

変敗食品由来の *Sporolactobacillus* 属菌の再同定

遠田 昌人

Re-identification of *Sporolactobacillus* spp. Strains Isolated from Spoiled Packaged Foods

Atsuhito Enda

Sporolactobacillus is a genus of spore-forming lactic acid bacteria that survive pasteurization, resulting in spoilage of acidic bottled beverages and packaged foods. For many years, *Sporolactobacillus inulinus* was the sole species of the genus *Sporolactobacillus*. Thus, historically, bacterial strains isolated from spoiled food products that displayed the appropriate biochemical characteristics were identified in our laboratory as *S. inulinus*.

However, subsequent re-identification based on 16S rRNA gene sequencing revealed that these strains belonged to several different *Sporolactobacillus* species, including *S. pectinovorans*, *S. putidus*, and *S. spathodeae*, or a closely related groups.

Mapping analysis based on next-generation sequencing data was performed for two strains identified as *S. pectinovorans*. The analysis revealed several common regions of gene deletion in the two strains, which may be related to their food spoilage properties.

Key words: identification, 16S rRNA gene, heat resistant bacteria, spore forming lactic acid bacteria

いわゆる有芽胞乳酸菌として知られる *Sporolactobacillus* 属菌は容器包装詰の酸性食品および飲料において、芽胞細胞が加熱殺菌工程を生残して変敗の原因となる¹⁾. *Sporolactobacillus* 属は分類学的には、“Bergey’s manual of Systematic Bacteriology”²⁾ において *Sporolactobacillus inulinus* のみの1属1種として記載されており、分類学上の記載が乏しいままであった. その後の遺伝子に基づく分子系統学の発展により、2009年の“Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Second Edition”³⁾ においては、*Sporolactobacillus* は *S. inulinus* の他に *S. kaffiense*, *S. lactis*, *S. lactosus*, *S. laevolactics*, *S. nakayamae* subsp. *nakayamae*, *S. nakayamae* subsp. *racemicus*, および *S. terrae* の6分類群が追加して記載されている. また、その他にも *S. dextrus*, *S. pectinovorans*, *S. putidus*, *S. shoreae*, *S. shoreicorticis*, *S. spathodeae*, および *S. vineae* が新種として提案されている.

本報においては、当所で過去に変敗食品より原因菌として分離され、その性状から便宜的に *S. inulinus* として同定された菌株について、染色体DNAの16S rRNA遺伝子領域の塩基配列解析に基づき再同定を試みた. また再同定の結果、*S. pectinovorans* として同定された菌株については次世代シーケンサーを用いたマッピング解析を行い、保有遺伝子の概況を調査したので報告する.

実験材料および方法

1. 使用菌株

本研究においては、変敗食品あるいは飲料より、変敗事故原因菌として分離し、保存していた菌株を用いた. それらの由来については表1に示した.

2. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析

(1) 染色体DNAの抽出

各菌株の種培養液を標準寒天培地 (Standard Method Agar : SMA) 平板に塗抹し、アネロパック・微好気 (スギヤマゲン) を入れたジャーに静置し、35℃で1晩培養した. 平板表面から掻き取って得られた菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) 1 mL を

表1 使用菌株

菌株	由来
TIFT 141001	みかん缶詰
TIFT 141003	みかん缶詰
TIFT 141004	みかん缶詰
TIFT 141005	デザート缶詰
TIFT 141007	微炭酸飲料 (500mL PET)
TIFT 141008	微炭酸飲料 (500mL PET)
TIFT 141009	みかん缶詰
TIFT 142001	デザート類 (18L 缶)

用いて 4,000 rpm 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 リゾチーム, pH 8.0) 1 mL を加え, 菌体を再懸濁した。37℃ で 1 時間静置した。DNA 抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いた。懸濁液に Proteinase K 25 µL と DNeasy 付属の AL バッファーを加え, 56℃ 30 分間静置した。懸濁液を抽出カラムに加えて, 洗浄バッファーで 2 回, カラムを洗浄し, 溶出バッファー 200 µL で溶出し, DNA 溶液とした。

(2) 16S rRNA 遺伝子領域の 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 et al. のユニバーサルプライマー (上流側 fDl: CCG-AAT-TCG-TCG-ACA-ACA-GAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TCA-G および 下流側 rP2: CCC-GGG-ATC-CAA-GCT-TAC-GGC-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T) を用いた。

増幅酵素には ExTaq (TaKaRa) を用いた。反応スケールは 50 µl 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)	4.0 µL
10 × ExTaq バッファー	5 µL
ExTaq DNA ポリメラーゼ	0.1 µL
fD1 プライマー (10 µM)	2.0 µL
rP2 プライマー (10 µM)	2.0 µL
染色体 DNA 抽出液	2.0 µL
滅菌水	35 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 5 µL に 2 µL の ExoSap-it (Applied BioSystems) を加え, 37℃ 15 分間反応させ, さらに 85℃ で 15 分間の失活処理を行って余剰のプライマーおよび dNTP を分解した。

(3) シークエンス反応

PCR 産物のシークエンシングは CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) を用いた。シークエンシングに用いたプライマーは Edwards *et al.* の pA: AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG および pC: CCC-ACT-GCT-GCC-TCC-CGT-AG を用いた。

シークエンシング反応には 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

シークエ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。シークエンシング反応後, 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, バキュームドライヤーで処理して乾燥し, 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クエンシング

(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 (Qiagen) 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 (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 x10 Reaction buffer	5 µL
NFW	32 µL
Shear Plus Enzyme mix	10 µL

ピペティングにより混合し, 37℃ で 20 分間, 切断反応を行った。

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, 配列解析を 400 塩基スケールで行うため, 480 塩基近傍のサイズの DNA を E-gel size select Agarose gel を用いて分取した。2% の size-select agar を用いて, DNA 溶液 15 µL をウェルにロードし, およそ 20 分間, 電気泳動

した。泳動を続け、ラダー DNA の 500 bp のバンドが回収ウェルに差しかったタイミングで泳動を停止し、回収ウェルから DNA 溶液を採取し、さらに 25 μ L の NFW を回収ウェルに加えて、ウェルを洗浄、回収した。採取した 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 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ [98 $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ 70 $^{\circ}$ C 60 sec] $\times$ 8 サイクル $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C のプログラムで PCR を行った。

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

増幅後の反応液は AMpure XP を用いて精製し、TapeStation 2200 (Agilent Technologies) を用いてサイズ分布および濃度を測定した。増幅後の 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 316 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 316 Chip にロードし Ion PGM 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

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 *S. pectinovorans* 基準株 GD201205^T のゲノム配列データである NR_152679.1⁴⁾ を用いた。

実験結果および考察

1. 有芽胞乳酸菌変敗原因菌株の再同定

有芽胞乳酸菌は以前からよく知られた容器包装詰食品の変敗原因菌である⁵⁾。変敗事故が起きる製品がみかんシラップ漬缶詰や PET ボトル詰メロンソーダなど限られた製品であること、変敗症状ではガス産生にともなう容器膨張や発泡、クエン酸の減少による pH 上昇と特徴的であること、また、変敗品の微生物検査においても、寒天平板では生育が乏しく、pE-2 培地のような微好気的条件下のみ生育が認められ、判定が容易であることから、食品の変敗原因菌としては詳細な検討がなされていない分類群であると言える。

当所においても、有芽胞乳酸菌が疑われるケースでの原因菌同定試験はかならずしも詳細に行われておらず、変敗内容物の有機酸組成分析等により原因を推定していた経緯がある。

そこで、これまで変敗食品から分離し、保存していた菌株について、同定手法としては現在の主流である 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行って、再同定を試みた。各菌株の 16S rRNA 遺伝子について 5' 側の 330 塩基の配列を解析し、解析ソフトウェア MEGA7⁶⁾ を用いて、配列データを整理、非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean : UPGMA) により計算した結果を系統樹として図 1 に示した。Outgroup として *Bacillus subtilis* 168 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (NR_102783.2) を用いた。

TIFT 141001 および TIFT 141009 株は *S. pectinovorans*⁷⁾ と配列類似性が高く、*S. pectinovorans* GD201205 株

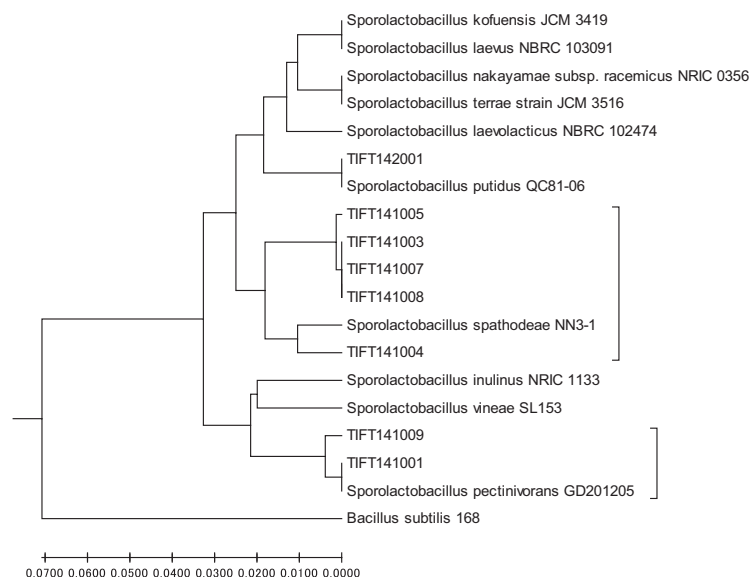


図 1 *Sporolactobacillus* spp. 変敗原因菌株の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統樹

(NR_152679.1) との比較で各々 100% および 99% 一致した, また, TIFT 142001 株は *S. putidus*⁸⁾ と類似しており, *S. putidus* QC81-06 株 (NR_1127741) と 100% 一致した. これらの菌種として同定するのが妥当と考えられた. *S. pectinovorans* はゼリーの変敗品から, また *S. putidus* はオレンジジュースの変敗品より分離されたものである.

一方, TIFT 141003, TIFT 141004, TIFT 141005, TIFT 141007 および TIFT 141008 の 5 菌株は *S. spathodeae* と類似してはいたが, やや離れた一群であることが示された. *S. spathodeae* はカエンボク (African Tulip; *Spathodea campanulata* P. Beauv.) の根より分離されている. *S. spathodeae* NN3-1 株 (LC062597.1) との一致度は TIFT 141004 株で 98%, その他の 4 菌株では 97% に留まった.

これらの結果から, 従前から容器詰食品において変敗を起こしている原因菌は *S. pectinovorans*, *S. putida*, および *S. spathodeae* に類似した一群の 3 グループを含むことが示された. 有芽胞乳酸菌による変敗防止を勘案する場合, 原料である砂糖の一次汚染が問題となるが, 汚染原料検査のために, PCR など, 遺伝子を対象とした特異性の高い試験法を構築する場合は, 上述の 3 グループを個別に, あるいは包含して一括に, 検出対象として含める必要があると考えられた.

2. 有芽胞乳酸菌変敗原因菌株のゲノムスケール塩基配列解析

変敗品から分離された *Sporolactobacillus* 属菌は再同定の結果, *S. pectinovorans*, *S. putida*, および *S. spathodeae* ないしはその近縁グループと同定されたが, これらのうち, ゲノム配列データが公開されているのは *S. pectinovorans* のみであった. そこで *S. pectinovorans* と同定された TIFT 14001 および TIFT 141009 の 2 菌株について, Ion PGM システムを用いたゲノムスケールでの配列解析を行った.

TIFT 141001 では 525,879 リード, TIFT 141009 では 666,097 リードの配列が解析された. *S. pectinovorans* 基準株 GD201205^T のゲノムデータ (NZ_NX01000001.1) を参照配列としてマッピングした. このとき, カバレッジ深さの平均は TIFT 141001 では 36.12x, TIFT 141009 では 42.15x が得られた.

マッピング解析の結果を横軸に直線として展開した基準株 GD201205 ゲノムに対してマッピングされたリード数の対数をプロットして示した (図 2). GD201205 ゲノムと比較して, TIFT 141001 および TIFT 141009 株では, マッピングリード数が落ち込んでいる領域, すなわち欠失領域が非常に類似していた. とともに, およそ 1,360–1430 kb, 2,810–2,880 kb に大規模な欠失領域があり, さらに 3,530–3,760 kb に多くの欠失領域が存在していた.

筆者は以前, *B. subtilis* の変敗事故原因菌のグループにおいて, 基準株ゲノムとの比較で大規模な欠失領域があることを報告したが⁹⁾, 有芽胞乳酸菌 *S. pectinovorans* についても同様の現象が見出された.

TIFT 141001 および TIFT 141009 株との間で, 欠失遺伝子領域が非常に類似している現象の原因として, 単純に, 系統的に近い菌株同士であると考えられることができるが, TIFT 141001 および TIFT 141009 株はともに変敗したみかん缶詰から分離されているものの, 製造者は異なっている. 分離された時期では TIFT 141001 株は 1978 年, TIFT 141009 株は 1995 年と 17 年間のギャップがあり, 原料の製造工程においてもこれほど長期間に渡って同系統の菌株汚染が継続していたとは考えにくい.

一方で, 単純な系統的類似ではなく, 遺伝子欠失によって生じる機能の関与を考えると, *S. pectinovorans* を含む有芽胞乳酸菌が変敗を起こす要因としては, その芽胞耐熱性だけでなく, 芽胞の耐酸性, 低 pH 環境における増殖性などが関係するが, これらの変敗発生を促進するなんらかの

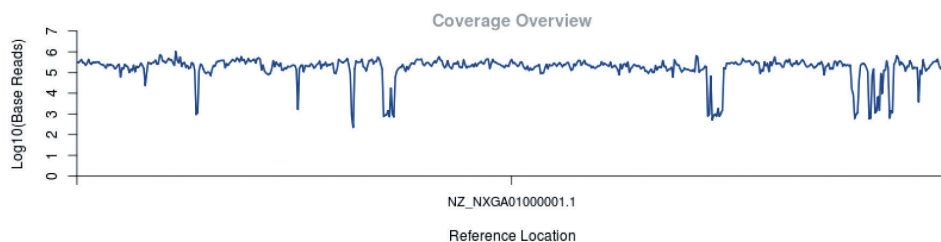


図 2 *S. pectinovorans* GD201205^T 株ゲノムに対する TIFT 141001 のカバレッジ深さの分布

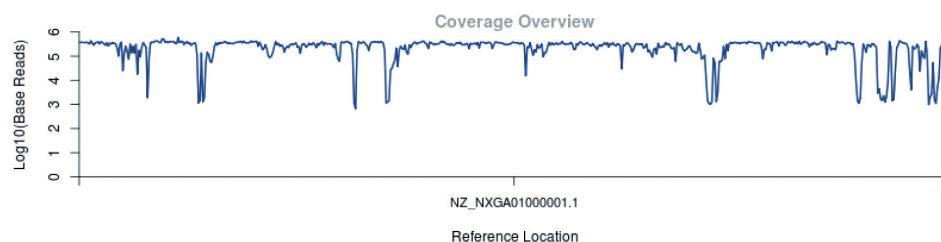


図 2 *S. pectinovorans* GD201205^T 株ゲノムに対する TIFT 141009 のカバレッジ深さの分布

性状が、分離株同士の染色体上の遺伝子の欠失と関連性があるとするのが妥当なものと考えられる。

本報では、解析に利用できたゲノムデータが *S. pectinovorans* のみであったが、他の *Sporolactobacillus* 属菌についても、ゲノムデータが蓄積していけば、保持あるいは欠失している遺伝子のプロファイルと有芽胞乳酸菌による変敗発生との関連性が解明され、変敗発生機構がより詳細に明らかになることで変敗事故発生防止に寄与するものと考えられた。

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) Sneath, P.H.A. *et al.* (editors): Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two, Section 13; Endospore-forming gram-positive Rods and Cocci, Williams & Wilkins (1986)
- 3) Paul De Vos *et al.* (editors): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Three, The Firmicutes, Springer (2009)
- 4) Lan, Q. X. *et al.*: Genome sequence and annotation of *Sporolactobacillus pectinovorans* GD201205^T, a lactic acid-producing bacterium, *Annals of Microbiology*, **68**(3), 159–162 (2018)
- 5) 池上義昭ら：有芽胞乳酸菌によるみかん缶詰の変敗について，東洋食品研究所研究報告書, **16**, 84–92 (1985)
- 6) Kumar, S. *et al.*: MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0, *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 1870–1874 (2016)
- 7) Lan, Q. X. *et al.*: *Sporolactobacillus pectinovorans* sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from spoiled jelly, *Int J Syst Evol Microbiol*, **66**(11), 4323–4328 (2016)
- 8) Fujita, R. *et al.*: *Sporolactobacillus putidus* sp. nov., an endospore-forming lactic acid bacterium isolated from spoiled orange juice, *Int J Syst Evol Microbiol*, **60**(Pt 7), 1499–1503 (2009)
- 9) 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)