



主任研究員
高橋 正之

・略歴

2006 年 東北大学理学研究科修士課程修了
2006 年 国税庁 財務技官
2010 年 酒類総合研究所 研究員
2015 年 広島大学 博士（農学）
2016 年～ 酒類総合研究所 主任研究員

近縁比較ゲノム解析を用いた火落菌の生理的特徴の解析

1. 背景・目的

日本の伝統的な酒造りの技術は、日本が誇る文化として世界的にも認められてきており、清酒の輸出額は、10 年前と比較すると 2023 年時点でおおよそ 4 倍に増加している。需要拡大の中であって、品質の担保は国内消費、輸出いずれにおいても重要であるが、輸出に当たっては国内消費と比べ流通期間が長いため、微生物汚染による品質劣化のないよう十分に品質管理しておく必要がある。

酒類における製品の品質保全上非常に重要な微生物として、エタノール存在下で生育可能な乳酸菌が存在する。特に、清酒やワイン、ビールなどの醸造酒においては、Lactobacillaceae 科に属する乳酸菌が汚染を引き起こすことがあり、それらが生産する代謝産物により酸味・苦味の増強や好ましくない香りの発生など製品のおいしさを著しく損なうことが知られている。従って、品質確保の手段としての殺菌条件等については研究・活用されている一方で、基礎的特性については十分理解が進んでおらず、乳酸菌の酒類中での生育（酒類の汚染）に必須の生理的特徴であるエタノール耐性（好エタノール性も含む。）に関しては、分子シャペロン等のストレス応答タンパクの発現増加や、細胞膜や細胞壁の組成や構造・細胞内の抗酸化性などに関する報告があるものの^(1,2)、エタノールへの応答に関して十分説明できる状況には至っていない。エタノール応答機構の解明は品質劣化に係る乳酸菌の耐性獲得に必要な要因の特定とそれに基づく生育管理や殺菌、視点を変えれば有用乳酸菌の育種にも繋がるため、これまで着目されていなかった遺伝子も含め網羅的に解析し、そのメカニズムを明らかにすることは学術上のみならず産業上も重要である。

清酒における汚染乳酸菌としては「火落菌」、「火落性乳酸菌」として複数の種が知られ

ているが、一般的な清酒製品のエタノール濃度である 15%を超える環境で生育可能なものとして主に *Fructilactobacillus fructivorans* と *Lactobacillus acetotolerans* が知られている。これらはいずれも清酒製品の品質劣化を招く注意すべき微生物であり、特に *L. acetotolerans* は 20%を超えるエタノール濃度中で生育する株が報告されている^(3,4)。一方、*L. acetotolerans* にはエタノール耐性が低い株も存在しており、同種内で清酒の汚染の原因となる株とならない株が混在するが、現時点でこのエタノールに対する応答の違いが何に起因するか明らかとなっていない。また、前記 2 種の一部の株は高エタノール濃度下でも生育が可能ではあるものの生育が遅く、汚染が表面化するのに長い時間がかかる。従来から培養法による品質管理も行われているものの、汚染自体の把握に時間を要する場合も多く、出荷までのリードタイムが長くなることや製造施設に汚染源があった場合などは製品や半製品へ汚染が拡大する可能性があることも品質管理上の課題であった。

エタノールへの応答という酒類における品質劣化に必須の生理的特徴を遺伝子レベルで理解することは、酒類のおいしさを汚染乳酸菌から守り、乳酸菌を活用した新たなおいしさを創造するための普遍的な知見となる。本研究では、第 1 にエタノールに対する応答の異なる *L. acetotolerans* 複数株の全ゲノム配列を取得し、どのような遺伝子がエタノール応答に寄与しているか近縁比較ゲノム解析的アプローチにより推定を試みることを、第 2 に構築された全ゲノム配列を基礎データとして活用し、清酒中に存在する汚染乳酸菌の将来的な汚染リスク（そのまま時間が経過した場合に汚染が起こるかどう）について、定量 PCR 等を用いた簡便な評価法を開発することを目的とした。

2. 材料・方法

2.1. *L. acetotolerans* 5 株のゲノム解析とエタノール応答遺伝子の探索

全ゲノム配列未知の *L. acetotolerans* 5 株 (RIB9126, RIB9135, RIB9151, JCM9904, JCM33214) について、PacBio 社 Sequel IIe を用いてゲノムシーケンス解析を実施した。得られたゲノム配列に基づく系統樹推定は Progressive cactus、SANS、PyANI 等のツールを利用し実施した⁽⁵⁻⁷⁾。分岐年代推定は Progressive cactus により作成したアライメント配列に基づいて BEAST2 プログラムを用いて実施した⁽⁸⁾。また、エタノールへの応答性と関連が予想される候補遺伝子は anvi'o、Progressive cactus、SHRS を用いて抽出し^(5,9,10)、候補遺伝子の COG 分類を実施した⁽¹¹⁾。なお、比較対象として使用した株のゲノム配列は NCBI/DDBJ/EMBL のデータベースから取得した。

2.2. 火落菌 *F. fructivorans* 及び *L. acetotolerans* の汚染リスク評価技術開発

F. fructivorans 及び *L. acetotolerans* のゲノム配列を基に、SHRS 法により上記 2 種の複製開始起点 *ori* 及び複製終結点 *ter* を定量可能な加水分解プローブ及び当該領域増幅用

プライマーを設計した。加水分解プローブは *ori* 領域定量用と *ter* 領域定量用の 2 種を *L. acetotolerans* と *F. fructivorans* の共通領域で設計し、増幅用プライマーはそれぞれの種及び領域に特異的となるように *L. acetotolerans ori* 領域用、*L. acetotolerans ter* 領域用、*F. fructivorans ori* 領域用及び *F. fructivorans ter* 領域用の計 4 種類デザインした。種間の交差性検証試験には Lactobacillaceae 科の他種 18 種を用い、検出対象種内における網羅性の検証には酒類総合研究所保有の株を利用した。定量には QIAcuity デジタル PCR システム(QIAGEN)を用いた。培養法による定量には検出までの期間を短縮した改変 SI 培地を使用した。一般化線型モデルは統計解析ソフト R を用いて作成した。

3. 結果と考察

3.1. *L. acetotolerans* 5 株のゲノム解析とエタノール応答遺伝子の探索

初めに今回用いた株の分類学的位置について把握するために、解析した 5 株とデータベース上にゲノム配列が公開されている NBRC13120(=RIB9124)株、及び *Lactobacillus* 属の他 5 種のゲノム配列を用いて系統樹の推定を行った。他種と比較すると非常に近い分類となったが、*L. acetotolerans* の種内ではエタノールに対する応答性の違いでクラスターが形成された。なお、エタノール応答性は NBRC13120、RIB9126、RIB9135 及び RIB9151 で好エタノール性及び高いエタノール耐性を示すが、JCM9904 及び JCM33214 は好エタノール性は示さず、エタノール耐性も高くない。ここで、*Lactobacillus delbrueckii* との分岐を 6,000 万年前として較正点を置いて分岐年代推定を行ったところエタノールへの応答性の違いで形成される株間のノードの分岐は概ね 150 万年以内に起こっていることが示唆された。これは人類が酒類を製造したとされる記録よりもはるかに古く *L. acetotolerans* のエタノール応答性は酒類中での生存に適応するために起こったとは考えづらいことを意味する(図 1)。一方、多くの細菌の平均的な塩基置換速度 10^{-6} /サイト/年を用いて、エタノール

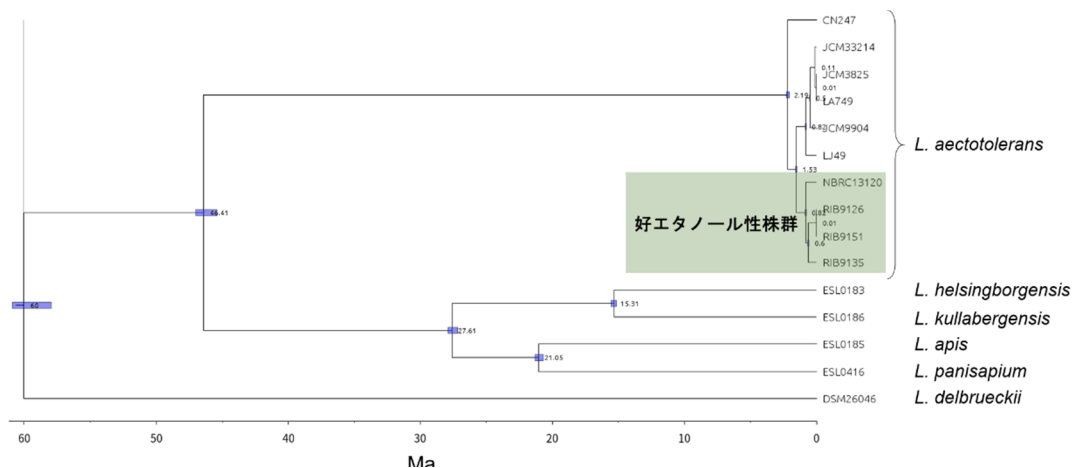


図 1 BEAST2 を用いた分岐年代推定. ノードの青色のバーは 95%最高事後密度信用区間である.

応答性の異なる株間の SNP 数のみを使用して推定すると、約 4,000~10,000 年前に分岐したと推定され、この場合、*L. acetotolerans* の一部の株がアルコールを含有する環境に入り込んだものがエタノール応答性を獲得した可能性も出てくるが、推定年代に大きく幅があるため、より深い議論を行うためにはより詳細な解析が必要である。

次にエタノール応答性に違いのある株のゲノム配列を基に、ゲノム上の挿入・欠失・置換とエタノール応答性に関連性のある遺伝子や領域を抽出した。図2は anvi'o により実施した Pangenome 解析の結果であり、好エタノール性を示す4株では存在し、エタノール耐性の低い2株では存在しない遺伝子を抽出している。置換や小さな挿入、欠失などについても Progressive cactus によるゲノムアライメントや SHRS による解析を用いて同様に抽出した結果、114 遺伝子がエタノールへの応答性に寄与する遺伝子として得られ、そのうちコードするタンパク質の機能ごとに機械的に COG 分類できた 90 遺伝子についてまとめると、図3のようになり、①アミノ酸代謝・取り込みに関する遺伝子、②複製や組換えに関する遺伝子、③転写因子等の遺伝子が影響している可能性が示された。これらの遺伝子については、今後 RNA-seq を用いてエタノールの有無における発現変動を解析していく予定である。

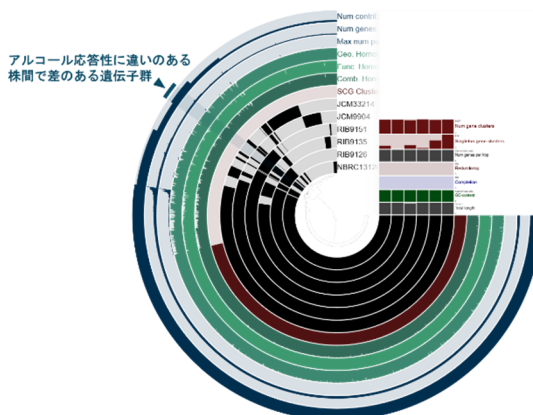


図2 今回ゲノム解析を実施した5株及び公共データベース登録の1株の全ゲノム配列を用いて行った Pangenome 解析の結果。青の矢印で示した部分がアルコール応答性の異なる株間で差のあった遺伝子群である。

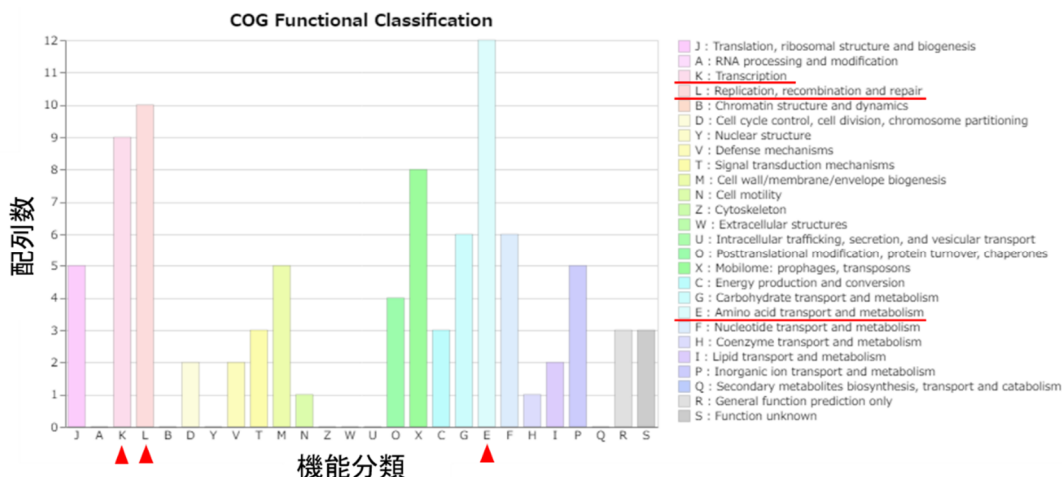


図3 エタノール応答性と塩基配列の間に関連性が示唆された遺伝子。COG による機能分類を行った。赤い矢印は、関連性が予測された遺伝子数が上位3位までのカテゴリを示している。凡例には各カテゴリの機能を記載している。

3.2. 火落菌 *F. fructivorans* 及び *L. acetotolerans* の汚染リスク評価技術開発

細菌のゲノムの複製は複製開始起点 *ori* から双方向に進み複製終結点 *ter* 周辺で止まる。この *ori* 周辺領域と *ter* 周辺領域の比 *ori:ter* 比は、細菌の増殖が早くなるにつれて大きな値をとることが知られている。このことは細菌叢における各細菌の増殖状態をハイスループットシーケンサーで網羅的に解析するバイオインフォマティクスツールなどで利用されている⁽¹²⁾。火落菌は前述の通り *F. fructivorans* 及び *L. acetotolerans* が存在するが、従来の方法では検出することに主眼が置かれており、検出された微生物がその後汚染を引き起こすか否かはほとんど検討されてこなかった。火落菌は生育が遅く、そのことが品質管理上のネックとなっているが、増殖している以上同様の傾向を示すと考えられたことから、*ori:ter* 比から火落菌の増殖状態を予測し、それに基づいて将来的な汚染に繋がるか評価する手法の開発を試みた。まず、前記2種の火落菌のゲノム配列に基づいて定量PCR用のプライマーと加水分解プローブをデザインした。火落菌2種の相互の交差性及び他種との交差性を検証したところ非特異的な増幅は見られず、対象菌種のみ定量が可能であった。また、*ter* 領域周辺は最後に複製が起こることから菌数との相関が高く、菌数の推定に用いることが可能と考えられた。*ori:ter* 比と増殖速度の関連性を解析した結果、*ori:ter* 比が1.5程度の時にその後の増殖速度が最大となる単峰性関数のモデルでフィッティングできた。*ori:ter* 比から予測できる増殖速度と *ter* 領域コピー数から推定できる菌数を説明変数、約1ヶ月後の汚染の有無を目的変数として一般化線型モデルによる回帰を実施したところ、1点での予測では決定係数は0.659となった(図4)。なお、2点サンプリングを行うことでサンプリングポイント間での増殖も説明変数として使用可能になるため、より高い精度での推定が可能であった。さらに、全てのプライマー及びプローブを混合したマルチプレックスPCRによる2菌種2領域の同時定量も可能であり、1回のデジタルPCRにより2種の *ori:ter* 比が同時に決定できる系が構築できたため、サンプリングから最短で1日以内に、概ね1ヶ月以内に火落菌による汚染が起こる確率を予測可能となった。

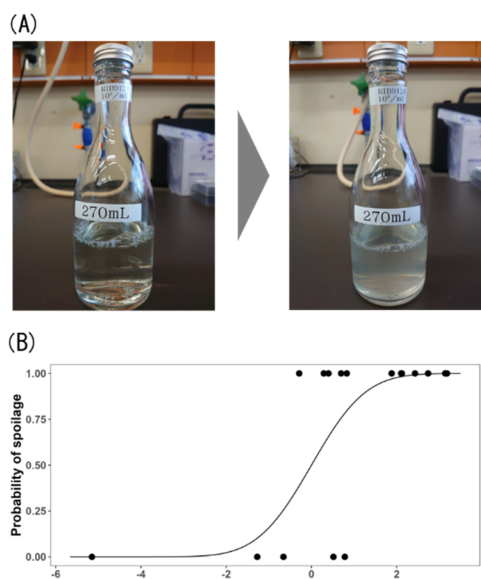


図4 火落菌 *L. acetotolerans* 及び *F. fructivorans* の汚染予測

(A) *L. acetotolerans* RIB 9124 による汚染の一例。10² /mL となるように植菌後、25℃で35日間培養。(B) 今回開発した手法により実験的に得られる指標を利用した汚染確率の回帰モデル。縦軸が将来的な汚染確率を示す。黒丸は実サンプルにおける結果をプロットしたもの。

従来の培養法は初期の菌数にもよるが1週間程度検出までに要し、また、各種検出法に共通することではあるが検出がそのまま将来的な汚染を意味するわけではなかった。通常PCR法による検出系では生死や増殖の有無などを判断することは難しく、これは、*L. acetotolerans*のように同一種内に清酒中で生育可能な株と生育できない株が混在する場合など、検出された微生物が管理しなければならないものか否か判断できないことを意味し、過大な品質管理を取らざるを得ない原因の一つと言える。一方で今回開発した手法によれば、1回のデジタルPCRにより汚染乳酸菌の存在量とその後の汚染リスクが予測できるため、簡易で必要十分な品質管理を行うための基礎的知見になるものと考え、今後はデータを蓄積し、高精度化を目指す予定である。

4. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団並びにご関係の皆様へ心より感謝申し上げます。

5. 引用文献

1. Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, and other 3 authors: Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**(10), 2973-2980 (2014).
2. Yang, X., Teng, K., Zhang, J., and other 6 authors: Transcriptome responses of *Lactobacillus acetotolerans* F28 to a short and long term ethanol stress. *Scientific reports*, **7**(1), 2650 (2017).
3. 百瀬洋夫, 三宅正太郎, 野白喜久雄: 火落ちに関する研究 (第3報), 日本醸造協會雑誌, **65**(11), 999-1002 (1970).
4. 後藤奈美: 火落菌, 増補改訂清酒製造技術, pp. 349-353, 日本醸造協会, 東京 (2009).
5. Armstrong, J., Hickey, G., Diekhans, M., and other 18 authors: Progressive Cactus is a multiple-genome aligner for the thousand-genome era. *Nature*, **587**(7833), 246-251 (2020).
6. Pritchard, L., Glover, R.H., Humphris, S., and other 2 authors: Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Analytical methods*, **8**(1), 12-24 (2016).
7. Rempel, A. and Wittler, R.: SANS serif: alignment-free, whole-genome-based phylogenetic reconstruction. *Bioinformatics*, **37**(24), 4868-4870 (2021).

8. Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., and other 6 authors: BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, **10**(4), e1003537 (2014).
9. Eren, A.M., Kiefl, E., Shaiber, A., and other 31 authors: Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvi'o. *Nature microbiology*, **6**(1), 3–6 (2021).
10. Takahashi, M., Morikawa, K., and Akao, T.: Short-length Homologous Region exhaustive Search algorithm (SHRS): A primer design algorithm for differentiating bacteria at the species, subspecies, or strain level based on a whole genome sequence. *Journal of Microbiological Methods*, **203**, 106605 (2022).
11. Shimoyama, Y.: COGclassifier: A tool for classifying prokaryote protein sequences into COG functional category. (2022).
<https://github.com/moshi4/COGclassifier>
12. Emiola, A. and Oh, J.: High throughput in situ metagenomic measurement of bacterial replication at ultra-low sequencing coverage. *Nature communications*, **9**(1), 4956 (2018).