

論文の内容の要旨

論文題目 ビール汚染能を持つ
 偏性嫌気性細菌に関する研究

氏 名 本山 靖朗

ビール醸造技術の進歩によるビール中の溶存酸素の低減から、ビール汚染能を持つ偏性嫌気性細菌が出現した。この細菌は、発見当初は *Zymomonas* 属や *Bacteroides* 属に分類されるなど分類学上の混乱が見られたが、後に新属新種に認められ、*Pectinatus cerevisiiphilus* と命名された。以降、欧米を中心に報告例が相次いだ。が、ビールに生育しない“*Pectinatus*”が分離されるなど、ビール生育性に関する情報が不十分であった。そこで多数の株を収集するために、環境からの分離法の検討を行った。具体的には、嫌気培養法、選択培養法、全染色体 DNA を probe とした Dot Blot/Colony Hybridization 法を検討し、これらの手法を組み合わせることより、ビール工場からの拭き取りサンプルから *Pectinatus* をスクリーニングした。得られた株は、DNA-DNA 類似度を中心とした同定試験を行った。このようにして分離した *Pectinatus* 株は、全てビール生育性を示した。従って、*Pectinatus* に属する株は、全てビール生育能を有することが判明した。

P. cerevisiophilus の分離以降、*Pectinatus* 属の別種とされる *P. frisingensis* や、ビール生育性を示さない、新属新種である *Selenomonas lactificex*、*Zymophilus paucivorans*、*Z. raffinosivorans* が分離されており、これらの細菌は 16S rRNA による系統解析により近縁関係が示されたが、16S は保存性の高い領域であるため類縁菌の系統を論じるには不十分であった。そこで 16S と 23S rRNA 遺伝子に挟まれる ITS 領域 (Internal Transcript Spacer: 内部転写領域) に注目した。解析の結果、長さの異なる 2 種類の ITS 領域が認められ (long、short)、tRNA 遺伝子の有無を除いては両者のホモロジーは高かった (図 1)。また、*Pectinatus* と *Selenomonas* の ITS にコードされる 2 つの tRNA 遺伝子の順序が 16S 方向より tRNA^{ala}→tRNA^{ile} であり、この順序はこれまで報告された他の細菌とは異なっていた (図 1)。

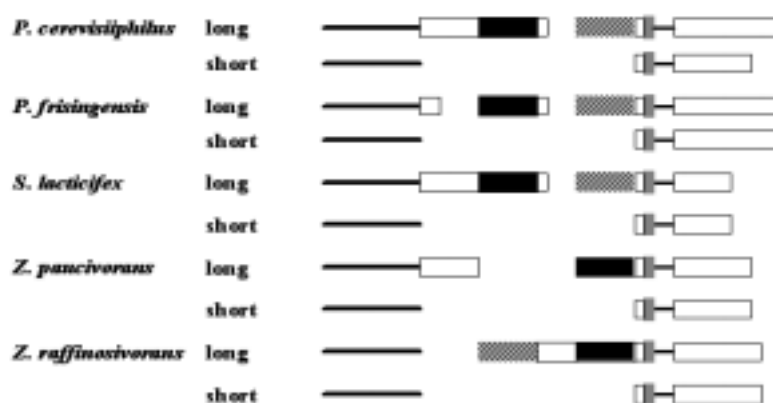


図 1 *Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus* の ITS 領域

— Conserved region, □ Variable region,
 ■ tRNA^{ala} gene, ▨ tRNA^{ile} gene, ▮ Box A-like

Pectinatus、*Selenomonas*、*Zymophilus* の細菌の ITS には、100bp 程度のギャップが認められた。これは、GC プロファイル (図 2) に示すとおり、ギャップ両端の GC 含量が低いこと (図 2▽) から、不安定な高次構造に起因する欠失によるものと思われた。同様に、*Pectinatus* と *Selenomonas* の tRNA 遺伝子については、tRNA 遺伝子周辺領域の低い GC 含量に起因する loop-out による水平移動であると推論した。

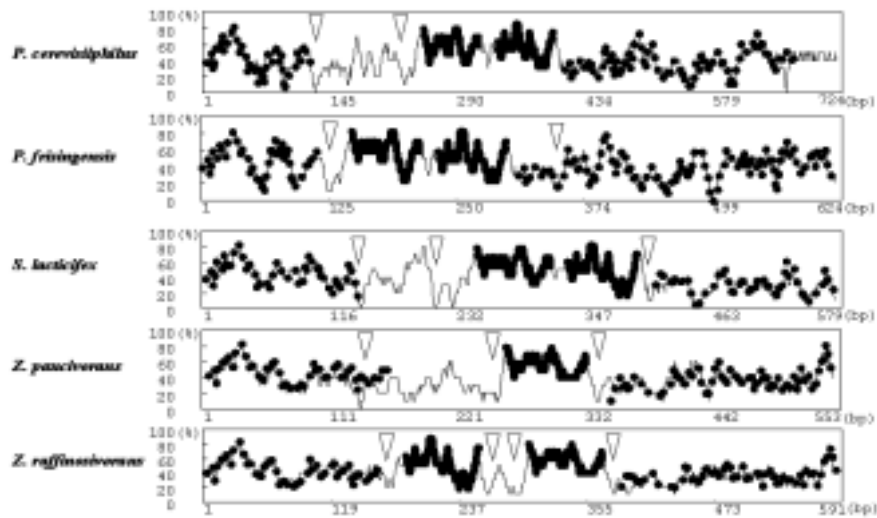


図 2 ITS の GC プロファイル

—— long-ITS, ●●●● short-ITS, ■■■■ tRNA gene, ▽ AT rich region

以上より、*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus* の long-ITS は、変化に富んだ領域であった。long-ITS より作成した分子系統樹は、16S rRNA では明らかにされなかった *Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus* の系統関係をより詳しく示した(図 3)。

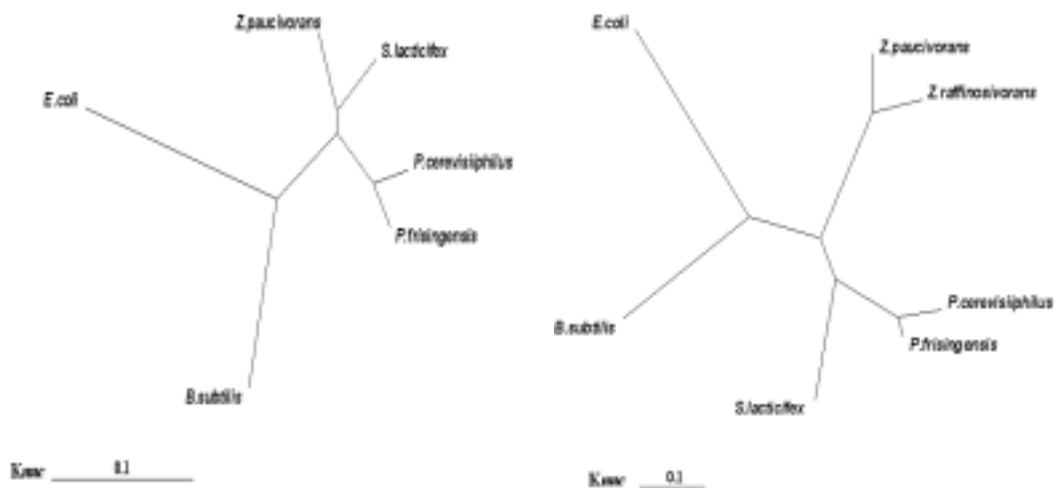


図 3 近隣結合法による分子系統樹
(左; 16S rRNA, 右; long-ITS)

一方、微生物的に安定なビールを製造していくために、ビール中に *Pectinatus* が存在するかどうかを迅速に判定する迅速同定法として、ITS を利用した PCR

による、高感度で特異性の高い方法を開発した(図 4)。

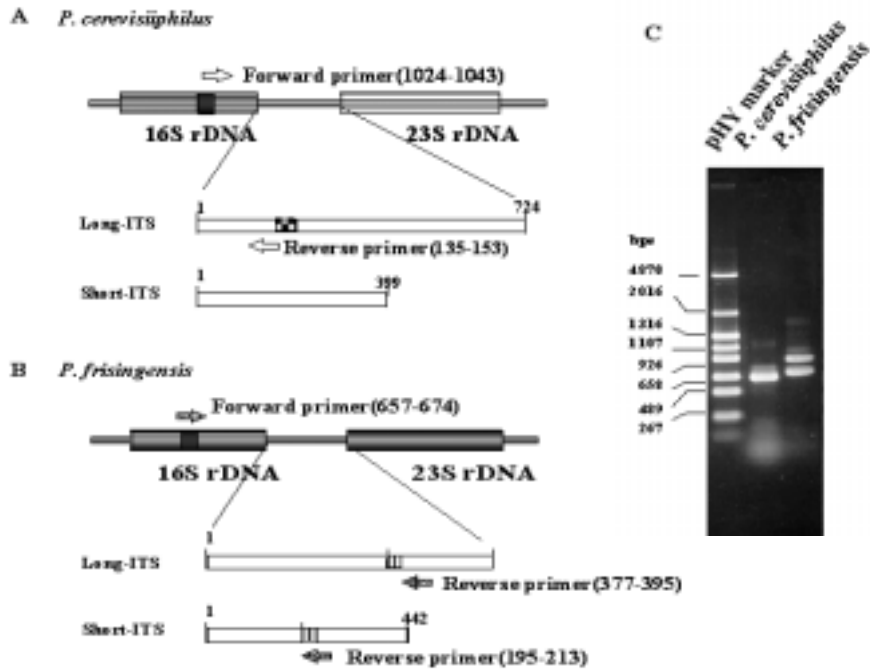


図 4 ITS 領域を利用した PCR 法
(A; *P. cerevisiophilus* 特異的 primer, B; *P. frisingensis* 特異的 primer, C; 各 primer による PCR 増幅結果)

次に、汚染源、経路を科学的に解明する為に、rRNA 遺伝子および周辺領域の多型を検出する Ribotyping 法を検討した。その結果、複数の制限酵素の使用により詳細なタイピングが可能となった(図 5)。この株レベルの異同判定と、先の環境からの分離源との関係を詳細に解析した結果、*Pectinatus* は、排水溝を通して工場内を拡散する汚染経路が示された。

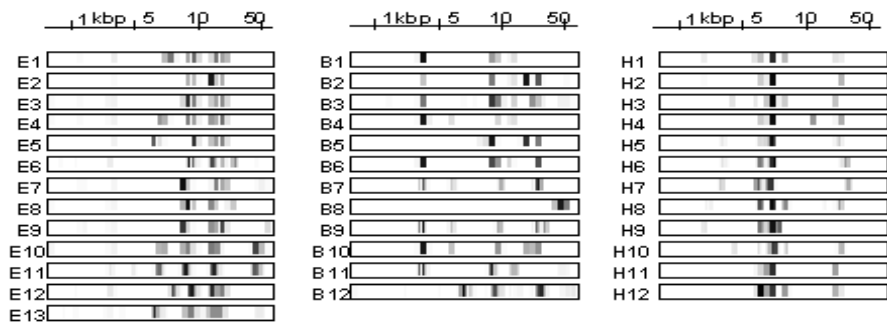


図 5 Ribotyping による *P. frisingensis* の分類
(E1~E13; *EcoRI*, B1~B12; *BamHI*, H1~H12; *HindIII* による ribotype)