

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 康司

ビールはアルコールを含むことおよび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が、ひとたび微生物事故を引き起こした場合、製品の回収に膨大なコストを要する上に長年培った企業ブランドに多大な損害を与える。ビール醸造業界においては、菌種特異的 PCR 検査法により既知のビール混濁性微生物種を迅速に検査できる体制を構築してきたが、同一菌種においてもビール混濁性に大きな差異のある菌株が存在することと、未知のビール混濁菌種が出現した場合に事前に対応できないことがこの検査法の問題点となっている。

本論文では、菌種を越えてビール混濁能と相関性を持つ遺伝子マーカーの探索により、未知のビール混濁菌を含む網羅的微生物検出システムの構築を目的としている。

序章に引き続き、第2章では新規ビール混濁乳酸菌の提案および同定検出法の開発を行った。乳酸菌はビールにおける微生物事故の約70%を占めるが、日本のビール産業では *Lactobacillus brevis* および *L. lindneri* に属する乳酸菌が脅威的な存在となっている。ビール工場環境から新規に単離した3株のビール混濁乳酸菌 *Lactobacillus* sp. LA2, LA7, LA8 株の16S rDNA 配列解析およびDNA-DNA ハイブリダイゼーション試験の結果から、本株が従来 of ビール混濁乳酸菌 *L. brevis*, *L. lindneri* およびもっとも近縁と考えられる *L. collinoides* のいずれの菌種にも属さない新菌種と結論し、新ビール混濁乳酸菌 *L. paracollinoides* を提案した。さらに、16S rDNA および16-23S rDNA ITS 領域の塩基配列を基に設計したプライマーのセットを用いることにより、本菌種を特異的に同定する検出法を開発した。

第3章では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を行った。強いビール混濁能を有する *L. brevis* ABBC45 株が保持するプラスミド pRH45 より見出された *horA* 遺伝子はホップ耐性遺伝子であることが実証されていたが、*horA* が欠失した ABBC45^c 株にもビール混濁能が残存していた。ABBC45^c 株を37°Cで継代培養することにより、ビール混濁能を完全に失った ABBC45^{cc} 株が得られた。ABBC45^c 株と ABBC45^{cc} 株のプラスミド構成の比較から、ABBC45^c 株の pRH45II プラスミドの一部が ABBC45^{cc} 株では欠失していることを見出した。欠失部に含まれる遺伝子の中で PMF 型多剤排出ポンプをコードすると考えられる ORF5 を遺伝子マーカーとして選択した。PCR およびサザンハイブリダイゼーション法により51株の *L. brevis* および *L. paracollinoides* における ORF5 ホモログの有無を調査したところ、ビール混濁能との完全な相関が見出された。一方、*horA* は ORF5 を持たない *L. lindneri* のビール混濁能と相関していた。*horA* と ORF5 の2つの遺伝子マーカーを併用することにより、乳酸菌のビール混濁能の判定について漏れのない検査体制につながることを示した。

第4章ではビール混濁能判定マーカー *horA*, ORF5 の遺伝学的解析を行った。ビール混濁能を持つ *L. brevis* 5株および *L. paracollinoides* 2株について、それぞれ 30°Cならびに 37°Cで継代培養を行ったところ、すべての株からビール混濁能を失った株が取得されたことから、従来のビール醸造微生物学の定説に反して乳酸菌のビール混濁能は不安定な形質であることを示した。また、ORF5 を含む遺伝子領域は、ビール混濁能を有する *L. paracollinoides* LA2^T株および *Pediococcus damnosus* ABBC478 株の当該領域と 99%以上の相同性を示したこと、および近接する ORF3 は transposase と相同性を有することから、当該遺伝子領域が転移性遺伝子である可能性が示された。同様の解析結果が *horA* 遺伝子からも得られたことから、乳酸菌のビール混濁能が外来遺伝子の水平伝播によって獲得されている可能性について考察した。

以上、本論文は乳酸菌のビール混濁能はプラスミド上の *horA* または ORF5 のいずれかの遺伝子によるものであることを明らかにするとともに、これらの遺伝子マーカーを用いる網羅的微生物検査を行う妥当性を示唆するものであり、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。