総 説

伝統発酵にみる微生物の共生と進化

森永 康^{*}、平山 悟、古川 壮一

日本大学生物資源科学部食品生命学科

伝統発酵食品福山酢は、その発酵過程に、麹菌、酵母、乳酸菌、酢酸菌が関与し、糖化、嫌氣的アルコール発酵と好氣的酢酸発酵が自然に進行する。それは東アジアで生まれた最も原始的な発酵様式であり、自然環境で起こっている炭水化物代謝を模したとも言えるものである。我々は、福山酢の製造工程から分離した乳酸菌と酵母及び酢酸菌の異種間相互作用を研究することを目的として、共培養系でのバイオフィーム形成について検討してきた。その結果、乳酸菌と酵母が共存すると細胞同士の接着により両細胞が組み込まれた特異な複合バイオフィームが培養容器底部の固液界面に形成されることや、乳酸菌と酢酸菌が共存すると培養液の気液界面に形成される酢酸菌のバイオフィーム（ペリクル）が顕著に増加することを見出した。さらに詳細に相互作用を調べてみると、これら3種の発酵微生物の共存系は、それぞれの菌が機能分担することで、栄養欠乏や酸化ストレス、外敵侵入などのさまざまな生存リスクに対応可能なきわめて巧妙な共生系であることが分かってきた。本稿では、こうした伝統発酵に見出した発酵微生物の共生系の特徴について、我々の成果を中心に紹介し、そこからうかがい知ることができる発酵微生物の進化についても論じてみたい。

Key words : Yeast, Lactic acid bacteria, Acetic acid bacteria, Biofilm, Symbiosis

1. はじめに

多くの伝統発酵食品に微生物が共存していることは良く知られている¹⁻¹⁰⁾。表1にその代表例を示した。いずれも馴染みの発酵食品だが、酵母と乳酸菌が必ず共存している。酵母が主役で乳酸菌が脇役の場合もあるし、乳酸菌が主役として働いている場合もある。前者としては清酒、ワイン、ランビックビールなどのアルコール飲料、後者としては漬物や発酵乳などがある。一方、酢酸菌が主役の伝統発酵食品は食酢である。糖を含む原料を酵母の嫌気発酵によって一旦アルコールに変換した後に、酢酸菌で好氣的に酢酸に変換するのが伝統製法の基本である¹¹⁾。元来アルコール飲料は、好氣的環境に放置すると、酢酸菌によって酢酸に変換されてしまう。このため、食酢はアルコール飲料とともに最も古くから人類に利用されてきた発酵食品である。

表1. 伝統発酵食品にみられる微生物の共存

食品	麹菌	酵母	乳酸菌	酢酸菌
清酒	○	○	○	*
ワイン		○	○	*
焼酎	○	○	○	
泡盛	○	○	○	
ウイスキー		○	○	
食酢(米酢)	○	○	○	○
醤油	○	○	○	
味噌	○	○	○	
パン種		○	○	
ケフィア		○	○	?
豆腐よう	○	○	○	
キムチ		○	○	

* 酸敗時に出現

文献10)を改変

このように多くの伝統発酵食品の製造プロセスには酵母、乳酸菌が共存し、好氣的環境ではこれらに加えて酢酸菌が共存して、物質変換が行われる。こうした物質変換は人類登場の遙か以前から自然界で起こっていた。我々の先祖はこうした自然の物質変換を巧みに食生活に取り込んでき

^{*}To whom correspondence should be addressed.

Phone : +81-466-84-3971

Fax : +81-466-84-3971

E-mail : morinaga @ brs.nihon-u.ac.jp

た。このように、伝統発酵の場合は微生物変換の模擬的自然環境とみなすことができる。したがって、伝統発酵微生物の共生関係を解析することで、発酵に関与する微生物の進化を探ることは有意義と考えられる。ここでは、我々が研究対象としてきた福山酢由来の微生物の相互作用解析を例に、酵母、乳酸菌、酢酸菌の共生と進化について考えてみたい。

2. 福山酢における微生物の相互作用

2-1. 福山酢について

福山酢は、鹿児島県霧島市福山町で約200年にわたり製造されてきた伝統的な米酢である。野外に設置した壺の中に水と蒸米と米麹を入れ、乾燥させた麹をその上に撒きふたをする。その後数カ月間そのまま静置することにより製造される。嫌気環境下での糖化とアルコール発酵、および好気環境下での酢酸発酵の三種類の発酵が、人工的管理を施すことなく、一つの壺の中で併行して進行するところに特徴があり、トリプル発酵と呼ばれている^{7, 12)}。酒造りの原点に近く、東アジアで生まれた最も原始的な発酵様式の一つであり、自然環境で起こっている複数の微生物が関与する炭水化物代謝を模したとも言えるものである。

2-2. 乳酸菌と酵母の相互作用

我々は、福山酢のもろみから、乳酸菌、酵母および酢酸菌を分離して、それらの相互作用についてバイオフィーム形成を指標として調べた。その結果、発酵初期（11日目）の福山酢から分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11（以下 ML11-11）と酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Y11-43（以下 Y11-43）を共培養すると固液界面に付着して顕著な二菌種複合バイオフィームを形成することを見出した（図1）¹³⁾。乳酸菌 ML11-11 の培養上清を酵母単独培

養系に添加してバイオフィーム形成が起こるかどうかを調べてみた結果、乳酸菌 ML11-11 の培養上清によってバイオフィーム形成は全く誘起されず、乳酸菌と酵母の細胞同士の物理的な接触が形成に不可欠ことが判明した¹³⁾。さらに微細構造を解析した結果、このバイオフィームの担体との接触部は乳酸菌で構成され、その上部に乳酸菌と酵母が凝集して積み重なった特異な微生物集合体であることが分かった（図2）。以後このバイオフィームを複合バイオフィームと呼ぶことにした^{13, 14)}。

乳酸菌 ML11-11 は福山酢から分離した酵母 Y11-43 だけでなく、清酒酵母の協会701号や実験室酵母の BY4741 などと組み合わせても顕著なバイオフィームを形成した^{13, 14)}。一方、35種以上に及ぶ乳酸菌の分離株や保存株計250株以上から乳酸菌 ML11-11 と同様に複合バイオフィームを形成する乳酸菌をスクリーニングした結果、新たに分離株から2株¹⁵⁾、保存株から3株¹⁶⁾の形成菌を見出した。乳酸菌 ML11-11 を含め、これまでに見出された形成菌の6株中5株は *L. plantarum* に属していた。その他の1株は *Leuconostoc mesenteroides* に属していた¹⁶⁾。その後、馴れ鮎から分離した *Leuconostoc citreum* に属する3株がやはり複合バイオフィーム形成能を有していることが分かった¹⁷⁾。このように、酵母との共培養においてバイオフィーム形成量が増加する現象は *L. plantarum* や *Leuconostoc* の一部の菌種にみられる現象である。なお、*L. plantarum* と酵母、*Leuconostoc* 属菌と酵母との共培養において形成されるバイオフィームの特性や形成機構の違いについては現在詳細を検討中である¹⁷⁾。

その後、我々は *L. plantarum* と酵母の複合バイオフィームの形成機序を解析すべく、乳酸菌 ML11-11 と酵母の細胞同士の相互作用に関して詳細な解析を進めてきた。その結果、両者の細胞を共存させると短時間で共凝集体が形成されること、その共凝集反応は加熱処理したり、プロテイナーゼ処理した乳酸菌細胞では起こらないが、加熱処理酵母細胞では起こること、マンノースによって共凝集が阻害されること、などが明らかとなり、酵母表層のマンナン糖鎖と乳酸菌表層のレクチン様タンパク質との相互作用を機序とする細胞接着によって形成されていることが強く示唆された^{14, 18)}。さらに、酵母のマンナン生合成に関与する遺伝子の欠損株を用いた解析により、乳酸菌 ML11-11 は酵母マンナンの分岐鎖構造を認識して細胞接着することを明らかにした¹⁹⁾。

こうした結果に加えて、乳酸菌 ML11-11 と清酒用酵母の野生型である協会7号酵母やその泡なし変異株の協会701号などとの相互作用を解析する過程で、泡なし変異株の方が野生型株に比べて乳酸菌 ML11-11 との共凝集性や複合バイオフィーム形成性が高いことを見出した。清酒酵母の野生型細胞の表層には清酒醸造時の高泡形成に関与する Awal タンパク質が存在しており、泡なし変異株では Awal タンパク質が細胞表層に存在しないことが知られて

図1. 乳酸菌と酵母の複合バイオフィーム形成

福山酢分離酵母 Y11-43 と乳酸菌 ML11-11 の単独培養及び共培養におけるバイオフィーム形成（左は形成量評価の結果、右は走査電子顕微鏡による観察結果）。文献 13）から改変

図 2. 乳酸菌と酵母の複合バイオフィーム形成機構

乳酸菌の表層タンパク質が酵母表層のマnnanの糖鎖を認識して細胞接着を起すことで乳酸菌と酵母の細胞で構成された複合バイオフィームを形成する。
文献 18) から改変

いる。そこで *Awal* タンパク質をコードする *AWAI* 遺伝子の欠損株やプラスミド上にクローニングした *AWAI* 遺伝子を導入した形質転換体を用いて乳酸菌 ML11-11 との共凝集性や複合バイオフィーム形成性を調べた結果、*Awal* タンパク質によって酵母と乳酸菌の間の細胞接着が阻害されていることが明らかになった²⁰⁾。

生酛づくりの種母作製過程において酵母と乳酸菌が共存し、最終的には主発酵酵母 *S. cerevisiae* が優占化することはよく知られている^{4, 10)}。種母作製の途上で出現する乳酸菌は乳酸を生成して、グラム陰性菌や産膜酵母のような雑菌の生育を抑制し、主発酵酵母が優占化する環境を整える。そして、その役割を終えると徐々に菌数が低下していくとされている。ところが、乳酸菌の活動が醸造過程後期まで衰えない場合には酒の風味に好ましくない影響を及ぼし腐造となる。乳酸菌と強い相互作用で接着する酵母は、乳酸菌が付随してくるため、腐造を起しやすき性質を持っているのではないかと考えられる。したがって、長年の優良清酒酵母の選別の過程で、腐造を起しにくい、すなわち乳酸菌と接着しにくい酵母が選ばれてきた可能性がある。協会 7 号などの *AWAI* 保有株が清酒酵母として選定されてきた背景には、乳酸菌と接着しにくく、腐造を起しにくい酵母であった、という特性があったのではない。前述の野生型清酒酵母の *Awal* タンパク質が乳酸菌の接着を阻害するという知見は、こうしたことを想起させるものである。

さて、この酵母・乳酸菌複合バイオフィームは、酵母を乳酸菌と共培養するだけでセルロースなどのバイオマスの担体上に形成させることができ、自律的に再生可能な固定化菌体として半連続発酵や連続発酵によるエタノール生産に利用できる。しかも、乳酸菌が共存するため、雑菌汚染

に対する耐性を有するなど、優れたロバスト性を有していた。この共培養系では、乳酸菌が糖を消費して乳酸が生成するが、生成した乳酸の大部分が酵母によって利用されるため、培地中に蓄積する乳酸の量は比較的少なく、エタノール収率の低下は軽微であった^{15, 21)}。

2-3. 乳酸菌と酢酸菌の相互作用

次に我々は、福山酢より分離した各種の乳酸菌と酢酸菌の相互作用を、バイオフィーム形成を指標として調べてみた。乳酸菌と酢酸菌を組み合わせて共培養した結果、800 通り以上の組み合わせの 95% 以上で酢酸菌のバイオフィーム形成が増加することが明らかとなった。そこで、福山酢から分離した乳酸菌 ML11-11 と酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* A11-10 (以下 A11-10) を選定し、共培養でのバイオフィーム形成を詳細に検討したところ、酢酸菌のバイオフィームは、いわゆるペリクルとして、気液界面から上部に顕著に形成され、液内の固体表面に乳酸菌のバイオフィームが形成されることが確認された²²⁾。酢酸菌のペリクル形成は、乳酸菌との共培養時だけでなく、乳酸菌培養上清や乳酸を培地に添加することによっても促進されたことから、乳酸菌が産生する乳酸が形成促進因子と考えられた。さらにピルビン酸も乳酸と同様の効果を示した²²⁾。

乳酸菌との共培養や乳酸添加によるペリクル形成促進はゲノム公開株である *A. pasteurianus* IFO3283-32 でも同様に認められたことから、酢酸菌に普遍的な現象と考えられた。なお、酢酸菌 A11-10 と酵母 Y11-43 の二菌種系と、これに乳酸菌 ML11-11 を加えた三菌種の共培養系における酢酸発酵を比較した結果、グルコースを炭素源とする培地を用いた場合、三菌種系での酢酸生成が有意に高いこと

が明らかとなった。こうした乳酸菌共存下の酢酸発酵の促進は、酢酸菌ペリクル形成の促進に伴う発酵効率の向上に起因すると考えられた²³⁾。

これらの結果をもとに、福山酢の発酵過程におけるバイオフィルムの役割を推定した(図3)。素焼きの壺の内面や蒸米の表面に乳酸菌と酵母の複合バイオフィルムが形成され、麴のアミラーゼによって米のデンプンから生成されたグルコースを乳酸やエタノールに変換する。一方、培養液の気液界面には、乳酸菌が生成した乳酸を利用して、酢酸菌のバイオフィルム(ペリクル)が旺盛に形成され、エタノールを効率的に酢酸に変換する。このように福山酢の壺の中では、二種類のバイオフィルムの共役によって、糖類から酢酸への代謝がきわめて効率的に起こっているものと考えられる²⁴⁾。

3. 福山酢にみる微生物の共生と進化

3-1. 栄養獲得のための共生

前述のように、福山酢では酵母、乳酸菌、酢酸菌の三菌種が共存しており、バイオフィルム形成という相互作用を通じて発酵成立に寄与していると考えられる。そこで、これら三菌種がお互いにどのような共生関係にあるのかをさらに検討することにした。微生物が共生する目的としては栄養獲得およびストレス回避が考えられる。

まず栄養獲得に関する共生関係についてみてみよう。酵母と乳酸菌の間には、乳酸菌が要求するアミノ酸やビタミンを酵母が供給することで共生関係が成立する可能性がある¹⁰⁾。我々は乳酸菌 ML11-11 と酵母 *S. cerevisiae* BY4741 を最少培地(田村・角田培地²⁵⁾)中で除菌フィル

ターを隔てて培養してみた。その結果、乳酸菌 ML11-11 の生育に必要なアミノ酸やビタミンを酵母 BY4741 が提供していることを示す結果を得た²⁶⁾。この結果は乳酸菌 ML11-11 が酵母を片利共生的に利用していることを意味する。一方、乳酸菌の産生する乳酸は、前述のように酵母の炭素源としても利用され、酢酸菌のペリクル形成を促進することから、酵母や酢酸菌は乳酸菌の恩恵を得ていることになる。

ここで、乳酸による酢酸菌のペリクル形成促進現象に関して考察する。ペリクルを形成している酢酸菌の培養系は不均一である。そのため、酢酸菌の生菌数を正確に把握することは困難だが、我々の調べた限りでは、乳酸は培養系の生菌数を増加させるのではなく、ペリクル量を特異的に増大させるようである。ペリクル量増大の原因としては多糖合成の亢進が考えられる²⁷⁾。KEGG で公開されている乳酸菌 *L. plantarum* WCFS1 の代謝マップをみると、乳酸菌では解糖系による嫌氣的糖代謝が主要経路であり、ペントースリン酸経路はあまり使われていないようである。また、好氣的な TCA 回路は持っていない²⁸⁾。

一方、酢酸菌 *A. pasteurianus* IFO3283-32 の代謝マップによると、*A. pasteurianus* には解糖系の中核を担うホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子が存在せず、解糖系が途中で切断されている(図4)²⁸⁾。そのため、酢酸菌がグルコースを代謝する場合、ピルビン酸はペントースリン酸経路経由でしか供給されず、ピルビン酸がエネルギー代謝の律速物質となっていると考えられる。ところが、乳酸菌との共培養時には、乳酸菌が生成する乳酸を酢酸菌がピルビン酸源として利用可能となるため、TCA サイクルへの炭素代謝の流れが円滑になり、その結果ペントースリン酸経路の代謝フラックスに余裕ができて多糖合成が活性化されると考えられる。さらに乳酸菌が大量に供給する乳酸を利用して、ピルビン酸を経由し、ペントースリン酸経路への炭素代謝の逆行が起こって多糖合成が活性化したことも考えられる(図4、5)。このように乳酸菌と酢酸菌は共存することで代謝経路を互いに補い合っており、糖代謝を活性化させている。福山酢の発酵過程でも、乳酸菌と酢酸菌が乳酸の受け渡しを介して代謝系を分担して糖代謝を行っていると考えられる(図3)。乳酸菌と酢酸菌の共生系における代謝経路の共有化は、いわば「共生代謝“Symbiotic Metabolism”」とも呼ぶべき現象で、伝統発酵の過程だけでなく自然界においても、乳酸菌や酢酸菌の優占化に役立っていると考えられる。

次に、酵母と酢酸菌の関係を考えてみる。良く知られているように、酵母の生産するエタノールは酢酸菌によって活発に利用される。この関係も一種の共生関係とみることができる。酢酸菌にとって、酵母によって生産されるエタノールはまたとないエネルギー源であり、酵母にとって酢酸菌が過剰に蓄積するエタノールを消費してくれることはストレス軽減にもなり好ましいことであろう。

図3. 福山酢の発酵システムとバイオフィルム

壺の底部に乳酸菌と酵母の細胞で構成された複合バイオフィルムが形成され、培養液の上部には酢酸菌の細胞で構成された単独バイオフィルム(ペリクル)を形成。乳酸菌と酵母によって生成した乳酸やアルコールを利用して酢酸菌が効率的に酢酸を生成する。文献24)から改変

図4. 乳酸菌及び酢酸菌の単独培養時の糖代謝

酢酸菌はホスホフルクトキナーゼがないため単独培養では糖リン酸化経路でしかグルコースを利用できない。乳酸菌の単独培養ではTCA回路がないため乳酸が多量生成する。(KEGG²⁸⁾の図を改変)

ところで、多糖類やタンパク質などの高分子栄養物は、分解酵素を持たない酵母や酢酸菌は利用できないが、乳酸菌は分解酵素を持っているため利用できる。したがって、乳酸菌との共培養系では、乳酸菌の力を借りることで、酵母や酢酸菌も高分子栄養物を利用可能になると考えられる¹⁰⁾。

また、*L. plantarum* など一部の乳酸菌はピリミジンやアルギニンの合成に必要なカルバモイルリン酸が欠乏しており、生育に高濃度の二酸化炭素を必要とするが、この二酸化炭素を酵母が供給している例が報告されている²⁹⁾。以上の栄養獲得に関する共生関係を図6に表した。この他にも、三菌種の間にはまだ未解明の栄養物が共生因子として働いている可能性があるのではないかと考え、我々は共培養系のメタボローム解析も試みている³⁰⁾。

3-2. ストレス回避のための共生

ストレスの回避や軽減をどう図るかは生物の生存戦略としてきわめて重要である。ストレス因子としては、生息環境の酸素濃度、pH、浸透圧、さらには他の微生物との競合や原生動物などの捕食者からのストレスなど様々なものがある。

これらの中で、福山酢製造過程におけるストレス因子としてまず考えられるのが酸化ストレスである。乳酸菌は通性嫌気性菌で酸素分圧の比較的低い環境であれば生育可能だが、呼吸鎖やカタラーゼを持っていないため酸素の豊富な環境はストレスになる。酵母も乳酸菌ほどではないが高濃度酸素の環境は好まない。一方、酢酸菌は絶対好気性で

図5. 酢酸菌と乳酸菌の複合培養時の糖代謝 (Symbiotic metabolism)

酢酸菌と乳酸菌を共培養すると、酢酸菌は乳酸菌が生成した乳酸をピルビン酸源として利用可能になるため、TCA回路や糖リン酸化回路の炭素フラックスが改善され、糖新生による多糖生産が促進されてペリクル形成が活性化すると推察。

培養液表面にペリクルを形成して酸素を活発に消費する。その結果、ペリクルに覆われた培養液内部は酸化ストレスに弱い酵母や乳酸菌の生育に好ましい嫌気的な環境になる(図3)。このように、乳酸菌や酵母にとって酢酸菌と共生することは、酸化ストレスを回避する上で大きな利点がある。

次に低pHにおける酸性ストレスについてみてみよう。乳酸菌、酵母、酢酸菌はいずれも低pH環境に適合性があり、これら3種の微生物が自然界で共存し得る最も重要な因子と考えられる。しかしながら、乳酸菌の乳酸生産に伴う急激なpHの低下は細胞質の酸性化を招き、乳酸菌自身にとってだけでなく、酢酸菌や酵母にとっても大きなストレスとなる。ところが、三種共存系では乳酸菌が生成する乳酸を酢酸菌や酵母が資化することによって、生息環境のpHの低下が緩和されると考えられる。実際に乳酸菌単独培養系と、乳酸菌と酵母の複合培養系での糖消費を比較してみると、乳酸菌単独系では培養液pHの低下が著しく、多くの糖が消費されずに残されるのに対し、酵母が共存する複合系では酵母が乳酸を消費するため、乳酸の過剰な蓄積が起こらず、pH低下が緩和された結果、菌の活性が維持されて、糖が完全に消費されるということが確認された^{15, 20)}。

さらに、自然界では生息環境に侵入してくる雑菌との競合も大きなストレスとなる。酵母・乳酸菌二菌種共存系に大腸菌や枯草菌をモデル雑菌として接種してみると、高い雑菌排除能を示すことが明らかとなった^{15, 20)}。酵母と乳酸菌に、さらに酢酸菌が加わった三菌種共存系では、酢酸菌

図6. 酵母・乳酸菌・酢酸菌間の栄養に関する共生関係

図7. 酵母・乳酸菌・酢酸菌間のストレスに関する共生関係

の形成するペリクルや酢酸によって雑菌排除能がさらに高まることが考えられる。これらのことから、酵母・乳酸菌・酢酸菌三菌種共存系は様々なストレスに抵抗性を持った共生系であると考えられる。

以上の考察をもとに、福山酢における三菌種共生によるストレス回避の機序を図7に示した。このように、模擬的自然環境とも言える福山酢においては、酵母、乳酸菌、酢酸菌の巧みな共生関係が成立している。こうした共生関係の解析をさらに深めることによって、それぞれの微生物が互いに関係し合いながら進化を遂げてきた道筋が見えてくるのではないだろうか。

3-3. 福山酢からみえてくる発酵微生物の進化

以上の福山酢にみられる三菌種共生系に関する知見をもとに、酵母、乳酸菌、酢酸菌がどのように進化してきたかを、いささか大胆ではあるが推理してみたい。

三菌種は酸性環境に適応している点で共通点があり、進化の過程でニッチでの共存が起こり、パートナーとしての道を歩み始めたと考えられる。共存の結果、前述したように、飢餓やストレスから回避することが可能になった。共生によって、アミノ酸、ビタミンなど栄養物の授受や、酸素、低pH、外敵侵入など生存を脅かすストレスへの対応が可能になった。これに加えて、共生によって炭水化物代謝における役割分担が構築され、炭素源を独占できるようになり、乳酸菌、酵母、酢酸菌からなる微生物コミュニティが確立されたのではないだろうか。このような共生系での役割分担が確立すると、ある微生物にとって単独生活では不可欠な機能であっても、共生生活では他の微生物が補ってくれるので、なくても良いものがでてくる。こうした共生生活にとって不可欠でない機能は、進化の過程で退化して失われる運命にあったのであろう。

福山酢における共生関係から読み解くと、例えば、酵母との共生でアミノ酸やビタミンなどの供給を得られるようになった乳酸菌は、一部のアミノ酸やビタミンの生合成経路を失った。また乳酸菌との共生で、乳酸菌から乳酸の供

図8. 乳酸菌の進化過程における宿主の変遷

乳酸菌はその表面タンパク質を介して他生物に接着する寄生生物としての生き方を選び進化を遂げた。進化の過程で寄生の相手を酵母から植物へ、さらには動物へと乗り換えたと推察。

給を受けることが可能になった酢酸菌は、解糖系の一部を失い、酸化発酵に特化するためペリクル形成するようになった。一方、乳酸菌は酢酸菌との共生により嫌気環境が保証されたため、酸化ストレス対応機構を失い、TCA サイクルなどの好氣的代謝機構の多くを失った。このように、栄養物の下面（内部）を住処とする乳酸菌、酵母と上面（気液界面）を住処とする酢酸菌が住み分け、炭水化物代謝系やアミノ酸、ビタミンの生合成系を補完し合って、強固な生存システムを構築し、炭素源を独占可能となった。こうした進化の過程で、酵母は乳酸菌や酢酸菌から遺伝子を取り込み好気、嫌気のいずれにも対応できるよう進化したということも考えられる。

前述のように、乳酸菌 ML11-11 は酵母に対し特異な接着性を示すが、酵母に接着するということが乳酸菌にとってどんなメリットがあるのか考察してみたい。乳酸菌と酵母が離れて存在している場合は、互いの相互作用が弱く、また行動を共にするのが難しいが、乳酸菌と酵母が接着している場合には行動を共にすることが可能になり、至近距離から栄養物を受け取ることができるなど大きなメリットがある。乳酸菌にとって厳しい自然環境を生き抜くには、酵母に接着していることが断然有利だったに違いない。こうした乳酸菌の姿をみると、乳酸菌は進化の過程で酵母に接着して寄生するという道を選んだのではないかと考え

られる。また、接着することでひょっとすると遺伝物質の授受が起こり、乳酸菌と酵母が共進化してきた可能性もある。

さらに視野を乳酸菌と植物細胞や動物細胞の関係にまで広げてみると、酵母との接着から植物細胞との接着、さらには動物細胞（消化管上皮細胞）との接着へと、乳酸菌は寄生する相手を選びながら接着することによって生存領域を拡大していった様子をうかがい知ることができる（図8）。

参 考 文 献

- Wood BJB (1981) The yeast/*Lactobacillus* interaction; a study in stability, p.137-150, Mixed culture fermentations, ed. by Bushell ME and Slater JH, Academic Press, London.
- 伊藤敏敏, 岡田早苗 (1996) 乳酸菌と他の微生物の共生, p.270-274. 乳酸菌の化学と技術, 日本乳酸菌研集談会編, 学会出版センター, 東京.
- 岡田早苗 (2010) 乳酸菌の自然界での分布, p.10-15, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 日本乳酸菌学会編, 京都大学学術出版会, 京都.
- 岡田早苗 (1997) 酵母と共棲する乳酸菌, p.66-75, 酵母からのチャレンジ, 田村學造, 野白喜久雄, 秋山裕一, 小泉武夫編, 技報堂出版, 東京.
- 小崎道雄 (2004) 発酵食品における乳酸菌の共存と共生, p.184-197, 乳酸発酵の新しい系譜, 小崎道雄, 佐藤英一編, 中央法規出版, 東京.
- 谷村和八郎 (2001) アジアの発酵食品事典, 樹村房, 東京.
- 発酵ハンドブック (2001) 財団法人バイオインダストリー協会発酵と代謝研究会編, 共立出版, 東京.
- Wood BJB (1998) Microbiology of fermented foods, Blackie Academic & Professional, London.
- 小崎道雄 (1999) 乳酸菌の共生. 日本醸造協会誌 **94**: 261.
- Furukawa S, Watanabe T, Toyama H, Morinaga Y (2013) Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. J Biosci Bioeng **116**: 533-539.
- 食物と健康の科学シリーズ酢の機能と科学 (2012) 酢酸菌研究会編, 朝倉書店, 東京.
- 柳田藤治 (1990) 壺酢-酢造りの原点を探る. 化学と生物 **28**: 271-276.
- Furukawa S, Yoshida K, Ogihara H, Yamasaki M, Morinaga Y (2010) Mixed-species biofilm formation by direct cell-cell contact between brewing yeasts and lactic acid bacteria. Biosci Biotechnol Biochem **74**: 2316-2319.
- Furukawa S, Nojima N, Nozaka S, Hirayama S, Satoh A, et al. (2012) Mutants of *Lactobacillus plantarum* ML11-11 deficient in co-aggregation with yeast exhibited reduced activities of mixed-species biofilm formation. Biosci Biotechnol Biochem **76**: 326-330.
- 森永康, 古川壮一 (2013) 酵母-乳酸菌複合バイオフィームの特性と利用. 月刊 BIOINDUSTRY **30**: 49-57.
- Furukawa S, Isomae R, Tsuchiya N, Hirayama S, Yamagishi A, et al. (2015) Screening of lactic acid bacteria that can form mixed-species biofilm with *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci Biotechnol Biochem **79**: 681-686.
- 山岸明日香, 古川壮一, 荻原博和, 森永康 (2014) 伝統発酵食品より分離した *Leuconostoc* 属乳酸菌と出芽酵母によるバイオフィーム形成, 日本乳酸菌学会 2014 年度秋期セミナー・酢酸菌研究会第 6 回研究集会合同シンポジウム講演要旨集.
- 以上, 福山酢からみえてくる発酵微生物の進化について, 大胆に考察してきた。この仮説が妥当なものかどうかを検証するには、今後さらに詳細な研究が必要だが、我々は伝統発酵における微生物共生関係を解析することで、発酵微生物の進化の過程を探るという新しい研究の方向性が見えてきたのではないかと考えている。

追 記

著者の一人、古川壮一先生は 2015 年 3 月 1 日に 41 歳で急逝されました。ここに謹んで哀悼の意を表します。

Symbiosis and evolution of microorganisms indicated in a traditional fermentation

Yasushi Morinaga, Satoru Hirayama and Soichi Furukawa

*Department of Food Bioscience and Biotechnology,
College of Bioresource Sciences, Nihon University*

Abstract

Fukuyama pot vinegar is known as traditional Japanese rice vinegar. In the fermentation process of Fukuyama pot vinegar, fungi, yeast, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria are involved. During this process, three types of fermentation, namely saccharification, anaerobic alcohol fermentation and aerobic acetic acid fermentation proceed autonomously, sequentially and partly in parallel. This is one of the most primitive fermentation process developed in East Asia and is analogous to carbohydrate metabolism occurred in nature. In order to elucidate inter-species interactions of microbes in this process, we isolated microbes from the brewing samples of the Fukuyama pot vinegar process and investigated the biofilm formation of lactic acid bacteria and yeasts or lactic acid and acetic acid bacteria under co-culture conditions. In the result, we found a unique mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and yeasts on solid-liquid interface in a bottom of culturing vessel and also found a significant increase of acetic acid bacteria biofilm (pellicle) on liquid surface of culture broth in the co-existence of lactic acid bacteria. In further studies, we realized that the co-existent system of these three microbes is an ingenious symbiotic system to cope with risks such as nutritional deficiency, oxidation stress, and invasion of other bacteria and so on. In this review, we outline properties of symbiotic system of these fermentation microbes from our recent studies and discuss about aspects on evolution of these fermentation microbes.