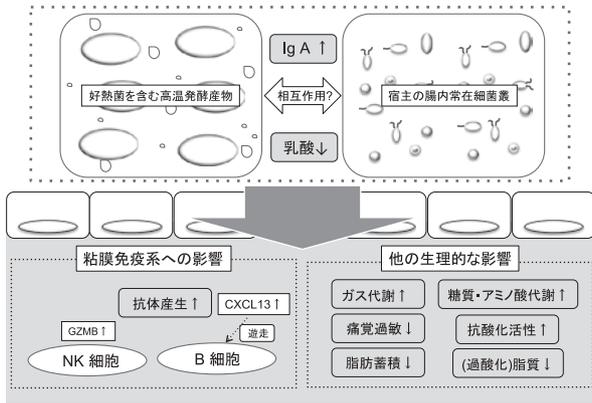
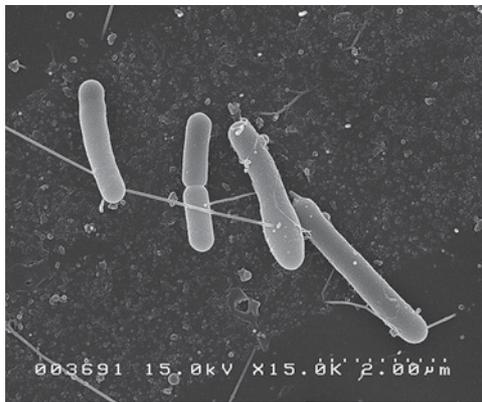


図10. 高温発酵物が動物の腸内環境に与える影響（概念図）



国際寄託番号: BP-863 (NITE)
千葉市産業振興財団・産学共同研究事業研究成果
図11. *Bacillus hisashii* N11^T (BP-863) の発見

パクレベルの解析を実施しており、粘膜免疫系に与える影響を明らかにしている(図10)¹⁸⁾。B細胞やNK細胞の活性化とともに、分泌型IgAの産生促進が確認されており¹⁸⁾、他の生理作用としても、肝臓や筋肉における過酸化脂質の低減や抗酸化活性の増加が確認されている¹⁹⁾。また、ガス代謝や糖質、アミノ酸代謝レベルへの影響など多彩な機能が示唆されている。一方で、フィルター滅菌した高温発酵液は十分な効果を発揮できなかったため、これらの生理的機能は、高温発酵物中の生菌によってもたらされることが推察された。そこで、無菌マウスに高温発酵液を給与したノトバイオートを構築し、盲腸内に生着性のある好熱菌群の単離試験を実施した。その結果、ヤシ酒の発酵微生物*B. thermoamylovorance*の近縁菌、ならびに有孢子性の乳酸菌*B. coagulans*などの複数種の好熱菌、耐熱菌群が単離された²⁰⁾。中でも、前者は標準菌株とのDNA-DNAハイブリダイゼーションなどの結果に基づいて、新菌種として*B. hisashii*と命名された(図11)²¹⁾。また、当該菌株は、内臓脂肪の蓄積軽減効果も有することから(図12)²²⁾、当該菌株を国際寄

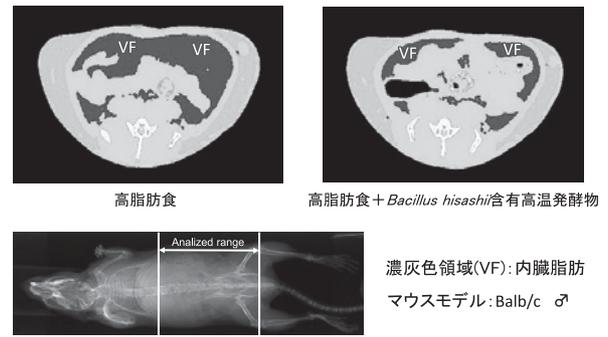


図12. 高脂肪食条件下のマウスのCTスキャン画像

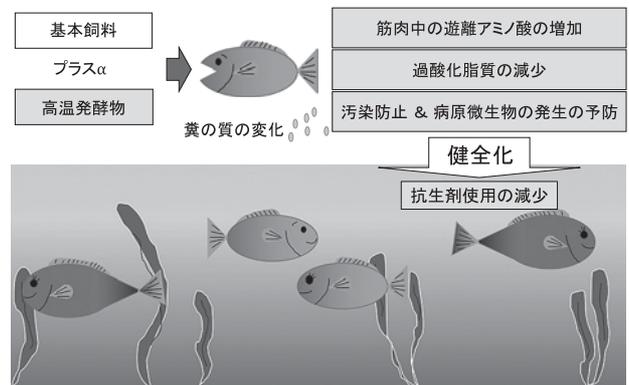


図13. 高温発酵物が魚類の飼育成績に与える影響

託するとともに(NITE国際寄託番号BP-863)、国際特許取得のためPCT出願し、現在、日本、中国、EUにおいて特許の権利化を実現させている²³⁾。

なお、高温発酵物の飼料としての適用は、魚類でも試されている。ヒラメ、真鯛、鯉をモデルとした研究において効能が確認されており^{22,24,25)}、特に筋肉中の遊離アミノ酸の増加、過酸化脂質の減少、病原菌であるエドワジエラに対する抗病性などが報告されている(図13)。今後、魚類に効果を示す優占菌群の同定やその作用機序を解明する試験を実施予定である。

食品廃棄物からの高光学活性L-乳酸の生産

前述のように、好気高温発酵物には、種々の*Bacillus*属細菌が含まれていることが明らかとなっているが、実際に効果を発揮している環境(土壌中・腸内)は、嫌気的条件である。そこで同時並行で、嫌気発酵における発酵物の機能の検証を進めていた。栄養源として標準生ゴミを用いて、発酵物を接種し、温度30–65°Cで、10%アンモニア水で24hごとにpH7.0へと調整して回分発酵を行った結果、30°Cおよび37°Cでは、全生産物に対する割合として75.5–80.5%で酪酸を生産することが明らかとなった(図14)。前述のように、動物の腸内にお

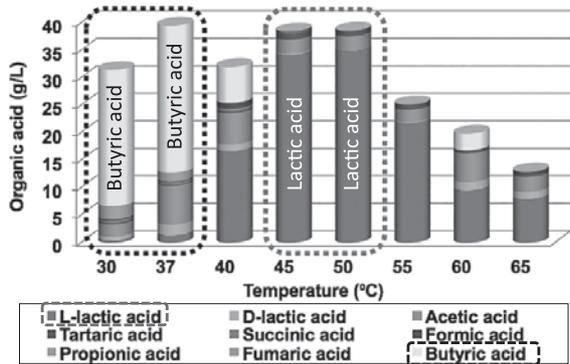


図14. 好熱菌複合菌を用いた食品廃棄物からの高純度L型乳酸の生産特性

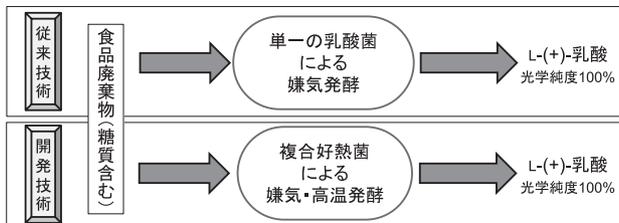


図15. 好熱菌複合菌を活用した高純度L型乳酸の生産技術

ける酪酸の役割は認知されており¹⁴⁾、腸内免疫において大きな役割を担う制御性T細胞 (Treg) の誘導に関わっていることから、発酵物の生理的作用を考慮するにあたって興味深い知見と言えた。次に、制御温度の上昇に伴う有機酸産生能の挙動を観察した結果、酪酸生産濃度が減少し、L-乳酸生産にシフトしていた。生産量としては、50°CでL-乳酸生産濃度が最大となり、選択性91.6%の最大値を示すとともに複合微生物による乳酸発酵の中では、初めてL-乳酸光学純度100%を達成した(図15)。さらに、PCR-DGGE法による細菌群集構造解析の結果、*B. coagulans*細菌がL-乳酸生産に寄与していることが明らかとなった²⁶⁾。近年、生分解性プラスチックであるポリ乳酸の原料として、光学活性乳酸 (L-乳酸またはD-乳酸) 生産に関する研究が精力的に行われているが²⁷⁾、筆者らは当該高温発酵物を複合微生物種菌として活用することによって、食品廃棄物からの高機能性製品への変換が可能であることを示唆したことになる。次に、これらの生産効率をさらに向上させるために、いくつかの仮説を立てて検証した結果、発酵初期の低pH化の制御が乳酸生産において重要であることが明らかとなり、新たなpH切替制御法 (pH振動制御→一定制御) を確立し、pH振動制御法と比較して最高のパフォーマンス (発酵時間、360%短縮; L-乳酸生産濃度、57%向上; 乳酸選択性、10%向上; 乳酸生産性、630%向上; L-乳酸光学純度、100%) を得ることができた²⁸⁾。

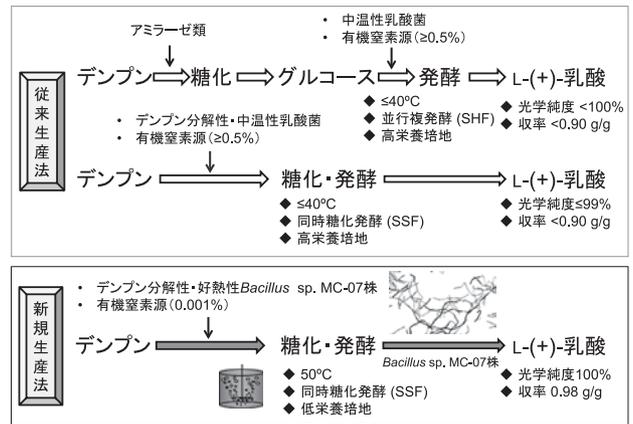


図16. デンプン分解能を有する新規好熱性*Bacillus* sp. によるL型乳酸生産プロセス

さらに、高温発酵物中の機能性バクテリアの分離試験を実施したところ、グラム染色陽性・内生孢子形成・通性嫌気性の耐熱性桿菌である*Bacillus* sp. MO-04株を見いだした。本株は*B. thermolactis* R-6488^Tと99.4%の高い相同性 (16S rRNA 遺伝子配列) を示したものの、系統分類解析と形状により、新種*B. kokeshiiformis* sp. nov. MO-04^Tを提唱した²⁹⁾。さらに、新たに分離された*Bacillus* sp. MC-07株は*B. thermoamylovorans* LMG18084^Tと99.2% (16S rRNA 遺伝子配列) の相同性を示し、デンプン分解性・好熱性 (最適増殖温度50°C, 最高増殖温度62°C) のL-乳酸生産細菌であった。発酵温度50°Cで振動制御法によるpHの影響を検討した結果、MC-07株およびLMG18084^T株の両株ともpH 7.0で最大乳酸生産濃度を示したが、MC-07株はLMG18084^T株よりも高い乳酸生産能 [光学純度, 100%; 生産濃度, 16.6 g/L; 選択性, 92.1%; 収率, 0.977 g/g; 生産性, 0.701 g/(L·h)] を示した。さらに、MC-07株はわずか0.001% (w/v)有機窒素源含有培地で乳酸生産が可能であった。これらの結果は、MC-07株を用いた培養系が、糖化酵素を用いず、安価な培地でデンプン質バイオマスからの直接L-乳酸に高温下で変換できる系であることを示唆している(図16)³⁰⁾。本研究は高温下における食品廃棄物からの高効率な光学活性L-乳酸生産プロセス技術を開発しただけではなく、複合微生物による発酵工学研究の新しい発想・基盤となり得るものである。

複合微生物系における標的微生物の新たな分離法の開発

自然界では、90%以上もの難培養の微生物が存在しているが、近年の遺伝子解析技術の発展に伴い、微生物を単離することなく生態系、環境や発酵プロセスを評価するために、複合微生物系における微生物群集構造、メタゲノムやトランスクリプトーム解析などの利用が可能

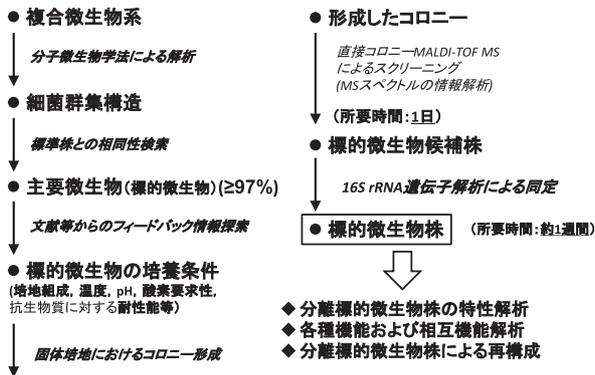


図17. 複合微生物系から標的微生物分離のための体系的フィードバック分離法

となった。一方、難培養性、あるいは未同定の微生物を分離できれば、株レベルで基礎的な微生物特性（増殖条件、基質特異性など）を知ることができ、各微生物の機能や微生物間の相互機能も直接証明できる。さらに、単離微生物群を用いて発酵プロセスの再構成や改良・向上も可能となることから、複合微生物系からの標的微生物の分離はきわめて重要である。

標的微生物の純粋分離が困難である理由として、①培養条件の不適當な微生物が固体培地で増殖（コロニーを形成）しない、②分離微生物の同定に時間と労力を要する（1週間程度）うえに、同定結果から標的微生物でないことが多い、などが考えられる。換言すれば、コロニー形成効率を向上し、標的微生物類縁菌を迅速にスクリーニングできれば、高効率かつ迅速な分離法となり得る。そこで、複合微生物系の標的微生物をスクリーニングし分離する新しい方法として、『体系的フィードバック分離法』を考案した(図17)。要約すれば、標的微生物が増殖できる培養条件を文献情報から分離条件にフィードバックし、得られたコロニーを直接コロニーMALDI-TOF MSに供して、対象株（たとえば標的微生物の基準株）とのMSスペクトルの類似性から標的微生物候補株をスクリーニングする手順である。体系的フィードバック分離法により、高温発酵物中の複合微生物系による発酵プロセスから標的細菌3種と標的細菌と類縁である3種の分離に成功し、本分離法の有効性を確認することができた³¹⁾。今後、本分離法は、自然環境の複合微生物系の評価をさらに詳細に実施する過程の手順の一つとして活用可能であると捉えている。

おわりに

本技術は、好熱性微生物を活用した発酵産物が、1) 化学肥料、農薬、抗生物質などの過剰な薬剤の使用を避けながら農畜水産業の生産効率を向上させる機能性肥



図18. 好熱菌、ならびに高温発酵物を活用した社会貢献の事例

飼料として活用できるとともに、2) 生分解性プラスチック原料のL型乳酸を生ゴミから高効率に生産可能であることを示している。当該技術は、その開発の過程で得られた知見を含めて、持続可能な循環型社会の構築、ならびに国連が提唱している「持続可能な開発目標 (SDGs)」のためにも次世代に貢献できる技術シーズであると言える。発酵肥・飼料としての利用については、現在では多くの製品の原料の一部として用いられている。循環型農業を構築するための発酵資材としての利用や畜産製品のブランド化についても一翼を担っている(図18)。今後、さらなる技術開発によって社会貢献できることを期待してさらなる研究の進展を図っている。

謝 辞

ベンチャー企業と大学との間で培われた20年以上にわたる産学連携研究の成果をご評価いただきまして感謝申し上げます。本賞の研究成果に至る過程では、榎本重男氏（都路グループ会長）をはじめ従業員の皆様には、循環型社会の構築のためのフィールド試験の場をご提供いただき、多岐にわたるご支援を頂きました。心より御礼申し上げます。また、新規事業化の推進のためにご支援いただいた京葉ガス（株）と京葉プラントエンジニアリング（株）の歴代の社長の皆様、役員、ならびに関係者の皆様に深謝申し上げます。その結果として、産学連携型の千葉大学発ベンチャー・（株）サーマスの設立に至り、本受賞に至りました。基礎研究においては、さまざまなアドバイスをいただいた石村巽先生（慶應義塾大学・名誉教授、サーマス最高顧問）、末松誠先生（慶應義塾大学・元医学部長、客員教授）、ノトバイオート試験の遂行にお力添えを頂いた伊藤喜久治先生（東京大学・元教授）、微生物の単離法において技術指導していただいた堀内三吉先生（東京医科歯科大学医学部講師）、モデル動物試験における検証にご協力いただいた松下映夫先生（水産大学校元教授・サーマス最高顧問）、DNAマイクロアレイの解析にご協力いただいた西内巧先生（金沢大学准教授）、近年のオミクス解析でご協力いただいた服部正平先生（早稲田大学教授）、大野博司先生（理化学研究所IMSグループディレクター）、ならびに福田真嗣先

生（慶應義塾大学准教授）に厚く御礼申し上げます。その他、さまざまな形でご支援、ご協力いただきました皆様に心より感謝申し上げます。最後に、研究資金のご支援を賜りました千葉市産業振興財団産学共同事業、経済産業省・戦略的基盤高度化支援事業、農林水産省・地域食料産業等再生のための研究開発等支援事業、独立行政法人科学技術振興機構、全国中小企業団体中央会ものづくり・商業・サービス革新事業における担当者、関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Faegri, A., Torsvik, V. I., and Goksoyr, J.: *Soil Biol. Biochem.*, **9**, 105–112 (1977).
- 2) Torsvi, V., Goksoyr, J., and Daae, D. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 782–787 (1990).
- 3) Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J.: *Science*, **309**, 1387–1390 (2005).
- 4) 宮本浩邦（大野博司 編）：共生微生物－生物と密接に関わるミクロな生命体，p. 247–256，化学同人（2016）。
- 5) Eva Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M. C., Tasani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P., and Canaider, S.: *Ann. Hum. Biol.*, **40**, 463–471 (2013).
- 6) Lederberg, J.: *Science*, **288**, 287 (2000).
- 7) Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M., and Moriguchi, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3397–3402 (1994).
- 8) Sakai, K., Okota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M., and Moriguchi, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3397–3402 (1998).
- 9) Niisawa, C., Oka, S., Kodama, H., Hirai, M., Kumagai, Y., Mori, K., Matsumoto, J., Miyamoto, H., and Miyamoto, H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **54**, 149–158 (2008).
- 10) Ishikawa, K., Ohmori, T., Miyamoto, H., Ito, T., Kumagai, Y., Sonoda, M., Matsumoto, J., Miyamoto, H., and Kodama, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 1349–1359 (2013).
- 11) Miyamoto, H., Kodama, H., Udagawa, M., Mori, K., Matsumoto, J., Oosaki, H., Oosaki, T., Ishizeki, M., Ishizeki, D., Tanaka, R., Matsushita, T., Kurihara, Y., and Miyamoto, H.: *Res. Vet. Sci.*, **93**, 137–142 (2012).
- 12) Ito, T., Miyamoto, H., Kumagai, Y., Udagawa, M., Shinmyo, T., Mori, K., Ogawa, K., Miyamoto, H., and Kodama, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 659–664 (2016).
- 13) Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., and Ohno, H.: *Nature*, **469**, 543–547 (2011).
- 14) Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., and Ohno, H.: *Nature*, **504**, 446–450 (2013).
- 15) Belenguer, A., Duncan, S. H., Holtrop, G., Anderson, S. E., Lobley, G. E., and Flint, H. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, e6526–e6533 (2007).
- 16) Duncan, S. H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A. M., Flint, H. J., and Lobley, G. E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, e1073–e1078 (2007).
- 17) Kajihara, Y., Yoshikawa, S., Cho, Y., Ito, T., Miyamoto, H., and Kodama, H.: *Anaerobe*, **48**, 160–164 (2017).
- 18) Satoh, T., Nishiuchi, T., Naito, T., Matsushita, T., Kodama, H., Miyamoto, H., and Miyamoto, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 500–505 (2012).
- 19) Miyamoto, H., Shimada, E., Satoh, T., Tanaka, R., Oshima, K., Suda, W., Fukuda, S., Nishiuchi, T., Matsuura, M., Mori, K., Miyamoto, H., Ohno, H., Hattori, M., Kodama, H., and Matsushita, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 203–208 (2013).
- 20) Miyamoto, H., Seta, M., Horiuchi, S., Iwasawa, Y., Naito, T., Nishida, A., Miyamoto, H., Matsushita, T., Itoh, K., and Kodama, H.: *J. Appl. Microbiol.*, **114**, 1147–1157 (2013).
- 21) Nishida, A., Miyamoto, H., Horiuchi, S., Watanabe, R., Morita, H., Fukuda, S., Ohno, H., Ichinose, S., Miyamoto, H., and Kodama, H.: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **65**, 3944–3949 (2016).
- 22) 経済産業省・21–22年戦略的基盤高度化支援事業報告書（関東経済産業局編）
- 23) 国際出願番号：PCT/JP2011/52735「好熱性微生物を用いた混合物，溶解液，及び医薬品」特許番号：（国内）：[特許第5578375号]（中国）：[ZL2011 8 0009184.2]（EU）：[No.2556835]
- 24) Tanaka, R., Miyamoto, H., Kodama, H., Kawachi, N., Udagawa, M., Miyamoto, H., and Matsushita, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **56**, 61–65 (2010).
- 25) Tanaka, R., Miyamoto, H., Inoue, S., Shigeta, K., Kondo, M., Itoh, T., Kodama, H., Miyamoto, H., and Matsushita, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 530–535 (2016).
- 26) Tashiro, Y., Matsumoto, H., Miyamoto, H., Okugawa, Y., Pramod, P., Miyamoto, H., and Sakai, K.: *Bioresour. Technol.*, **146**, 672–681 (2013).
- 27) Poudel, P., Tashiro, Y., and Sakai, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 642–654 (2016).
- 28) Tashiro, Y., Inokuchi, S., Poudel, P., Okugawa, Y., Miyamoto, H., Miyamoto, H., and Sakai, K.: *Bioresour. Technol.*, **216**, 52–59 (2016).
- 29) Poudel, P., Miyamoto, H., Miyamoto, H., Okugawa, Y., Tashiro, Y., and Sakai, K.: *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **64**, 2668–2674 (2014).
- 30) Poudel, P., Tashiro, Y., Miyamoto, H., Miyamoto, H., Okugawa, Y., and Sakai, K.: *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 143–149 (2015).
- 31) Poudel, P., Tashiro, Y., Miyamoto, H., Miyamoto, H., Okugawa, Y., and Sakai, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 63–70 (2017).