変敗食品由来の *Thermoanaerobacterium* 属菌の再同定

遠田 昌人

Re-identification of *Thermoanaerobacterium* spp. strains isolated from spoiled packaged foods

Atsuhito Enda

The genus *Thermoanaerobacterium* contains facultative thermophilic and obligate anaerobe spore-forming bacteria. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, also known as *Clostridium thermosaccharolyticum*, is the most common species of *Thermoanaerobacterium* and a typical causal bacterium of the spoilage of bottled beverages and packaged foods.

Re-identification based on 16S rRNA gene sequencing analysis of causal strains isolated in previous spoilage cases revealed these strains belonged to *T. thermosaccharolyticum and T. saccharolyticum*.

Mapping analysis with next-generation sequencing revealed most of the genome deletions were conserved in three strains of *T. thermosaccharolyticum*.

Key words: identification, 16S rRNA gene, heat resistant bacteria, thermophilic bacteria, swelling

目的

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum およびその synonym である *Clostridium thermosaccharolyticum* は，通性好熱性かつ偏性嫌気性の有芽胞細菌であり，容器包装詰製造においては主に大型容器詰食品で殺菌不足や冷却不足（高温放置）を原因として変敗を引き起こす変敗原因菌であることが知られている[1)]．

本菌種による変敗は旺盛なガス産生による容器膨張が特徴で，容器が変形した結果，内容物の漏洩に至ることも少なくない．また有機酸産生も激しく，内容物の pH が著しく低下し，多くは酪酸臭を呈するため，変敗症状から直ちに本菌種による変敗と推測が可能である．そのため本菌種による変敗と推定された過去の事例では必ずしも同定試験が十分でないことが多かった．また *Thermoanaerobacterium* 属については本属と同時に提案された *T. xylanolyticus*，*T. saccharolyticum*，*T. thermosulfurigenes*[2)] 以外にも *T. aoteroense*[3)] などの新しい菌種も提案され，*Thermoanaerobacterium* 属と推測された変敗原因菌の分類学的帰属が定かでなかった．そこで当所においてこれまでに変敗食品より分離，保存している *Thermoanaerobacterium* 属菌の菌株について，コンベンショナルシーケンサーと次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析，および次世代シーケンサーによるゲノムスケール配列解析を行って再同定したので報告する．

実験材料および方法

1．使用菌株

変敗食品より，その原因菌として分離し，凍結保存していた菌株を用いた．詳細については**表 1** に示した．なお TIFT 221008 および TIFT 221009 は同一の事例から分離された菌株である．

表 1　使用菌株

菌株	由来
TIFT 221001	アサリ袋詰
TIFT 221003	マッシュルーム水煮缶詰
TIFT 221004	椎茸水煮缶詰
TIFT 221007	経口栄養食袋詰
TIFT 221008	ココア飲料缶詰
TIFT 221009	

2．16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析

(1) 染色体 DNA の抽出

−80℃にて凍結保存していた各菌株の保存菌液を 7 mL のチオグリコール酸培地Ⅱ（日水製薬）に接種し，流動パラフィンを重層した．55℃で 2 日間静置培養後，変法 GAM 寒天（日水製薬）の平板培地に 100 μL を塗抹した．平板培地はアネロパック・ケンキ高温菌用（スギヤマ

ゲン）を入れたジャーに静置し，55℃で４日間培養した．平板表面から綿棒で菌体を掻き取り，リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline: PBS）1 mL を用いて 6,800 × g で 10 分間，遠心分離して洗浄した．酵素溶解液（20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1.2% Triton-X, 20 mg / ml Lysozyme, pH 8.0）1 mL を加え，菌体を再懸濁して 37℃で 30 分間，溶菌した．溶菌液から DNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen）を用いて DNA を抽出した．

(2) 16S rRNA 遺伝子の PCR

16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析に際して，16S rRNA 領域の増幅には Weisburg ら[4] のユニバーサルプライマー fDl および rP2 を用いた．

増幅酵素には ExTaq（TaKaRa）を用いた．反応スケールは 25μl として，200 μL マイクロチューブに以下の通りに試薬を混合した．

dNTPs（10 mM）	2.0 μL
10 × Ex*Taq* バッファー	2.5 μL
Ex*Taq* DNA ポリメラーゼ	0.05 μL
fD1 プライマー（10 uM）	1.0 μL
rP2 プライマー（10 uM）	1.0 μL
染色体 DNA 抽出液	1.0 μL
Nuclease-free water	17.5 μL

増幅反応は 95℃ 30 s →[95℃ 30 s → 65℃ 30 s → 72℃ 60 s]× 35 サイクル→ 72℃ 5 min のプログラムで行った．反応液の精製には ExoSap-it（Applied BioSystems）を用いて余剰プライマーおよび dNTP の分解を行った．5 μL の PCR 反応液に 2 μL の ExoSap-it を加え，37℃ 15 分間，さらに 85℃で 15 分間の失活処理を行った．

(3) シーケンシング反応

PCR 産物のシーケンシングは CEQ8000 Genetic Analysis System（Beckman Coulter）を用いた．シーケンシングに用いたプライマーは Edwards ら[5] の pA-pH˙を用いた．

シーケンシング反応には DTCS Quick Start Kit（Sciex）を用い，以下の通りに反応液を調製した．

DTCS QuickStart Master Mix	8 μL
DNA テンプレート	10 μL
プライマー（10 pmol/μL）	2 μL

シーケンシング反応のプログラムは 96℃ 20 s → 55℃ 20 s → 60℃ 4 min とし，これを 30 サイクル行った．シーケンシング反応後，反応液は 60 μL の 95%エタノールで 1 回，70%エタノールで 2 回，遠沈洗浄（12,000 × g，15 min，4℃）した後，沈殿を 15 分間，遠心濃縮機 MV-100（トミーメディコ）で乾燥した．沈殿はキット付属の SLS バッファーに溶解し CEQ8000 にロードして，配列解析を行った．

3．ゲノムスケールシーケンシング

(1) ライブラリー DNA の調製

16S rDNA の塩基配列解析と同様に，DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて染色体 DNA を得た．抽出したゲノム DNA は 2 倍量の 70%エタノールおよび 1/10 量の 6 M 酢酸ナトリウムを加え，12,000 × g で 10 分間遠心分離し，上清を捨てた．沈殿は 200 μL の 70%エタノールを加えて遠心分離して上清を捨て，沈殿を 2 回洗浄した．DNA 沈殿は Nuclease-free water（以下，NFW）に溶解して，ゲノム DNA とした．ゲノム DNA より，Ion Xpress Plus Fragment DNA Library Kit を用いて，以下のようにライブラリー DNA を調製した．

(a) ゲノム DNA の断片化

抽出したゲノム DNA は Qubit 2.0 Fluorometer および Qubit DNA HS Assay Kit（Invitrogen）を用いて定量し，各 100 ng をライブラリー DNA 調製に供した．ゲノム DNA は Ion Share Plus を用いて酵素的に断片化した．200 μL のマイクロチューブに下記の通り試薬を加えた．

ゲノム DNA	3 μL
Ion Share Plus × 10 Reaction buffer	5 μL
NFW	32 μL
Shear Plus Enzyme mix	10 μL

ピペッティングにより混合し，37℃で 20 分間，断片化反応を行った．

断片化後の反応液は Agencourt AMpure XP（Beckman Coulter）を用いて DNA を回収し，70%（v/v）エタノールで 2 回洗浄後，25 μL の LowTE 緩衝液で溶出した．

(b) アダプターライゲーション

断片化したゲノム DNA を用いてアダプタ DNA を結合した．以下の通り，試薬を混合し，25℃ 15 min → 72℃ 5 min → 4℃のプログラムでリガーゼ反応を行った．

断片化ゲノム DNA	25 μL
10 × Ligase buffer	10 μL
Adapter DNA	2 μL
dNTP mix	2 μL
NFW	51 μL
DNA Ligase	2 μL
Nick-repair Polymerase	8 μL

ライゲーション反応後は切断反応後と同様に，AMpure XP を用いて精製を行った．

(c) サイズセレクション

断片化およびアダプターライゲーションを行ったゲノム DNA は E-Gel 電気泳動システムを用いておよそ 480 bp の DNA を分取した．2% E-gel size select Ⅱ Agarose gel に，DNA 溶液 20 μL に Sample Loading Buffer 2.5 μL および NFW 2.5 μL を加えて，ウェルにロードし，およそ 18 分間，電気泳動した．ウェルから回収した

25 μL の DNA 溶液は AMpure XP を用いて精製した．

(d) 増幅

サイズセレクションを行った DNA 溶液を用いて，増幅反応を行った．下記の通り，試薬を混合し，98℃ 5 min → [98℃ 15 sec → 58℃ 15 sec → 70℃ 60 sec] × 8 サイクル→ 4℃のプログラムで PCR を行った．

PCR super mix	100 μL
Library amplification primer mix	5 μL
精製ゲノム DNA	25 μL

増幅後の反応液は AMpure XP を用いて精製し，2200 TapeStation（Agilent Technologies）および High Sensitivity D1000 ScreenTape を用いてサイズ分布および濃度を測定した．DNA 濃度が 100 pM となるように NFW で希釈し，ライブラリー DNA とした．

(2) ライブラリー DNA の配列解析

調製したライブラリー DNA を用いて塩基配列解析を行った．解析チップは Ion 318 Chip を用い，シーケンス反応には Ion PGM Hi-Q View OT2 kit および Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit を用いた．

ライブラリー DNA は Ion OneTouch 2.0 システムを用いてエマルジョン PCR を行い，さらに Ion OneTouch ES システムを用いて濃縮処理を行い，テンプレート DNA を調製した．テンプレート DNA は Ion 318 Chip にロードし Ion PGM シーケンサー（ThermoFisher Scientific）を用いてシーケンス反応を行った．

(3) ゲノム DNA の解析

シーケンス反応後，得られたリードデータは Ion PGM 付属のソフトウェアでマッピング解析を行った．参照配列には *T. thermosaccharolyticum* DSM517T のゲノム配列データ NC_014410.1，*T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 ゲノム CP003184.1 および *T. aotearoense* SCUT27 の NZ_CP047602.1 を用いた．

実験結果および考察

1．*Thermoanaerobacterium* 属変敗原因菌株の再同定

Thermoanaerobacterium（*Clostridium*）*thermosaccharolyticum* に代表される *Thermoanaerobacterium* 属細菌は，変敗原因菌としてはかなり古くから知られていた[7]．

芽胞の耐熱性は高く，ボツリヌス菌を対象とした 121℃ 4 分間相当程度の殺菌では制御が困難である．

Thermoanaerobacterium 属菌が問題となる食品は常温流通される低酸性食品で，多くの場合，業務用の大型容器詰で発生しており，冷却不足による高温放置が原因と考えられる．本質的には好熱性菌であり，成育至適温度も 55-62℃と高いが，一部に 30℃でも成育可能な菌株が含まれており，高温条件に比べより緩慢にではあるが小型の常温流通品においても変敗を起こす場合がある[7]．また pH4.6 未満でも成育する耐酸性のグループも含まれており，トマトジュースなどの酸性飲料の殺菌指標菌でもある[8]．

変敗症状の典型は容器膨張と酸敗であるが特にガス産生能が高く，金属缶では不可逆的な変形となるいわゆる“硬膨張”に至り，レトルトパウチの場合では激しい膨張の末，破袋し，ともに内容物が漏洩することも多い．内容物は酪酸臭を呈する場合が多く，独特の変敗症状を示すため，*T. thermosaccharolyticum* による変敗であることが明白であるために，以前は原因菌の詳細な同定が省略されることも少なくなかった．

本報では変敗原因菌となり，簡易的に *C. thermosaccharolyticum* あるいは *Thermoanaerobacterium* 属菌と同定された菌株について，16SrRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて再同定を行った．

16S rRNA の配列解析はコンベンショナルシーケンサー CEQ8000 を用いたダイレクトシーケンシングでの解析結果と，次世代シーケンサー Ion PGM での解析結果を統合して行った．Ion PGM によって得られたリードは *T. thermosaccharolyticum* DSM 571^T のゲノム配列（RefSeq: NC_014410.1）および *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 のゲノム配列（CP003184.1）を参照配列としてマッピングし，16S rRNA 遺伝子の領域の配列を抽出し，CEQ8000 での解析結果と併せて整列して共通配列を得た．得られた共通配列を解析ソフトウェア MEGA X[9] を用いて Maximum Likelihood 法（最尤法）により解析した結果を系統樹として**図 1** に示した．図には比較対象として *T. thermosaccharolyticum* DSM 571^T および *T. saccharolyticum* DSM 7060^T の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を示した．

この結果より，TIFT 221001，TIFT 221004，TIFT 221005，TIFT 221008 および TIFT 221009 は

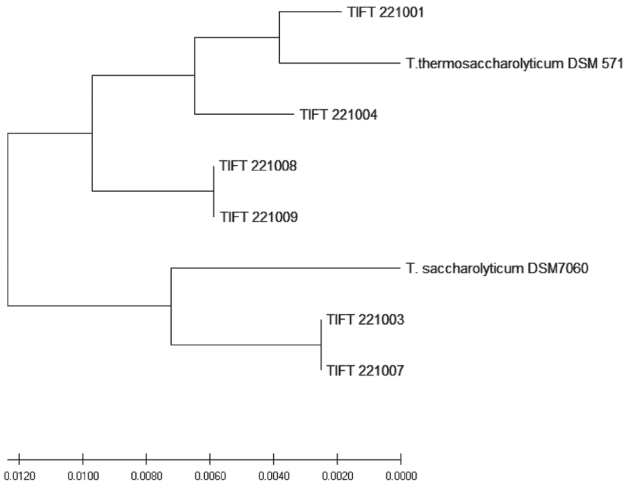

図 1　*Thermoanaerobacterium* 属変敗原因菌株の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統樹

T. thermosaccharolyticum と同定された．また，TIFT 221003 および TIFT 221007 は *T. saccharolyticum* と同定された．このとき 16S rRNA 遺伝子塩基配列において *T. saccharolyticum* ときわめて類似度の高い *T. aotearoense* とは区別できなかった．*T. saccharolyticum* および *T. aotearoense* は有機酸産生においても酢酸および乳酸を産生する点でも似ているが，TIFT 221003 および TIFT 221007 ともに *T. aotearoense* の特徴である好酸性を示さなかったため，*T. aoteroense* ではなく，乳酸を産生する *T. saccharolyticum* と同定することが妥当と考えられた．

同定試験の結果から，容器詰食品において膨張型変敗を起こしている好熱性の嫌気性有芽胞細菌は *T. thermosaccharolyticum* および *T. saccharolyticum* が含まれていることが示された．*Thermoanaerobacterium* 属菌によると思われる変敗は貝類，キノコ類を含む製品での事例が多く，*Thermoanaerobacterium* 属菌による汚染は食品原料の中でもある程度の偏在性があるものと推測される．耐熱性の高い *Thermoanaerobacterium* 属菌により汚染された原料を避けることで製品の安全性を高めることができると考えられるが，その際，遺伝子を標的とした検査系ではこれらの菌種を対象として構築する必要があると考えられた．

2．*Thermoanaerobacterium* 属変敗原因菌株のゲノムスケール塩基配列解析

再同定の結果，変敗食品から分離された *Thermoanaerobacterium* 属の変敗原因菌は *T. thermosaccharolyticum*, および *T. saccharolyticum* と同定された．各供試菌株について調製したゲノム DNA を用いて Ion PGM によりゲノムスケールでの塩基配列を解析した．参照配列については記述の通り，*T. thermosaccharolyticum* については DSM 571^{T}（RefSeq: NC_014410.1），*T. saccharolyticum* については JW/SL-YS485 株のゲノム配列（CP003184.1）を用いてマッピングした．

各菌株における解析結果の概要を**表 2** に示した．*T. saccharolyticum* と同定された TIFT 221003 および TIFT221007 においてもカバレッジは 83%程度と低い結果であったが，*T. thermosaccharolyticum* の 4 菌株，TIFT 221001, TIFT 221004, TIFT 221008 および TIFT 221009 ではさらに低く，79%前後のカバレッジに留まり，いずれの供試菌株も *T. thermosaccharolyticum* DSM 571T とはゲノム構成が大きく異なることを示した．

T. thermosaccharolyticum と同定された TIFT 221001, TIFT 221004, TIFT 221008 の 3 菌株でのマッピングの結果を**図 2** に，*T. saccharolyticum* と同定された TIFT 221003 および TIFT 221007 での結果を**図 3** に示した．縦軸はマッピングされたリード数，横軸はゲノム配列上の位置を示している．供試菌株間のマッピング結果を比較すると，*T. saccharolyticum* の 2 菌株では共通して欠失している遺伝子領域が少なからず存在していたが，ゲノム全体としては類似していなかった．一方で *T. thermosaccharolyticum* の 3 菌株では多くの欠失遺伝子領域が共通しており，ゲノム全体が類似していた．*T. thermosaccharolyticum* での結果は，以前報告した *B. subtilis*[10] および有芽胞乳酸菌 *Sporolactobacillus pectinovorans*[11] 変敗原因菌株での結果と同様であった．*T. thermosaccharolyticum* の参照配列が適切かどうかについてはカバレッジの低さから確かではないものの，*T. thermosaccharolyticum* についてもゲノム上の遺伝子領域の欠失と変敗事故を引き起こす性状との間でなんらかの関連性があるものと考えられる．

表 2　ゲノムスケール配列解析結果

菌株	参照配列	Mapped reads	Mean depth	Coverage%
TIFT 221001	NC_014410.1	612,045	53.95	79.63
TIFT 221003	CP003184.1	934,596	94.81	83.47
TIFT 221004	NC_014410.1	1,048,572	87.90	78.76
TIFT 221007	CP003184.1	773,987	68.13	83.54
TIFT 221008	NC_014410.1	996,452	83.07	79.39
TIFT 221009	NC_014410.1	719,252	61.63	79.76

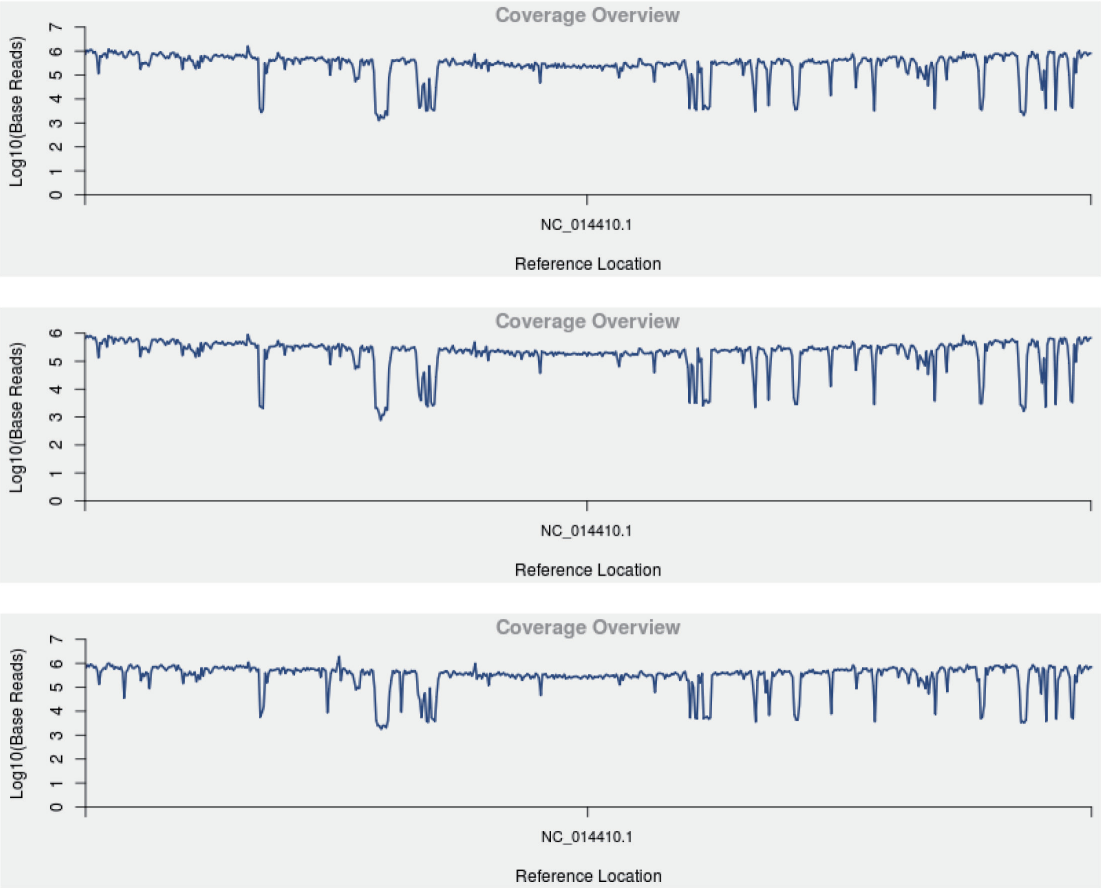

図 2　*T. thermosaccharolyticum* DSM 571^{T} 株ゲノムに対する TIFT 221001, TIFT 221004, および TIFT 221008 のカバレッジ深さの分布

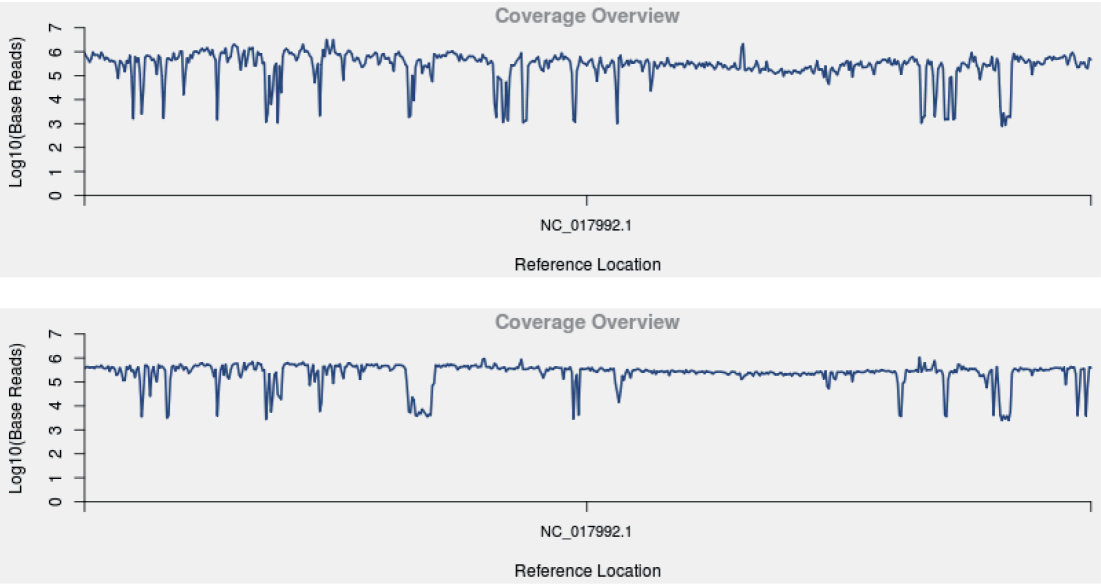

図 3　*T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 株ゲノムに対する TIFT 221003 および TIFT 221007 株のカバレッジ深さの分布

参考文献

1）遠田昌人：「清涼飲料」,「缶詰・レトルト食品」, 微生物殺菌実用データ集, 山本茂貴（監修）, サイエンスフォーラム（2005）

2）Lee, Y-E, *et al*: Taxonomic Distinction of Saccharolytic Thermophilic Anaerobes: Description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; Reclassification of *Thermoanaerobium brockii, Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., Respectively; and Transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus, Int. J. Syst. Bacteriol*., **43**(1), 41–51（1993）

3）Liu, S-Y, *et al*: *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a Slightly Acidophilic, Anaerobic Thermophile Isolated from Various Hot Springs in New Zealand, and Emendation of the Genus *Thermoanaerobacterium*, *Int. J. Syst. Bacteriol*., **46**(2), 388–396（1996）

4）Weisburg, W.G. *et al*: 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, *J. Bacteriol*., **173**(2), 697–703（1991）

5）Edwards, U. *et al*: Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA, *Nucleic Acids Res*., **17**(19): 7843–7853（1989）

6）Hersom, A. C., Hulland, E. D.:「缶詰食品―その微生物学入門―」, 高尾彰一（監訳）, 田中光幸（訳）, 建帛社（1969）

7）松田典彦ら：*Clostridium thermosaccharolyticum* の最低発育温度, 日食工誌, **32**(8), 565–567（1985）

8）長田隆ら：トマトジュースの商業的無菌性を確保する加熱殺菌条件の検討, 日食工誌, **16**(2), 145–152（2015）

9）Kumar, S. *et al*: MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms, *Molecular Biology and Evolution*, **35**, 1547–1549（2018）

10）遠田昌人, *Bacillus subtilis* 耐熱性株のゲノムスケール配列解析, 東洋食品研究所研究報告書, **31**, 51–55（2016）

11）遠田昌人, 変敗食品由来の *Sporolactobacillus* 属菌の再同定, 東洋食品研究所研究報告書, **32**, 51–55（2018）