

論文の内容の要旨

氏名 林 伸之

指導教員 五十嵐 泰夫

論文題目

遺伝子増幅技術を用いたビール製造における微生物検査手法に関する研究

近年、食品製造業において、「食の安全」を保証する事は、以前にも増して重要な課題となっている。ビール製造においては工程中に品質に悪影響を及ぼす汚染菌が存在しないこと、及び製品に汚染菌が存在しないことを消費者に保証することは重要である。ビール自体はアルコールを含むこと、pHが比較的低いこと、細菌、特にグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つホップ由来の苦味物質を含むことなどから、ビール中で繁殖する可能性がある微生物の種類は比較的限られている。ビールを汚染する微生物に対して菌種を同定するPCR法等はあったが、同じ菌種に属していても株毎にビールでの増殖能が異なることがあり、正確なリスク評価にはビール混濁能、及びその判定法に関する研究が望まれていた。

第1章 *Lactobacillus brevis* ビール混濁菌株を識別する遺伝子マーカーの取得

ビールに添加されるホップ苦味物質は、イオノフォアとして細胞内の Mn^{2+} イオンのような二価イオンと H^+ イオンを交換することにより、感受性菌の細胞膜

をはさんだ pH 勾配を破壊する。しかし、いくつかの種類の乳酸菌は、このような抗菌活性に対抗してビールで増殖することが出来る。製品ビール中で増殖して混濁事故を引き起こす乳酸菌として、*Lactobacillus brevis* が広く知られているが、*L. brevis* には菌株によって混濁能を持つ株と持たない株が存在し、このホップ苦味物質に対する抵抗性が *L. brevis* のビール混濁能を分けていると考えられている。しかし 16S rRNA 遺伝子を使った PCR などでは混濁菌と非混濁菌を見分けることが出来なかった。

そこで RAPD PCR で混濁菌と非混濁菌を見分けるマーカーを検索した。440 のランダムプライマーを使ってスクリーニングした結果、あるランダムプライマーがビール混濁菌に特異的な 1.1 kb の DNA 断片を増幅させることが分かった。塩基配列解析の結果、そこには ORF が存在し、11 の膜貫通領域、binding-protein-dependent transport signature を持つ膜タンパクがコードされていた。また相同性検索からは、この遺伝子は Nramp と呼ばれる二価カチオントランスポーターに相同性があり、*hitA* (hop-inducible cation transporter) と名付けられた。ノーザン解析では、ホップ苦味物質を添加した MRS 培地で培養することによって *hitA* 遺伝子の発現が誘導され、ホップ苦味物質に対する抵抗性に関与しているのではないかと考えられた。乳酸菌の増殖にはマンガンは重要な役割を果たしていることから、ホップ苦味物質のようなイオノフォアが培地に存在する場合においてもマンガンを細胞内に維持する機構は、ビール中で増殖するために重要であると推察された。

第2章 多菌種のビール混濁乳酸菌を検出する遺伝子マーカーの取得

乳酸菌のビール混濁を起こす機構はまだ不明な点が多いことから、RAPD PCR 解析をさらに拡大し、数多くのランダムプライマーについて混濁菌を識別できるかどうか検討した。600 プライマーのスクリーニングの結果、いくつかのプライマーが混濁菌を識別することが新たに分かった。これらのプライマーで

増幅された領域の塩基配列解析の結果、いくつかの遺伝子座が見つかり、その中の一つの遺伝子座が特にビール混濁能に深く関与していることが推察された。その遺伝子座には dolicol phosphate mannose synthase 相同遺伝子、teichoic acid glycosylation protein 相同遺伝子等をコードするオペロンが存在していた。この遺伝子座の配列を使った PCR による評価では、混濁菌を識別する確率がより高く、さらに *Pediococcus damnosus* 等他の菌種の混濁菌を見分けていた。当社では、混濁菌を識別する抗血清が取得されており、これらの抗血清はビール混濁菌に特異的な細胞壁外層の糖鎖構造を認識していると考えられている。従って、本研究で発見されたテイコ酸グリコシレーション蛋白等をコードする当該遺伝子座が、乳酸菌の混濁能にかかわっている可能性は非常に高いと考えられた。

第3章 LAMP 法を利用した *Brettanomyces/Dekkera* 属野生酵母の同定と検出

微生物の検出、同定法は PCR を基本に検討してきたが、近年 LAMP 法と言う新しい遺伝子増幅技術が報告されている。LAMP 法は栄研化学によって開発され、等温で反応が進む、特異性が高い、増幅効率が高く、短時間に増幅が可能である、増幅産物量が多く、簡易検出に適している等の特徴を有している。そこで LAMP 法をビール有害微生物検出・同定系へ応用すべく検出用プライマーの開発を行った。検討対象として、野生酵母である *Dekkera* 属酵母を選択した。

ITS 領域を標的にして *Dekkera* 属酵母 4 菌種 (*Dekkera anomala*、*D. bruxellensis*、*D. custersiana*、*Brettanomyces naardenensis*) を菌種レベルで識別できる LAMP 法プライマーセットを開発した。これらのプライマーセットを用いた際に、ビール、ワイン、清涼飲料水等の様々な由来の *Dekkera* 属酵母から標的遺伝子領域を増幅することが出来、また検出対象の菌種以外の酵母から特異的に識別することができた。このプライマーセットを使った LAMP 法は、非常に高感度であり、蒸留水、ワイン、ビールに懸濁した 10^1 cfu レベルの

Dekkera 属酵母を検出できた。また、LAMP 法によるコロニー形成数の定量は、 1×10^1 cfu から 1×10^7 cfu の範囲で可能であると考えられた。ワインやビールに *Saccharomyces* 属酵母を多量に懸濁した場合でも、同程度の感度で *Dekkera* 属酵母を検出できた。LAMP 法はリアルタイム PCR や nested PCR のような PCR 改変法と同等の感度を持つと考えられるが、LAMP 法では電気泳動・DNA 染色は必要なく、反応 1 時間で結果が確認できる。このように特異性、作業効率、検出感度の面から、本研究で開発した *Dekkera* 属を検出する LAMP 法は、ビール工場をはじめとして、ワイナリー、清涼飲料工場においても非常に有用な微生物検査手法となると考えられた。

まとめ

RAPD PCR 解析により、ビール混濁乳酸菌を特異的に識別できる遺伝子マーカーが取得でき、中には菌種の範囲を超えた混濁能判定が可能なマーカーもあった。これらのマーカーには、マンガン輸送、細胞壁糖鎖構造など従来からホップ苦味物質への耐性機構に重要とされている要因と関わりが推察される遺伝子がコードされており、このようなアプローチがビール混濁能に関連する遺伝子取得に有効であることが示された。

さらにビール有害微生物の効率的で精度の高い検出のために新しい遺伝子増幅法である LAMP 法を評価した。本研究で作成した *Dekkera* 属酵母検出用 LAMP プライマーは、特異性・検出感度が高く、ワインやビールからも直接対象菌株を検出できた。これらの技術を製造工場に導入することで、詳細で正確なデータを迅速に工程に提供できるようになり、品質保証体制のさらなる高度化が期待される。