

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 飯島 和丸

ビールは、抗菌作用をもつホップ成分を含むことから品質を劣化させる微生物の生育は限られているため、微生物学的には比較的安定な食品といえる。しかし、近年、生ビールの消費が増加していることから、ビール製造企業にとってビール混濁性微生物の管理は重要な問題となっている。本論文は、ビール混濁性菌を包括的に検出できる微生物管理法を構築することを目的として行ったものであり、5章からなる。

第1章の序論に続き、第2章では *horC* 遺伝子の機能と乳酸菌のビール混濁性について検討を行った。*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った。そこで、*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^{cc} 株に *horC* 遺伝子を導入することにより機能解析を試みた。*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べたところ、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。*horC* 遺伝子の機能解析の結果、*horC* 遺伝子は多剤耐性を賦与する機能を有していること、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され、ホモダイ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。

第3章では、ビール混濁性マーカー *horA* 遺伝子および *horC* 遺伝子を用いた未確立菌種検出法について検討した。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 4 株の新菌種 (*Lactobacillus backi* および *Pediococcus inopinatus*) を取得した。*P. inopinatus* 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* 遺伝子の有無を調べたところ、*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* 遺伝子または *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。*P. inopinatus* および *L. backi* 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 *P. inopinatus* や *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。

第4章では、ビール混濁性細菌の包括的な菌種同定検出法の開発を行った。2004年以降、*L. 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ている。しかし、*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。そこで、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。*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、新菌種対応マルチプレックスPCR法を構築し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た。第5章では、総括と展望が述べられている。

以上、本研究は、*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、ビール混濁性乳酸菌は少なくとも *horA* 遺伝子または *horC* 遺伝子を保有していること、また、菌種が未確立な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法について提案したものであり、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。