

## 論文の内容の要旨

論文題目      ビール混濁性細菌の包括的検出法構築に関する研究

氏名            飯島 和丸

ビールは、微生物耐久性の優れた飲料であり、古くから世界中で飲まれているにも拘わらず、近年に至ってもなお、新規なビール混濁性微生物が発見されている。新菌種による混濁事故の報告はまだ少数ではあるものの、今後も新規なビール混濁性菌種が出現する可能性は否定できない。万一、ビール製造工程中にビール混濁性微生物が混入した場合、製品ビールの異臭や混濁が発生し、製品回収を行わなければならない事態になり、ビール製造企業にとっては、多大な経済的損失と長年培ってきた企業ブランドの失墜を招くことになる。そこで、未対応の新菌種が微生物管理網を潜り抜け、微生物混濁事故を引き起こすことを未然に防止するため、本論文では、未確立菌種を含めたビール混濁性菌を包括的に検出できる微生物管理手法を構築することを研究の目的とした。第 1 番目に、菌種が未確立なビール混濁性乳酸菌の検出法について検討を行い、第 2 番目に、新菌種を含む既報のビール混濁性菌種の包括的な検出法の開発を行うことにより、目的の実現を図った。

第 1 番目の菌種が未確立なビール混濁性乳酸菌の検出法については、*horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子をマーカーとしたビール混濁性乳酸菌検出法が有望視されている。ただし、*horA* 遺伝子についてはホップ耐性遺伝子であることが明らかにされていたが、*horC* 遺伝子の機能については不明であり、*horC* 遺伝子をビール混濁性マーカーとすることの根拠が必ずし

も十分ではなかった。また、両遺伝子のビール混濁性マーカーとしての有効性については主要なビール混濁性乳酸菌種およびビール非混濁性菌種を用いて検討されてきたが、菌種が未確立なビール混濁性乳酸菌株を検出できる可能性を有しているのかという点については、さらに検討の必要があった。

まず、*horC* 遺伝子の機能と乳酸菌のビール混濁性との関係を明らかにするため、代表的なビール混濁性菌種である *Lactobacillus brevis* のビール非混濁株で *horC* 遺伝子を欠失している ABBC45<sup>cc</sup> 株に *horC* 遺伝子を導入することにより機能解析を試みた。*L. brevis* に *horC* 遺伝子を導入するため、大腸菌-乳酸菌シャトルベクター pHY300PLK をベースとして、シャトルベクター pGK13 の選択マーカーであるクロラムフェニコール耐性遺伝子を組み込んだシャトルベクター pHYc を新たに構築することにより、*horC* 遺伝子を ABBC45<sup>cc</sup> 株に導入することに成功し、機能解析が可能となった。そこで、ビール混濁性に関連する機能として、*horC* 遺伝子導入株について、ホップ耐性およびビール混濁性を調査したところ、ホップ耐性の上昇およびビール混濁性の獲得が認められた。このことから、*horC* 遺伝子をビール混濁性マーカーとして利用することは、機能の観点からも妥当であると考えられた。*horC* 遺伝子がどのような条件下で機能発現するのかという知見が、*horC* 遺伝子の起源、あるいは、どのような微生物種に水平伝播する可能性があるのかという謎を解決する糸口になると考え、*horC* 遺伝子の機能解析を進めた。その結果、*horC* 遺伝子は多剤耐性を賦与する機能を有していることが示された。また、HorC タンパク質は、ハーフサイズの RND トランスポーターと推定しているが、ホモダイマー（あるいはホモオリゴマー）の形態で、ホップ耐性および多剤耐性機能を発現することが示唆された。

菌種が未確立なビール混濁性乳酸菌株を検出できる可能性を有しているのか考察するため、ビール醸造関連環境からビール混濁性乳酸菌株のスクリーニングを行い、主要ビール混濁性乳酸菌 34 株以外にビール混濁性に関する知見に乏しい新菌種 *Lactobacillus backi* LA21、LA22、LA23 株および *Pediococcus inopinatus* LA20 株を取得した。分離された *L. backi* および *Ped. inopinatus* についてビール混濁性を調査した結果、*L. backi* は 3 株全てがビール混濁性を示し、*Ped. inopinatus* については非常に弱いビール混濁性（準ビール混濁性）を持つことが示唆された。*Ped. inopinatus* LA20 株を含む全ての乳酸菌 38 株についてビール混濁性マーカー *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子の有無を調査したところ、*horA* 遺伝子については分離株の 92%、*horC* 遺伝子については分離株の 97% が保有していた。また、全ての乳酸菌分離株で *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子のいずれか一方を保有していたため、*horA* 遺伝

子および *horC* 遺伝子の 2 つの遺伝子マーカーを併用すれば包括的にビール混濁性乳酸菌株を検出できると考えられた。*Ped. inopinatus* LA20 株および *L. backi* LA21 株、LA22 株について、*horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子の周辺領域解析を行い、いずれの株の *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子領域も *L. brevis* ABBC45 株の当該領域と本質的に同じ DNA 領域を有していることを示した。このことから準ビール混濁性株 *Ped. inopinatus* やビール混濁性新菌種 *L. backi* においても水平伝播によりビール混濁性マーカー *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子を獲得していることが示唆された。そのため、ビール混濁性マーカー *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子の水平伝播が主要ビール混濁性菌種だけで起きている特別な現象ではなく、その他の乳酸菌においても起きている可能性が示された。このことは、ビール混濁性マーカー *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子が、菌種が未確立なビール混濁性乳酸菌株の検出にも適用できることを示唆するものであると考えられた。

2004 年以降、*Lactobacillus backi*、*Pectinatus haikarae*、*Megasphaera sueciensis*、*Megasphaera paucivorans* がビール混濁性を有する新菌種として提案されたが、乳酸菌以外でビール混濁性細菌として重要な *Pectinatus* 属菌や *Megasphaera* 属菌などの偏性嫌気性グラム陰性菌には、これまでにビール混濁性マーカーの報告は無い。このため、現状では、グラム陰性菌については菌種が未確立なビール混濁性菌株を検出する手段はなく、ビール混濁性新菌種が提案されたら、菌種同定検出法を速やかに構築することが必要となる。そこで、本論文第 2 番目の取り組みとして、操作性に優れたマルチプレックス PCR 法の開発を行い、新菌種を含む既報のビール混濁性菌種を包括的に検出することを試みた。2004 年以降に新菌種提案されたビール混濁性菌種について、同定検出法構築の必要性について検討するため、菌種の再同定および既報マルチプレックス PCR 法における反応性を調査したところ、*P. haikarae*、*M. sueciensis*、*M. paucivorans* について、新たに同定検出法を構築する必要があると考えた。*P. haikarae* については菌種特異的プライマー、*M. sueciensis* および *M. paucivorans* については、両菌種を同時に検出可能な共通プライマーを設計し、それぞれ既報の *Pectinatus* 属菌用マルチプレックス PCR 法 (*P. multiplex*) およびビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法 (*C. multiplex*) にプライマーを加えた新菌種対応 *Pectinatus* 属菌用マルチプレックス PCR 法および新菌種対応ビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を構築した。新菌種対応マルチプレックス PCR 法の性能について評価したところ、いずれも実用水準を満たした特異性、反応性、検出感度を有していると考えられ、新菌種を含めた既報の全ビール混濁性菌種を同定検出することが可能になった。

本研究により、*horC* 遺伝子が乳酸菌にホップ耐性およびビール混濁性を賦与すること、主要ビール混濁性菌種以外のビール混濁性乳酸菌も *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子を保有しており、さらに水平伝播により両遺伝子を獲得している可能性があることを示した。これらのことは、これまで明確ではなかった *horC* 遺伝子の機能および主要ビール混濁性乳酸菌種以外への *horA* 遺伝子領域および *horC* 遺伝子領域の水平伝播について知見を与えるものであり、ホップ耐性遺伝子が乳酸菌間を拡散して新たなビール混濁性乳酸菌が出現するという水平伝播仮説を強く支持するものであると考えられる。このことから、*horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子をマーカーとしたビール混濁性乳酸菌検出法は、遺伝子マーカーの有無とビール混濁性との高い相関および水平伝播仮説に加え、機能の観点からも裏付けられた信頼性の高い手法であると言いうことができ、菌種が未確立なビール混濁性乳酸菌を検出するための有効な施策であると考えられた。また、実用水準の特異性、反応性、検出感度を有した既報の全ビール混濁性菌種を簡便に検出できるマルチプレックス PCR 法を完成させた。本研究により、菌種が未確立なビール混濁性乳酸菌および既報のビール混濁性細菌について、包括的に検出することが可能な微生物管理手法が完成したと考えられる。