

日本酒に含まれる細菌DNA

寺崎 桃香・高橋裕里香・西田 洋巳

(工学部生物工学科)

日本酒に含まれるDNAを濃縮・精製し、広範な細菌を検出できるプライマーを用いて、定量PCRを行った。日本酒の開封と同時にサンプリングを行った9つのサンプル、および開封後1年間冷蔵庫に保管しているサンプル（サンプル0）を使用した結果、細菌DNAの量は、開封直後の9サンプルにおいてはほぼ一定であったが、サンプル0については、開封直後のものより約32倍多かった。そこで、サンプル0を含む5つのサンプルについて大量並列DNAシーケンスを行って、細菌の菌叢を解析した。その結果、サンプル0だけに*Lactobacillus fructivorans*の塩基配列を検出した（サンプル0全体の55%）。これは、日本酒に（おそらく開封後に）火落ち菌が混入し、増殖したことを示している。また、菌叢解析の結果、開封直後の日本酒に含まれる細菌DNA量は一定であるにもかかわらず、サンプル間における細菌菌叢は極めて多様であることが明らかになった。

キーワード：細菌、日本酒、DNA定量、DNAシーケンス、火落ち

1. はじめに

日本酒の中には、様々な化合物が存在している。例えば、18%程度入っているアルコールの大半は、酒造りの過程において清酒酵母が糖を発酵してつくったものであるが、酒の種類によっては、アルコールが添加される場合がある。アルコール分子に違いがないため、添加したものを見分けることはできない（実際には、C4植物であるサトウキビ由来のアルコールを添加した場合、C3植物である米とは炭素の同位体量比が違っているため、添加の有無は識別できるようなものである）。他方、（高分子）化合物であるDNAは、構成成分である塩基の並び方（配列）が生物種によって異なっていることより、塩基配列の違いに基づき見分けることができる。

日本酒は並行複発酵によって造られる。すなわち、原料である酒米を麹菌が糖化し、その糖を清酒酵母がアルコール発酵する。この糖化と発酵が並行に行われる。よって、酒造りには、酒米、麹菌、清酒酵母が使われており、最終産物である日本酒の中に、それらのDNAが含まれる。実際、日本酒のDNA中の酒米DNAのPCRによる原料米品種の判別が行われている（大坪と中村, 2007）。

基本的な酒造りの方法は酒造会社によって異なっても共通である。他方、製造地域と関連性が強い水を使用していたり、それぞれの酒蔵に繁殖している微生物群相が違っていたり、酒造会社や日本酒が造られる地域によって異なる点も多々存在している。

多くの酒造りはオープンな環境で行われており、原料以外の微生物が混入することが一般的である。そこで、多くの細菌に共通にコードされている遺伝情報のDNA塩基配列に基づくプライマーを用いて、日本酒に含まれる細菌のDNAを定量した。また、PCRで増幅した

DNAの塩基配列を網羅的に決定し、それらの塩基配列から細菌の菌叢を解析した。

2. 実験に用いた日本酒サンプル

表1に示した酒造会社7社が製造した10種の日本酒を実験に用いた。サンプル0については、90 mLよりDNAをAmicon Ultra 15 遠心式フィルターユニット（メルクミリオア社）を用いた限外ろ過により濃縮し、NucleoSpin gDNA Clean-up（マッハライ・ナーゲル社）を用いて精製した（濃縮率は360倍）。その他の日本酒サンプルは開封直後に各30 mLを取り、それらより、DNAを濃縮・精製した（濃縮率は150～300倍）。

表1. 実験に用いた日本酒

サンプル	酒造会社	製造年月	酒米	精米歩合	加熱処理	炭ろ過
0	富山A	2015.3	雄山錦	60%	2回	あり
1	富山B	2016.5	雄町	50%	1回	なし
2	富山A	2016.6	不明	70%	1回	あり
3	富山A	2016.6	山田錦	55%	2回	あり
4	富山C	2016.6	山田錦、五百万石	55%	0回	不明
5	名古屋D	2016.8	山田錦	50%	2回	あり
6	盛岡E	2016.8	山田錦、吟ぎんが	50%	2回	あり
7	秋田F	2016.3	秋田酒こまち	50%	2回	あり
8	飛騨G	2016.8	飛騨ほまれ	55%	2回	あり
9	富山A	2016.10	雄山錦	60%	1回	あり

3. 定量PCR

濃縮・精製したDNAサンプルを2 μ L使用して、定量PCRを行った。プライマーについては、Corless et al. (2000) で用いられたものを使用した。その配列は、5'-CCATGAAGTCGGAATCGCTAG-3' および 5'-ACTCCCATGGTGTGACGG-3' である。

定量PCRの条件は、95 $^{\circ}$ Cで10分間の後、95 $^{\circ}$ Cで10秒・55 $^{\circ}$ Cで10秒・72 $^{\circ}$ Cで15秒を45サイクル、LightCycler Nano (ロッシュ社) を用いて行った。定量PCRは同一サンプルに対して、複数回行った。

4. DNAシーケンス

イルミナ社のプロトコル (Part # 15044223 Rev. B) に従って、サンプル0~4の濃縮・精製したDNAより、バクテリアの16S rRNA遺伝子 (V3V4領域、約460塩基) をPCRで増幅し、大量並列型シーケンサーMiSeq (イルミナ社) による塩基配列決定 (300塩基 \times 2、ペアエンド) を行った。シーケンスデータの連結・クオリティフィルタリング・キメラ除去をQIIME (バージョン1.9.0、Quantitative Insights into Microbial Ecology、www.qiime.org) を用いて行い、OTU解析に基づく α 多様性によって各サンプル内の菌叢を十分に解析できるリード数を求めた。次に、各サンプルで無作為抽出したリードについて、Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>) のバクテリア16S rRNAデータベース (バージョン11.5、2016年9月公開) に対して類似塩基配列検索Blastnを行った。

5. 結果と考察

図1に定量PCRの結果を示す。開封後1年経過したサンプル (サンプル0) におけるCq値は21程度であり、開封直後の9つのサンプル (サンプル1から9) のCq値は26から27の範囲に収まっていた。Cq値とは、PCRにおいて、DNAの増幅を検出できたサイクル数を示しており、Cq値が低いほどDNAの濃度が高いことを示す。また、Cq値の差がnである場合、DNAの濃度は2ⁿ倍となる。よって、開封後1年経過したサンプルにおけるバクテリアDNAの量は開封直後に比べ、約32 (2⁵) 倍多いことを示している。

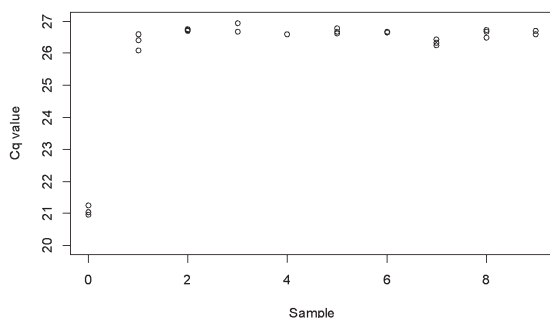


図1. 定量PCRの結果

大量並列DNAシーケンスの結果、208788 (サンプル0)、366673 (サンプル1)、208574 (サンプル2)、135382 (サンプル3)、117138 (サンプル4) のリード数を得た。そのシーケンスの中から無作為抽出した各々5000の塩基配列に基づく菌叢解析の結果より、サンプル0の特徴として、約55%のバクテリアが*Lactobacillus fructivorans*に近い塩基配列であった (図2)。この塩基配列は、ほかの4サンプルにはない。*L. fructivorans*は酒の腐敗でよく知られる火落ちの原因菌であることより、サンプル0は開封後に火落ち菌が混入し、それが日本酒中において増殖したと考えられる (サンプル0を飲んだところ、とても不味くなっていった)。火落ち菌の最適生育温度は30 $^{\circ}$ Cであるが、低温貯蔵していても火落ちすることもある (野白と百瀬, 1970)。

他方、興味深いことには、日本酒に含まれるバクテリアのDNA量はほぼ一定であるにもかかわらず (図1)、それらのDNAを持っているバクテリアの生物種は極めて多様であった (図2)。また、サンプル0、2、3は同じ酒造会社 (富山A) であり、同じ酒蔵で製造された日本酒であるにもかかわらず (ただ、日本酒の種類は違っている、表1参照)、それらのバクテリア菌叢は違っていた (図2)。特にサンプル3は大きく菌叢が異なっていた (図2) よって、酒蔵に特有のバクテリアが製造工程において規則的に混入しているとは考え難い。

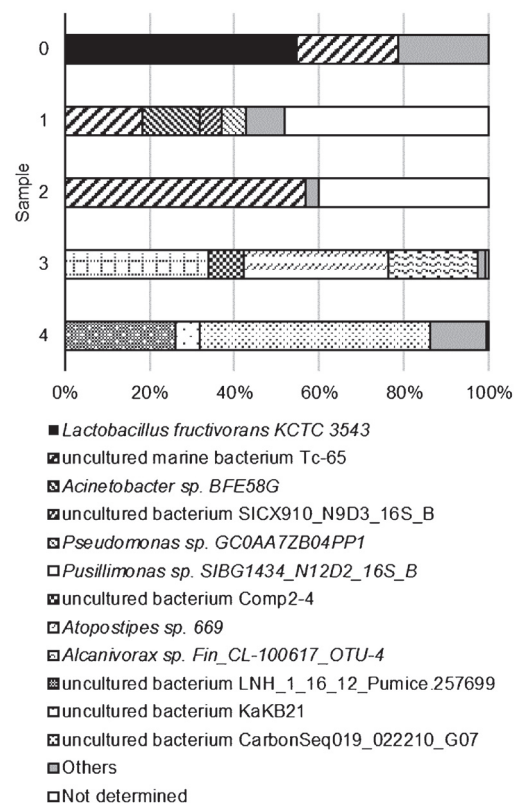


図2. バクテリア菌叢解析の結果

酒造りにおいては、バクテリア等の微生物の混入に注意を払っており、腐敗が生じる危険があるものの製造は中止しているはずである。よって、日本酒として販売されているものは、その基準をパスしている。すなわち、酒造りの過程において、バクテリアの増殖は制限されており、このことが、バクテリアのDNA量が、異なる日本酒においても一定量になっている要因であると考えられる。

6. おわりに

酒造りは日本の伝統文化であり、日本はこの伝統文化を守り、継承する義務があると考えている。日本酒に含まれるバクテリアのDNAを解析する研究は、これまでにない新しいものであり、その解析が日本酒の伝統文化の維持および発展に寄与できるようにしたい。

他方、日本の文化である日本酒を直接に実験で使用することに、日本酒愛好家として、抵抗を感じることも事実である。そこで、酒粕からDNAを得ることを考えており、その有効性について検証する予定である。

謝辞

「日本酒に含まれるDNAの網羅的シーケンスに基づく

製造過程のモニタリング」(共同研究先:成政酒造株式会社)の研究課題に対し、平成28年度産学官連携研究費を本学よりいただいています。ここに深く感謝いたします。この論文報告は、その予備実験の結果を報告いたしました。成政酒造の山田雅人さんからは貴重なコメントをいただきました。深く感謝いたします。また、定量PCR実験において、本学生物工学科3年生の福山明香利さんに手伝っていただきました。深く感謝いたします。

引用文献

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ (2000) Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1747-1752.

大坪研一, 中村澄子 (2007) 日本酒を試料として原料米品種を判別する技術の開発. *日本醸造協会誌*, 102, 792-801.

野白喜久雄, 百瀬洋夫 (1970) 火落菌について. *日本醸造協会誌*, 65, 88-91.

Bacterial DNAs included in Japanese rice wine, sake

Momoka Terasaki, Yurika Takahashi, Hiromi Nishida

Department of Biotechnology

DNAs included in Japanese rice wine (sake, nihonshu) were concentrated and purified. From the DNAs, bacterial DNAs were amplified and quantified using the PCR primers to detect broad bacterial species. As the results, although the C_q values of the fresh sakes (samples 1 to 9) were approximately 26, that of the sake (sample 0) that was opened one year ago was approximately 21, indicating that the bacterial DNA concentration of sample 0 is 32 times higher than those of samples 1 to 9. The massively parallel DNA sequence analysis showed that sample 0 included *Lactobacillus fructivorans* as the most dominant (55%), indicating that sample 0 became putrid due to *L. fructivorans* (Hiochi). In addition, the analysis showed that although the bacterial DNA concentration was similar among different fresh sakes, the bacterial species variation was extensive.

Keywords: bacteria, Japanese rice wine, DNA quantification, DNA sequence, Hiochi (a putrefaction of sake)