

ビール汚染能を持つ  
偏性嫌気性細菌に関する研究

本山 靖朗

# 目次

	頁
略語表	4
第I章 序論	6
第II章 <i>Pectinatus</i> の分離・同定	
第1節 緒言	10
第2節 材料および方法	12
第3節 結果	
1. 分離培養法およびスクリーニング法の検討	23
2. 工場サンプルの解析	25
3. ビール生育性試験	26
第4節 考察	28
第5節 要約	32
第III章 <i>Pectinatus</i> 、 <i>Selenomonas</i> 、 <i>Zymophilus</i> の系統解析	
第1節 緒言	33

第2節	材料および方法	35
第3節	結果	
1.	ITS領域の増幅	39
2.	ITS領域の解析	39
3.	系統解析	43
第4節	考察	45
第5節	要約	48
第IV章	PCR法による迅速同定法の開発	
第1節	緒言	49
第2節	材料および方法	50
第3節	結果	
1.	特異primersによる増幅	53
2.	特異性の確認	53
3.	種内での保存性	53
4.	検出感度	54
第4節	考察	55
第5節	要約	56

第V章	Ribotyping法による <i>Pectinatus</i> の汚染追跡法	
第1節	緒言	57
第2節	材料および方法	58
第3節	結果	
1.	<i>P. frisingensis</i> の分類	60
2.	ビール工場別の解析	60
3.	分離箇所別による解析	61
第4節	考察	62
第5節	要約	65
第VI章	総括および今後の展望	66
引用文献		69
原著論文		79
謝辞		80

## 略語表

BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pair
BU	Bitter unit
CCD	Charge-coupled device
DDBJ	DNA data bank of Japan
DNA	Deoxyribonucleic acid
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
dATP	2'-Deoxyadenosine-5'-Triphosphate
dCTP	2'-Deoxycytidine-5'-Triphosphate
dGTP	2'-Deoxyguanosine-5'-Triphosphate
dNTPs	2'-Deoxyribonucleoside-5'-Triphosphates
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
dTTP	2'-Deoxythymidine-5'-Triphosphate
DW	Distilled water
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
IFO	Institute for fermentation, Osaka
ITS	Internal transcript spacer
JCM	Japan collection of microorganisms
kbp	Kilo-base pair
LB	Luria-Bertani

LPS	Lipopolysaccharides
MK	Menaquinones
MRS	De Man, Rogosa, and Sharpe
NJ	Neighbor-joining
PAT	PBS-BSA-Triton X
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PL	Asahi brewery's culture collection ( <i>Pectinatus</i> -like)
RFLPs	Restriction fragment length polymorphisms
rrn	rRNA operon
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
rTaq	recombinant Taq
SDS	Sodium dodecylsulfate
SSC	Standard saline citrate
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGC	Thioglycolate
Tris	Tris hydroxyethyl aminomethane
tRNA	transfer ribonucleic acid
UQ	Ubiquinones
UV	Ultraviolet

## 第I章

### 序論

ビール造りの歴史は長く、その起源は古代エジプト・メソポタミア文明にまで遡る(1)。当時の偶然に左右された自然発酵による醸造法から技術は飛躍的に進展し、現在の大規模なビール工場では大型タンクで醸造したビールを毎分1000本以上の速度で缶や瓶に充填し、品質的に制御されたビールを迅速かつ大量に生産できるまでになった。

しかし、幾つかの重要な問題が未だ残されており、そのひとつがビールを汚染する細菌に対する衛生管理である(2)。近年では、新規のビール汚染菌 *Pectinatus* が問題となっている(3,4)。この細菌に汚染されたビールは、著しく混濁し、硫化水素、メルカプタンにより、“硫黄臭”“腐卵臭”といった、ビールの爽快な味感とは極めてかけ離れた香味を呈する(3,4,5)。属名は、やや湾曲した菌体の内側側面に複数の鞭毛が付いていることから(3)、“櫛”を意味する *Pectinatus* と命名された(3)。*Pectinatus* の諸性質(3,4,6,7,8,9,10)を Table 1 に、鞭毛染色写真を Fig. 1 に示す。

*Pectinatus* は、アメリカの大手ビール会社 Adolph Coors Company の Lee *et al.* により 1978 年に初めて報告され、*Pectinatus cerevisiiphilus* と命名された(3,4)。報告当初、この細菌は *Zymomonas* や *Bacteroides* に含まれるなどの混乱があったが(5)、特徴的な鞭毛の付き方や、代謝産物、免疫交差性の違

Table 1. Characteristics of *Pectinatus*

Characteristics	<i>Pectinatus</i> <sup>a</sup>
Cell shape	Slightly curved rods
Cell diameter, µm	0.7-0.8
Cell length , µm	2.0-32.0 or longer
Flagellar arrangement	Multiple flagella(1-23 or more) on concave side, but not as a tuft
Motility	Young cells move very actively, giving the appearance of an “X” shape as they swim. Older and longer cells have a snakelike motion as they move.
Oxygen tolerance	Obligatory anaerobic
Gram stain	—
Sporeforming	—
Catalase activity	—
Oxidase activity	—
Main fermentation products	Propionate, Acetate
Quinone system	—
Peptidoglycan	Directly cross-linked <i>meso</i> -diaminopimelic acid
LPS	+
Cellular fatty acids	C <sub>11:0</sub> FA, C <sub>14:0</sub> DMA, C <sub>15:0</sub> FA, C <sub>18:1</sub> DMA <sup>b</sup>
GC content, mol%	38-41
Phylogeny by 16S rRNA	Gram-positive bacteria with a low DNA G+C content
Others	<i>Pectinatus</i> produces an unpleasant odor of “rotten eggs” in the beer due to metyl mercaptan, dimethyl sulfide, and hydrogen sulfide.

<sup>a</sup> Data from reference 3,4,6,7,8,9,10

<sup>b</sup> DMA=dimetyl acetal



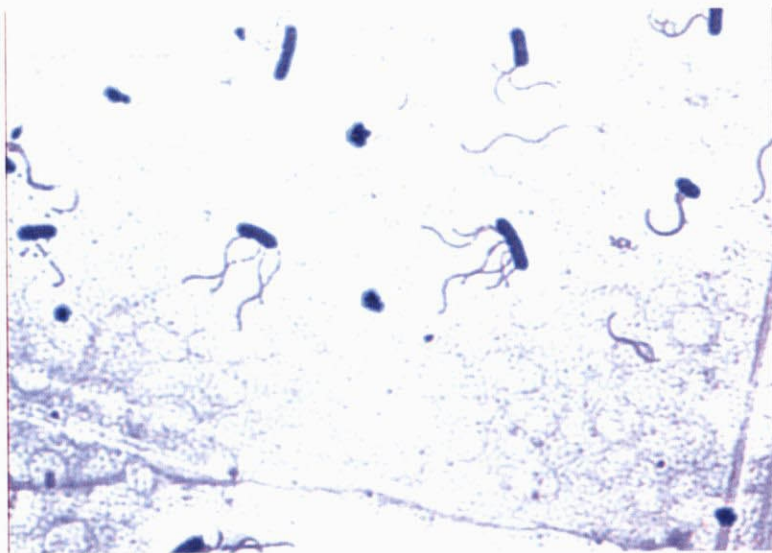


Fig. 1. Photograph of *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20467<sup>T</sup> /flagella staining. (Photo; Miwa Tanaka)

いにより、新属新種と認定された(5)。この *P. cerevisiiphilus* ATCC29359株は、エタノール濃度4.5 %(w/v)まで、pH3.7の酸性条件下で生育性を示し、ビール中で旺盛に増殖した(3)。しかし、Haikaraがビール醸造の添加酵母(pitching yeast)より分離した“*Pectinatus*”は、糖の利用能や低温生育性が異なり、pH4.2以下では生育しなかった(11)。ビールのpHは3.7-4.8であるため(2)、この“*Pectinatus*”はビールに生育しないか、例え生育してもビール品質に混濁などの重大な影響は及ぼさないと考えられた。このように“*Pectinatus*”のビール生育性についての情報が混乱していた。そこで国内ビール工場から新たに*Pectinatus*の分離同定調査を行い、全ての株のビール生育性を調べた。その結果について、第II章に記述した。

Lee *et al.*が最初に報告した*P. cerevisiiphilus* ATCC29359株(3,4)以降、偏性嫌気性のグラム陰性桿菌が次々と分離された(10,11,12,13)。分離源は、混濁ビール(12,13)、添加酵母(11)、ビール工場の排水(10)など様々であった。その中でVTT-E-79100株は、*Pectinatus*に特徴的な鞭毛が菌体側面に並ぶユニークなものであったことから、*Pectinatus*に属すると推定された(12,13)。しかし、*P. cerevisiiphilus* ATCC29359株とはGC含量が3%異なり、各種糖発酵性やATCC29359抗血清による凝集性も異なったことから、*P. cerevisiiphilus*とは異なる種であると推定されたが、それ以上のことは解らなかった(12,13)。一方、VTT-E-86269株は、低温での増殖能が高くエタノール耐性も強かったが、低pHでは生育せず、VTT-E-79100とのDNA-DNA交雑試験におけるDNA類似度が0-10%と低い為、*P. cerevisiiphilus*とは異なる種か、他の異な

る属であると推定された(11)。Schleifer *et al.*は上記の菌株を含めた類似の菌株群について、各種糖の発酵性、ペプチドグリカン、イソプレノイドキノン(UQ, MK)、GC含量、DNA-DNA交雑、16S rRNAの解析を行った(10)。その結果、VTT-E-79100株を含むグループは*Pectinatus*属の新種*P. frisingensis*、VTT-E-86269株を含むグループは*Selenomonas*属の新種*S. lacticifex*と命名された(10,11)。さらに*Pectinatus*、*Selenomonas*とは異なる菌株群が存在することが判明し、その菌株群は2つの菌種から構成され、新属新種*Zymophilus raffinovorans*、*Z. paucivorans*と命名された(10)。第III章ではTable 2に記載した細菌の詳細な系統学的位置の確認について記載した。

欧米における*Pectinatus*を原因とするビール混濁事故は、大手のビール企業を中心に発生していた(5)。この理由は、大企業が有する最新鋭の設備では酸素濃度の低いビールの生産が可能であり(2,5)、その結果偏性嫌気性の*Pectinatus*の生育が可能になった為である、と推定された(14)。我が国のビール製造の特徴も、欧米と同様に酸化耐久性向上の為酸素濃度が低いこと、加えて生(未殺菌)ビールが主流であること、ビールの鮮度を重視する傾向から製造から出荷までの日数が減少していること、が挙げられる。これらの要因は、*Pectinatus*の汚染の危険性が高まっており、迅速検査を実施する必要性を示している。そこで第IV章では、*Pectinatus*の新たな検査法の開発について記した。

ビールから*Pectinatus*が検出された際、迅速な汚染源の発見と汚染経路の

Table 2. List of Bacterial Strains of *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera*

Genus	Species	Source	Accession No. of 16S rRNA	Reference strains
<i>Pectinatus</i>	<i>cerevisiiphilus</i>	Spoiled Beer <sup>a</sup>	AF373026	DSM20467 <sup>T</sup> (= ATCC29359 <sup>T</sup> ), DSM20466, DSM20762, DSM20763
	<i>frisingensis</i>	Spoiled Beer <sup>a</sup>	AF373027	DSM6306 <sup>T</sup> (= VTT-E-79100), DSM20465, DSM20466, DSM20467, DSM20759, DSM20760
<i>Selenomonas</i>	<i>ruminantium</i> subsp. <i>lactilytium</i>	Bovine Rumen Contents <sup>b</sup>	AF373022	JCM6582 <sup>T</sup>
	<i>ruminantium</i> subsp. <i>ruminantium</i>	Bovine Rumen <sup>b</sup>	AF373022	JCM7528 <sup>T</sup>
	<i>noxia</i>	Human Gingival Crevice <sup>c</sup>	AF287799	JCM8546 <sup>T</sup>
	<i>infelix</i>	Human Gingival Crevice <sup>c</sup>	AF287802	JCM8545 <sup>T</sup>
	<i>flueggei</i>	Human Gingival Crevice <sup>c</sup>	AF287803	JCM8544 <sup>T</sup>
	<i>sputigena</i>	Human mouth <sup>d</sup>	AF373023	JCM6580
	<i>lacticifex</i>	Pitching Yeast <sup>a</sup>	AF373024	DSM20765 <sup>T</sup>
<i>Zymophilus</i>	<i>paucivorans</i>	Brewer's waste <sup>a</sup>	AF373025	DSM20756 <sup>T</sup>
	<i>raffinosisivorans</i>	Brewer's waste <sup>a</sup>	N. A. <sup>e</sup>	DSM20757 <sup>T</sup>
<i>Megasphaera</i>	<i>elsdenii</i>	Rumen of Sheep <sup>e</sup>	U95027	JCM1772 <sup>T</sup>
	<i>cerevisiae</i>	Brewer's waste <sup>e</sup>	L37040	DSM20462 <sup>T</sup>

<sup>a</sup> Data from reference (10)

<sup>b</sup> Data from reference (15)

<sup>c</sup> Data from reference (16)

<sup>d</sup> Data from reference (17)

<sup>e</sup> Data from reference (18)

<sup>e</sup> N. A.=Not Available

把握をすることが求められる。しかし、同種の菌が複数のポイントから検出された場合、種レベルの情報だけでは汚染源や汚染経路を特定することはできない。そこで第Ⅴ章では、*Pectinatus*を株レベルで分類することにより、汚染源と経路を科学的に把握することを可能にする汚染追跡法について記述した。

## 第II章

### *Pectinatus*の分離・同定

#### 第一節 緒言

ビールあるいは醸造用酵母、ビール工場排水などから、新規の偏性嫌気性細菌の分離が、欧米を中心に報告された(3,4,10,11,12,13)。その中で*Pectinatus*は新しいビール汚染菌として報告された(3,4)。しかし、*Pectinatus*に属する全ての株にビール生育性があるかは不明であった(11)。この調査を行うには多数の*Pectinatus*菌株を用いた網羅的なビール生育性試験をする必要があったが、本研究以前に分離された*Pectinatus*は株数が少なかった(3,4,12,13)。*Pectinatus*は“微生物事故”のビールから分離された新規の細菌であって(3,4)、環境からの分離法が確立されていないことが株数の少ない理由である。そこで第II章では、以下の項目の検討を行った。

#### ・採取・培養

*Pectinatus*はその生育に高度な嫌気度を要求するため(3,4,6)、採取から培養までの過程において、高度な嫌気状態の保持に配慮する必要があり、特に平板培養は困難であった(4)。しかし混濁ビールが分離源である場合は、ビール中に占める*Pectinatus*の存在比率は優勢であるため、平板培養でのコロニー形成率が低くても純分離操作に問題はなかったものと推定された。

一方、環境サンプルには多種多様な細菌が混在している。従って、サンプ

ル中の*Pectinatus*の存在比率が低い場合、以前報告された平板培養法では、コロニーが形成されないか、形成されても他のコロニーに隠れてしまう可能性が高い。そこで、選択培養法およびコロニー形成率が高い嫌気培養法を検討した。

#### ・スクリーニング

平板培地に生育した個々のコロニーに対し、グラム染色、鞭毛観察、糖発酵性などの性状試験を行うことは、操作が煩雑で、効率が悪い、という問題があった。そこで、Colony Hybridization法(19,20)を用いてスクリーニングすることにした。プローブは、*Pectinatus*の全染色体DNAを使用した。また、対象とするコロニーには、グラム陽性菌などの*Pectinatus*以外の細菌が含まれることを想定し、フィルター転写後の溶菌条件や、Hybridizationのstringencyを検討した。

#### ・同定試験

以前に記載された*Pectinatus*の一般性質(3,4,6,10)を参考にし、基準株、参考株を基に、各種糖発酵能、GC含量、DNA類似度(21,22,23,24)を中心とした化学分類法に基づく同定を実施した。

以上より、分離・同定を行った全ての*Pectinatus*株について、ビール生育性を調査した。

## 第二節 材料および方法

### 1. サンプル採取および培養

#### (1) サンプル採取および増菌培養

滅菌済木軸綿棒(栄研器材)を用いた拭き取り法を採用した。採取後の綿棒は、直ちにチオグリコレート培地(25, 変法TGC™, 日水製薬)へ穿刺し培養を開始した。

TGC : カゼイン-スイ液消化ペプトン 17g, 大豆ペプトン 3g,  
ブドウ糖 6g, 塩化ナトリウム 2.5g, チオグリコール酸ナトリウム  
0.5g, L-シスチン 0.25g, 亜硫酸ナトリウム 0.1g, カンテン 0.7g,  
精製水 1000ml, pH7.0

#### (2) 選択培養

市販ビールを5N-NaOHでpH4.6以上に調整しpore size  $\phi$  0.45 $\mu$ mのフィルターでろ過した“Modified Beer”を選択培地とした。嫌気条件下で、30℃、最長1ヶ月の培養期間とした。

#### (3) 嫌気培養法

ガスパック法(Gas Pack Pouch: BBL) (Fig. 2A)および嫌気グローブボックス法(Anaerobic glove box: COY Laboratory Products Inc.) (Fig. 2B)を比較検討のために使用した。



Gas Pack Pouchは、活性試薬液を試薬袋（鉄粉、炭酸カルシウム、クエン酸が混在）に注入する事によりPouch内の酸素を消費し炭酸ガスを発生させ、嫌気状態を作成する。これは、活性液と試薬袋内のクエン酸により酸が発生し、その酸が炭酸カルシウムと反応し、炭酸ガスが発生すると同時に、鉄の酸化反応で酸素が減少する。また、付属のindicatorは約3時間で青色から白色に変わり、嫌気状態になった事を示す。

Anaerobic glove boxの構成は次の通りである。まずシャーレなどの培養物をentry box内(Fig. 2B-1)で強制的に嫌気状態にする。これは真空ポンプ(Fig. 2B-2)によるentry box内空気の排気、ガスによる置換のサイクルを複数回繰り返す。この際使用される混合ガス( $\text{N}_2:\text{CO}_2:\text{H}_2=8:1:1$ )は、混合ガス作成装置(Fig. 2B-3)で作製される。本体glove boxには、Catalyst Boxes(Fig. 2B-4)が設置され、ガス置換で除去しきれなかった微量な酸素を混合ガス中の水素と反応させ水にする。生じた水はシリカゲルへ吸着させる。なお、内部に設置するOxygen and Hydrogen Analyzer (COY Laboratory Products Inc)(Fig. 2B-5)は、酸素濃度および水素濃度を監視することが可能である。

#### (4)嫌気培養法の比較検討

上記1.(4)の方法で培養した*P. cerevisiophilus*および*P. frisingensis*をPBSで希釈した後、Bacteria Counting Chamber deep0.02(Erma)で菌数を計測した。この菌 $4 \times 10^2$  cellsを予め $0.45\mu\text{m}\phi$ のフィルターでろ過したビールに接種した。この*Pectinatus*添加ビールを $0.45\mu\text{m}\phi$ のニトロセルロー

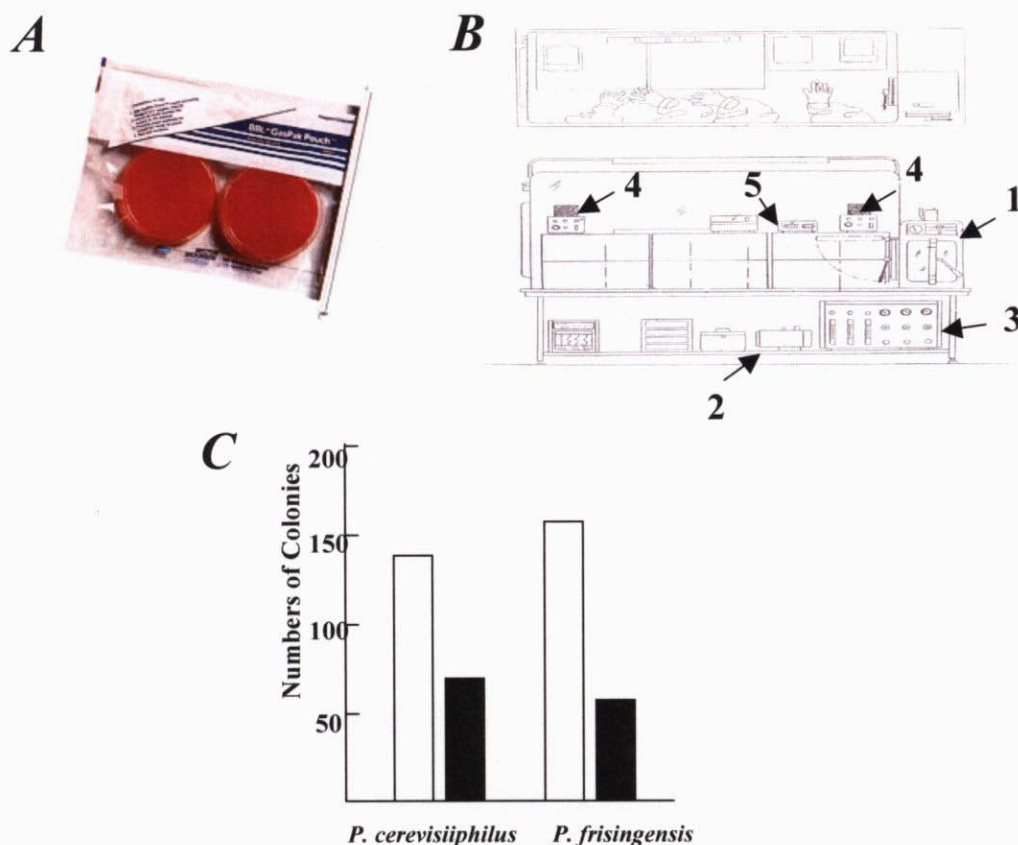


Fig. 2. Anaerobic Systems for *Pectinatus* Cultivation (A) GasPak system (BBL), (B) Anaerobic glove box (COY Laboratory Products Inc. ); 1, Entry Box; 2, Vacuum pump; 3, Gas mixer, 4, Pt-Pd (Catalyst); 5, Oxygen and Hydrogen Analyzer, (C) Comparison of Anaerobic Systems, □; Anaerobic globe box, ■; GasPak System.

ス製メンブランフィルター (Toyo Roshi Kaisha) をセットした減圧濾過ユニット (Toyo Roshi Kaisha) で濾過し、濾過後のメンブランフィルターを滅菌済のピンセットとハサミで2分割した。その分割した各々のメンブランを別々の1.5%(w/v)寒天添加TGC平板培地に載せ、直ちに1.(3)のガスパック法ならびに嫌気グローブボックス法で嫌気培養を開始した。培養温度は30℃とし、コロニーの数を目視で計測した。なお、培養期間は最長2週間までとした。

#### (5) 平板培養

1.5%寒天を含むTGC培地により、30℃、嫌気グローブボックス法による嫌気培養で行った。

#### (6) 基準株、参考株の培養

グラム陰性菌 (Table 2に示したType Strain) およびグラム陽性菌 *Lactobacillus brevis* (JCM1059, Type Strain)、*L. casei* (ATCC334, Type Strain)、*L. plantarum* (JCM1149, Type Strain) を供した。グラム陰性菌は、TGC培地、30℃、グラム陽性菌は、MRS broth (Merck)、25℃で各々嫌気グローブボックス法により、3日間行った。

MRS broth (g/liter): Peptone from casein 10.0, Meat extract 8.0, Yeast extract 8.0, D(+)Glucose 20.0, di-Potassium hydrogen phosphate 2.0, Tween80 1.0, di-Ammonium hydrogen citrate 2.0, Sodium acetate 5.0,

Magnesium sulfate 0.2, Manganese sulfate 0.04, pH5.7±0.2 at 25°C

## 2. スクリーニング

### (1)DNA抽出

10mlの液体培地で定常期まで培養した菌体を、滅菌水で1回集菌洗浄し、最終1mlのsuspension buffer(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、0.35M sucrose、pH8.0)に懸濁した。その懸濁液にLysozyme(SIGMA)を1mg/ml、N-acetylmuramidase(Seikagaku-Kogyo Co.)を50μg/mlおよびRNase A(SIGMA)を100μg/mlとなるように添加し、37°Cで1時間保持した後、160μg/ml proteinase K(Nakalai tesque)を含む2mlの2×CTAB bufferを添加し、50°Cで1時間保持した。

2×CTAB buffer : 100mM Tris-HCl, 1.5M NaCl, 20mM EDTA, 2%

CTAB, 2% 2-mercapt ethanol, pH8.0

その後、反応液に2mlのChloroform-isoamyl alcohol(97:3)を加え、20分間リストシェーカーで懸濁振とうした後、室温で2000×g、10分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、等量の2-propanolを加えて、氷中で1時間保持した後、4°Cで2000×g、10分間遠心した。その後、上清を捨て沈殿物を1mlの70% ethanol(-20°C)を加え、4°Cで2000×g、10分間遠心した。再度上清を捨て、15分間真空乾燥した後、沈殿物を100μlのTE

に懸濁し、CHROMA SPIN columns(CLONTECH)で最終精製を行った。

## (2)プローブの作製

近年、アイソトープを使用しない簡便なDNA標識法が開発され(26)、これを参考にした。

### 標識

2. (1) で抽出した10~30 $\mu$ lのDNA溶液と1 mg/mlに調製したphotobiotin溶液 (VECTOR) を等量混合し、水銀ランプ (KYOKUTO ELECTRIC 300W)下で20分間光照射した。次に、最終溶液が100 $\mu$ lになるように1mM EDTAを含む100mM Tris-HCl(pH9.0)を加えた後、2-butanolを100 $\mu$ l添加し、手で攪拌してエマルジョンを形成させた。16,000-18,000 $\times g$ 、1分間遠心した後、遊離のbiotinを含んだ上層を除いた。この抽出操作を計2回繰り返した。

### 変性

標識したプローブを沸騰水中で5分間加熱した後、氷中で急冷することによりプローブを変性させた。

## (3)Dot Blot/Colony Hybridization

### メンブランフィルターの調製

#### a. Dot Blot

10ngのDNAをナイロンメンブラン(Hybond-N<sup>+</sup>; Amersham)上にスポット後風乾し、0.4N-NaOHを染み込ませた濾紙(Whatman<sup>TM</sup>)上に載せ、20分間放置した。その後、2×SSC(0.3M NaCl, 0.3Mクエン酸ナトリウム)で中和した。

#### b. Colony hybridization

Table 3に示すように、Betzl *et al.*の方法(19)、Lonvaud-Funel *et al.*の方法(20)、更にproteinase K処理を追加する改良法を検討した。改良法を具体的に述べる。positive chargeのナイロンメンブラン(Hybond-N<sup>+</sup>; Amersham)上にコロニーを転写し、コロニー面が上向きになるようにした。次にLysozyme溶液の上にメンブランを載せ、室温で45分間インキュベートした。

Lysozyme溶液：10mg/ml Lysozyme, 50mM glucose, 50mM Tris-HCl, pH7.5

続いて、アルカリ溶液(0.5N NaOH, 1.5M NaCl)にて7分間インキュベートし、トリス緩衝液(0.5M Tris-HCl, 1.5M NaCl, pH8.0)にて中和操作を3分間 2回行い、続けて5×SSCに浸し、キムワイプでcell debrisを拭き取ることにより除いた。このメンブランをプロテアーゼ溶液(100µg/ml proteinase K, 0.1% SDS, 2×SSC)中に浸し、68℃で1時間イ

ンキュベートした。溶液を捨て、0.1% SDSを含む2×SSCで68℃、15分間の洗浄を2回行った。

### Hybridization

上記2.(3)で調製したメンブランを、68℃のECL gold hybridization buffer (Amersham)に浸し、1時間以上pre-Hybridizationを行った。続いて、2.(2)で調製したプローブを50ng/mlとなるように加え、68℃、16時間Hybridizationを行った。なお、ここでのプローブは、*P. cerevisiophilus* プローブと *P. frisingensis* プローブの mixture を用いた。Hybridization bufferを除き、メンブランを2×SSCにより5分間室温で振とうした後、0.4% SDSを含む2×SSCで68℃、15分間の洗浄を2回行った。次にBlocking溶液(1% casein, 0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH7.5)で室温、30分間インキュベートした後、そのBlocking溶液にStreptavidine-peroxidase conjugate(PIERCE)を0.1μg/mlとなるように添加し、室温で30分間反応させた。溶液を除き、マレイン酸緩衝液(0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH7.5)で室温、20分間の洗浄を2回行った。次に、ECL遺伝子検出キットの発光試薬Detection reagent 1及び2(Amersham)を等量混合した後、その2mlをメンブランのDNA面にムラなく滴下し、1分間インキュベートした。検出は、X-ray Film(Hyper film-ECL; Amersham)に感光させ、レンドール、レンフィックス(フジカラーサービス)で現像する方法、或いはCCDカメラを用いた画像解析システムArgus(浜松ホトニクス)を用いる方法を採用した。

### 3. 同定試験

#### (1) マイクロプレートを用いたDNA-DNA交雑試験

上保ら(21)および山田ら(22)の方法を参考にした。

#### DNA吸着プレートの調製

2. (1) の方法で抽出・精製したDNAを沸騰水中で5分間加熱後、氷中で急冷した。この操作より変性したDNAを0.1M  $\text{MgCl}_2$ を含むPBS(8mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137mM  $\text{NaCl}$ , 2.7mM  $\text{KCl}$ )で4ng/ $\mu\text{l}$ に調製し、マイクロタイタープレート(Nunc ImmunoplateまたはスミロニライザプレートH)に100 $\mu\text{l}$ ずつ分注した。30℃で15-16時間保温した後、200 $\mu\text{l}$ のPBSで1回洗浄後、60℃で3時間乾燥させた。なお、陰性対象としてサケ精子DNAを、陽性対象としてプローブとした菌種の精製DNAを用いた。

#### Hybridization

50℃に加温したPre-hybridization buffer 100 $\mu\text{l}$ を各ウェルに入れ、50℃で30分間インキュベートした。Pre-hybridization bufferを除いた後、4.で作製したプローブを予め50℃に保温したHybridization bufferに0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、各ウェルに100 $\mu\text{l}$ 入れてHybridizationを18時間行った。



Pre-hybridization buffer: Formamide 5.0ml, 20×SSC 2.5ml, 50×

Denhardt 1.0ml, DW 1.25ml, 熱変性Calf thymus DNA 0.25ml

Hybridization buffer: Formamide 4.5ml, 20×SSC 2.0ml, 50×Denhardt

0.2ml, 50% Dextran Sulfate 2.0ml, DW 1.1ml, 熱変性Calf thymus DNA  
0.2ml

#### DNA類似度の測定

Hybridization bufferを除いた後、200μlの0.2×SSCで3回ウェルを洗  
浄し、200μlのPAT bufferを入れ室温で10分間放置した。

PAT buffer : 0.5% BSA(fractionV), 0.1% Triton X-100 in PBS

PAT bufferを捨て、Streptavidine-β-galactosidase複合体(Gibco/BRL Life  
Technologies, Inc.)を0.1%含むPAT bufferを100μl入れ、37℃で30分間保  
温した後、200μlのPBSでウェルを3回洗浄した。

0.1mg/ml の 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside(Sigma)(1mM  
MgCl<sub>2</sub>含むPBS)を200μl加え、37℃に保温した。蛍光強度の測定は、  
マイクロプレートリーダーを用い、励起波長360nm、放射波長450nm  
にて測定した。

DNA類似度の計算は次式で算出した。

$$\text{DNA類似度} = 100 \cdot (X - N) / (P - N)$$

X: 測定対象DNA、P: 陽性対象DNA、N: サケ精子DNA

## (2) グラム染色試験

グラム染色キット(日水製薬)を使用した。試験法は添付の説明書に従った。

## (3)カタラーゼ試験

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>過酸化水素水溶液を菌体に滴下し、気泡の発生の有無を肉眼で判定した。

## (4)糖発酵性

API50CH(bioMerieux)を用いた。このキットは、galactose、glucoseなどの基質が各々49のウェルに封入してあり、そのウェルに菌を懸濁した培地を分注し培養する。この培地には炭素源以外の嫌気性細菌の生育に必要な成分、ならびにプロモクレゾールパープルが添加してあり、基質分解による酸生成に伴うpH変化により、培地は黄色に変化する。各基質の発酵能は、これらの色調の変化を目視で読み取った。

## (5)GC含量

2. (1) の方法で抽出・精製したDNAをNuclease I (ヤマサ醤油) で分解後、HPLCで分析した。条件は、YMC-PACK AQ-312を用い、移動層には

10mM リン酸カリウムバッファー (pH3.5) を流速 1.5ml/min で行い、UV270nm で検出した。GC 含量の算出は、検出されたピーク面積の比より行った。

#### 4. ビール生育性試験

TGC 培地で嫌気条件下、30℃、3 日間培養した *Pectinatus* 菌体を集菌洗浄後、市販ビール(500ml 瓶)に  $10^5$  cells 接種し、瓶肩部に衝撃を加えビール泡を噴出させることにより空寸部の空気を追い出し、直ちに再打栓した。25℃、静置状態で最大3ヶ月間観察した。生育判定は、瓶内ビールの濁り、沈殿の有無を肉眼で観察することより実施した。

### 第三節 結果

*Pectinatus*の環境からの分離・同定スキームをFig. 3に示した。まず、拭取り法でサンプリングした綿棒は、TGC brothで嫌気培養を開始した。培養後生育が認められた場合、TGC平板培地で培養を開始する一方で、Modified-Beerへ植継いだ。Modified-Beerで生育が認められた場合は、同様にTGC平板培地で培養を行った。これらの培養操作より生育したコロニーは、Colony Hybridization法へ供した。Colony Hybridizationで検出された陽性コロニーは、TGC平板培地で純分離操作を行い、形態がカン菌であり、グラム陰性カタラーゼ陰性である細菌について、Dot Blot Hybridizationを行った。このDot Blotは、Colony Hybridization法での擬陽性の確認、種の推定 (*P. frisingensis*/*P. cerevisiiphilus*) を目的に実施した。これらの試験により選抜された*Pectinatus*株は、最終的にGC含量の測定、各種糖の発酵性試験、DNA-DNA類似度の測定により同定を行った。

#### 1. 分離培養法およびスクリーニング法の検討

##### (1) 培養法の検討

ガスパック法(Fig. 2A)と嫌気グローブボックス法(Fig. 2B)の比較試験では、嫌気グローブボックス法の方が*Pectinatus*のコロニー形成率が高かった(Fig. 2C)。従って、平板培地の嫌気培養は、嫌気グローブボックス法を採用した。

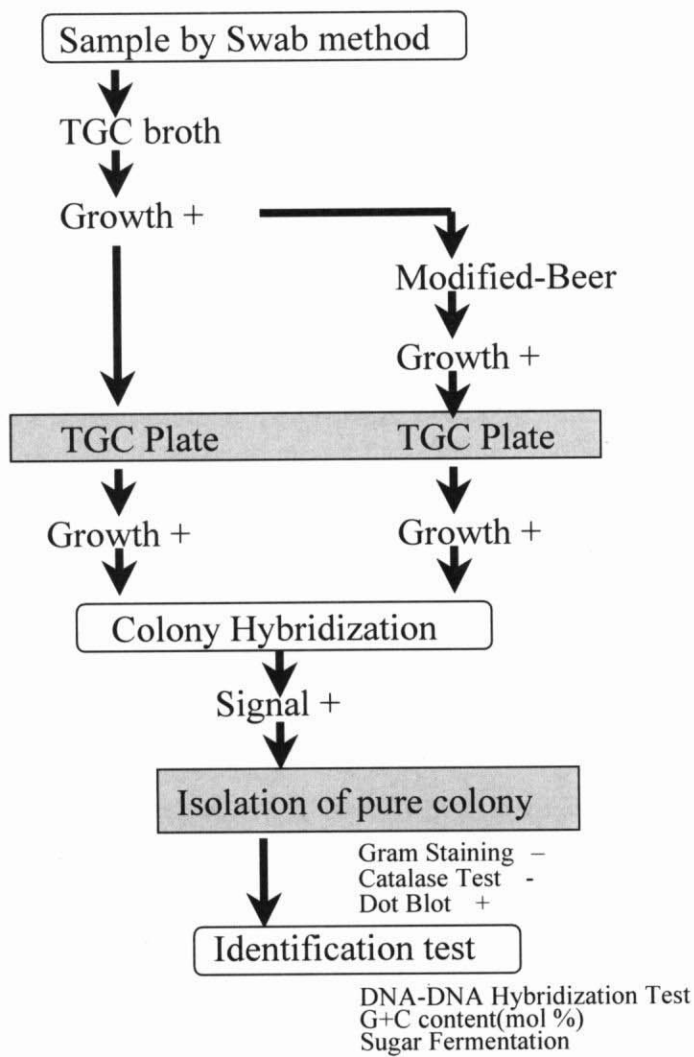


Fig. 3. Isolation/Identification Scheme of *Pectinatus* from Brewery Environment.  
 ■ ;Cultivation in Anaerobic glove box

## (2)スクリーニング法の検討

### Dot Blot Hybridization

Hybridization温度を68℃に設定することにより、species-specificな検出が可能になった(Fig. 4A)。検出感度は、 $10^6$  cells/spot(Fig. 4B)であった。この方法は、Fig. 3のスキームに示すように、純分離操作後に実施することで、Colony Hybridizationでの擬陽性の確認として用いると共に、2種類のプローブ(*P. cerevisiiphilus*/*P. frisingensis*) を各々使い分けることにより、同定試験を行う前の大まかな種の推定として用いた。

### Colony Hybridization法

フィルターの調製に関し、複数の方法が報告されている(19,20)。Betzl *et al.*は、フィルター上のLactococciのコロニーに対し、界面活性剤処理後microwave ovenにて細胞を破碎した(19)。一方、Lonvaud-Funel *et al.*は、Lysozymeによる溶菌処理とアルカリ処理を併用した(20)。これらの方法を評価した結果、signalが得られないか、特異性が得られない問題が生じた(Table 3)。そこで、Lonvaud-Funel *et al.*の方法(20)を改良し、Lysozyme/アルカリ処理の次にプロテアーゼ処理を追加した。これより、非特異的結合の問題を解決できた(Table 3, method3-1)。さらに、アルカリ処理の改良によりsignalの増強が認められた(Table 3, method3-2)。Fig. 5Aに*P. frisingensis*DSM6306を供したColony Hybridizationの結果を示した。

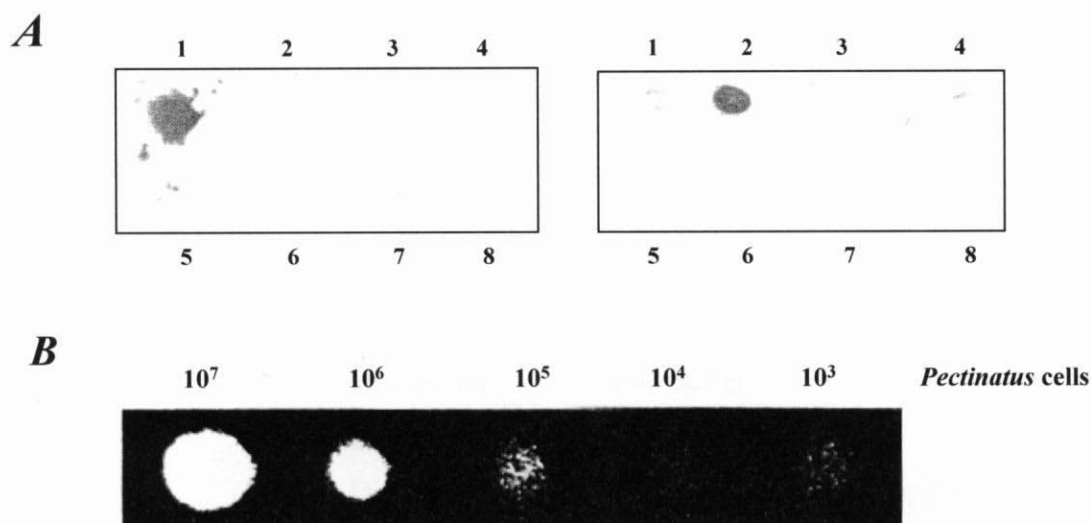


Fig. 4. Specificity (A) and Sensitivity (B) Detection by Dot Blot Hybridization. (A) Total DNA of *P. cerevisiophilus* DSM20467 was used as the probe (Left). Total DNA of *P. frisingensis* DSM6306 was used as the probe (Right). The DNA to be tested was spotted on the filter; 1, *P. cerevisiophilus*; 2, *P. frisingensis*; 3, *S. lacticifex*; 4, *Z. paucivorans*, 5, *Z. raffinivorans*; 6, *L. brevis*; 7, *L. casei*; 8, *L. plantarum*. (B) Total DNAs, which were extracted from various concentrations of *Pectinatus* cells, were spotted on the filter.

Table 3. Evaluation of the Membrane Preparation for Colony Hybridization

Method	1 <sup>*a</sup>	2 <sup>*b</sup>	3-1 <sup>*c</sup>	3-2 <sup>*c</sup>
	SDS	Lysozyme	Lysozyme	Lysozyme
	Microwave oven	alkaline	alkaline	alkaline
		Tris-HCl buffer	Tris-HCl buffer	Tris-HCl buffer
		SSC buffer	SSC buffer	
		alkaline	alkaline	
		Dipping membrane into SSC buffer	Dipping membrane into SSC buffer	Dipping membrane into SSC buffer
			Proteinase K	Proteinase K
			Wash with SSC buffer	Wash with SSC buffer
Specificity	- <sup>d</sup>	-	++	++
Signal	-	+	+	++

<sup>a</sup> Method from reference(19)  
<sup>b</sup> Method from reference(20)  
<sup>c</sup> Modified method of reference (20)  
<sup>d</sup> The degree of the evaluation result is indicated by -(bad), +(good), and ++(very good)



## 2. 工場サンプルの解析

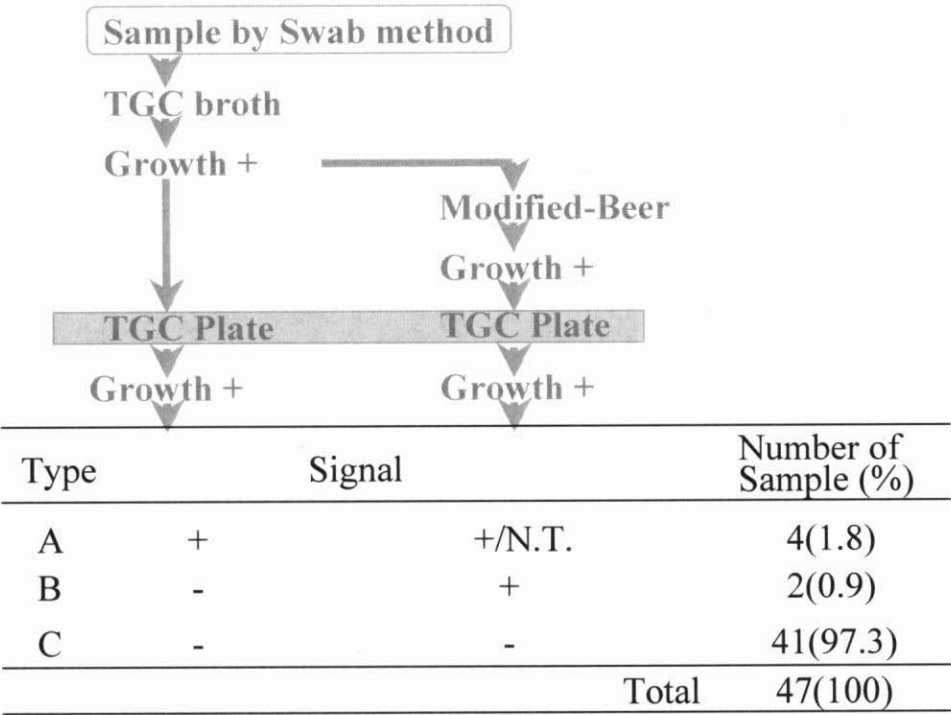
アサヒビール(株)の工場(A, B, C, D, E, F, G)よりサンプリングした試料を、Fig. 3に従って培養を進めた。

### (1)選択培養法およびColony Hybridization法

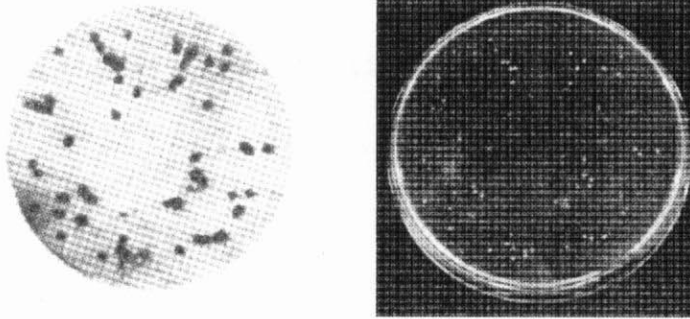
ふき取り法による採取後、TGC brothで生育が認められ、その後の平板培養のコロニーを供したColony Hybridization法で陽性判定が得られたものをType A、このTGC平板では陰性であったが、“modified-Beer”による選択培養でColony Hybridization法の陽性判定が認められたケースをType B、いずれの培養結果に対してもColony Hybridization法の陰性判定であったものをType Cとした(Table 4)。代表的な工場のデータとして、その構成比率は、Type Aは1.8%、Type Bは0.9%、Type Cは97.3%であった(Table 4)。Type Bが認められ、このことは“modified-Beer”により*Pectinatus*の選択培養が行なわれたことを示した。工場サンプルからColony Hybridization法により*Pectinatus*を検出した代表的な結果をFig. 5Bに示した。

以上の操作により得られた菌株で、グラム染色、カタラーゼ反応、Dot Blot試験により*Pectinatus*と推定された菌株は30株であり、菌種の内訳は*P. cerevisiophilus*が1株、残り29株は*P. frisingensis*であった。

Table 4. Results of Colony Hybridization from a Representative Brewery. Type A: *Pectinatus* was detected from both TGC and Beer media, Type B: *Pectinatus* was detected from Beer media after TGC cultivation, Type C: *Pectinatus* was detected from neither TGC nor Beer media. +; Hybridized, -; no signal, N. T.; Not Tested.



**A**



**B**

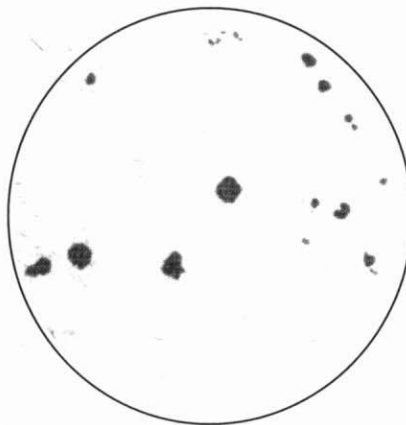


Fig. 5. Representative Results of Colony Hybridization. A; A pure culture of *P. frisingensis* (Left: Result of colony hybridization, Right; colonies on TGC medium), B; Environmental sample (Brewery's waste)

## (2)同定試験

### DNA-DNA交雑試験

*P. frisingensis*と推定された29株は、基準株DSM6306<sup>T</sup>と58.0%-100.0%のDNA類似度を示した。一方、*P. cerevisiiphilus*と推定された1株(PL-44)は、基準株DSM20467<sup>T</sup>と87%のDNA類似度を示した(Table 5)。

### 糖資化性

試験した30株は、基準株の糖発酵性の試験結果(Table 6)とほぼ一致した。しかし、*P. frisingensis* のmaltose発酵性について、基準株は(-)あるいは(+w)である(Table 6)のに対し、分離株の73.5%(34株中25株)がmaltose(+)であった(Table 5)。

### GC含量

*Pectinatus*と同定された株のGC含量は37.9%-41.2%であり、以前の記載(10)とほぼ一致した(Table 5)。

## 3. ビール生育性試験

供試した*P. frisingensis* 34株および*P. cerevisiiphilus* 5株を接種したビールは、全て3ヶ月間以内にビール中で著量の菌体増殖が認められ、生育を確認した(Table 5, 6)。従って、*Pectinatus*に属する株は全てビール生育能を有することが判明した。

Table 5. Characteristics of *Pectinatus* Strains Isolated from Breweries

Species	Strains	GC contents (mol%)	Ribose	Xylose	Rhamnose	Mannitol	Sorbitol	Xylitol	Lactose	Maltose	Cellobiose	Raffinose	Melibiose	N-Acetyl- glucosamine	Adonitol	Esculin	Dulcitol	Inositol	DNA homology (%)	Growth in beer
<i>P. frisingensis</i>	PL466	38.1	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	73 <sup>a</sup>	+
	PL468	38.0	+	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	88	+
	PL45	40.2	+	-	+W	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	58	+
	PL437	38.3	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	78	+
	PL451	38.6	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	97	+
	PL452	41.2	+	-	+	+	+	+	+W	+	+	-	-	+	-	+	+	+	85	+
	PL453	37.9	+	-	+	+	+	+	+W	+	+	-	-	+	-	+	+	+	93	+
	PL454	38.6	+	-	+	+	+	+	+W	+	+	-	-	+	-	+	+	+	92	+
	PL469	38.0	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	84	+
	PL47	38.2	+	-	+W	+	+	+	-	-	+	-	-	+W	-	+	-	+	76	+
	PL48	38.0	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+W	-	+	-	+	96	+
	PL49	38.1	+	-	+W	+	+	+	-	-	+	-	-	+W	-	+	-	+	71	+
	PL51	39.0	+	-	+W	+	+	-	-	-	+	-	-	+W	-	+	+	-	59	+
	PL407	40.5	+	-	+	+	+	N.T. <sup>b</sup>	-	+	+	-	-	N.T.	+	N.T.	+	+	75	+
	PL136	38.9	+	-	+	+	+	N.T.	-	+	+	-	-	N.T.	+	N.T.	+	+	77	+
	PL467	38.4	+	-	+W	+	+	+W	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	82	+
	PL470	39.2	+	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	92	+
	PL70	40.7	+	-	+W	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	59	+
	PL471	38.3	+	-	+	+	+	+W	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+W	83	+
	PL472	38.4	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+W	84	+
	PL473	38.4	+	-	+	+	+	+W	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+W	94	+
<i>P. cerevisiophilus</i>	PL455	38.4	+	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	100	+
	PL456	38.2	+W	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	93	+
	PL460	39.3	+	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+W	-	-	+	84	+
	PL461	38.2	+W	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	79	+
	PL464	38.3	+	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	66	+
	PL465	38.1	+	-	+W	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	95	+
	PL77	40.7	+	-	+	+	+	+	-	+W	+	-	-	+	+	+	-	+	62	+
	PL462	39.6	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	84	+
	PL44	38.4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	87 <sup>a</sup>	+

<sup>a</sup> + = Positive reaction; - = negative reaction; +W = weak positive reaction  
<sup>b</sup> N.T. = not tested  
<sup>c</sup> DNA homology with total DNA of *P. frisingensis* (DSM63067)  
<sup>d</sup> DNA homology with total DNA of *P. cerevisiophilus* (DSM20467T).

Table 6. Characteristics of *Pectinatus* Reference Strains

Species	Strains	Ribose	Xylose	Rhamnose	Mannitol	Sorbitol	Xylitol	Lactose	Maltose	Cellobiose	Raffinose	Melibiose	N-Acetyl-glucosamine	Adonitol	Esculin	Dulcitol	Inositol	Growth in beer
<i>P. frisingensis</i>	DSM6306	+	-	+w	+	+	+	-	+w	+	-	-	+	-	+	+	-	+
	DSM20465	+w	-	+w	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+w	+	+
	DSM20759	+	-	+	+	+	+	-	-	+w	-	-	+w	-	-	+	+	+
	DSM20761	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
	DSM20760	+	-	+w	+	+	+	-	-	+w	-	-	+w	+w	+	+w	+	+
<i>P. cerevisiiphilus</i>	DSM20466	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
	DSM20467	+	+	+w	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
	DSM20762	+	+	+w	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
	DSM20763	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+w	-	+

<sup>a</sup> +=Positive reaction; - =negative reaction; +W=weak positive reaction

以上より、工場サンプルから分離された菌株の内、29株は*P. frisingensis*、1株は*P. cerevisiiphilus*と同定された。分離源の内訳は、工場排水が40.0%、製造場の床が13.3%、回収瓶が3.3%、その他が32.5%であった(Table 7)。

Table 7. Sources of the *Pectinatus* Strains Isolated from Japanese Breweries

Strain	Brewery	Location
PL466	A <sup>a</sup>	drainage
PL468	A	floor
PL469	A	drainage
PL467	A	floor
PL470	A	floor
PL471	A	drainage
PL472	A	drainage
PL473	A	recycled bottle
PL45	B	others
PL462	B	drainage
PL51	C	floor
PL47	D	others
PL48	D	others
PL49	D	others
PL437	E	others
PL451	E	others
PL452	E	others
PL453	E	others
PL454	E	others
PL455	E	drainage
PL456	E	drainage
PL460	E	drainage
PL461	E	drainage
PL464	E	drainage
PL465	E	drainage
PL77	E	drainage
PL70	F	others
PL407	G	others
PL136	G	others

<sup>a</sup> Symbols A-G represent Japanese domestic breweries.



#### 第四節 考察

Lee *et al.*やHaikara *et al.*は、使用直前に液体培地を煮沸して溶存酸素を除いてから容器に空寸部が無くなるまで充填し、偏性嫌気性の*Pectinatus*の培養を行った(4,12)。しかし、平板培養については、コロニーが形成されないか、形成されても形成率が低いなど良好な結果は得られなかった(4,12)。嫌気培養法としてCO<sub>2</sub> incubatorとGasPak systemが検討された(4,12)が、前者は充填するCO<sub>2</sub>に微量な酸素が含まれること、後者は嫌気状態を作出する化学反応の間、菌体が酸素に曝されること、がこれらシステムの欠点として考えられた。従って*Pectinatus*の平板培養のポイントは、酸素を速やかに除去し、高度な嫌気状態を維持すること、と考察した。嫌気グローブボックス法はこの両方の条件を満たすものであり、この方法の採用により*Pectinatus*の良好な平板培養が可能になった(Fig. 2C)。また、採取・輸送法についてもTGC培地を使用した嫌気条件に配慮した方法を採用した。

選択培養は改変したビールを培地とする方法を検討した。ビールの主要な生育抑制因子として、pH、ホップ成分、炭酸ガスが挙げられ(28)、*Pectinatus*はpH3.7-8.0の範囲で(29)、エタノール濃度4.5(%W/V)まで(14)、苦味成分33-38 BUまで(14)生育が確認されている。その中でpHが重要な因子であり(14)、僅かなpHの違いが生育に大きく影響する(28)。そこで*Pectinatus*の生育性を重視し、ビールのpHを4.6以上に調整した“modified- beer”を選択培地とした。

*Pectinatus*のスクリーニングとして、Colony Hybridization法(19,20)を検討した。この際、基準株のtotal DNAをプローブとした。この理由は、HybridizationのStringencyをコントロールするだけで、特定のDNA領域の解析や、プローブ設計をすることなく、簡便に種レベルでの検出が行える利点による(24)。Dot Blotの試験系においては、Hybridization温度を68℃に設定することより、種レベルの特異検出が可能になった(Fig. 4A)。しかし、Colony Hybridizationの既存のフィルター調製法(19,20)では、他の細菌へのプローブの交差性が見られ特異検出ができなかった(Table 3, method 2)。この理由はグラム陽性菌の細胞壁の溶解が困難であるため(19)、フィルター上にcell debrisが残存し、そのcell debris中のタンパク質にプローブが非特異的に吸着したものと考えられた。検討の結果、Lonvaud-Funel *et al.*の方法(20)にプロテアーゼ処理を追加し特異性の問題を解決した(Table 3, method3-1)。また、アルカリ処理条件の変更によりsignalの増強を行うことができた(Table 3, method3-2)。これはpositive chargeのフィルターを使用したか、過度のアルカリ処理によりDNAの拡散が起こるものと推察した。

以上で検討したスクリーニング法により、*Pectinatus*の選択培養を評価した。その結果、ビールのpH調整を行った“modified-beer”で*Pectinatus*の選択培養に成功したケースが認められた(Table 4 Type B)。このことから、“modified-beer”により*Pectinatus*の短期間の培養が可能になり、その一方で未調整の生育抑制因子（エタノール、ホップ成分）により他細菌の生育が抑制された、と考察した。

以上の採取、培養ステップを経て、スクリーニングされた菌株について、*Pectinatus*の同定試験を行った。方法は、基準株とDNA塩基配列の類似度を比較する、最も直接的かつ信頼性の高い方法(21)であるDNA-DNA 交雑試験法を採用し、マイクロプレート法(21,22,23)により測定した。DNA類似度と菌種の独立性について現在の取り決めは、基準株と70%以上のDNA類似度がある場合同一種とみなし、50%以下であれば独立した別の種とみなされる(24,27)。得られたデータは、全てが50%以上の高い値を示したことから、*Pectinatus*に属する株であると同定された。GC含量、糖発酵性は、以前の報告(10)および基準株の試験結果(Table 6)とほぼ一致し、DNA類似度による同定結果を支持したものであった。

分離した株には、maltoseの発酵能を有する株が多数認められた(Table 5)。これまで*Pectinatus*には、ビール中の主な炭素源であるmaltoseを発酵する株が少ない(10)とされ、基準株を用いた試験でもmaltoseを発酵しないか発酵能が弱かった(Table 6)。従って、今回分離された株は、これまで欧米で分離された株とは異なるタイプの株が多い。また、分離株は*P. frisingensis*の方が*P. cerevisiiphilus*よりも多かった。*P. frisingensis*は*P. cerevisiiphilus*と比較して、糖の発酵パターンが広いこと (Table 5, 6)、耐熱性が高いこと(30,31)、広いpH範囲での生育が可能であること(32) が背景として挙げられる。従って、ビール工場で実施する熱や酸・アルカリによる殺菌洗浄、環境中の制限された栄養状態が、*Pectinatus*の分離頻度に影響を与えたものと考えられた。

以上のように、効率的な環境からの*Pectinatus*の分離法を確立した為、短

期間に多数の*Pectinatus*株を収集することが可能となった。これらの株のビール生育性を調査した結果、全ての株にビール生育性が認められた(**Table 5, 6**)。従って、*Pectinatus*属細菌は全般的にビール生育性を有することが判明した。

## 第五節 要約

*Pectinatus*の環境からの分離法を確立することで多数の株を収集し、*Pectinatus*のビール汚染性を調査した。まず、環境からの採取には還元剤を含むTGC培地を使用し、速やかに嫌気条件下へ移行し高度な嫌気度を維持できる嫌気グローブボックス法を採用した。また、選択培養としてpH調製ビールを使用した。このように培養したコロニーの中から*Pectinatus*を効率良く、かつ精度良くスクリーニングするために、Colony Hybridization法を検討した。コロニー溶菌条件など検討した結果、*Pectinatus*の特異検出が可能になった。以上より選択・分離した株をDNA-DNA 交雑試験を中心とした同定試験を実施した。その結果、34株を*P. frisingensis*、1株を*P. cerevisiiphilus*と同定した。GC含量、糖の発酵性は概ね以前の記載と一致したが、マルトース発酵能を有する株を多数認めた。これら分離した株は、全てビール生育能を有することが判明した。

### 第III章

#### *Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*の系統解析

##### 第一節 緒言

Woeseは、rRNAが全ての生物種に保存された高分子であることに注目し、この塩基配列を分類の指標に用いて生物の系統進化を論じた(33)。この研究により、動物界と植物界、細菌との距離が明らかにされ、生物界を分類する階層であるDomainという考え方を提唱した(33,34)。細菌の系統分類法としても、rRNAの塩基配列を利用した多くの研究成果が発表されている(34)。

一方、細菌の化学分類学では、DNA-DNA 交雑試験によるDNA類似度に基づく種の概念の提案がある(21,22,23,24)。さらに近年ではWoeseの概念(33)を取り入れて、16Sの塩基配列の相同性が97%以上、かつDNA-DNA類似度が70%以上、が同一種であるという条件が多く研究者に支持されている(35)。しかし、16S rRNAの塩基配列の相同性が99.5%以上あっても、DNA-DNA交雑でのDNA類似度が70%以下であるケースがあるように、別種でありながら16Sの相同性が極めて高い例がある(36)。従って、近縁種間の系統解析を16S rRNA遺伝子の塩基配列だけで行うことは不明確であり、他の有用な領域の検討の必要性が論じられていた(37)。

*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*は、DNA-DNA交雑試験では明確に区別され、16S rRNAの比較では、*Pectinatus*と*Selenomonas*は87.5-88.2%、

*Pectinatus*と*Zymophilus*は87.9-88.6%、*Selenomonas*と*Zymophilus*は92.0%であり、これらの菌種は近縁関係にあることが示されている(10)。しかし、第II章で確認したように*Pectinatus*はビール汚染能を有する一方で、*Selenomonas*、*Zymophilus*はビール汚染能を有さない(10,11)。そこで第III章では、これらの細菌の系統をより明らかにすることを目的とした。

我々は、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子に挟まれるITS領域(**Internal Transcript Spacer**:内部転写領域)に注目した。この領域は、rRNA遺伝子よりも保存性が低い(37)ことから、近縁種の細菌の解析として注目されている(37,38,39)。

## 第二節 材料および方法

### 1. 菌株および培養方法

供試菌株はTable 2に記載した。但し、*P. cerevisiiphilus*、*P. frisingensis*についてはType Strainのみとした。培養は、TGC broth、30℃、嫌気条件下、3日間とした。

### 2. ITS領域のPCR増幅

第II章記載のDNA抽出法より、各細菌のゲノムDNAを得た。このDNAを鋳型に用いて、ITS領域をPCRで増幅した。PCRプライマーは、16S rRNA遺伝子ならびに23S rRNA遺伝子から設計した。16S rRNAは20,000を超えるデータベースがあること、23S rRNAは16S rRNAほどのデータはない(40)がいくつか保存性の高い領域があることから、これらの領域から設計したプライマーよりITS領域をPCR増幅することが可能であり、様々な菌種で増幅された例が報告されている(37,38,39,41,42)。

(1) *P. frisingensis*、*P. cerevisiiphilus*、*S. lacticifex*、*Z. raffinivorans*、*Z. paucivorans*のITS増幅

*P. frisingensis*、*P. cerevisiiphilus*、*S. lacticifex*、*Z. raffinivorans*、*Z. paucivorans*の16S rRNA遺伝子の塩基配列が報告されており(10, Table 2)、これら菌種間で保存性が高く、16S rRNA遺伝子の5'末端より557-576 bpに相当する配列をforward primer1とした。一方、23S rRNA遺伝子の塩



基配列は、*P. frisingensis*のみの報告があった(40)。そこで、多くの菌種について保存性が高く、ITS領域のPCR増幅を行う際のプライマーとして使用実績がある塩基配列(37)であり、かつ、*P. frisingensis*の23S rRNA遺伝子の5'末端から21-28bpに相当する配列(40)をreverse primer1とした(Fig. 6A)。

Forward Primer1 for ITS amplification:

5'-GGCAAGCGTTGTCCGGAATT-3'

Reverse Primer1 for ITS amplification:

5'-CGCCAAGGCATCCACCAT-3'

(2)*Megasphaera cerevisiae*、*M. elsdenii*、*S. ruminantium*、*S. putigena*、*S. infelix*、*S. flueggei*、*S. noxia*のITS増幅

Table 2に示したようにこれらの細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列が公開されており、Fig. 6Aに示した保存性が高い配列をforward primer2とした。一方、23S rRNA遺伝子については、ITS領域のPCR増幅を行う際のプライマーとして使用実績がある配列(37)をreverse primer2とした(Fig. 6A)。

Forward Primer2 for ITS amplification:

5'-GCCCCGTCACACCACG-3'

Reverse Primer2 for ITS amplification:

5'-CGCCAAGGCATCCACCAT-3'

PCR反応は、denature 95°C 30sec、annealing 55°C 30sec、extension 75°C 30secを、25-30サイクルで行った。PCR産物を精製後、ベクター pCR2.1 (invitrogen)へライゲーションし、*E. coli*コンピテントセルINVαF'へ形質転換した。次に50μg/mlアンピシリン添加LB液体培地、37°Cで一晩培養した菌体よりプラスミドを回収した。プラスミドDNAの抽出は、plasmid mini Kit (QIAGEN)により添付のプロトコールに従って実施した。

### 3. 塩基配列決定

塩基配列決定は、4000L Long ReadIR™ DNA Sequencing System(LI-COR)またはCEQ™8000 Genetic Analysis System(Beckman Coulter)を用いた。前者では、シーケンシングプライマーは、IRD41 Infared Dye Labeled M13 Forward プライマーおよびIRD41 Infared Dye Labeled M13 Reverse プライマー(日清紡)を、反応液はSequiTherm™ Long-Read™ Cycle Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES)を使用した。後者では、CEQ™ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter)を使用した。

### 4. 解析

tRNA遺伝子の検索、相同性解析、ドットマトリクス解析は、GENETYX ver. 6.1 (GENETYX CORPORATION)を用いた。ITS領域はギャップが多いため、相同性解析はITS1、ITS3(後述)に分割して行った。同様の理由により、アラ

インメントならびに系統樹の作成は次のように行った。まず、GENETYX ver. 6.1でITS1、ITS2、ITS3、tRNA遺伝子ごとにアライメントを作成した。このように作成したスペースを含んだ塩基配列を各々繋ぎ合わせ、最終的に全長のアライメントとした。このアラインメントをfasta形式で出力し、DDBJプログラムClustal Wに入力し、出力されたファイルをTreeView ver. 1.6.5にて系統樹を作成した。なお、系統樹はNJ法(近隣結合法; 43)を採用し、*Streptococcus coelicolor*(Accession No.; Z76678)、*Bacillus subtilis* (Accession No.; J01551, AB050658)および*Escherichia coli* (Accession No.; K00763, U55296)をアウトグループとした。

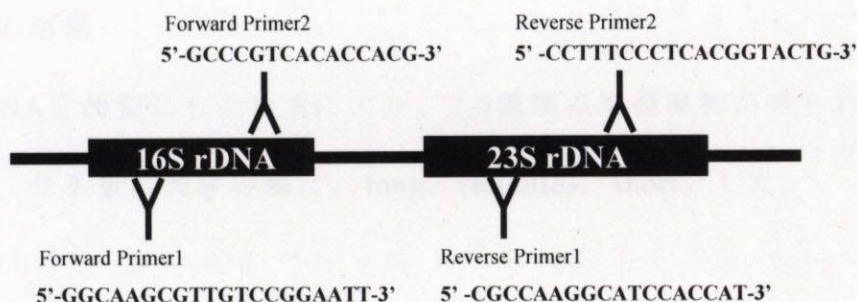
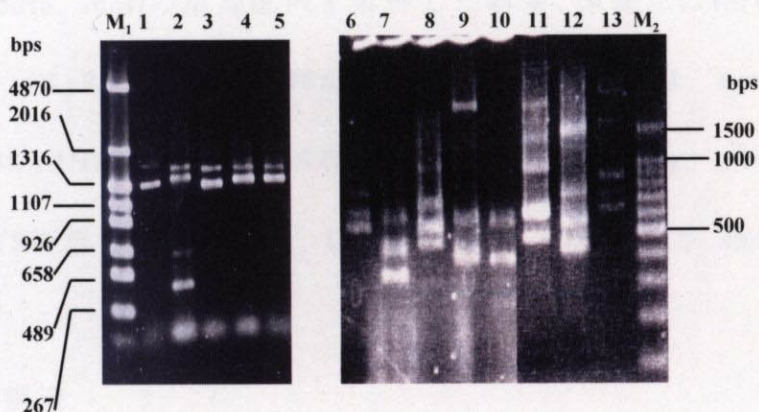
**A****B**

Fig. 6. Amplification of the ITS region of *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera* by PCR. (A) PCR Primers for Amplification of ITS (B) Agarose Gel Electrophoresis of PCR Products using Primer1 (Left) and Primer2 (Right). Lane M<sub>1</sub>: pHY molecular size marker, 1: *P. cerevisiophilus* DSM20467, 2: *P. frisingensis* DSM6306, 3: *S. lacticifex* DSM20757, 4: *Z. paucivorans* DSM20756, 5: *Z. raffinovorans* DSM20765, 6: *M. cerevisiae* DSM20462, 7: *M. elsdenii* JCM1772, 8: *S. sputigena* JCM6580, 9: *S. ruminantium* subsp. *lactilytium* JCM6582, 10: *S. ruminantium* subsp. *ruminantium* JCM7528, 11: *S. flueggei* JCM8544, 12: *S. infelix* JCM8545, 13: *S. noxia* JCM8546, M<sub>2</sub>: 100bp ladder

### 第三節 結果

#### 1. ITS領域の増幅

各々のDNAを鋳型にしたPCRにより、2-3種類の増幅産物が得られた(Fig. 6B)。以下、分子量の大きい順に、long、(middle)、shortとした。

#### 2. ITS領域の解析

long、middle、shortの塩基配列を解析した結果、末端にはforward primer の3'側以降の16S rRNA遺伝子配列が存在し、その反対側は、reverse primer の5'上流の23S rRNA遺伝子配列が存在した。従って、long、middle、shortは、いずれもITS領域を含んでおり、以下long-ITS、middle-ITS、short-ITSとした。

##### (1)ITSの構造

ITSの塩基配列長をTable 8に示した。*Pectinatus* spp.、*Selenomonas* spp.、*Z. paucivorans*、*M. cerevisiae*のlong-ITSにはtRNA<sup>ile</sup>遺伝子およびtRNA<sup>ala</sup>遺伝子が存在した。一方、*Z. raffinivorans*、*M. eladenii*のlong-ITSおよび*M. cerevisiae*のmiddle-ITSにはtRNA<sup>ala</sup>遺伝子が存在した(Table 8)。一方、short-ITSにはtRNA遺伝子がなかった(Table 8)。

ITSにtRNA遺伝子が含まれる場合、その数は1つまたは2つであり、その種類はtRNA<sup>ile</sup>、tRNA<sup>ala</sup>のみである(37)。従って、*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*の解析結果(Table 8)は以前の報告と一致した。この2つのtRNA遺伝子の順序は、16S rRNA遺伝子方向より

Table 8. ITS sequences of *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera*

Species	Designation	Length of spacer	tRNA Genes (position)	Length of		%G+C	% G+C of overall Genome
				ITS1(1')	ITS2 ITS3(3')		
<i>P. cerevisiiphilus</i>	long	724	Ala*(245-316), Ile*(330-402)	244	9	318	38-41 <sup>c</sup>
	short	399	—	127	-	212	39.2
<i>P. frisingensis</i>	long	624	Ala(143-214), Ile(229-301)	142	10	319	38-41 <sup>c</sup>
	short	442	—	123	-	319	39.9
<i>S. lactificex</i>	long	579	Ala(245-317), Ile(325-398)	245	4	177	42-45 <sup>c</sup>
	short	321	—	148	-	173	35.4
<i>S. sputigena</i>	long	590	Ala(269-344), Ile(355-431)	268	10	159	57 <sup>c</sup>
	short	434	—	266	-	188	48.7
<i>S. ruminantium</i> subsp. <i>lactilytium</i>	long	487	Ala(141-216), Ile(221-297)	140	4	190	48-53 <sup>c</sup>
	short	291	—	102	-	189	37.1
<i>S. ruminantium</i> subsp. <i>ruminantium</i>	long	468	Ala(143-218), Ile(223-299)	142	4	169	48-53 <sup>c</sup>
	short	276	—	125	-	151	38.1
<i>S. flueggei</i>	long	857	Ala(133-208), Ile(436-512)	132	227	344	56 <sup>c</sup>
	middle	509	—	135	-	364	44.9
	short	373	—	149	-	224	43.3
<i>S. infelix</i>	long	625	Ala(134-209), Ile(384-460)	133	174	148	58 <sup>c</sup>
	short	315	—	167	-	148	43.1
<i>S. noxia</i>	long	762	Ala(250-325), Ile(500-576)	249	173	185	57 <sup>c</sup>
	short	523	—	167	-	356	44.5
<i>Z. paucivorans</i>	long	553	Ala(263-338)	262	-	218	39-41 <sup>c</sup>
	short	375	—	170	-	205	37.7
<i>Z. raffinosisivorans</i>	long	591	Ile(183-255), Ala(301-372)	182	41	218	38-41 <sup>c</sup>
	short	376	—	170	-	206	38.1
<i>M. cerevisiae</i>	long	704	Ile(294-370), Ala(469-544)	293	98	160	42-45 <sup>d</sup>
	middle	553	Ala(319-394)	318	-	159	45.4
	short	458	—	299	-	159	44.3
<i>M. elsdenii</i>	long	320	Ala(139-214)	138	-	106	53 <sup>d</sup>
	short	218	—	124	-	94	39.3

<sup>a</sup> alanine  
<sup>b</sup> isoleucine  
<sup>c</sup> data from reference(10)  
<sup>d</sup> data from reference(18)

tRNA<sup>ile</sup>→tRNA<sup>ala</sup>で配置されるのが一般的であり(37)、*Z. raffinivorans* および *M. cerevisiae*については、以前の報告と一致した。しかし、*Pectinatus* spp.、*Selenomonas* spp.のtRNA遺伝子順は、tRNA<sup>ala</sup>遺伝子→tRNA<sup>ile</sup>遺伝子であり(Fig. 7)、これまでの報告(37)と逆であった。

ITSには少なくとも4つの機能を有する領域が存在する。すなわち、16Sの3'末端のprocessing stalk、23Sの5'末端のprocessing stalk、tRNA遺伝子、Box A(後述)である(44)。そこで他菌種の解析(41,42)と同様に、tRNA遺伝子およびその5'側、3'側に分割して解析した。16S rRNA遺伝子の3'末端から1番目のtRNA遺伝子までの領域をITS1とし、2つのtRNA遺伝子間の配列をITS2、2番目のtRNA遺伝子の3'末端から23S rRNA遺伝子の5'末端までをITS3とした(Fig. 7)。short-ITSには、long-ITSのITS1領域およびITS3領域それぞれに高い相同性で対応する領域があり、各々ITS 1'、ITS 3'とした(Fig. 7)。ITS1(1')領域は102-318bp、ITS2領域は4-227bp、ITS3(3')領域は94-364bpであった(Table 8)。

## (2)相同性

16S rRNAによる比較をTable 9に示した。*Pectinatus* spp.- *S. lacticifex*では87.5-88.2%、*Pectinatus* spp.- *Zymophilus* spp.では87.9-88.6%であった。一方、ITSの比較では次の通りであった。ITS1/ITS3の属内の比較では、*Pectinatus*では56.2%/82.7%、*Selenomonas*では47.0-96.7%/ 40.0-82.4%、*Zymophilus*では65.7%/91.7%、*Megasphaera*では43.7%/52.1%であった。一方、属を超えた比較ではITS1では44.0-77.9%、ITS3では

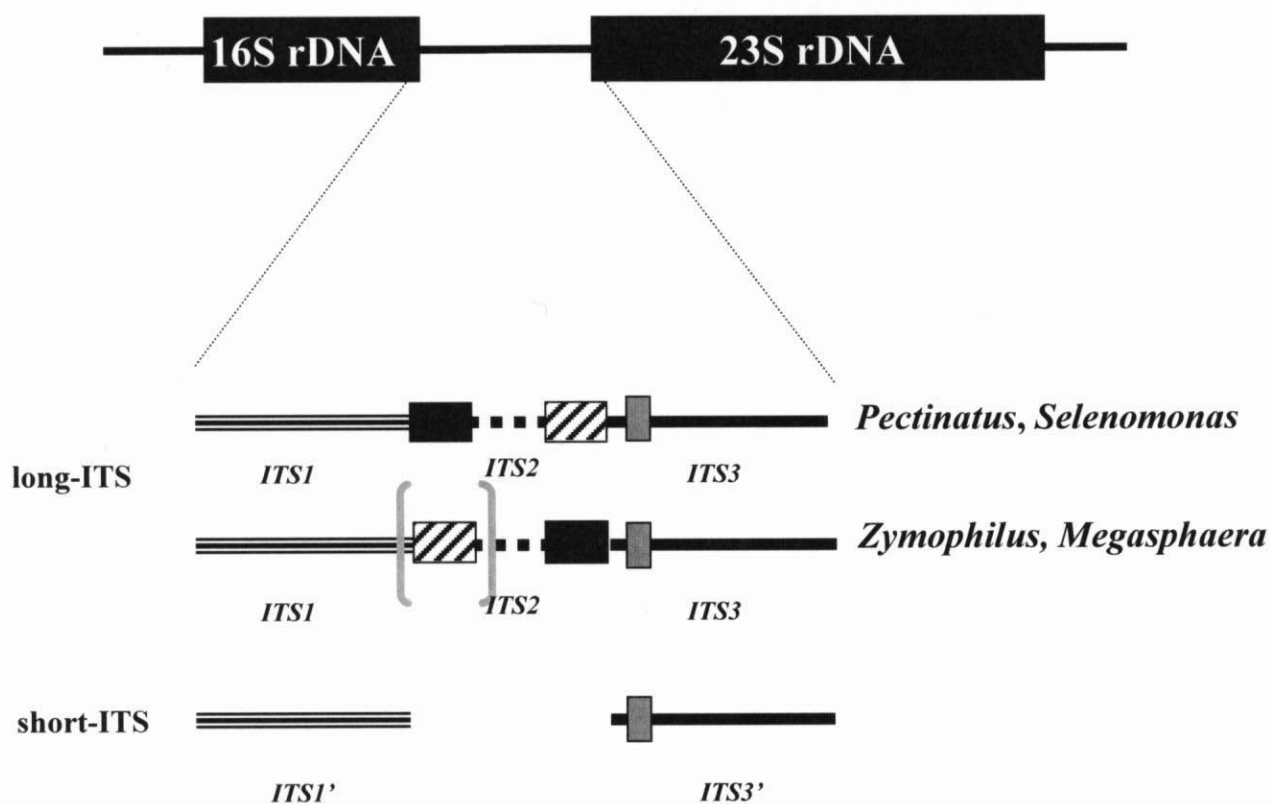


Fig. 7. Basic Structure of ITS region from *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera*. tRNA<sup>ile</sup>, tRNA<sup>ala</sup>, Box A



Table 9. Percentage of Identity of *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera* on 16S rRNA sequences

species	Pc <sup>a</sup>	Pf	Sl	Srl	Ss	Sf	Si	Sn	Zp	Zr	Mc	Me
<i>P. cerevisiiphilus</i>	100.0	94.3	88.3	81.8	85.0	82.1	81.9	83.4	88.9	N <sup>b</sup>	78.2	80.8
<i>P. frisingensis</i>		100.0	87.7	81.6	83.7	82.2	81.7	83.1	87.9	N	77.8	80.0
<i>S. lactificex</i>			100.0	86.5	87.3	84.8	84.8	85.3	92.0	N	79.0	82.6
<i>S. ruminantium</i>				100.0	85.5	84.2	84.9	85.2	83.0	N	79.6	81.3
<i>S. sputigena</i>					100.0	88.0	89.0	89.3	85.9	N	78.2	83.9
<i>S. flueggei</i>						100.0	93.7	95.2	83.4	N	78.2	82.2
<i>S. infelix</i>							100.0	94.5	83.0	N	77.7	83.3
<i>S. noxia</i>								100.0	84.5	N	79.0	83.4
<i>Z. paucivorans</i>									100.0	N	78.3	82.0
<i>Z. raffinosivorans</i>										N	N	N
<i>M. cerevisiae</i>											100.0	83.2
<i>M. elsdenii</i>												100.0

<sup>a</sup> Pc=*P. cerevisiiphilus*; Pf=*P. frisingensis*; Sl=*S. lactificex*; Sf=*S. flueggei*; Si=*S. infelix*; Sn=*S. ruminantium*; Ss=*S. sputigena*; Zp=*Z. paucivorans*; Zr=*Z. raffinosivorans*; Mc=*M. cerevisiae*; Me=*M. elsdenii*.

<sup>b</sup> N=undetermined percentage

27.8-58.8%であり、全般にITS1よりもITS3の方が菌種間で保存性が低かった(Table 10)。また、ITS2はその長さが4-227bp (Table 8) であり、菌種により大きな差異があるため、相同性の比較から除外した。一方、short-ITSの比較では属を超えた比較では、明確な区別がつけられなかった (Table 10)。

### (3)保存性が高い領域

#### tRNA遺伝子

*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera* のtRNA遺伝子の塩基配列長は全て76bpであった。tRNA<sup>ala</sup>遺伝子およびtRNA<sup>ile</sup>遺伝子の菌種間の相同性は、各々97.4-100%、93.4-100%であった。また、全てのtRNA遺伝子の3'末端にはアダプター配列CCAがコードされていた(Fig. 8-10)。この配列は、*Lactobacillus*などの例外を除き(38)、殆どの真正細菌のtRNA遺伝子の3'末端にコードされている。

#### Box A様配列

Box A配列はtranscriptional antiterminorであり、leader領域にあるleader Box Aと、ITSにあるspacer Box Aが報告されている(45,46,47)。この領域にRNA polymeraseが到達すると、Nus factorによる修飾を受け(“recharge”)、23S rRNAの合成がプロモートされる(45)。Box Aは*E. coli*で詳しく研究され、その後広く真正細菌(eubacteria)や古細菌(archaeobacteria)に存在することが知られている(47)。その配列は、*E.*

Table 10. Percentage of Identity of *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera* on short-ITS (lower left “triangle”) and ITS1/ITS3 (upper right “triangle”) sequences.

species	Pc <sup>a</sup>	Pf	Sl	Srl	Srr	Ss	Sf	Si	Sn	Zp	Zr	Mc	Me
<i>P. cerevisiiphilus</i>		56.2/82.7 <sup>b</sup>	58.9/43.7	52.9/45.0	54.1/42.1	55.6/44.7	53.3/52.6	53.7/40.3	54.5/46.7	62.1/47.8	58.2/47.8	58.2/40.6	49.6/29.6
<i>P. frisingensis</i>	80.0		53.5/45.0	77.6/46.7	77.9/44.2	47.8/43.3	69.1/51.4	68.9/40.1	47.7/46.6	50.8/48.9	63.2/48.6	46.4/40.1	75.2/28.2
<i>S. lactificex</i>	55.5	54.1		56.7/71.9	56.3/75.5	57.1/50.6	54.3/41.7	54.3/55.1	62.7/48.7	63.2/58.6	60.4/58.8	60.0/48.6	50.6/44.1
<i>S. ruminantium</i> subsp. <i>lactilytium</i>	54.6	53.2	74.5		93.7/82.4	47.0/50.8	71.3/43.8	70.0/50.5	49.3/46.6	50.8/53.9	67.0/52.1	44.0/50.3	72.5/43.2
<i>S. ruminantium</i> subsp. <i>ruminantium</i>	55.9	53.9	74.4	87.8		47.0/46.5	69.3/40.0	68.7/52.0	50.0/51.1	51.9/57.4	67.2/58.8	45.4/46.8	73.6/43.2
<i>S. sputigena</i>	51.9	51.1	52.8	53.8	52.3		50.4/41.7	50.8/56.8	66.9/55.6	53.3/54.6	54.4/53.2	63.0/53.6	47.8/45.3
<i>S. flueggei</i>	53.6	55.0	62.1	59.1	59.3	54.0		96.7/40.9	54.9/49.0	52.3/44.9	73.1/45.5	48.1/39.9	66.4/27.8
<i>S. infelix</i>	56.8	53.6	65.4	62.0	65.0	54.9	75.5		55.3/74.3	52.7/49.3	72.5/50.2	48.1/44.8	65.3/45.3
<i>S. noxia</i>	55.6	55.5	52.6	48.0	49.2	52.5	62.2	56.3		58.1/51.6	56.4/50.0	63.4/47.3	46.6/40.9
<i>Z. paucivorans</i>	56.9	57.1	64.3	63.8	63.1	56.0	58.7	59.0	53.9		65.7/91.7	56.8/47.4	49.6/39.5
<i>Z. raffinivorans</i>	57.0	57.0	64.5	63.9	63.2	56.4	58.8	59.7	53.7	97.9		52.9/50.2	62.1/41.7
<i>M. cerevisiae</i>	55.9	52.3	54.4	51.3	51.1	56.9	54.5	53.1	52.7	54.8	54.0		43.7/52.1
<i>M. elsdenii</i>	45.3	42.4	55.6	59.7	59.9	43.2	48.9	55.4	38.6	51.6	51.2	44.9	

<sup>a</sup> Pc=*P. cerevisiiphilus*, Pf=*P. frisingensis*, Sl=*S. lactificex*, Srl=*S. flueggei*, Srr=*S. infelix*, Ss=*S. noxia*, Sf=*S. infelix*, Si=*S. ruminantium* subsp. *lactilytium*, Sr=*S. ruminantium* subsp. *ruminantium*, Ss=*S. sputigena*, Zp=*Z. paucivorans*, Zr=*Z. raffinivorans*, Mc=*M. cerevisiae*, Me=*M. elsdenii*.  
<sup>b</sup> DNA homology of ITS1(left) and ITS3(right).

```

Pc 1: GAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAT 60
Pf 1: GAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAT 60
*****

Pc 61: ITGACAAAAATCTGTTCGAGTACATCCGGAATATGTATTGTTTGGTTTTGAGGGTTTCTCC 120
Pf 61: TAAAACAATCCG---TCGAGCACATCCGGAACATGTATTGTTTGGTTTTGAGGGTTTCTCC 118
* * ** *****

Pc 121: CTCATAAATAATAGTAGATACTTGTAAAGAGTGTATGTTTAAAGCTGGTCGG 180
Pf 119: CTCAAAAAAATAGATAGAAC----- 138
**** *

Pc 181: AAATATTGTGGTGCAAAAAAATGCATGGCAGTAGAGAAGACTGGTAAAAAAGAATGAAC 240
Pf 138: ----- 138

Pc 241: TAAIgggggcgtagctcagatgggagagcacctgccttgcaagcagggggtcaggagttc 300
Pf 139: TAAIgggggcgtagctcagctgggagagcacctgccttgcaagcagggggtcaggagttc 198
*****

Pc 301: aactctcctcgtctccaccaGAAGAGAAA-gggcctatagctcagctgggttagagcgcac 359
Pf 199: aaatctcctcgtctccaccaGAAGAGAAATgggcctatagctcagctgggttagagcgcac 258
** *****

Pc 360: gcctgataagcgtgaggtcagtagttcaagtctacttaggccaccaATATTGCACATTG 419
Pf 259: gcctgataagcgtgaggtcagtagttcaagtctacttaggccaccaTAATTGCACATTG 318
*****

Pc 420: AAAACTACACAGAAGAAAGCAAAGAACAAT-TATCACCATGC-CAAACTTGTAAGAGAA 477
Pf 319: AAAACTACACAGAAGAAAGCAAAGAACAATTAATCACCATGCCAAACTTGTGAGAGGA 378
*****

Pc 478: ATCGAGGAGAGAATG-GCGGGGAATAGTTGGACCAAGCACAAATTAGGAAAAGAAACAAA 536
Pf 379: GATTTTCAAGAGGATGGCGGGGAATAGTTGGACCAAGCACAAATTAGGAAACTAAAAACAA 438
* *****

Pc 537: CGCTAAGAAACAAAC-AIATAAACITTAAGCGAAAAGGTGATATTCTGGAGGAAACTTCAG 595
Pf 439: GCTA-AGACAAAACATATAAA-CTTAAGCTAAAGGTGATATT-CTGGAGGAGACTCGAG 494
*** *

Pc 596: AGTATATAAACTTACCA-GAAGCGTTCAGATGCGAGGAAGGGCAAAGCTGAGAGAAGAAA 654
Pf 495: AATATAATAAACTTACCAGAAGCGTTCAGATGCAAGGAAGCATGAAAGCGAATGAAGAAG 554
* **** *

Pc 655: GCGTATTAAATATACGCTGATGAACGAAGCAAAGCACTGACAAAGCAGATGGATGGTTATG 714
Pf 555: GCGTATTAGTATACGCCGATGAGTGAGCTGAAATGATGACGAAGCAGATGAGCGGTTATG 614
*****

Pc 715: GGAAGTTACA 724
Pf 615: GAAAGTTTAA 624
* *****

```

Fig. 8. Alignment of the Nucleotide Sequences of long-ITS Region from *Pectinatus*. Pc, *P. cerevisiophilus*; Pf, *P. frisingensis*; Nucleotides conserved among *Pectinatus* spp. are labeled with an asterisk. Box A are underlined and shown in boldface. tRNA genes are indicated by lowercase lettering and shown in boldface.

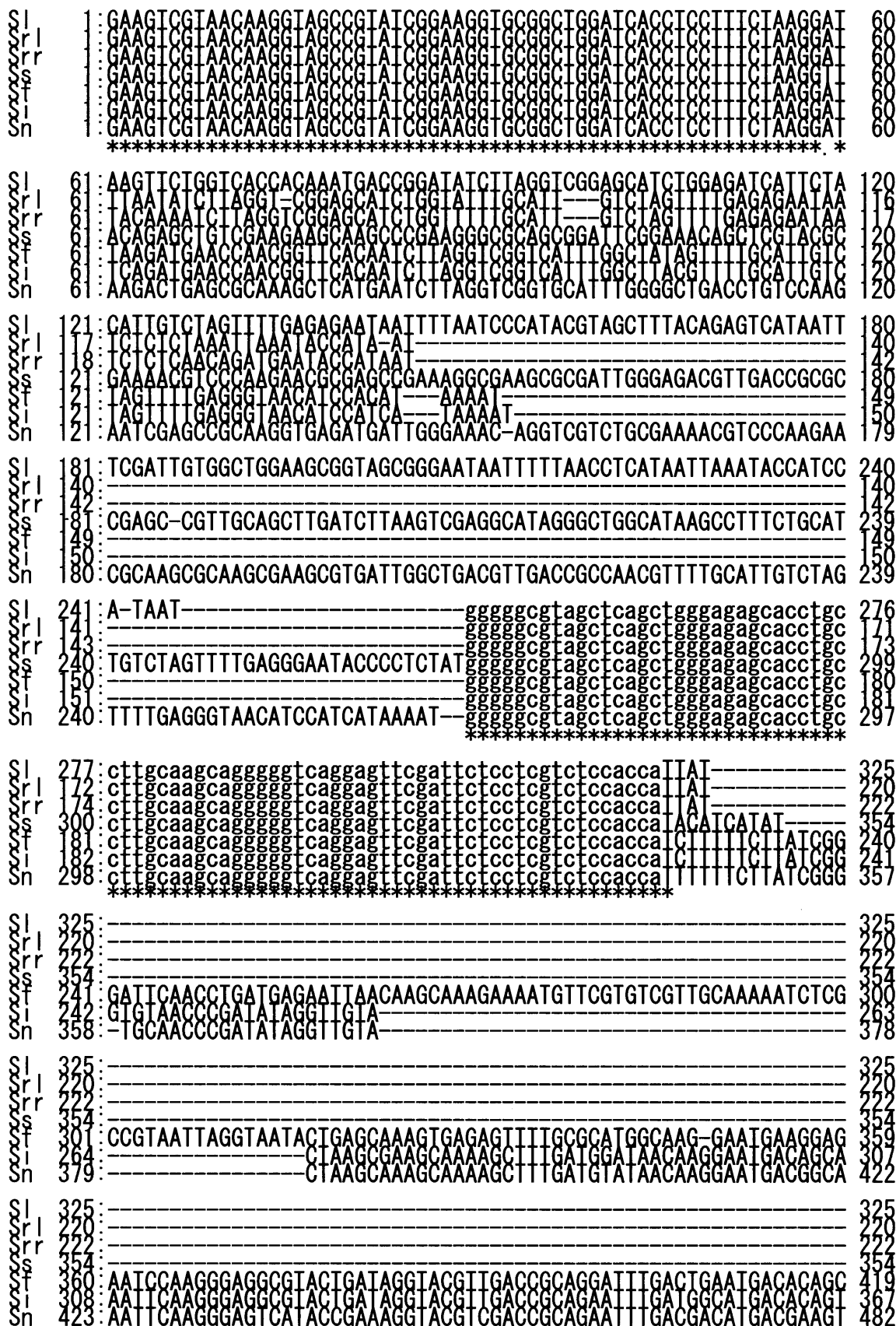


Fig. 9. Alignment of the Nucleotide Sequences of long-ITS Region from *Selenomonas*. Sl, *S. lactificifex*; Sf, *S. flueggeri*; Si, *S. infelix*; Sn, *S. noxia*; Si, *S. infelix*; Srl, *S. rumitantum* subsp. *lactilytium*; Srr, *S. ruminantium* subsp. *ruminantium*; Ss, *S. sputigena*, Nucleotides conserved among *Selenomonas* spp. are labeled with an asterisk. Box A are underlined and shown in boldface. tRNA genes are indicated by lowercase lettering and shown in boldface.

```

SI 326:-----ggggccatagctcagctggttagagc 351
Srl 327:-----ggggccatagctcagctggttagagc 346
Srr 223:-----ggggccatagctcagctggttagagc 248
Ss 355:-----ggggccatagctcagctggttagagc 380
Sf 420: CAGGCACAAAAACATCAGTTTGGCTCTAATAT-----ggggccatagctcagctggttagagc 478
Si 368: TAGCCGCAAGAATCTTGGCTCGCGCCATAAT-----ggggccatagctcagctggttagagc 426
Sn 483: TAGACGCAAGAATCTTGCCTTGGCGCTATAAT-----gggcctatagctcagctggttagagc 542
*****

SI 352: gcacgcctgataagcgtgaggtcaatagttcaagttctatttagggccaccaTTAAAAGAT 411
Srl 347: gcacgcctgataagcgtgaggtcaatagttcaagttctatttagggccaccaTTAAAAACA 306
Srr 249: gcacgcctgataagcgtgaggtcaatagttcaagttctatttagggccaccaTTAAAAAAC 308
Ss 381: gcacgcctgataagcgtgaggtcagtagttcaagttctacttagggccaccaTT----- 433
Sf 479: gcacgcctgataagcgtgaggtcagtagttcaagttctacttagggccaccaTTATTTGT 538
Si 427: gcacgcctgataagcgtgaggtcagtagttcaagttctacttagggccaccaTTTGTTC- 485
Sn 543: gcacgcctgataagcgtgaggtcagtagttcaagttctacttagggccaccaTTATTTGT 602
*****

SI 412: ATGGTATA-----TGTACACTGAAAACACACAGAAGAAAAAAT 450
Srl 307: GAATGGT-ATACCCGAAAGGGCAAAATTA-----TGTACACTGAAAACACACAGAAGAAATTA 365
Srr 309: AGAATGGTATA-----TGTACACTGAAAACACACAGAAGAAATCAA 350
Ss 434: -----TGTACCTTGAAGAACACACAGAAGCAAAAT 464
Sf 536: -----TGTCCCTGAAAACACACAGAAGAAACAAG 566
Si 481: -----TGTTCACAGAAAACACACAGAAGAAACAAG 511
Sn 599: -----TGTTCACAGAAAACACACAGAAGAAACAAG 629
***. *. *****. *****. *. *

SI 451: AAAATGTAATCA-----ATTTCAACCATGGTTTCAGTAAAATGAACAG----- 491
Srl 366: AATGTAATCAATTTTAAACCAAGG----- 388
Srr 351: AATGTAATCAATTTTAAACCAATGG----- 373
Ss 465: GAAAGAAAAATC-----ATCGAAGGCTGTAGCAATACAGCAAGATT----- 505
Sf 567: AAAATCTAAGAAAGGGGAGACTTTTGTAACATCATGTCATAAA-GTTTTCTTCACTGAGGTC 625
Si 512: AAAATCTAAGAAAGGGGAAACGAAGC-GTTCATCATGACGCGACGTTTTCTTCACTAAAAGA 570
Sn 630: AAAATCTAAGAAAGGGGAGACGGAGTGAACATCATGTACACAACGTTTTCTTCACTGAGGTC 689

SI 491:----- 491
Srl 388:----- 388
Srr 373:----- 373
Ss 505:----- 505
Sf 626: TTCTACCGAAAG-----GTAGAAAGTAACAGAATAGATTTTCCCGAGGAATCGCTGATGAA 681
Si 571: TTT-----TCCCAAGCAAAAT----- 586
Sn 690: TTCTACTGAGTGATCAGTAGAAAGTAACAGAATAGATTTTCCCAAGCAAAAT----- 741

SI 492:-----TGTTAAACAACAAATGGTTTGAACAAACATTTTAGGATTC 531
Srl 389:-----TCTACACGACAGTGTAAACAGAGGTGAACGAA-CATTTTAGGATTC 434
Srr 374:-----TCTACACGACAGTGTAAACAGAAGGTGAACGAACATTTTAGGATTC 420
Ss 506:-----TCCGAACAATTTTAGGATCA 525
Sf 682: ATGAAGTCATTTCAGCTTGGCGCAGATTTTATGGTCTGCCGCGGAGACAAACCGGACGCAT 741
Si 586:----- 586
Sn 741:----- 741

SI 532: AAGCATAGACATCAITATAACAATATGATACCTAAAGGCATAATATTA----- 579
Srl 435: AAAAGCAATAG-ACATCATAGAACAATATGATACCTTTAAGG----- 473
Srr 421: TAAAAGCATAGACATCACAATATGTA-----TACCTTATAG----- 457
Ss 526: CAAACCAAGAACATC-AGAAATGATGCCCT----- 554
Sf 742: AGCAGAGCTATGTGGAGGATTTGTGACAAACAGCAGAGCGGAAAAGATGCCCAAGATGGA 801
Si 586:----- 586
Sn 741:----- 741

SI 579:----- 579
Srl 474:-----CAAAACGAAAGATT----- 487
Srr 458:-----CAACGAAAGTT----- 468
Ss 555:-----GAAGGCGAAACACACGATGAA 575
Sf 802: GGGCTGAATGAATCAGTGCTTCCGAATAGCAAATTAGGATAAAGCGAAAAATACCTAAGTA 861
Si 587:-----AGGATAAAGCGAAAAATACCTTGAAG 611
Sn 742:-----AGGATAAAGCGAAAAATACCTTGAAG 766

SI 579:----- 579
Srl 487:----- 487
Srr 468:----- 468
Ss 576: AATCGTGGAAAAGTC----- 590
Sf 862: AACAAAAAGACGTA----- 874
Si 612: TCGTGAGACGTTAA----- 625
Sn 767: TCGTGAGACGTA----- 779

```

Fig. 9.-Continued.

Zr	1:	GAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTAICGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAG	60
Zp	1:	GAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTAICGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAG	60
Mc	1:	GAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTAICGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAG	60
Me	1:	GAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTAICGGAAGGTGCTGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAA	60
		*****.*****	
Zr	61:	ACACGAGACTTGAAATACAGTTTCAAAGATTACTTCGGTAATCGGATGTCATTCTAGGTC	120
Zp	61:	ACACGAGACTTGAAATACAGTTTCAAAGATTACTTCGGTAATCGGATGTCATTCTAGGTC	120
Mc	61:	AAGCAGGGAGCCGCATGTGAAGGAGTGCAACGCACGACGCACACATGTGAGCGAGTCA-C	119
Me	61:	AACCTAAGAAGTCGGCACATTTGGCAATTCATT-----	92
		* *	
Zr	121:	GTACACATTTGGCCTTTCTACATT-----GTCTAGTTTT--G--AGGGAATACCTCA	168
Zp	121:	GTACACATTTGGTATTTATTAATCTGCAATGTTTAGTTTT--G--AAAAGCGAACTAA	174
Mc	120:	TTATGCCCGATATGACTGATAGTATATGTTGAAAGACATATAGTATGAGCGCAGATCCGG	179
Me	92:	-----	92
Zr	169:	ATGTAAATGGTAT-----	182
Zp	175:	TTTCTTATATCTAAATACTAGACAACAGAATTAGTACGTCGATTGGCTCTATTTGCAAAAA	234
Mc	180:	CGAAGTAGAGATACAGTAAGGGACTCAACCCAATCATTAGGTCGGCATCTCTGGAACAAC	239
Me	93:	CATTGTTTCAGTTTTGAGAG-----	111
Zr	183:	-----gggcct	188
Zp	235:	AGAGTCAATTTAAAGACTAAAA-----TAACAT-----	262
Mc	240:	CAATTTTGCATTGTTTGTAGTTTTGAGAGGCCATGTGCTTCTTAATTTCAATAATgggcct	299
Me	112:	-----GCCATCCTCTCAAGAGATAGAGAAGCT-----	138
Zr	189:	atagctcagctggttagagcgcacgcctgataagcgtgaggtcaatagttcaagtctatt	248
Zp	262:	-----	262
Mc	300:	atagctcagctggttagagcgcacgcctgataagcgtgaggtcggtagttcaagtctacc	359
Me	138:	-----	138
Zr	249:	taggcccaccaTATATCAATTATGTGGTGAGTAATCAAATATAGTATATTAT-----	300
Zp	262:	-----	262
Mc	360:	taggcccaccaTGGCAAATTGATATACCTGAAACATGAAAATGTAGTACGGACAATCAAG	419
Me	138:	-----	138
Zr	301:	-----gggggcgtagc	311
Zp	263:	-----gggggcgtagc	273
Mc	420:	GCGCCTTTATGCATTAATGGGGATTTATAATAAATCCCGAGTAAGTAGTgggggtgtagc	479
Me	139:	-----gggggtgtagc	149
		*****	
Zr	312:	tcagatgggagagcacctgccttgcaagcaggggggtcaagagttcgattctcttcgtctc	371
Zp	274:	tcagatgggagagcacctgccttgcaagcaggggggtcaagagttcgattctcttcgtctc	333
Mc	480:	tcagctgggagagcacctgccttgcaagcaggggggtcaggagttcgattctcctcatctc	539
Me	150:	tcagctgggagagcacctgccttgcaagcaggggggtcaggagttcgattctcctcatctc	209
		*****	
Zr	372:	caccaTAAACAATTTCCATTTTTTA-TGTTCTTTGAAAACACACAGAAGAAAAGAAAT	430
Zp	334:	caccaAAAAACAATTTACGAGACTTTATGTTCTTTGAAAACACACAGAAGAAAAGAAAT	393
Mc	540:	caccaACACATT-----TGTACCTTGACAACCTGCATAGAAAAGTATTGAA	584
Me	210:	caccaAAGCTTTTTTATCA-----TCGTACCTTGACAACCTGCATAAAAATGTTAGAA	260
		*****	
Zr	431:	GTAACCTTAATTACCAAAAGGTCTTATGAAATGCGAAAGCATGGAAGTAAAACCTCTCA	490
Zp	394:	GTAACCTTAATCGCCAAAAGGTCAATAGATGGTGGGAAAGCATCAAATAAAGCCTCTC-A	452
Mc	585:	GAAAGTACCTCTTTTTTTGTAAGAAAAAAGGGAGTACCTTAA-----	626
Me	261:	ATACCTCTTTTTAAAAAGAGATCTTAACGA-----	290
Zr	491:	GAAATGAGAGCGAATTAACGAGCATTTTAGGATTCGATCAAAAAGATCTAGACATTAAAGAG	550
Zp	453:	GAAATGAGAGCGAATTAACGAGCATTTTAGGATTCGATCAAAAAGATCTAGACATTAAAGAG	512
Mc	627:	-----CGAACCAGAGAAACTCTAA	645
Me	291:	-----ACCTTGAATTCCTTGTTTATAGAAATTAGTC-----	320
Zr	551:	TATGAACATATGGCAAAACAAAGAAAGCCGCAAGGC-----AATCTA-----	591
Zp	513:	TATGAACATATGGCAAAACAAAGAGAGCCGCAAGGC-----AATCTA-----	553
Mc	646:	TATACACAAGGTGAAGACAGCAGGAGCCGCAAGGTGAGAGCTGATCTTAAAAAAGACGT	704
Me	320:	-----	320

Fig. 10. Alignment of the Nucleotide Sequences of ITS Region from *Zymophilus* and *Megasphaera*. Zp, *Z. paucivorans*; Zr, *Z. raffinosivorans*; Mc, *M. cerevisiae*; Me, *M. elsdenii*. Nucleotides conserved between *Zymophilus* and *Megasphaera* are labeled with an asterisk. Box A are underlined and shown in boldface. tRNA genes are indicated by lowercase lettering and shown in boldface.

*coli*ではTGCTCTTTAA(C/A)AATTT、*B. subtilis*では(A/T)G(A/T)TCTTTGAAACTAである(47)。*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*のITSにも spacer Box Aと推定される配列がITS3(3')領域の5'側に認められた(Fig. 8-10 underline)。この配列は*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*の Genusレベルでは良く保存されていた。このBox A様配列の3'下流にある11塩基CACAGAAGAAAは、*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*に共通の配列であった(Fig. 8-10)。

#### ITS1(1')の1-59bp相当領域

ITS1(1')の1-59bpに相当する領域は、*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*で保存性が高かった(Fig. 8-10)。この領域は16S rRNAのprocessing stalk(44)に相当する領域であると考えられた。

#### (4)ギャップ(挿入/欠失)

近縁種間のITSの相同性比較では、塩基置換だけでなくギャップが多いことが報告されている(41,44)。ドットマトリクス解析により、*P. cerevisiiphilus*のITS1には*P. frisingensis*には認められない100bpのギャップが存在した(Fig. 11A)。同様に*S. lacticifex*のlong-ITS1には、*S. ruminantium*には認められない99bpのブロックが存在した(Fig. 11B)。*S. flueggei*と*S. infelix*の比較では、*S. flueggei*のITS2、ITS3に種特異的な54bpと約180bpのブロックが認められた(Fig. 11C)。また、*Z. raffinovorans*のlong-ITSに存在するtRNA<sup>ile</sup>遺伝子およびその周辺領域



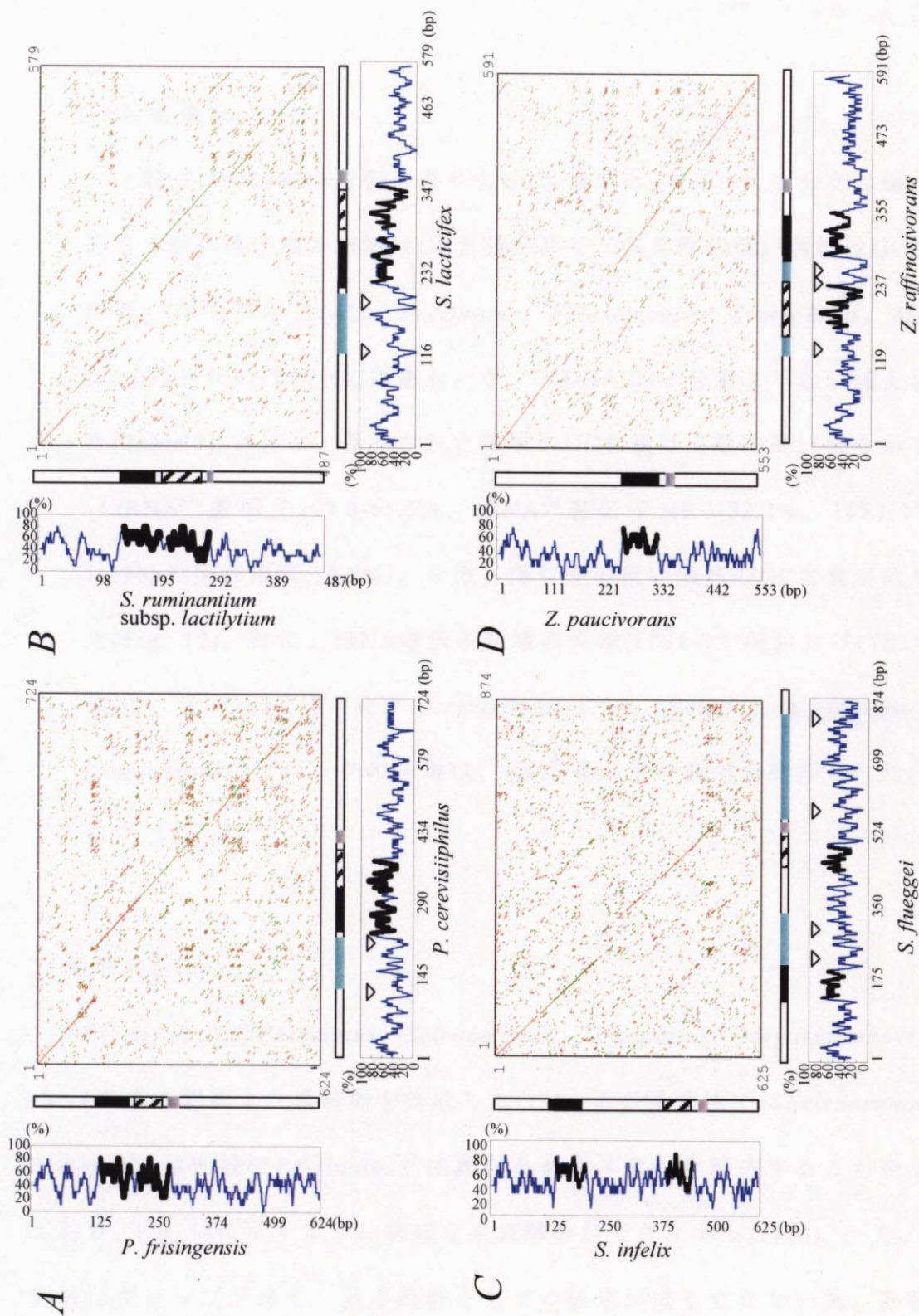


Fig. 11. Dot Matrix and GC profiles of (A) *P. cerevisiophilus* / *P. frisingensis*, (B) *S. lacticifex* / *S. ruminantium* subsp. *Lactilytium*, (C) *S. flueggei* / *S. infelix*, and (D) *Z. raffinovorans* / *Z. paucivorans*. ■: tRNA<sup>ala</sup>, ▨: tRNA<sup>ile</sup>, ▩: Box A, ▪: Species-specific block, ▽: AT rich region

が *Z. paucivorans* では欠失していた (Fig. 11D)。

### (5) GC 含量

一般に ITS は rRNA 遺伝子よりも GC 含量が低く (38)、その分布は偏りがあり、保存性の高い領域は GC 含量が高く、保存性の低い領域は GC 含量が低い傾向がある (41)。 *Pectinatus*、 *Selenomonas*、 *Zymophilus*、 *Megasphaera* 各々の ITS の GC 含量も、ゲノム DNA の GC 含量より低い値を示した (Table 8)。さらに、保存された領域の GC 含量は比較的高い値を示した (tRNA<sup>ala</sup> 遺伝子; 57.0-61.5%、 tRNA<sup>ile</sup> 遺伝子; 49.3-52.2%、 ITS1(1') の 1-59bp の保存領域; 52.5%)。一方、保存性の低い領域の GC 含量が低かった (Fig. 12)。特に、 tRNA 遺伝子領域の両端 (ITS1 の 3' 側および ITS3 の 5' 側) や、上記 (4) で述べた *P. cerevisiophilus*、 *S. lacticifex*、 *S. flueggei*、 *Z. paucivorans* のブロックの両端は、 GC 含量が低い個所が認められた (Fig. 11▽, 12)。

## 3. 系統解析

Schleifer *et al.* は *Pectinatus*、 *Selenomonas*、 *Zymophilus*、 *Megasphaera* の 16S rRNA の塩基配列より系統樹を作成した (10)。その系統樹では *Selenomonas* と *Zymophilus* は近縁で *Pectinatus* とは異なるクラスターを形成することを示しており、 Fig. 13 に示すように明確な系統解析ができなかった (10)。一方、 ITS 領域はギャップが多く、分子時計としての仮定が成り立たない為、系統樹には進化速度一定を仮定しない NJ 法 (43) を用いた。その結果 long-ITS より作

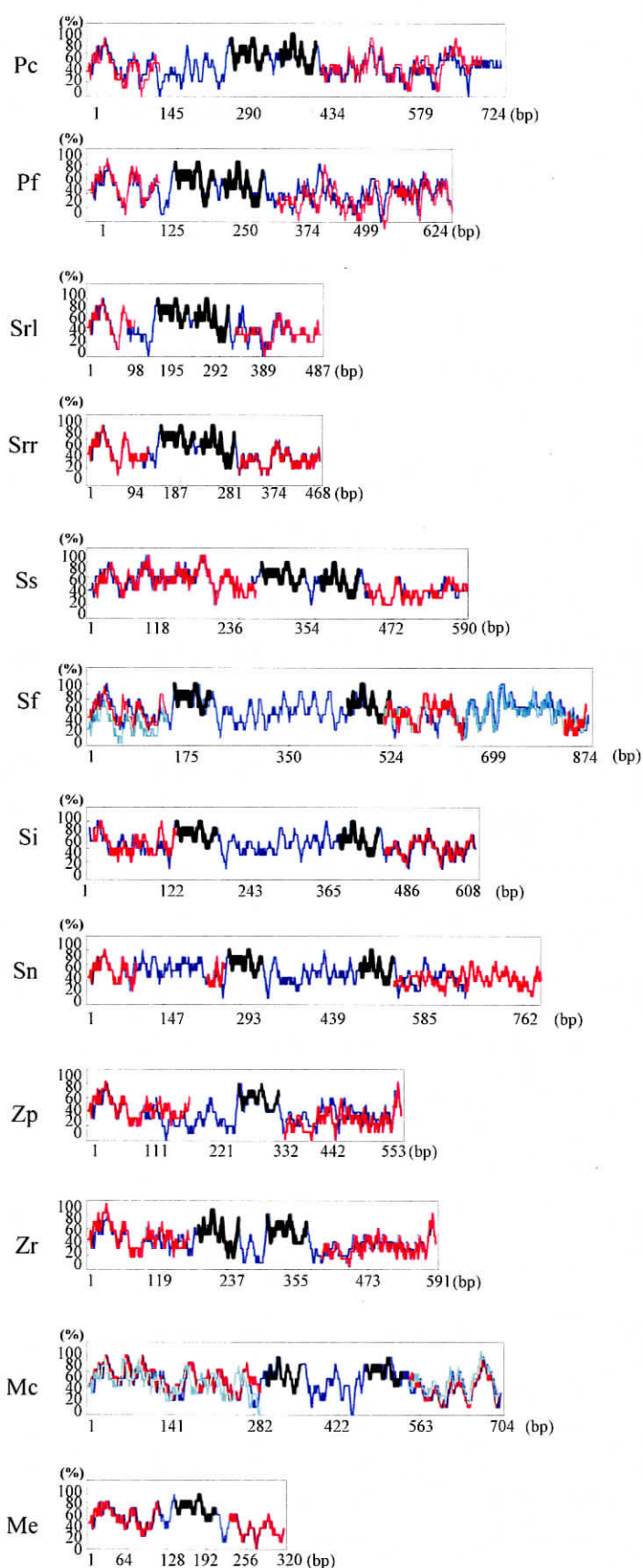


Fig. 12. GC Profiles of ITS Regions of *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera*. Pc=*P. cerevisiophilus*, Pf=*P. frisingensis*, Sl=*S. lactificex*, Sf=*S. flueggeri*, Si=*S. infelix*, Sn=*S. noxia*, Si=*S. infelix*, Srl=*S. ruminantium* subsp. *lactilytium*, Srr=*S. ruminantium* subsp. *ruminantium*, Ss=*S. sputigena*, Zp=*Z. paucivorans*, Zr=*Z. raffinivorans*, Mc=*M. cerevisiae*, Me=*M. elsdenii*. Blue line represent the GC profile of the long-ITS, red line represent the GC profile of the short-ITS, and green line represent the GC profile of the middle-ITS.

成した系統樹では、*Pectinatus*と*Selenomonas*は近縁であり、このクラスターとは離れて*Zymophilus*、*Megasphaera*が存在した(Fig. 14)。

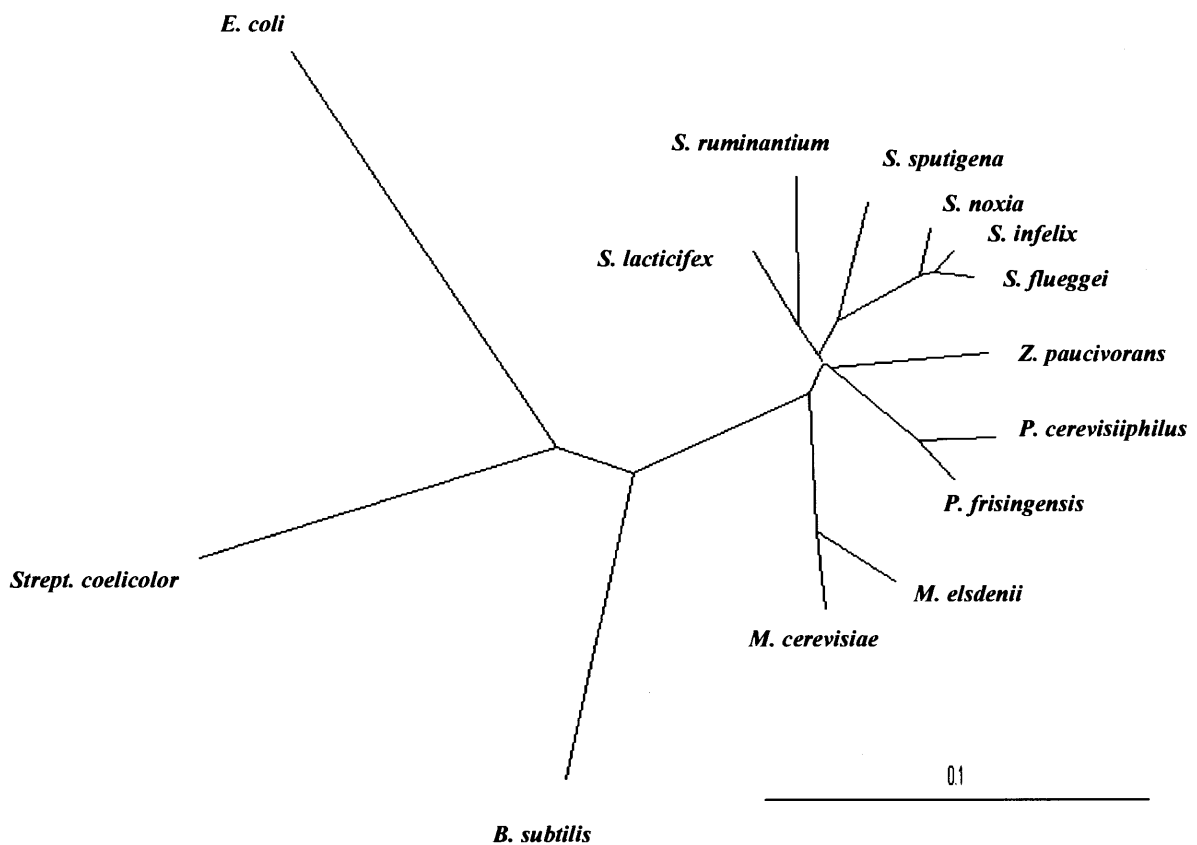


Fig. 13. Unrooted Phylogenetic Tree Showing the Relationships Among Five Species Investigated in This Study, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*, and *Escherichia coli* Based on the 16S rRNA Gene. Scale bar=10 nucleotides substitutions per 100 nucleotides.

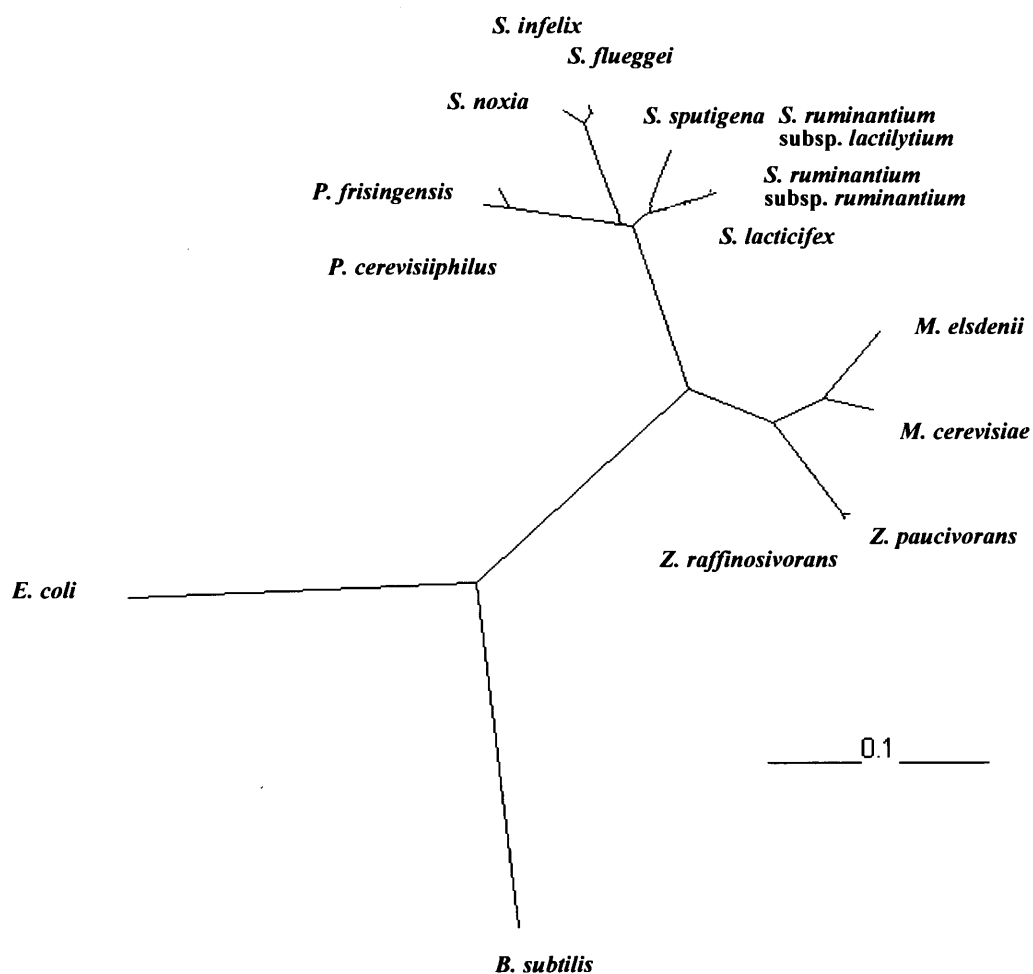


Fig. 14. Unrooted Phylogenetic Tree Showing the Relationships Among *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, *Megasphaera*, and Reference Strains Based on the DNA Sequence Obtained from the Long-ITS. Scale bar=10 nucleotides substitutions per 100 nucleotides.

#### 第四節 考察

細菌のゲノムあたりの*rrn*数は1(*Mycoplasma*)から10(*Bacillus subtilis*)まで報告されている(37)が、ITS領域をPCR増幅しアガロースゲル電気泳動を行うとこれらは纏まったバンドとして検出される(37,38,49)。この理由は複数の*rrn*のITSの長さは2、3種類に大別される為で(37)、例えば*Escherichia coli*では全7*rrn*オペロンのITSの長さは355bpと431-441bpに大別される(37)。*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*についても複数の*rrn*を有するものと思われるが、PCRではサイズの異なる2-3種類のITSの増幅産物が認められた(Fig. 6B)。

一般にITS解析は全*rrn*のITSを比較することなく、PCR産物を基に行なわれる(37,38,39,41,42)。これはゲノム内のITS塩基配列のvarietyは、近縁種間のvarietyほど大きくないことが理由である(48,49)。*Bacillus subtilis*の例では、10の*rrn*オペロンは8つのshort-ITSと2つのlong-ITSに大別される(36)。そのshort-ITS間の相同性は97-100%である(48)。long-ITSに存在するtRNA遺伝子を一塩基の変化とみなした場合、long-ITSとshort-ITSの相同性は、95.3-97%である(48)。一方、近縁種*B. atrophaves*のITSと*B. subtilis*の全てのITSとの比較では、88.2-91.6%である(48)。

*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*も同様に、long-ITSはshort-ITSよりも200-300bp程度長く、その領域には1-2個のtRNA遺伝子が認められた(Table 8)。ITS1(1')ならびにITS3(3')は各々相同性が高く、long-ITSはshort-ITSの中央にtRNA遺伝子およびその周辺領域が挿入された構造であ

った(Fig. 7)。このうちtRNA遺伝子およびITS1領域の1-59bp は保存性が高く、かつGC含量が高い領域であった(Fig. 12)。一方、これ以外の領域は保存性が低く、GC含量も低かった(Fig. 12)。さらに近縁種間の比較では、塩基置換だけでなくギャップが認められ、その両端はAT richな領域が存在した(Fig. 11)。ITSのギャップについて他の菌種での報告がある(44,50,51)。 *E. coli* K-12株では、*rrnB*オペロンのITS領域の86bpからなるrsl (ribosomal spacer loop)が欠失したことが実験的に確かめられ、このrslはhairpin-loop構造をとるものと推定された(44)。 *Staphylococcus aureus*では、*rrnA*と*rrnE*のITSの比較によりギャップが認められ、その両端はAとTのみで構成される配列が存在した(50)。このことから*rrn*オペロンの相同組換え(51)によりホモロジーの低い領域がlooped outした、というモデルが提唱されている(44,50)。 *Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*についても同様のモデルが当てはまるものであり、更にITSのギャップは各々の種を特徴付けるものであった。

ITSは16S、23S、5Sの3つのrRNAサブユニットと一続きの前駆体RNAとして転写された後、プロセッシングを受ける領域であり(49)、その構造は16Sの3'末端のprocessing stalkを含むITS1、23Sの5'末端のprocessing stalkを含むITS3、tRNA遺伝子に分けられる(44)。一方、ITSのアラインメントにあたっては、ITSには多くのギャップが認められた為、ホモロジーを最大にする為にスペースを加える必要があった。そこで適切な高次構造を維持する為に、ITS1、2、3およびtRNA遺伝子毎に整列し、最終的に全長のアラインメントを作成した。その結果long-ITSによる系統樹Fig. 14は、特異的なITSの構造



を持つ *Pectinatus* と *Selenomonas* が同一のクラスターを形成しており、16S rRNAによる系統樹(Fig. 13)とは明確に異なっていた。これらの細菌の共通祖先(54)からの系統進化において、*Zymophilus*、*Megasphaera*の系統ではITSのtRNA遺伝子の順序に変化は起こらず、*Pectinatus*、*Selenomonas*の系統ではtRNA遺伝子の逆転が起こったものと考察された(Fig. 15)。我々の報告と同時期に、*Pectinatus*、*Selenomonas*と同様のtRNA遺伝子の順序をITS領域に持つ細菌種が報告された(52)。この細菌 *Antactrobacter heliothermus* は、Table 11に纏めたようにグラム陰性で好気性細菌であり、 $\alpha$ -*Proteobacteria*に属する(52,53)。一方、*Pectinatus*、*Selenomonas*は、Gram-positive bacteria with a low DNA G+C contentに含められ(10)、*A. heliothermus*とは系統学的に大きな隔たりのある。この細菌の存在は、ITSのtRNA遺伝子の逆転は、各々の系統で起こった特有の現象であることを裏付けるものである。

*Pectinatus* はビールから分離された細菌種(3,4,5,6)である一方で、*Selenomonas*はヒトや動物からの分離例が多い(15,16,17)。本研究による系統解析は、16S rRNAでは明らかにされなかったビール醸造に関連する偏性嫌気性細菌とこれまで分離例のある類縁細菌との系統を明確にし、*Pectinatus* のHabitat(14)を考察する上で興味深いものであった。

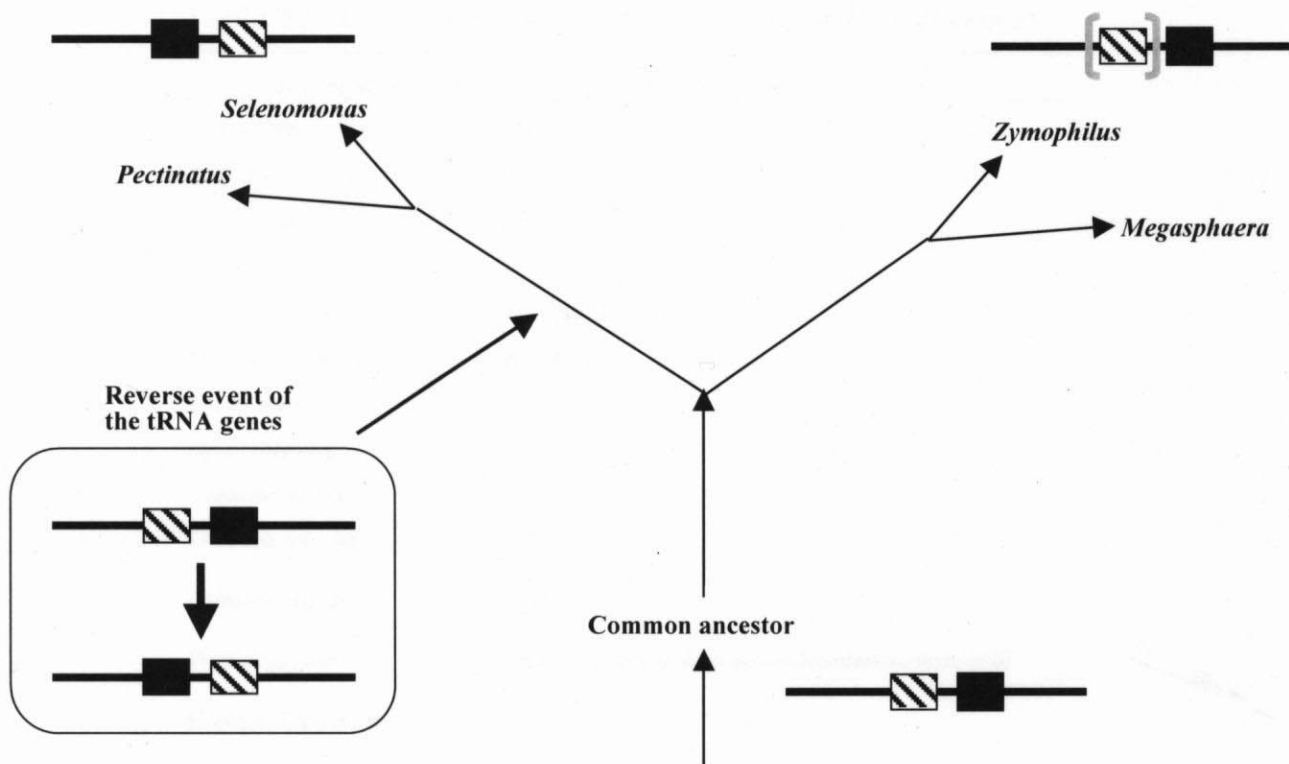


Fig. 15. Schematic Hypothetical Evolutionary Course of *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus*, and *Megasphaera*. ■; tRNA<sup>ala</sup>, ▨; tRNA<sup>ile</sup>

Table 11. Characteristics of *Antarctobacter heliothermus*

Characteristics	<i>A. heliothermus</i> <sup>a</sup>
Cell shape	Rod
Cell diameter, µm	0.8-1.2
Cell length , µm	2.0-33.6
Motility	+
Flagella	1-3 flagella/ cell
Oxygen tolerance	Aerobic
Gram stain	—
Sporeforming	—
Catalase activity	+
Oxidase activity	+
Quinone system	Q-10
Peptideglycan	Directly cross-linked <i>meso</i> -diaminopimeric acid
Cellular fatty acids	C <sub>18:1</sub>
GC content, mol%	62.3-62.8
Phylogeny by 16S rRNA	<i>α-Proteobacteria</i>

<sup>a</sup> Data from reference 52,53

## 第五節 要約

*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*のような近縁関係にある細菌の系統解析系に、保存性の低いITS領域による解析を行った。その結果、ITS領域は塩基置換だけでなくギャップが多く認められる領域であった。さらに、*Pectinatus*、*Selenomonas*のlong-ITSにコードされていた2つのtRNA遺伝子は、16S rRNA方向よりtRNA<sup>ala</sup>→tRNA<sup>ile</sup>であった。これまで報告された細菌のITSのtRNA遺伝子順は全てtRNA<sup>ile</sup>→tRNA<sup>ala</sup>であることから、*Pectinatus*、*Selenomonas*のITSの構造は特異的であった。近縁な細菌である*Megasphaera*、*Zymophilus*とも明確な区別がつけられたため、16S rRNAよりも詳細な系統学的位置の確認を行うことができた。

## 第IV章

### PCR法による迅速同定法の開発

#### 第一節 緒言

近年ビール業界ではビール鮮度を重視しており、ビールを製造後速やかに品質上の問題の有無を見極めて出荷することが必要になっている。一方、第II章では*Pectinatus*が多数分離され、わが国に於いても欧米と同様に*Pectinatus*によるビール汚染が懸念された。以上のことから、ビールに混入した*Pectinatus*を迅速に同定し、危険性を早急に察知する必要がある。しかし従来からの細菌の同定法である、生理・生化学性状を基にした検査法を用いることは時間を要し、再現性に乏しく、精度が悪い等の問題があった(55)。一方、DNA-DNA交雑試験は最も信頼性の高い方法である(17,18,23,24)が、日常検査に用いるには操作が煩雑であるなどの問題があった。

そこで第IV章では、PCR法による*Pectinatus*の迅速同定法を開発することにし、第III章で解析したITS領域を利用した。

## 第二節 材料および方法

### 1. 供試菌および培養条件

第II章で分離した *Pectinatus* (Table 5)、Table 2に記載したグラム陰性菌(基準株)を、第II章に記載の方法で培養した。グラム陽性菌としては、*Lactobacillus acidophilus* IFO13951、*L. casei* ATCC334、*L. brevis* JCM1059、*Lactococcus lactis* JCM5805、*Leuconostoc mesenteroides* JCM6124、*Pediococcus damnosus* JCM5886を試験に供し、その培養は、MRS broth (Merck)により、25℃、嫌気条件下で3日間行った。*Escherichia coli* IFO3301は、LB培地、37℃好気条件下で1日間行った。

### 2. DNA抽出法

第II章 第二節 2.(1)のDNA抽出法を簡易化した方法を採用した。培養菌体200μlを、滅菌水で1回集菌洗浄し、200μlのsuspension bufferに懸濁した。その懸濁液にLysozyme(SIGMA)を1mg/ml、N-acetylmuramidase (Seikagaku-Kogyo Co.) を50μg/mlとなるように添加し、37℃で1時間保持した後、160μg/ml proteinase K (Nakalai tesque) を含む400μlの2×CTAB bufferを添加し、50℃で1時間保持した。その後、反応液に2mlのPhenol-chloroform (1:1)を加え、手で攪拌した後、4℃で16,000-18,000×g、5分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、1μlのGlycogenを加え軽く攪拌した後、300μlの2-propanolを加えて、再び手で攪拌し、-20℃にて30分間放置した。その後、4℃で16,000-18,000×g、15分間遠心した。その後、上清を捨て沈殿物を1mlの70%

ethanol(-20℃)を加え、4℃で16,000-18,000×g、10分間遠心した。再度上清を捨て、5分間真空乾燥した後、沈殿物を100μlの滅菌蒸留水に懸濁した。

### 3. PCRプライマーの設計

Forward primerは、Sakamoto *et al.*(55)が*Pectinatus*の特異検出法として16S rRNA遺伝子(10)より設計した塩基配列を利用した。reverse primerは、第III章で解析したITS領域より設計した。

#### (1)Forward Primerの設計

Sakamoto *et al.*により、*P. cerevisiiphilus*と*P. frisingensis*の16S rRNA遺伝子(10)から、*Pectinatus*の特異プライマーが選定されている(55)。これは、*P. cerevisiiphilus*の16S rRNA遺伝子(10)の5'末端より1024bpから1043bpまでの部位、*P. frisingensis*の16S rRNA遺伝子の5'末端より657から674bpである。この領域をForward Primerとした(Fig. 16AB)。

#### Forward Primer (16F-F)

for *P. cerevisiiphilus*: 5'-CGTATGCAGAGATGCATATT-3'

#### Forward Primer (16C-F)

for *P. frisingensis*: 5'-CGAACTGAGGTTCTTGAG-3'

#### (2)Reverse Primerの設計

*P. cerevisiiphilus*のlong-ITSには約100bpのブロックが存在し(Fig. 11A)、

ここから **Reverse Primer** を設計した (Fig. 16A)。一方、*P. frisingensis* の ITS3 (3') は保存性が低く、ここから **Reverse Primer** を設計した。long-ITS の 5' 末端より 377bp から 395bp までの部位、short-ITS の 5' 末端より 195 bp から 213bp までの部位を *P. frisingensis* の特異プライマーとして選択した (Fig. 16B)。

#### **Reverse Primer IC-R**

for *P. cerevisiophilus*: 5'-CACTCTTACAAGTATCTAC-3'

#### **Reverse Primer IF-R**

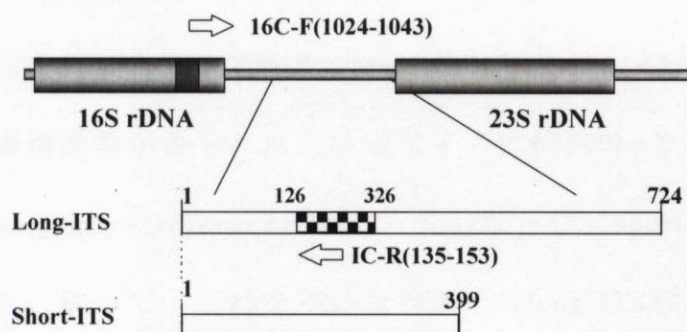
for *P. frisingensis*: 5'-CCATCCTCTTGAAAATCTC-3'

## **4. PCR**

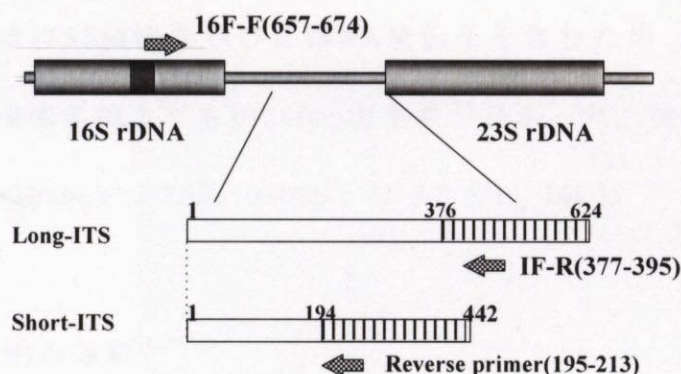
TOYOBO 社 rTaq polymerase を 1μl、10× Buffer を 5μl、DNA を 5μl、dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) を各 1μl、5mM MgCl<sub>2</sub> を 5μl、H<sub>2</sub>O を 31μl 加え Total 50μl とした。装置は Perkin-Elmer 社の GenAmp2000 を、温度プログラムは、denature : 95°C 30 sec annealing : 55°C 30 sec extension : 75°C 30 sec を 30 サイクルとした。PCR 増幅産物は、アガロースゲル電気泳動法により検出した。アガロースゲルは、2.5% NuSieve agarose gel を、TBE Buffer 中で 100V 約 30 分間 Mupid により実施した。核酸の染色には、SYBER GREEN II (Molecular Probes) を、添付の説明書に従い使用し、UV 照射によりバンドを検出した。



**A** *P. cerevisiiphilus*



**B** *P. frisingensis*



**C**

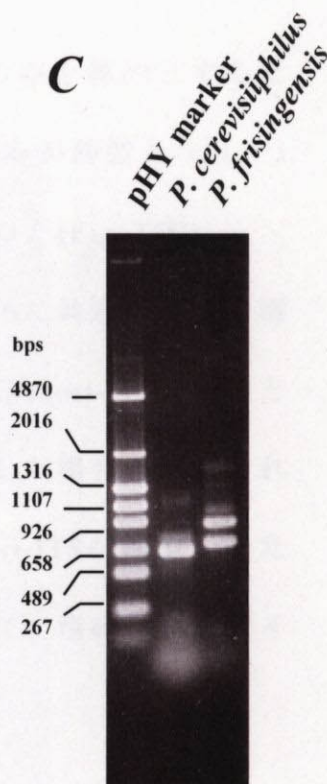


Fig. 16. (A) Deduced Structure of the ITS Region of *P. cerevisiiphilus*. Nucleotide positions 135 to 153 in the *P. cerevisiiphilus* long-ITS are represented by the checked box. That region was only found in the *P. cerevisiiphilus* long-ITS. The white arrows represent the species-specific primers for the detection of *P. cerevisiiphilus*. (B) Deduced Structure of the ITS Region of *P. frisingensis*. The hatched boxes represent the regions relative with low homology between *P. cerevisiiphilus* and *P. frisingensis*. The gray arrows represent the species-specific primers for the detection of *P. frisingensis*. (C) Polymerase Chain Reaction (PCR) Products from different template DNAs using species-specific primers which were developed in this study. Lane M, PHY markers; lane 1, PCR product with *P. cerevisiiphilus* DNA and primers 16C-F and IC-R; lane 2, PCR products with *P. frisingensis* DNA and primers 16F-F and IF-R.

### 第三節 結果

#### 1. 特異primersによる増幅

*P. cerevisiiphilus*用のreverse primerはlong-ITSの配列のみを標的とするため、これを用いたPCRでは*P. cerevisiiphilus*のlong-ITSのみが鋳型となり、1種類の増幅産物が得られた。このサイズは約600bpであった(Fig. 16C)。

*P. frisingensis*のreverse primerは、longならびにshort-ITSに共通な配列を標的とした。従って、これを用いたPCRではlong-ITSおよびshort-ITSが鋳型となり、2種類の増幅産物が得られた。Long-ITSを鋳型とした場合、増幅される領域はITS2領域ならびにtRNA遺伝子を含むため、short-ITSを鋳型とした場合の増幅産物よりも約200bp塩基長が長かった。従って、増幅産物のサイズは約1200bpおよび約1000bpとなった(Fig. 16C)。

#### 2. 特異性の確認

*P. frisingensis*の特異primersを用いたPCRでは、*P. frisingensis* DNAを鋳型とした場合のみ増幅が認められ、他の細菌DNAからは増幅が認められなかった(Fig. 17A)。*P. cerevisiiphilus*の特異primersを用いたPCRでは、*P. cerevisiiphilus* DNAを鋳型とした場合のみ増幅が認められ、他の細菌DNAからは増幅が認められなかった(Fig. 17B)。

#### 3. 種内での保存性

*P. frisingensis*の特異primersを用いて、第II章で分離した*P. frisingensis*29株

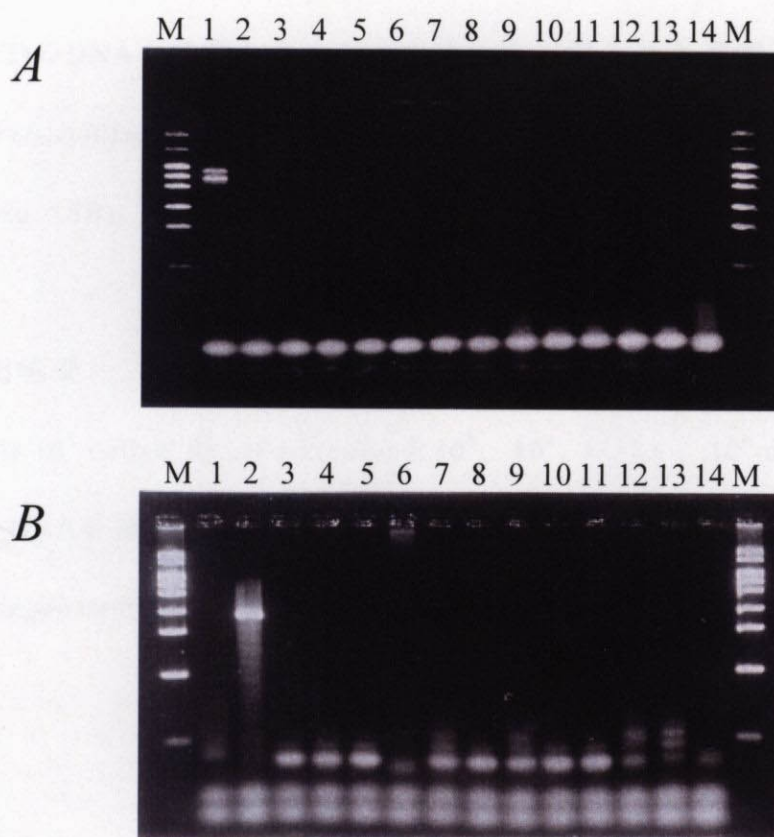


Fig. 17. Specific Detection of *P. frisingensis* (A) and *P. cerevisiiphilus* (B). The DNA from various bacteria was reacted with the specific primers for *P. frisingensis* (A) and *P. cerevisiiphilus* (B). Lanes M: pHY markers, Lane 1: *P. frisingensis* DSM6306, Lane 2: *P. cerevisiiphilus* DSM20467, Lane 3: *S. lacticifex* DSM20757, Lane 4: *Z. raffinivorans* DSM20765, Lane 5: *Z. paucivorans* DSM20756, Lane 6: *E. coli* IFO3301, Lane 7: *M. cerevisiae* DSM20462, Lane 8: *L. acidophilus* IFO13951, Lane 9: *L. casei* ATCC334, Lane 10: *L. brevis* JCM1059, Lane 11: *Lacto. lactis* JCM5805, Lane 12: *Leuconostoc mesenteroides* JCM6124, Lane 13: *Pediococcus damnosus* JCM5886, Lane 14: Negative control

(Table 5)と基準株5株(Table 2)のDNAを鋳型としたPCRを行った。得られた増幅産物のサイズは、*P. frisingensis* のType Strain DSM6306株由来のPCR増幅産物と同様であり、Fig. 18Aに結果の一部を示した。*P. cerevisiiphilus*の特異primersを用いて、第II章で分離した*P. cerevisiiphilus*1株(Table 5)と基準株4株(Table 2)のDNAを鋳型としたPCRを行った。得られた増幅産物のサイズは、*P. cerevisiiphilus*のType Strain DSM20467株由来のPCR増幅産物と同様であった(Fig. 18B)。

#### 4. 検出感度

*E.coli*  $10^7$  cellsに対し*Pectinatus*を $10^5$ 、 $10^4$ 、・・・、 $10^0$  cellsとなるように添加後DNAを抽出し、PCR試験に供した。その結果*P. cerevisiiphilus*および*P. frisingensis*それぞれの検出系において、検出限界は $10^2$ cellsであった(Fig. 19)。



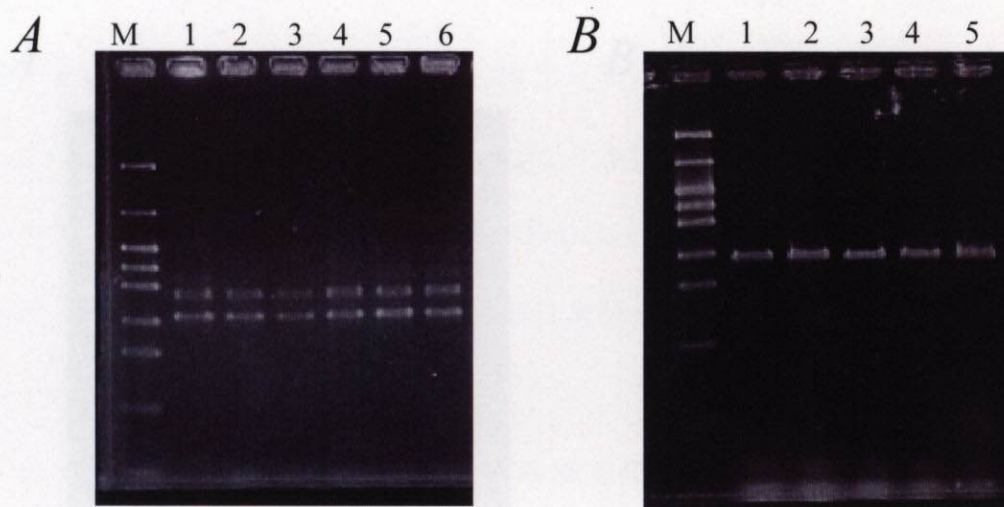


Fig. 18. (A) Reactivity of other *P. frisingensis* strains with specific-primer 16F-F and IF-R (partial data). The DNA from various strains of *P. frisingensis* reacted with the specific primers for *P. frisingensis*. Lane M, pHY markers; Lane 1, DSM 6306<sup>T</sup>; Lane 2, DSM20759; Lane 3, DSM20761; Lane 3, PL-437; Lane 4, PL-466; Lane 5, PL-471; Lane 6, PL-473 (B) Reactivity of other *P. cerevisiiphilus* strains with specific-primer 16C-F and IC-R. The DNA from various strains of *P. cerevisiiphilus* reacted with the specific primers for *P. cerevisiiphilus*. Lane M, pHY markers; Lane 1, DSM20467<sup>T</sup>; Lane 2, DSM 20466; Lane 3, DSM20762; Lane 4, DSM20763; Lane 5, PL-44

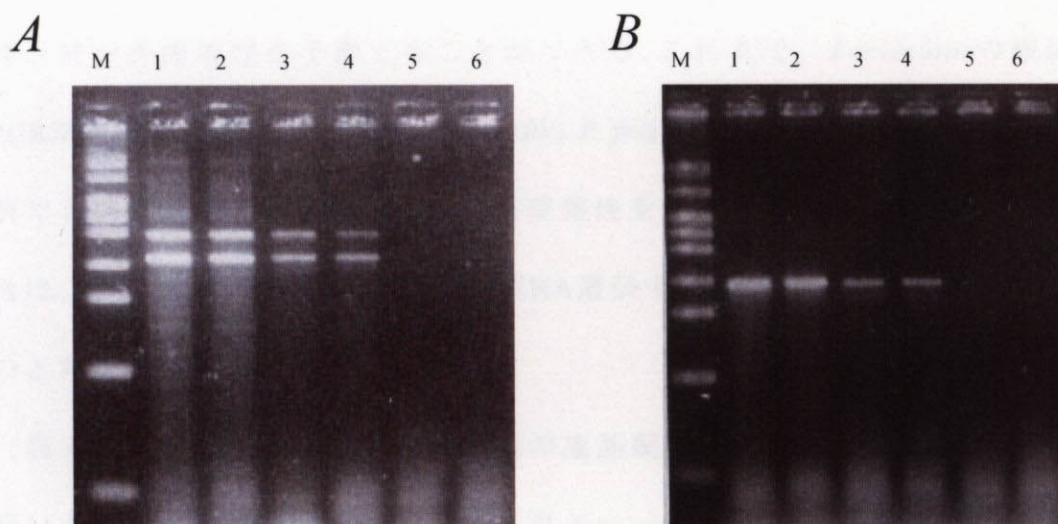


Fig. 19. Sensitivity in the PCR Detection of *Pectinatus*. Cells of *P. frisingensis* (A) and *P. cerevisiiphilus* (B) was serially diluted and Genomic DNA was purified as a template. *E. coli* cells ( $10^8$ cells) were added to each *Pectinatus* cells before DNA extraction as a carrier. The following cell amounts of templates were used: Lane 1,  $10^5$ cells; lane 2,  $10^4$ cells, lane 3,  $10^3$ cells; lane 4,  $10^2$ cells, lane 5,  $10^1$ cells; lane 6,  $10^0$ cells; Lanes M, pHY marker.

#### 第四節 考察

*Pectinatus*は全ての株にビール汚染性があることが第II章で判明し、一方で類縁菌である*Selenomonas*や*Zymophilus*はビール汚染性を持たない(10, 11)。従って、類縁菌やその他の細菌と区別して*Pectinatus*を特異検出できれば、ビール汚染性を予測することができる。これまで、*Pectinatus*の検出にPCRが適用された報告がある(55,56)が、*P. frisingensis*と*P. cerevisiiphilus*を区別できず類縁菌である*Zymophilus*に交差性を示す問題があった(56)。この理由は、プライマーを選択した16S rRNA遺伝子の保存性の高さに起因するものと考えられた。

我々は第III章で検討したITS領域の塩基配列を利用した。ITSは保存性が低いため、この領域から設計したプライマーは極めて特異性が高いものと期待された。様々な菌株を用いた試験では、特異性が高く、*P. cerevisiiphilus*と*P. frisingensis*が判別可能であることが確認された(Fig. 17)。この方法は従来の同定試験法よりも、高感度で精度の高い迅速な同定法であった(Fig. 17, 18, 19)。

本法は現在ではビール工場の品質管理法として採用され、ビールの出荷判定検査に用いられている。

## 第五節 要約

*Pectinatus*の迅速検査法として、ITS領域を利用したPCR法を構築した。この方法は、特異性が高く近縁関係にある*Selenomonas*や*Zymophilus*その他の細菌に交差性を示さない。さらに*Pectinatus*の2種*cerevisiiphilus*と*frisingensis*を明確に区別することが可能である。従って、本法は以前報告された16S rRNA遺伝子の配列を利用した検査法よりも優れていた。



## 第V章

### Ribotyping法による*Pectinatus*の汚染追跡法

#### 第一節 緒言

*Pectinatus*によるビール汚染の迅速判定が第IV章により可能になった。そこで微生物的により安定な製造を継続する為に、*Pectinatus*の汚染源や経路を追跡できる手法を開発しておく必要があった。この為に*Pectinatus*をstrainレベルで分類することが重要である。この手段として、これまで糖発酵性パターンなどの生理生化学試験が用いられてきた(57)が、時間を要すること、同種である場合類似した結果が得られる例がある等、いくつかの問題があった(57)。

近年、DNAやRNAの塩基配列の差異を検出する遺伝子解析が応用されるようになった(34,57)。これらの中でRibotyping法は、rRNA遺伝子の制限酵素断片長多型を検出する方法であり(57-61)、主に病原性細菌の疫学的調査に適用されている(58,59,60,62,63)。そこで我々は、*Pectinatus*の汚染追跡法としてこのRibotyping法を検討した。

## 第二節 材料および方法

### 1. 供試菌および培養、DNA抽出方法

第II章で分離した *P. frisingensis* 29株 (Table 5) および *P. frisingensis* の reference株5株 (Table 2) を供した。培養およびDNA抽出は、第II章に記載の方法に準じた。

### 2. Ribotyping法

*Eco*RI、*Hind*III、*Bam*HIで処理したDNA断片を、RiboPrinter™ Characterization System (Qualicon, Inc.) (57)に供した。本装置の詳細なステップは、以下の通りである。

#### (1)電気泳動による分離およびメンブレンへのブロッティング

DNA断片は、アガロースゲル電気泳動で分離し、さらにメンブレンにブロッティングする。

#### (2)特異的プローブによるハイブリダイゼーション

メンブレン上のDNA断片は、固定、変性した後、化学標識したプローブ(大腸菌由来のrRNAオペロン)とハイブリダイゼーションさせる。洗浄後、ブロッキングバッファーと抗スルホン化DNA抗体／アルカリホスファターゼ・複合体で順次処理する。

#### (3)化学発光によるバンドの検出

メンブレンに化学発光性基質を添加し、発光しているDNAのバンドパターンをCCDカメラで撮影する。その画像データをデジタル化し、コン

ピューターに保存する。

#### (4)データ処理および解析

コンピューターに保存されたサンプルの画像データは、**Riboprinter™**  
**Microbial Characterization System**の専用画像解析ソフトにより、サンプルとマーカーのバンドの位置や強度の比較などから標準化される。

### 第三節 結果

#### 1. *P. frisingensis*の分類

*P. frisingensis* 34株は、制限酵素 *Eco*RI、*Hind*III、*Bam*HIにより、各々 13 type、12 type、12 typeに分類された(Fig. 20)。最も分解能が高い酵素は*Eco*RIであったが、*Eco*RIにより同一のribotypeを示す菌株群が、他の制限酵素により異なるribotypeを示すケースが見られた。例えば*Eco*RIにより示されるribotype:E1 の 8 株 (PL-437,451,452,453,454,469,DSM20759,DSM20761) は、*Bam*HIでは5種類(ribotype:B3,4,5,11,12)に分類され、*Hind*IIIでは4種類(ribotype:H1,H3,H11,H12)に分類される。このように各株を制限酵素別のribotypeをまとめたところ、C1~C17の17 typeに分類することができた(Table 12)。

#### 2. ビール工場別の解析

*P. frisingensis*は、第II章でA~G工場より合計29株が分離された (Table 7)。そこでTable 12とTable 7より、工場別の分離源とribotypeの関係をまとめた。その結果、各工場に特有のribotypeを有する菌株が存在し、同一のribotypeを示す株は複数の工場で重複して分離されていないことが判った(Table 13)。

また、D工場で検出されたPL-47、PL-48、PL-49株は、ヨーロッパで分離されたDSM20760と同じribotypeC6を示した(Table 13)。一方、他の26株のribotypeは基準株とは異なっていた(Table 13)。

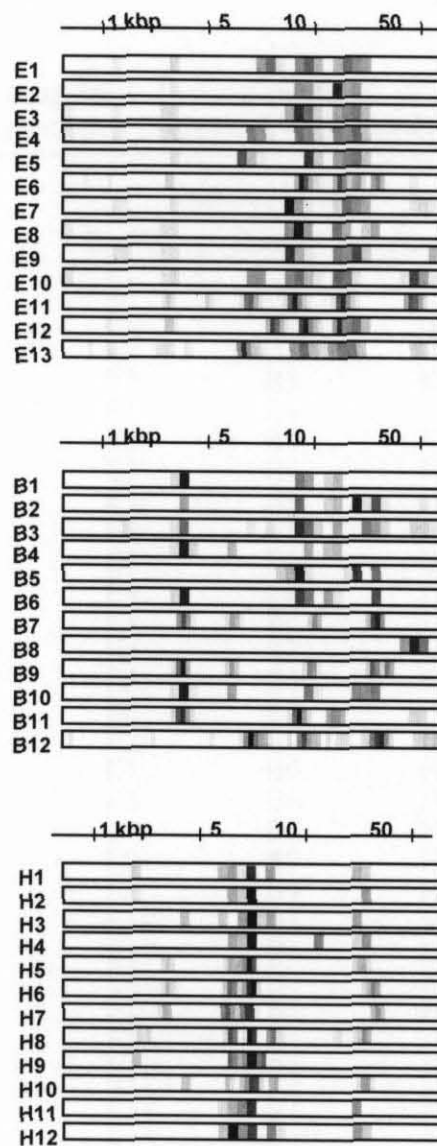


Fig. 20. Ribotypes of 34 *P. frisingensis* Strains Isolated from Breweries and Reference Strains. Ribotypes; E1-E13, B1-B12, and H1-H12 were obtained by *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, respectively.

Table 12. Composite Typing of 34 *P. frisingensis* Strains Based on Ribotypes Digested with *Eco*RI, *Bam*HI, and *Hind*III

Strain	Restriction Enzyme			Composite Ribotypes <sup>a</sup>
	<i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	
PL466	E1	B1	H1	C1
PL468	E1	B1	H1	C1
PL45	E2	B2	H2	C2
PL437	E3	B3	H1	C3
PL451	E3	B4	H1	C4
PL452	E3	B4	H1	C4
PL453	E3	B4	H1	C4
PL454	E3	B4	H1	C4
PL469	E3	B5	H3	C5
PL47	E4	B6	H4	C6
PL48	E4	B6	H4	C6
PL49	E4	B6	H4	C6
PL51	E5	B7	H1	C7
PL407	E6	B8	H5	C8
PL136	E6	B8	H5	C8
PL467	E7	B9	H6	C9
PL470	E7	B9	H6	C9
PL70	E8	B6	H2	C10
PL471	E9	B9	H7	C11
PL472	E9	B9	H7	C11
PL473	E9	B9	H7	C11
PL455	E10	B1	H8	C12
PL456	E10	B1	H8	C12
PL460	E10	B1	H8	C12
PL464	E10	B1	H8	C12
PL465	E10	B1	H8	C12
PL461	E10	B1	H8	C12
PL77	E10	B1	H8	C12
PL462	E11	B10	H9	C13
DSM6306	E12	B5	H10	C14
DSM20465	E13	B3	H1	C15
DSM20759	E3	B11	H11	C16
DSM20760	E4	B6	H4	C6
DSM20761	E3	B12	H12	C17

<sup>a</sup> The *Eco*RI, *Bam*HI, and *Hind*III ribotype data for each strain was assembled into a composite pattern, and composite ribotypes were formed.

Table 13. Distribution of *P. frisingensis* isolated from Japanese Breweries

Brewery	Composite Ribotypes	Source(Strain Number)
A	C1	drainage(1) floor(1)
	C5	drainage(1)
	C9	floor(2)
	C11	drainage(2) recycled bottle(1)
B	C2	others(1)
	C13	drainage(1)
C	C7	floor(1)
D	C6	others(3)
E	C3	others(1)
	C4	others(4)
	C12	drainage(7)
F	C10	others(1)
G	C8	others(2)
reference	C6	DSM20760
reference	C14	DSM6306
reference	C15	DSM20465
reference	C16	DSM20759
reference	C17	DSM20761

### 3. 分離箇所別による解析

A工場から8株の*P. frisingensis*が分離されており、その分離箇所は排水口、製造場の床、回収瓶である(Table 7, 13)。その中で、回収瓶から検出されたPL-473株はribotypeC11であった(Table 12)。排水口より分離されたPL-471、PL-472株は、回収瓶由来のPL-473株と同じribotypeC11を示した(Table 12, 13)。また、排水口から分離されたPL-468株は、製造場床由来のPL-466株と同一のribotypeC1を示した(Table 12)。

E工場から12株の*P. frisingensis*が分離され、この内7株は複数の排水口から分離されていた(Table 7, 13)。これらの7株は全てribotypeC12であった(Table 12)。



#### 第四節 考察

Ribotyping法は、rrnオペロンの制限酵素切断断片長多型(RFLPs)を検出する方法である(57,58)。制限酵素は*EcoRI*が最も汎用されているが、細菌種により分解能の高い制限酵素は異なる(61)。一方、細菌のタイピングには、Ribotyping以外にも様々な方法が報告されている(34)が、菌種によって評価は異なり、複数の方法を組み合わせて実施される例もある(62,63,64)。しかし、操作の煩雑さや迅速性、コストの面で問題があった。

そこで我々は、*Pectinatus*のRibotypingにあたりゲノムDNAを*EcoRI*、*HindIII*および*BamHI*で各々処理し、その制限酵素処理断片を1種類のプローブで検出した。その結果、得られたribotypeのうち*EcoRI*が最も多くのパターンを示した(Fig. 20)が、他の制限酵素で得られたribotypeと複合し新たに分類することにより、より詳細なタイピングが可能になることを示した(Table 12)。この複数の制限酵素を使用するRibotypingは、分解能、ならびに迅速性やコスト面の問題点を解決する方法であった。

日本各地で分離された*P. frisingensis*は、各地域固有のribotypeを示した(Table 13)。このことは、各工場に生息する*Pectinatus*は各地域に特徴的な菌株であることを示した。また、国内分離株はmaltose発酵能を持つ株が多いなど、欧米での分離株とは異なっていた(第II章 Table 5)が、Ribotypingについても国内分離株はreference株とは異なるribotypeを示す株が多数を占めており(Table 13)、maltose発酵試験の成績を裏付けるものであった。

これまで分離された*Pectinatus*の分離源は、ビールやビール工場の設備であり(3,4,10,11)、工場での汚染経路などは不明確であった(14)。現在のビール工場の衛生管理では、醸造設備のサニタリー化、CIPシステムによる洗浄殺菌が行われている(28)にも関わらず、最新鋭の工場を中心に*Pectinatus*による汚染事故が発生すること(5)は矛盾している様にも見える。この件に関しHaikaraは、水が有力な汚染源の一つであると報告し(14)、Backは、*Pectinatus*の汚染がビール醸造ラインとは異なる経路で起こることを指摘している(65)。しかし、いずれも具体的な汚染経路について言及していなかった。第II章で回収瓶から*Pectinatus*が分離されていた(Table 6)。この回収瓶から分離された株と排水口から分離された株のribotypeが一致した(Table 12)。市場から回収されたビール瓶は洗浄・殺菌して再利用するが、この洗浄・殺菌プロセスのうち最初に予洗水で回収瓶内部の汚れを排出する予洗工程がある(Fig. 21)。この水は殺菌成分を含まないため細菌が死滅せず、瓶内部の細菌が排水口に移行する可能性がある。従って、*Pectinatus*は回収瓶経由で工場に侵入し、洗浄工程を経て排水口に侵入する経路が示された。一方、複数の排水口由来の分離株が同一のribotypeを示した(Table 13)。排水口は排水管で繋がっていることから、排水管を通じて*Pectinatus*が拡散する経路が示された。加えて、排水口由来の分離株と床由来の分離株が一致した事例があった(Table 13)。これより、排水口ー床の汚染経路が示された。偏性嫌気性菌である*Pectinatus*はエアロゾル中での生存が可能であり、空気を介してビールに混入する、との報告がある(14)。さらにBackは、*Pectinatus*によるビール汚染はFilling machine（ビール充填機）やCrown(王冠打栓機)を介する、

との報告をしている(65)。以上の知見を基に推定された、*Pectinatus*が回収瓶から排水管を通じてビール充填室に侵入しビールへ混入する汚染経路をFig. 21に示した。これは、これまでの断片的な情報(14,65)を支持する、ビール工場のCCP (Critical Control Point)に関する有力な情報である。

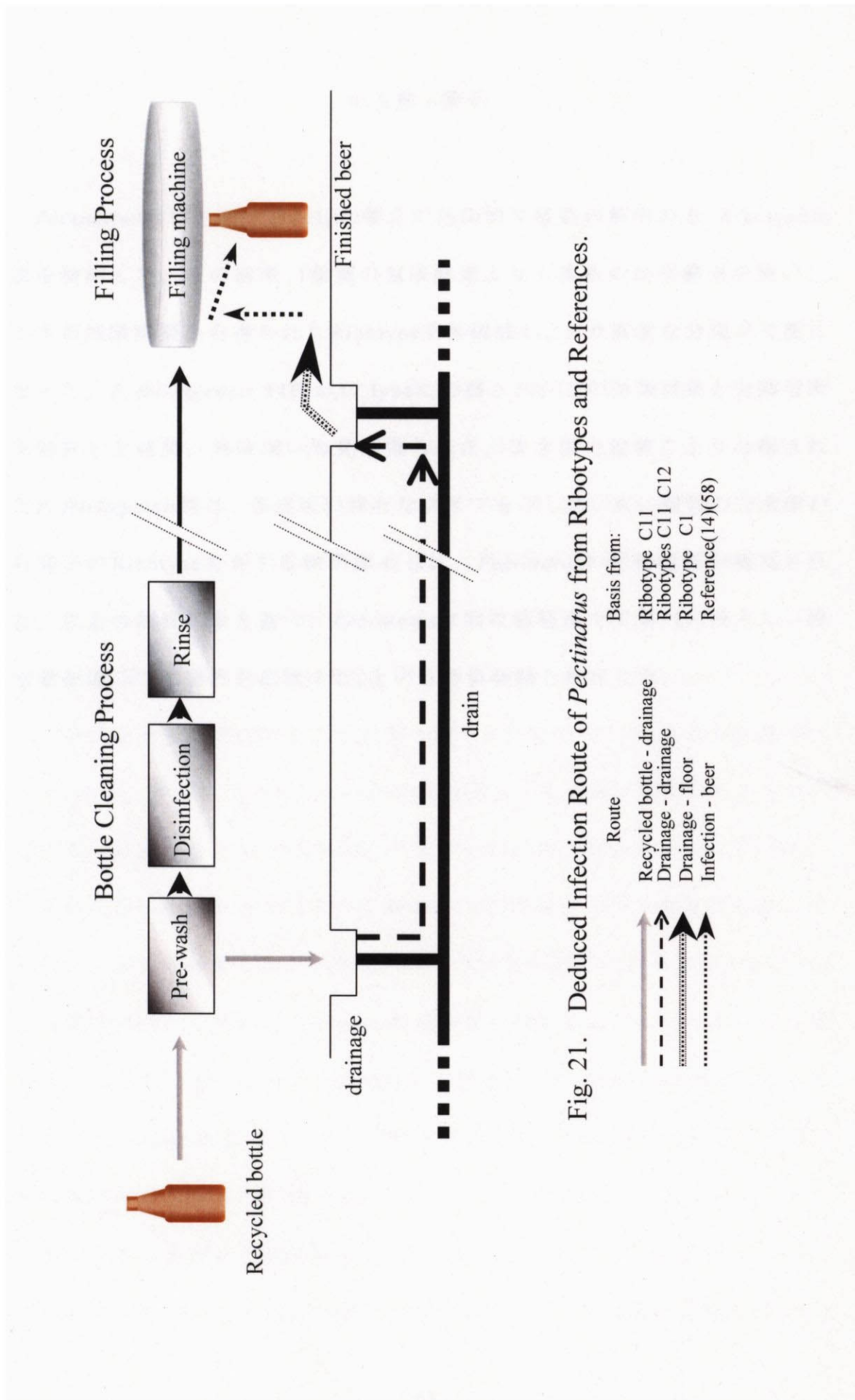


Fig. 21. Deduced Infection Route of *Pectinatus* from Ribotypes and References.

## 第五節 要約

*Pectinatus*がビールへ混入した場合の汚染源や経路の解明の為、Ribotyping法を検討した。その結果、1種類の制限酵素よりも複数の制限酵素を使い、各々の制限酵素から得られたRibotypeを再編成し、より高度な分類が可能になった。*P. frisingensis* 34株が17 typeに分類され、この分類結果と分離箇所を解析した結果、興味深い知見が得られた。まず国内地域により分離された*P. frisingensis*株は、各地域に特有なタイプを示した。次に複数の分離源から同一のRibotypeを有する株が認められ、*Pectinatus*の汚染経路が類推された。以上の解析結果を基に、*Pectinatus*は回収瓶経由で工場内に侵入し、排水管を通じて工場内を拡散する、という汚染経路を推定した。

## 第VI章

### 総括および今後の展望

本研究で取り上げたビール汚染細菌*Pectinatus*は、技術革新を背景に突然出現した細菌であり、ビールの長い歴史の中で極めて最近の出来事であった。*Pectinatus*は、従来のビール汚染菌とは異なりビールに不快な臭味をもたらす産業上の重大な細菌でもあることから、新属新種に対する調査・研究と同時にビール工場における検査体制の整備も早急に進める必要があった。その実施すべき必要項目を順に述べる。

第一に、その細菌に関する情報を得ること、すなわち*Pectinatus*のビールでの汚染性を確実に調査することであった。これについては、豊富な株数を確保し、各々の菌株についてビール汚染性を調査する必要がある。しかし本研究以前に分離された*Pectinatus*は、環境からの採取方法が確立されていないため菌株数が少なかった。そこで第II章では、環境からの分離方法の確立を試みた。採取・培養方法、スクリーニング法を検討しこれらを組み合わせ、短期間で効率よく多数の*Pectinatus*候補株を分離することができた。この候補株は最終的に、1株を*P. cerevisiiphilus*、29株を*P. frisingensis*と同定した。これらの*Pectinatus*は全てビール生育性を有しており、*Pectinatus*全般にビール生育性がある、ことが判明した。

第二には、類縁菌との系統を明らかにする事であり、これよりビール汚染性を有する細菌と有さない細菌との詳細な系統学的位置の確認を行うこ

とができる。そこで第III章では、*Pectinatus*、*Selenomonas*、*Zymophilus*、*Megasphaera*のITS領域の解析を行った。その結果、*Pectinatus*、*Selenomonas*のlong-ITSは特徴的な構造を有することが判明し、その塩基配列を基に詳細な系統解析を行うことができた。

第三に、迅速な検査体制を整備し、汚染源や経路の追跡法を開発する必要があった。そこで第IV章では、ITS領域の塩基配列を利用したPCR法を適用した。ITSからプライマーを設計し、高感度であり特異性に優れた迅速な検出法を開発できた。この方法をビール工場の品質検査法として導入することにより、精度の高い迅速出荷判定システムの構築を行うことができた。第V章では*Pectinatus*の株レベルの分類法としてRibotyping法を検討した。その結果、複数の制限酵素より得られるRibotypeを組み合わせ、詳細な分類が可能となった。第II章で分離した*Pectinatus*29株の分類結果と分離源との関係を解析することで、*Pectinatus*が市場から回収したビール瓶を介してビール工場へ侵入後排水管を通じて工場内部を拡散し、製造場の床にまで到達する経路が示された。本研究以前は*Pectinatus*の汚染源や経路は不明であった為、今後のビール工場の汚染対策についての重要な知見を得ることができた。

本研究は *Pectinatus* にフォーカスを当てた研究であるが、成果の一部は他の細菌へ応用可能な汎用性を有している。すなわち、環境からの分離法として確立した、嫌気度に配慮した採取、培養法やスクリーニング法は、他の嫌気性細菌にも適用可能である。Colony Hybridization 法は、グラム陽性菌

を含めた溶菌条件の設定をしており、全染色体 DNA をプローブとした特異的検出が可能である。従って、分離を目的とする菌株あるいは全染色体 DNA が入手できれば、本法により迅速に精度良くスクリーニングすることが可能である。系統解析では、ITS の塩基配列を類縁菌と比較解析することで、詳細な系統解析が可能である。ITS 領域を増幅する PCR プライマーの設計は、鋳型となる 16S ならびに 23S rRNA のデータベースは日々拡充していることから選択肢は今後も広がり、様々な菌種への応用範囲が広がるものと期待される。ITS 領域は 16S rRNA に比べ保存性が低く、種に特異的な領域があることが判明したため、この領域から特異的な PCR プライマーを設計し、迅速な同定法が構築可能であると期待される。PCR 法は日常検査が可能な品質管理法として、ビール工場に導入済みであり、新たなプライマーを追加することで、検査対応菌種を拡充することが可能である。汚染追跡法では、複数の制限酵素を用いた Ribotyping 法より、詳細な株レベルでの分類が可能になった。この方法は、他の菌種に対する汎用性を有している。

将来、ビールの味の変化や更なる技術革新に伴うビール製造法の変化により、*Pectinatus* とは異なる新しい細菌種がビール汚染菌として突然出現する可能性が想定される。そのような事態が起こった場合、本研究で得られた成果は大いに役に立つものと期待される。



## 引用文献

- 1) 春山行夫, ビール文化史(上), 東京書房社, (1972)
- 2) Jespersen, L., and Jakobsen, M., Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection, *Int. J. Food. Microbiol.*, 33, 139-155, (1996)
- 3) Lee S. Y., Mabee, M. S., and Jangaard, N. O., *Pectinatus*, a new genus of the family *Bacteroidaceae*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28, 582-594, (1978)
- 4) Lee S. Y., Mabee, M. S., Jangaard, N. O., and Horiuchi, E. K., *Pectinatus*, A new genus of bacteria capable of growth in hopped beer, *J. Inst. Brew.*, 86, 28-30, (1980)
- 5) Chelack, B. J., and Ingledew, W. M., Anaerobic gram-negative bacteria in brewing-a review, *ASBC J.*, 45(4), 123-127, (1987)
- 6) Krieg, N. R., Anaerobic gram-negative straight, curved and helical rods. on: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol I. Williams and Wilkins: Baltimore*, 604, 655 and 685, (1984)
- 7) Halander, I. M., Hurme, R., Haikara, A., and Moran A. P., Separation and characterization of two chemically distinct lipopolysaccharaides in two *Pectinatus* species, *J. Bacteriol.* 174(10), 3348-3354, (1992)
- 8) Moore, L. V., Bourne, D. M., and Moore, W. E., Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic gram-negative bacilli, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 338-347, (1994)

- 9) Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., and Farrow, J. A., The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations, 44, 812-826, (1994)
- 10) Schleifer, K. H., Leuteritz, M., and Weiss, N., Ludwig, W., Kirchof, G., and Seidel-Rifer, H., Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: Emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lacticifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov. and *Zymophilus paucivorans* sp. nov., Int. J. Syst. Bacteriol., 40, 19-27, (1990)
- 11) Haikara A., Invasion of anaerobic bacteria into pitching yeast, In European Brewery Convention, Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Congress, Zurich, Switzerland. Oxford University Press, Oxford, UK, 473-480, (1989)
- 12) Haikara, A., Penttila, L., Enari, T.-M., and Lounatmaa, K., Microbiological, biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain, Appl. Environ. Microbiol., 41, 511-517, (1981)
- 13) Haikara, A., Enari, T.-M., and Lounatmaa, K., The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria In: European Brewery Convention, Proceedings of the 18<sup>th</sup> Congress, Copenhagen, Denmark, IRL Press Limited, London, UK, 229-240, (1981)
- 14) Haikara, A., The genera *Pectinatus* and *Megasphaera*, In: Balows, A., Truper, G. H., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (Eds), The Prokaryotes. 2nd

- ed. Springer-Verlag, New York, NY, II, 1993-2004, (1991)
- 15) Bryant, M. P., The characteristics of strains of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents, *J. Bacteriol.*, 72, 162-167, (1956)
- 16) Moore, L. V. H., Johnson, J. L., and Moore, W. E. C., *Selenomonas noxia* sp. nov., *Selenomonas flueggei* sp. nov., *Selenomonas infelix* sp. nov., *Selenomonas diana* sp. nov., and *Selenomonas artemidis* sp. nov., from the human gingival crevice, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36(3), 271-280, (1987)
- 17) Johnson, J. L., Holdeman, L. V., and Moore, W. E. C., Replacement of the type strain of *Selenomonas sputigena* under rule 18g, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35(3), 371-374, (1985)
- 18) Doyle, L. M., McInerney, J. O., Mooney, J., Powell, R., Haikara, A., and Moran, A. P., Sequence of the gene encoding the 16S rRNA of the beer spoilage organism *Megasphaera cerevisiae*, *J. Indust. Microbiol.*, 15, 67-70, (1995)
- 19) Betzl, D., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Identification of Lactococci and Enterococci by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(9), 2927-2929, (1990)
- 20) Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., and Ledoux, O., Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes, *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 501-508, (1991)
- 21) 上保健一, 野崎菜穂子, 橋場炎, 豊田修次, マイクロプレートハイブリダ

- イゼーション法によるヒト糞便由来の*Lactobacillus acidophilus*類縁菌種の同定, SNOW BRAND R&D REPORTS, 191, 209-215, (1994)
- 22)山田より子, 金子嘉信, 見方洪三郎, 発酵研究所に保存されている醸造酵母の同定, JFCC, 6, 66-85, (1990)
- 23)新留亜子, 後藤(山本)奈美, 溝口晴彦, 原昌道, DNA-DNA交雑による火落菌の簡易同定法, 生物工学会誌, 73(1), 27-31, (1995)
- 24)江崎孝行, DNA-DNAハイブリダイゼーション法による菌種の同定, 新しい分類学に伴走する細菌同定法(細菌学技術叢書8), 菜根出版, 98-113, (1987)
- 25)坂崎利一, 新 細菌培地学講座・上, 近代出版 東京, 274-278, (1978)
- 26)Forster, A. C., McInnes, J. L., Skingle, D. C., and Symons, R. H., Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin, Nucl. Acids. Res., 13, 745-761, (1985)
- 27)Wayne, L.G., Brenner, D., J., Colwell, R., R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G., Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics, Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 463-464, (1987)
- 28)宮本豊, 微生物管理, 醸協, 96(7), 455-465, (2001)
- 29)Tholozan, J.-L., Membre, J.-M., and Kubaczka, M., Effects of culture conditions on *Pectinatus cerevisiophilus* and *Pectinatus frisingensis*

- metabolism: a physiological and statistical approach, *J. Appl. Bacteriol.*, 80, 418-424, (1996)
- 30) Watier, D., Lequerinel, I., Hornez, J. P., Chowdhury, I., and Dubourguier, Heat resistance of *Pectinatus* sp., a beer spoilage anaerobic bacterium, *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 164-168, (1995)
- 31) Flahaut, S., Tierny, Y., Watier, D., Hornez, J.-P., Jeanfils, J., Impact of thermal variations on biochemical and physiological traits in *Pectinatus* sp., *Int. J. Food. Microbiol.*, 55, 53-61, (2000)
- 32) Tholozan, J.-L., Membre, J.-M., Grivet, J.-P., Physiology and development of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*, two strict anaerobic beer spoilage bacteria, *Int. J. Food. Microbiol.*, 35, 29-39, (1997)
- 33) Woese, C.R., Bacterial Evolution, *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-271, (1987)
- 34) 駒形和男, 細菌分類学の流れ, 日本微生物生態学会誌, 17(1), 4-11, (2002)
- 35) Stackebrandt, E., Taxonomic note; A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846-849, (1994)
- 36) Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., and Jurtshuk P., How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 166-170, (1992)
- 37) Gurtler, V., and Stanisich, V. A., New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region, *Microbiology*, 142, 3-16,

(1996)

- 38)Nour, M., 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis, Res. Microbiol., 149, 433-448, (1998)
- 39)Graham, T. A., Golsteyn-Thomas, E. J., Thomas, J. E., and Gannon, V. P. J., Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp., Int. J. Syst. Bacteriol., 47(3), 863-869, (1997)
- 40)Ludwig, W., Kirchhof, G., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M., Hertel, C., Jilg, S., Tatzel, R., Zitzelsberger, H., Liebl, S., Hochberger, M., Shah, J., Lane, D., Wallnofer, P. R., and Scheifer, K. H., Complete 23S ribosomal rnn sequences of Gram-positive bacteria with a low G+C content, System. Appl. Microbiol., 15, 487-501, (1992)
- 41)Christensen, H., Jorgensen, K., and Olsen, J. E., Differentiation of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* by length and DNA sequence of the 16S-23S rRNA internal spacer region, Microbiology, 145, 99-105, (1999)
- 42)Goncalves, E. R., and Rosato, Y. B., Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 355-361, (2002)
- 43)Saitou, N., and Nei, M., The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol., 4, 406-425, (1987)
- 44)Harvey, S., Hill, C. W., Squires, C., and Squires, C. L., Loss of the spacer

- loop sequence from the *rrnB* operon in the *Escherichia coli* K-12 subline that bears the *relA1* mutation, J. Bacteriol., 170(3), 1235-1238, (1988)
- 45) Pfeiffer, T., and Hartmann, R. K., Role of the spacer BoxA of *Escherichia coli* ribosomal *rrn* operons in efficient 23S rRNA synthesis in vivo, J. Mol. Biol., 265, 385-393, (1997)
- 46) Morgan, E. A., Antitermination mechanisms in rRNA operons of *Escherichia coli* (minireview), J. Bacteriol., 168(1), 1-5, (1986)
- 47) Berg, K. L., Squires, C., and Squires, C. L., Ribosomal RNA operon anti-termination function of leader and spacer region Box B-Box A sequences and their conservation in diverse micro-organisms, J. Mol. Biol., 209, 345-358, (1989)
- 48) Nagpal, M. L., Fox, K. F., Fox, A., Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interpace regions within a genome and between strains for closely related organisms, J. Microbiol. Methods, 33, 211-219, (1998)
- 49) Luz, S. P., Rodriguez-Valara, F., Lan, R., and Reeves, P. R., Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. J. Bacteriol., 180(8), 2144-2151, (1998)
- 50) Gurtler, V., The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements, Gene, 238, 241-252, (1999)
- 51) Liu, S.-L., and Sanderson, K. E., Homologous recombination between *rrn* operons rearranges the chromosome in host-specialized species of

- Salmonella*, FEMS Microbiol. Lett., 164, 275-281, (1998)
- 52) Soller, R., Hirsch, P., Blohm, D., and Labrenz, M., Differentiation of newly described Antarctic bacterial isolates related to *Roseobacter* species based on 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences, Int. J. Syst. Bacteriol., 50, 909-915, (2000)
- 53) Labrenz, Y., Collins, M. D., Lawson, P. A., Tindall, B. J., Braker, G., and Hirsch, P., *Antarctobacter heliothermus* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho lake, Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1363-1372, (1998)
- 54) Stackebrandt, E., Pohla, H., Kroppenstedt, R., Hippe, H., and Woese, C. R., 16S rRNA analysis of *Sporomusa*, *Selenomonas*, and *Megasphaera*: on the phylogenetic origin of Gram-positive eubacteria, Arch Microbiol., 143, 270-276, (1985)
- 55) Sakamoto, K., Funahashi, W., Yamashita, H., and Eto, M., A reliable method for detection and identification of beer-spoilage bacteria with internal positive control PCR (IPC-PCR), EBC Congress, 631-638, (1997)
- 56) Satokari, R., Juvonen, R., Wright, A. V., and Haikara, A., Detection of *Pectinatus* beer spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction, J. Food Protec., 60(12), 1571-1573, (1997)
- 57) Bruce, J., Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food, Food Technol., 50(1), 77-81, (1996)
- 58) Bruce, J. L., Hubner, R. J., Cole, E. M., McDowell, C. I., and Webster, J. A.,



- Sets of *EcoRI* fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5229-5233, (1995)
- 59) Dalsgaard, A., Esheverria, P., Larsen, J. L., Siebeling, R., Serichantalergs, O., and Huss, H. H., Application of ribotyping for differentiating *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from shrimp farms in Thailand, Appl. Environ. Microbiol., 61, 245-251, (1995)
- 60) Okwumabua, O., Tan, Z., Staats, J., Oberst, R. D., Chengappa, M. M., and Nagaraja, T. G., Ribotyping to differentiate *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* and *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* isolated from bovine ruminal contents and liver abscesses, Appl. Environ. Microbiol., 62(2), 469-472, (1996)
- 61) Rodtong, S., and Tannock, G. W., Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping, Appl. Environ. Microbiol., 59(10), 3480-3484, (1993)
- 62) Skov, M. N., Pedersen, K., and Laesen, J. L., Comparison of pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and plasmid profiling for typing of *Vibrio anguillarum* serovar O1, Appl. Environ. Microbiol., 61(4), 1540-1545, (1995)
- 63) Avery, S. M., Liebana, E., Reid, C.-A., Woodward, M. J., and Buncic, S., Combined use of two genetic fingerprinting methods, pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping, for characterization of *Escherichia coli* O157 isolates from food animals, retail meats, and cases of human disease, J. Clin. Microbiol., 40(8), 2806-2812, (2002)

- 64)Schalch, B., Bader, L., Schau, H.-P., Bergmann, R., Romersch, A., Maydl, G.,  
and Keßler, S., Molecular typing of *Clostridium perfringens* from a  
food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus  
pulsed-field gel electrophoresis, J. Clin. Microbiol., 41(2), 892-895, (2003)
- 65)Back, W., Secondary contaminations in the filling area, Brauwelt Int., 4,  
326-333, (1994)

## 原著論文

Motoyama, Y., Ogata, T., and Sakai, K., Characterization of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *P. frisingensis* by ribotyping, J. Am. Soc. Brew. Chem., 56(1), 19-23, (1998)

Motoyama, Y., and Ogata, T., 16S-23S rDNA spacer of *Pectinatus*, *Selenomonas*, and *Zymophilus* reveal new phylogenetic relationships between these genera, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 883-886, (2000)

Motoyama, Y., and Ogata, T., Detection of *Pectinatus* spp. by PCR using 16S-23S rDNA spacer regions, J. Am. Soc. Brew. Chem., 58, 4-7, (2000)

Motoyama, Y., Funahashi, W. and Ogata, T., Characterization of *Lactobacillus* by ribotyping, J. Am. Soc. Brew. Chem. 58, 1-3, (2000)

## 謝辞

本研究を行うにあたりご指導を賜り、また本論分の取りまとめに際してご教示と御校閲を頂いた東京大学・依田幸司教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に格別のご理解、ご高配を賜りましたアサヒビール株式会社 福地茂雄代表取締役会長兼CEO、同 池田弘一代表取締役社長兼COO、同 江藤正和商品技術開発本部長、同 廣野辰彦非常勤顧問、ニッカウキスキー株式会社中川正人専務に謹んで御礼申し上げます。研究上の貴重なご助言、ご指導と激励を賜りましたアサヒビール株式会社非常勤顧問 藪内精三博士、同未来技術研究所長 池田満雄博士、同法務部特許室長 坂井和久博士、同酒類研究所所長 川面克行氏、同酒類研究所醸造科学部長 加賀美昇氏に深く感謝致します。また、本研究において多くのご支援を頂きましたアサヒビール株式会社 宮本豊氏、八子奈々氏、鈴木康司氏、船橋互氏、坂本幹太博士、八幡和久氏、田中美和氏、飯島和丸氏、佐見学博士、ならびに安原貴臣氏に感謝致します。特に本研究の遂行および本論分執筆に当たり多くのご助言と励ましを頂いた尾形智夫博士に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究に当たり多くのご支援を頂きました、アサヒビール株式会社 研究開発センター・本店・工場の皆様に深く感謝致します。