

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 林 伸之

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が、ある種の乳酸菌や酵母はこのような環境下でも増殖する能力を持つ。本論文では、ビール工場において微生物の危害性を迅速に評価し、工程全体に渡って微生物レベルを抑制し、微生物事故を未然に防ぐことを目的として、微生物によるビール混濁の機構に関連した遺伝子マーカー、及び迅速かつビール工場で実施が容易な遺伝子増幅技術について検討した。

第1章では、ビール工場で頻繁に分離される *Lactobacillus brevis* についてビール混濁菌株と非混濁菌株を識別する遺伝子マーカーを取得するため、RAPD PCR による解析を行った。440 のランダムプライマーについて混濁菌と非混濁菌を見分けるプライマーをスクリーニングした結果、一つのランダムプライマーがビール混濁菌に比較的特異的な 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、膜タンパクがコードされており、*hitA* と名付けられた。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った。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章では、RAPD PCR 解析をさらに拡大し、ビール混濁を起こす機構に関わる未知の遺伝子マーカーが取得出来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し、これらのプライマーによって増幅される領域が4つの遺伝子座にまとまることが分かった。その中の一つの遺伝子座が特にビール混濁菌株を見分ける確率が高く、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、*L. brevis* 混濁菌が高い確率で識別され、さらに *Pediococcus damnosus* の混濁菌も見分けていた。これまでに *L. brevis* 混濁菌、*P. damnosus* 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テイコ酸を含む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、本論文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章では、従来微生物の検出・同定法に用いて来た PCR に替わって、作業現場での利用に向いているとされている LAMP 法と言う新しい遺伝子増幅技術のビール有害微生物検出・同定系への応用について検討した。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*) 用の LAMP 法プライマーセットを開発したところ、反応 1 時間以内にこれら菌種を特異的に識別出来た。このプライマーセットを使った LAMP 法は、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、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。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、ビール工場の他、ワイナリー等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。

以上、本研究は、ビール混濁乳酸菌を特異的に識別できる新規な遺伝子マーカーや特異性・検出感度の高い *Dekkera* 属酵母検出用 LAMP プライマーを用いることで、ビールやワインから直接対象菌株を検出でき、工程内での微生物検査に有用であることを示したものであり、学術的さらには産業応用的に貢献するところが多い。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。