

論文の内容の要旨

論文題目 乳酸菌のビール混濁性に関する研究

氏 名 鈴木 康司

ビールに生育し混濁事故を引き起こすビール混濁菌は、現在でも世界のビール業界において大きな問題であり、約 70%の事故実例は乳酸菌を原因としたものである。従って、これらのビール混濁乳酸菌を迅速に検出および同定することは、ビール工場における微生物環境改善ならびに製品検査を実施する上で、極めて重要である。検出された細菌のビール混濁性を判定する方法として、最も精度が高い手法は、実際の製品ビールに植菌するものである。しかし、本法では結果が得られるまで早くとも数日から、多くの場合は数週間を要するのが現状である。このため、検出された細菌のビール混濁性を迅速に判定できる方法が望まれていた。

ビールはアルコールを含むこと、無酸素状態であること、栄養成分が少ないこと、抗菌作用を持つホップ成分を含む等の理由により、生育しうる細菌の菌種は極めて少ない。日本で醸造される典型的なビールにおいては、*Lactobacillus brevis*、*L. lindneri*、*Pediococcus damnosus*、*Pectinatus frisingensis*ならびに *Pect. cerevisiiphilus* 等に限定される。この中でも *L. brevis* ならびに *L. lindneri* のビール混濁性は群をぬいて強く、ビール産業にとっては脅威的な存在として知られている。このため、従来ビール醸造業界では、既知のビール混濁菌種に対して同定検出法の開発を行い、検出菌のビール有害性判定を実施してきた。代表的なものとして、遺伝学的手法を応用した菌種特異的 PCR 検査法があげ

られる。本手法は、数時間以内に検出細菌を菌種レベルまで推定できる点で優れている。

しかしながら、本法は未知のビール混濁菌種が出現した場合、対応が後手へと回るため、微生物事故を絶対に発生させないことを至極の目的とする網羅的微生物検査体制の構築にとっては必ずしも十分とは言えない。本論文では、菌種を越えて乳酸菌のビール混濁性を判定できる *trans-species genetic marker* という概念を提唱し、新しい切り口の微生物検査法として提案すると共に、本微生物検査を実施すべき理論的な裏づけについて考察する。本論文は以下の3章からなる。

1. 新規ビール混濁乳酸菌 *Lactobacillus paracollinoides* の提案および同定検出法の開発

筆者らは、最もビール混濁性が強いとされる *L. brevis* ならびに *L. lindneri* と同等に強いビール混濁性を持つ *Lactobacillus sp.* LA2、LA7 ならびに LA8 株をビール工場環境から単離した。本株は 16S rDNA の全長解析の結果、*L. collinoides* JCM1123^T と約 99% の相同性を示した。その一方で、DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験の結果では、ビール工場環境から検出された3株は DNA 相同性に関してお互いに 70% 以上の相同性を示し同一菌種グループであると考えられたが、*L. collinoides* JCM1123^T との相同性は 46.8% から 57.6% であり、*L. collinoides* に属さない新菌種群であることが示唆された。また、*L. collinoides* についてビール混濁性を調査した結果、ビール工場環境検出菌と対照的に全くビールに生育することはなかった。さらに、フラクトースの資化性についてもビール工場環境検出菌と *L. collinoides* とは識別可能であった。以上の3点の差異から、新ビール混濁乳酸菌 *Lactobacillus paracollinoides* を提案した。

新たなビール混濁細菌が見出されたため、本菌種を特異的に検出同定できる検査系を PCR 法に基づき開発を行った。上流プライマーは 16S rDNA 塩基配列をもとに設計し、下流プライマーは 16-23S rDNA ITS 領域の塩基配列をもとに設計を実施した。その結果、従来 16S rDNA 領域のみでは判別が困難であった *L. collinoides* を含めたその他の乳酸菌種およびビール工場環境頻出菌に対して特異性を持った検出同定法の開発に成功した。

2. 乳酸菌のビール混濁能を判定できる遺伝子マーカーの探索

前章では、既存の種に属さないにも関わらず強いビール混濁能を持つ乳酸菌が出現する事例を示し、新有害菌種の出現に対応して実施する微生物検査法構築について述べた。しかしながら、本施策による網羅的微生物検査法の構築は常に後手に回るため、未知の混濁細菌種の出現に事前に対応できない。そこで、菌種同定法と異なる切り口でビール混濁能判定が可能となる方法を模索することとした。

世界で最初に見出され、ホップ耐性遺伝子であることが実証された *horA* は、*L. brevis* ABBC45 株から見出された遺伝子であるにも関わらず、菌種を越えてビール混濁性を判定できる遺伝子マーカー(Trans-species Genetic Marker (TGM))であるという点で注目を集めた。しかしながら、本遺伝子マーカーは、ビール混濁性を持つ *L. paracollinoides* LA7 株、LA8 株では検出することができないこと、*L. brevis* ABBC45 株から、*horA* を欠損さ

せた ABBC45^c 株にもビール混濁性が残存していたことから、一つの遺伝子マーカーでは漏れのない検査体制を構築することは困難であることが明らかとなり、新たな遺伝子マーカーを探索することとなった。

まず、*horA* 遺伝子を保有しない *L. brevis* ABBC45^c 株に残存するホップ耐性因子の生化学的解析を行った結果、本株のホップ耐性はエネルギー源として Proton Motive Force (PMF) を利用するタイプの多剤排出ポンプにより付与されていることが推察された。次に、*L. brevis* ABBC45^c 株から、通常培養温度より高い 37°C で継代培養することにより、ホップ耐性を完全に失ったホップ感受性株 ABBC45^{cc} 株を取得した。ABBC45^c 株と変異株 ABBC45^{cc} 株との間に差異を見出すため、両株間のプラスミド構成を比較した。その結果、pRH45 II と名づけたプラスミドに異変が起きていることが判明した。そこで、本プラスミドの全塩基配列解析を実施した結果、23.4kb のプラスミドであった。サザンハイブリダイゼーション試験ならびに塩基配列解析の結果、ABBC45^{cc} 株では本プラスミドの 12.6kb 部分が欠落していることがわかり、残存部は再結合して小型のプラスミドとして ABBC45^{cc} 株に存在していた。欠落部には 12 個の Open Reading Frame (ORF) が存在しており、その中の ORF5 が 11~12 回膜貫通型膜タンパク質をコードしているようであった。この特徴は、上述した PMF 型多剤排出ポンプの典型的なものであったため、*L. brevis* および *L. paracollinoides* における本 ORF ホモログの有無とビール混濁性との相関性を PCR 法およびサザンハイブリダイゼーション法で調査した。57 株について調べた結果、ORF5 ホモログとビール混濁性の有無は完全に一致していた。以上のことから、ORF5 は本 2 菌種を判定できる有用な遺伝子マーカーであることが判明した。一方、もう一つの遺伝子マーカーである *horA* は、ORF5 を保有しないビール混濁乳酸菌である *L. lindneri* のビール混濁性を正しく判定できるため、これらの遺伝子マーカーを併用することにより、漏れのない検査体制につながるということがわかった。

3. ビール混濁能判定マーカーの遺伝学的解析およびビール混濁乳酸菌発生機構に関する考察

これまでビール醸造微生物学では、乳酸菌のホップ耐性は安定した形質であることが定説であり、ホップ耐性株からホップ感受性株の取得はできないとされてきた。その一方で、同一菌種内においても、ホップ耐性を持つ株と持たない株が存在しており、ビール混濁乳酸菌がどのような機構で発生したかについては謎に包まれていた。

筆者らは、ビール混濁乳酸菌 *L. brevis* ABBC45 株から、*horA* 遺伝子および ORF5 という異なる 2 つのプラスミド上に存在する遺伝子を欠損させることにより、完全にビール混濁性を失った株の取得に成功した。そこで、本現象が一般的に発生する現象であるか否かについて、ビール混濁性を持つ *L. brevis* 5 株 (ABBC44、ABBC46、ABBC64、ABBC104 および ABBC400) ならびに *L. paracollinoides* (LA2^T 株および LA9 株) について、それぞれ 37°C ならびに 30°C で継代培養を行った。その結果、すべての株からビール混濁性を失った株の取得に成功した。このことから、ビール醸造微生物学の定説に反し、乳酸菌のビール

混濁性は不安定な形質であることを示すことができた。

これらの変異株について調査した結果、野生株すべてが *horA* ならびに ORF5 を共に保有する株であるのに対し、変異株ではすべての株について 2 つの遺伝子マーカーを検出することはできなかった。このことから、両遺伝子マーカーは比較的脱落しやすい遺伝子であることが示唆された。また、これら 2 つの遺伝子マーカーが乳酸菌のビール混濁能の本体であると仮定した場合、どこかに供給源がない限りビール混濁乳酸菌は消滅していく運命にある。そこで、筆者らは *horA* および ORF5 が転移性遺伝子であり、本来無害な乳酸菌を有害菌化しているという仮説を持った。

本仮説を検証するため、ORF5 周辺に存在する ORF3-7 について、ビール混濁能を持つ *L. paracollinoides* LA2^T 株ならびに *Pediococcus damnosus* ABBC478 株について塩基配列解析を行った。その結果、5.3kb の本遺伝子領域は、*L. brevis* ABBC45^C 株の ORF に相当する領域に対して約 99% の相同性があり、ORF の構造は酷似していた。*L. paracollinoides* および *P. damnosus* と *L. brevis* 間の 16S rDNA の相同性はそれぞれ 92.6%、92.3% であることから、ORF3-7 を含む遺伝子領域は両菌種と進化を共にしてきた遺伝子群ではないことが推察された。また、当該遺伝子領域の相同性の高さから、比較的最近獲得された遺伝子領域であることも示唆された。さらに、当該遺伝子領域の中で、ORF3 は *Leuconostoc lactis* に見出された transposase とアミノ酸レベルで 91% の相同性を示し、当該遺伝子領域の転移性と関連性があると考えられた。

一方、*horA* 遺伝子についても、*L. lindneri* ABBC276 株、*L. paracollinoides* LA2^T 株、*P. damnosus* ABBC478 株の塩基配列の解析を行った。その結果、*L. brevis* ABBC45 株由来の *horA* に対し、それぞれの相同性は 99.7%、99.6%、99.4% であり、事実上同一塩基配列であった。それぞれの菌種の *L. brevis* に対する 16S rDNA 遺伝子の相同性はそれぞれ 90.2%、92.6%、92.3% であり、同様に水平伝播により *horA* が獲得された可能性が高いと考えられた。さらに、*L. brevis* に次いで乳酸菌で混濁事故が多いとされる *L. lindneri* について *horA* を含むプラスミドの全塩基配列を決定した結果、プラスミドの骨格部は *L. brevis* ABBC45 由来のプラスミドと 99% を越す塩基配列の相同性が認められ、プラスミドを介した水辺伝播が示唆された。

以上の研究成果より、ビール混濁乳酸菌は、外来遺伝子の水平伝播により、本来無害であった乳酸菌に有害遺伝子が感染することにより生じたものであると推察した。従来、ビール産業における微生物検査は、菌種同定法によるビール混濁性の判定が主流であった。しかしながら、筆者らの得た知見から、ビール混濁性を付与する遺伝子を標的とした検査法を構築することは、既知の菌種内での正確なビール混濁能判定につながるだけでなく、未知の混濁細菌の出現にも事前に対応できる可能性が示唆された。また、本研究は今まで謎とされてきたビール混濁乳酸菌の発生について、新たな仮説を提唱するものであり、意義深いものと考えている。