

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 本 山 靖 朗

醸造技術の進歩によるビール中の溶存酸素の低減から、新たな偏性嫌気性細菌によるビール汚染事故が起こるようになった。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あったが、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。ビールに生育しない“*Pectinatus*”が分離されるなど、性質の解明は不十分であった。本論文は、多数の本菌株の取得から、系統分類、迅速検出法の確立、汚染経路解析まで、*Pectinatus* に関する研究をまとめたもので、6章からなっている。

第1章の序論では、*Pectinatus* 発見の経緯と研究開始時までの知見、未解明の問題点について述べられている。

第2章では、まず解析に必要な多数の株を収集するために、環境からの分離法を検討した。嫌気培養法、選択培養法、全染色体 DNA を probe とした dot blot/ colony hybridization 法について検討し、これらを最適に組み合わせることより、ビール工場サンプルから *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、全てビール中で生育した。従って、*Pectinatus* に属する株は、全てビール汚染能を有することが判明した。

第3章では、系統分類について述べられている。*P. cerevisiiphilus* 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 による系統解析から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 遺伝子に挟まれる内部転写領域 (Internal Transcript Spacer: ITS 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両者のホモロジーは高かった。*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus* の ITS には、100bp 程度のギャップが認められ、ギャップ両端の GC 含量が低いことと関連する欠失によるものと思われた。また、*Pectinatus* と *Selenomonas* の ITS 中の 2 つの tRNA 遺伝子の順序は 16S 方向より tRNA^{ala}→tRNA^{ile} で、これまで報告された他の細菌と異なっていた。このことも、tRNA 遺伝子周辺の低い GC 含量に関連した loop out による水平移動と推論した。*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus* の long ITS は、変化に富んだ領域で、これによって作成した分子系統樹は、*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus* の系統関係をより詳しく示した。

第4章では、微生物的に安定なビールを製造していくため、ビール中に *Pectinatus* が存在するかどうかを判定する迅速同定法について検討した。ITS 内の配列をプライマーに利用した PCR により、高感度で高特異性の方法を開発することができた。これによれば、ビール汚染性をもたない *Zymophilus* などとは交差反応することなく、 10^2 個の細胞があれば、*P. cerevisiiphilus* と *P. frisingensis* を区別して検出可能である。

第5章では、*Pectinatus* の汚染源・汚染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。複数の制限酵素を使用することにより、詳細な株のタイピングが可能となった。この株レベルでの異同判定と、その分離源の関係を詳細に解析し、回収瓶によって工場内にもちこまれた *Pectinatus* が、排水溝を通して拡散する汚染経路が示され、以後の工場設備設計の改善に役立てることができた。

第6章では、本研究のまとめと今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、不明な点が多かった新たなビール汚染菌である *Pectinatus* について、多数の株を分離して比較解析し、ビール汚染性との関係や系統分類について調べ、迅速かつ高精度の検出法を確立したものであり、学術上・応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。