

## 変敗食品から分離された *Weizmannia coagulans* の系統学的解析

遠田 昌人

### Phylogenetic Analysis of Strains of *Weizmannia coagulans* Isolated from a Case of Food Spoilage.

Atsuhito Enda

Seven strains of *Weizmannia coagulans* isolated from a food spoilage case in Japan in the 1990s were analyzed by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis and WGS (Whole Genome Sequencing) using a next-generation sequencer.

The seven strains were differentiated into four groups by RAPD, and three groups by mapping analysis based on WGS. Although these groupings are not directly related to spore heat resistance, we found that strains with relatively low heat resistance and strains with extremely high heat resistance coexisted among phylogenetically similar strains.

Herein, we show that phylogenetic analyses by these methods can be helpful in evaluating the spore heat resistance of causative isolates of *W. coagulans* in food spoilage.

**Keywords:** spore, heat resistance, spoilage, next-generation sequencer, *Weizmannia coagulans*

*Weizmannia coagulans* (basonym *Bacillus coagulans*)<sup>1)</sup> は常温流通される缶詰, 瓶詰, レトルト食品等の容器包装詰食品の典型的な変敗原因菌である。耐熱性の高い芽胞を形成し, 一部の耐熱性の高い菌株では加圧加熱殺菌後も生残することがあり, 常温で保管, 流通される容器包装詰食品に変敗を引き起こす。

*W. coagulans* は菌株や芽胞形成時の条件によって芽胞の耐熱性が異なり, 菌株間の耐熱性が非常に幅広いことが知られている<sup>2-4)</sup>。120℃程度のレトルト殺菌後も生残しうる極めて耐熱性の高い菌株が存在する一方で, 100℃以下の加熱によっても死滅する菌株も含まれている。

芽胞耐熱性の範囲が広い *W. coagulans* による食品変敗においては芽胞の耐熱性評価が変敗の原因推定に不可欠であり, その結果により, 設定されていた殺菌条件が十分であったか, あるいは殺菌工程上の問題がなかったかを検討するが, 著しく耐熱性が低い場合では二次汚染の可能性も含めて慎重な検討が必要となる。さらに, 原因菌の耐熱性が高く, 設定されていた殺菌条件が不十分であることが推定される場合には変敗防止策として再設定する殺菌条件の算定の根拠となる。

一方, 分離された変敗原因菌株の耐熱性の実際の評価に際しては, 芽胞形成能の喪失や極端な耐熱性低下がしばしば経験される。これらの現象は殺菌工程における加熱による突然変異によるものと推測されるが, 殺菌条件と比較して耐熱性の低い菌株が, 本来十分に耐熱性を備えていた

菌株が耐熱性を損失したのか, あるいは本質的に耐熱性の低い菌株なのかは単純な耐熱性データだけでは判断が難しい。

そこで, 本報においては過去の食品変敗事例より, 分離された推定原因菌株の耐熱性が非常に高く, 原因として殺菌条件の不足が推定されたものの, 分離菌株に耐熱性の低い菌株も含まれていた事例を取り上げ, 分離菌株について RAPD 解析および次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) を用いたゲノムスケール配列解析 (Whole Genome Sequencing: WGS) によって分子系統学的な解析を行った。その結果, 明らかとなった分離菌株群に含まれていた遺伝的な多型性, およびその多型性に基づく分離菌株の遺伝学的系統と耐熱性との関係について報告する。

#### 実験材料および方法

##### (1) 使用菌株

表 1 に示した *W. coagulans* TIFT 115015-TIFT 115021 の 7 菌株を用いた。

これらの菌株は同一の変敗事例において各々別の変敗品よりその原因菌として分離し, 凍結乾燥アンブルとして保存していた検体を復元して用いた。

表 1 使用菌株の分離当時の耐熱性

菌株	温度 (°C)	D (分)
TIFT 115015	120	4.6
TIFT 115016	115	2.6
TIFT 115017	120	1.5
TIFT 115018	120	6.0
TIFT 115019	120	1.9
TIFT 115020	120	7.0
TIFT 115021	120	7.0

## (2) 芽胞耐熱性

*W. coagulans* 7 菌株の分離時における芽胞耐熱性について表 1 に示した。耐熱性評価の方法は以下の通りとした。

最終濃度 50ppm の  $MnSO_4$  を添加した Proteose-peptone Acid Agar (PPAA) 平板培地に種菌を接種、45 °C にて静置培養後、形成した菌体を綿棒にて回収しリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) に懸濁した。PPAA 平板培地は Proteose-peptone NO.3 (Difco) 5 g, Yeast Extract (Difco) 5 g,  $KH_2PO_4$  4 g, Glucose 5 g を 500 mL の脱イオン水に溶解し pH 5.0 に調整したものと寒天 20 g を 500 mL の脱イオン水に溶解したものを別々に滅菌した後、両液を混合、別途滅菌した 5%  $MnSO_4$  水溶液を 1/100 容添加し、平板に固化した。

懸濁液は遠心分離 (14,000 × g, 10 分間) にて集菌し、PBS で 2 回遠心洗浄後、最終的に 50 mL の PBS に懸濁して芽胞懸濁液とした。TDT 試験管 (105 mm × 内径 5 mm, 肉厚 1 mm) に芽胞懸濁液 1 mL ずつを封入してバーナーで熔封、所定の温度の油浴に浸漬して加熱し、所定時間経過後、流水中で冷却、開封して取り出した芽胞懸濁液を PBS で適宜希釈した後、標準寒天培地 (Standard Method Agar: SMA) に混釈して、45 °C で静置培養後、生じたコロニー数から生残菌数を計数して D 値を計算した。

## (3) RAPD

RAPD の方法は牧野<sup>5)</sup>に従って行なった。プライマーは以下の配列の合成オリゴ DNA (Sigma-Aldrich) を用いた。

AP40 CCG-CAG-CCA-A  
 AP41 GCG-ATC-CCC-A  
 AP42 AAC-GCG-CAA-C  
 AP43 GTG-GAT-GCG-A

PCR 反応は ExTaq Mg<sup>2+</sup> free Buffer (TaKaRa) を用

い、25 μL のスケールで行った。反応液組成は以下の通りとした。

10 × ExTaq Buffer	2.5 μL
dNTP Mixture	2.0 μL
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	3.0 μL
Primer (50 mM)	0.4 μL
Template DNA	1.0 μL
ExTaq	0.1 μL
Nuclease Free Water (NFW)	16.1 μL

サーマルサイクラーの増幅プログラムは 94 °C 1 分間 → [94 °C 1 分間 → 38 °C 2 分間 → 72 °C 2 分間] × 40 サイクル → 72 °C 10 分間とし、38 °C から 72 °C への昇温を毎秒 0.2 °C とした。反応液は 2200 TapeStation (Agilent) を用い、D1000 / High Sensitivity kit (Agilent) にて増幅産物を解析した。

## (4) ゲノムスケール塩基配列解析

種菌を SMA 寒天平板に接種し、45 °C で 2 日間静置培養後、滅菌綿棒で菌体を回収し、PBS に懸濁した細胞懸濁液より DNeasy (Qiagen) のグラム陽性菌用プロトコルを用いてトータル DNA を調製した。トータル DNA は断片化、アダプターライゲーションおよびサイズ分取を行って、ライブラリー DNA を調製し、ゲノム DNA の配列解析に供した。ライブラリー DNA 調製には Ion Xpress Plus Fragment Library Kit および Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit および Ion OneTouch 2 を用い、配列解析には Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit および Ion PGM (いずれも ThermoFisher Scientific) を用いた。これらの手順は既報<sup>6)</sup>と同様に行なった。

## 実験結果

### (1) RAPD

4 種類のプライマーを用いた 7 菌株の RAPD の結果を 2200 TapeStation での電気泳動像として図 1 に示した。対照として、TIFT 115018-115021 とは異なる事例にお

いて変敗原因菌として分離された *W. coagulans* TIFT 115001 での電気泳動像を示した。いずれのプライマーにおいても本件での分離菌株 7 菌株は対照菌株とは異なった増幅産物が観察され、また同一の事例から分離された 7 菌株は互いに非常に類似した増幅産物パターンを示していた。この結果から、RAPD により菌株同士が十分に識別可能であること、および 7 菌株が非常に近縁な群であることが示された。

菌株おのおのの増幅産物を詳細に観察すると、異なる

増幅産物あるいは特定の産物の消失が認められた。特にプライマー AP40 では産物パターンより TIFT 115015 1 菌株, TIFT 115016 および TIFT 115017 の 2 菌株, TIFT 115018 および TIFT 115019, TIFT 115021 の 3 菌株, TIFT 115020 1 菌株の 4 パターンに分かれた。これらの菌株のパターンは基本的には同一の菌株とみなせるほど類似してはいたが、ゲノム DNA にわずかな変異が存在することが示唆された。

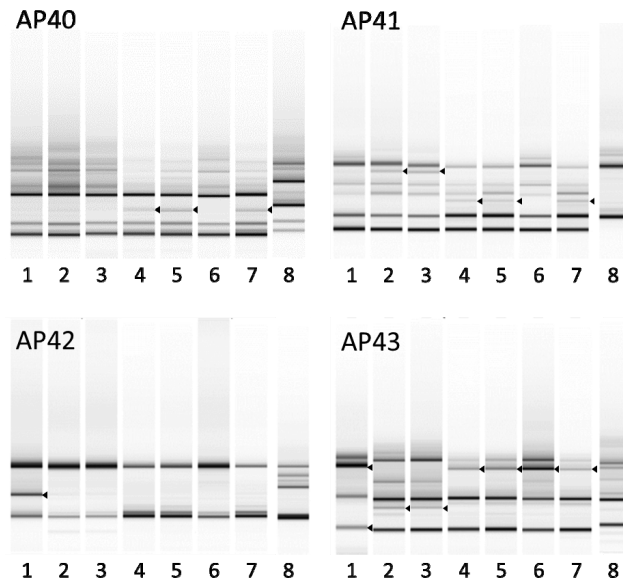


図 1 RAPD 電気泳動像

レーン 1: TIFT 115015, 2: TIFT 115016, 3: TIFT 115017, 4: TIFT 115018,  
5: TIFT 115019, 6: TIFT 115020, 7: TIFT 115021, 8: TIFT 115001.  
層別の弁別点とした増幅産物バンドに◀を記した。

## (2) ゲノムスケール塩基配列解析

7 菌株のゲノムスケール塩基配列を解析し、*W. coagulans* ゲノムデータを参照配列としたマッピングの結果を図 2 に示した。参照配列には NCBI で公開されている *W. coagulans* ゲノムデータのうち、最もゲノムサイズの大きい *W. coagulans* 36D1 株ゲノム (CP003656.1) を選定して用いた。マッピング解析では大域的な遺伝子領域に関してはいずれの菌株も大規模な欠失領域はなく、菌株間で大きな違いは認められなかった。各サンプルの 36D1 株ゲノムに対するカバレッジ (被覆率) は 78.55-78.85% の範囲であった。

マッピング解析結果を詳細に調査したところ、36D1 株との比較においてはゲノム全体におよそ 6,000-10,000 個の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNPs) が散在していた。おのおのの菌株について欠失

している遺伝子を調べたところ、TIFT 115016 および TIFT 115017 の 2 菌株, TIFT 115018-TIFT 115021 の 4 菌株はいずれも保持している遺伝子領域が共通していた。グループ間を比較すると、TIFT115016-115017 のグループは fumarate reductase, L-carnitin dehydrogenase, nucleotide sugar dehydrogenase, type-I restriction-modification systemなどを欠失していた。TIFT 115018-115021 のグループはそれらの遺伝子を保持している一方で、L-rhamnose isomerase, xylulokinase, allophanate hydrolase, RNA-directed DNA polymeraseなどを欠失していた。TIFT 115015 は citrate transporter および機能不明の 1 領域を欠失していた以外はほぼ TIFT 115018-115021 と同一であった。

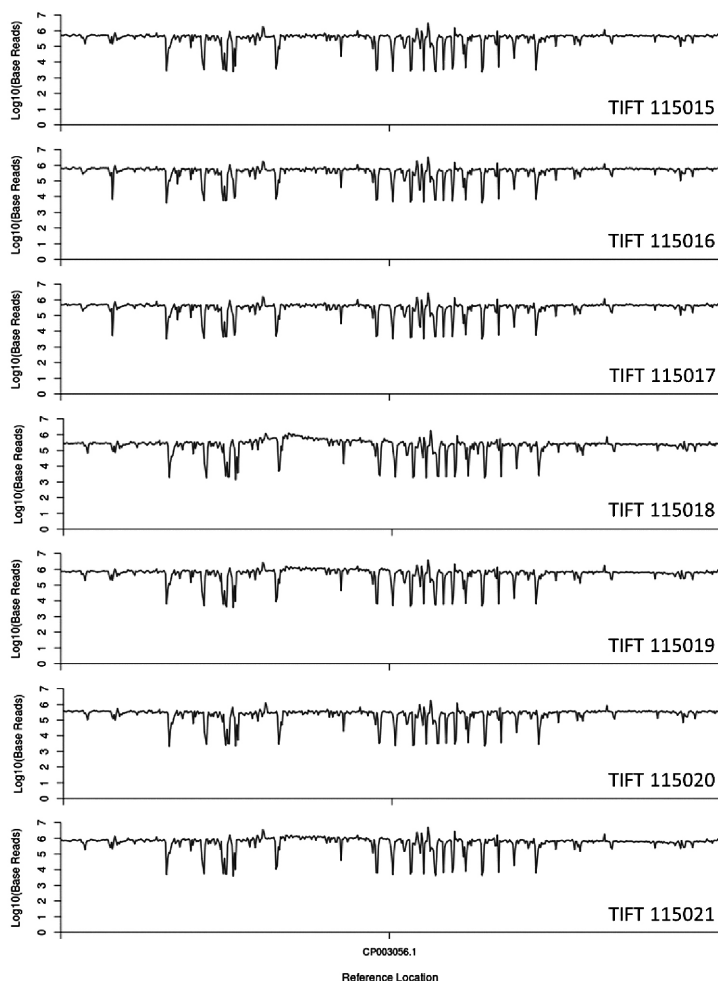


図2 供試菌株のマッピング解析

## 考察

本報で取り上げた食品変敗は1990年代に発生した事例である。多数の変敗サンプルから細菌が分離され、分離された7菌株はいずれも *W. coagulans* と同定され、芽胞の耐熱性を評価したところほとんどの菌株で殺菌条件を超える耐熱性を備えていることが判明し、本件が殺菌不足による変敗であることが推定された。一般に *W. coagulans* の耐熱性は  $D_{120}$  として0.04-3.76(分)<sup>3)</sup> あるいは  $D_{121}$  として0.4-3.0(分)<sup>7)</sup> との報告があるが、ほとんどの菌株の耐熱性は既報よりもかなり高い耐熱性を示し、本件での殺菌条件を大きく超えるものであった。この耐熱性評価により、本件では殺菌前の原料において非常に耐熱性の高い *W. coagulans* の汚染があったものと推測された。

本報で使用した TIFT115018-115021 の菌株はこの事例の際におのおの別々の変敗試料から分離された菌株を単離し、芽胞形成後、その懸濁液を凍結乾燥して4℃で冷蔵保存されていたものである。

変敗原因菌7菌株を用いた RAPD 解析およびゲノムスケール塩基配列解析の結果は、詳細に調査するとわずかに異なる点が見出されたが、基本的にはこれらの菌株がほぼ同一起源みなせる近い系統であることを示した。

NGSによるゲノムスケール配列解析の結果は保持する遺伝子領域のプロファイルから、7菌株には TIFT 115016 および TIFT 115017 の系統と TIFT 115015 の系統、TIFT 115018-115021 の系統の3グループが含まれていることが明らかとなった。TIFT 115016 および TIFT 115017 の系統はもう一方の系統と比較すると芽胞耐熱性が低い傾向であり、特に TIFT 115016 は  $D_{115}$  が2.5(分) ( $z=10$  として換算すると  $D_{120}$  では0.87(分)) と耐熱性が低かった。いずれの系統においても欠失した遺伝子領域には特に芽胞形成に関連する遺伝子は見出されず、耐熱性と保持遺伝子との関連性は明確でなかった。耐熱性の低い TIFT 115016 株については、ごく近縁であった TIFT 115017 は  $D_{120}$  が1.5(分) と平均的な耐熱性を保持していたことから、TIFT 115016 株は加熱殺菌を生

残したものの、高温での加熱による変異などにより元来保持していた耐熱性を喪失したのではないかと推測された。いずれのグループの菌株においても相互に多数の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNPs) が散在しており、芽胞耐熱性にはこれらの SNPs のいずれかが関与している可能性があり、今後 *W. coagulans* の遺伝子の機能解析により、*W. coagulans* 芽胞の耐熱性の変動について明らかにされることが期待される。

RAPD 解析においては、TIFT 115020 がゲノムスケール配列解析では同グループであった TIFT115018, TIFT 115019 および 115021 とわずかに異なる増幅産物パターンを示し、7 菌株は 4 グループに層別されたが、ゲノムスケール配列解析と概ね同様の解析結果が得られた。食品変敗に際してはこれらの解析手法による分離菌株の系統解析は変敗の全体像解明に有効なものと考えられた。

RAPD 解析とゲノムスケール配列解析とを比較すると、現在のところ設備および運用コストの面では、本質的には PCR の変法である RAPD 解析が圧倒的に有利である。RAPD の難点としては、使用する増幅酵素、反応液組成、サーマルサイクラーなどの影響を受けやすく再現性が低いため、データとしての積み上げが困難な点にあるが、ゲノムスケール解析と同等の感度で菌株間の系統解析が可能なが示され、特に結果が急がれる原因調査においてはその場限りの方法ではあるが有効であることが確認された。

一方、ゲノムスケール配列解析のコストや所要時間は徐々に小さくなってきており、将来的には食品変敗の調査に際して、変敗への関与が疑われる細菌について、系統解析だけでなく菌種同定、性状予測などを一括して実施できるようになる可能性がある。

変敗食品の原因調査における耐熱性評価では、突然変異によると考えられる耐熱性の喪失はしばしば経験する現象であり、それを補うためにも可能な限り多数の菌株を用いて行うのが好ましいが、耐熱性検査は手間と時間がかかるため、本報で述べたように系統解析によるグルーピングを利用して縮約し、効率よく実施することが有効であろう。

## 参考文献

- 1) Gupta, R. S. et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**(11), 5753-5798 (2020).
- 2) 中條均紀, 石津弥生: 日食工誌, **32**(10), 725-730 (1985).
- 3) 中條均紀, 森山裕子: 日食工誌, **38**(3), 211-213 (1991).
- 4) 岡崎尚ら: 広島食工技研報, **22**, 35-38 (2000).
- 5) 牧野壮一: モダンメディア, **41**(5), 186-194 (1995).
- 6) 遠田昌人: 東洋食品研究所研究報告書, **31**, 51-55, (2016).
- 7) 芝崎勲: 新・食品殺菌工学, 光琳 (1983).