

論文審査報告書

氏名	てらさき ももか 寺崎 桃香
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博生第31号
学位授与日	令和3年3月20日
論文題目	日本酒造りにおけるバクテリアの多様性および生態に関する研究
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 西田 洋巳 教授 五十嵐 康弘 教授 生城 真一 准教授 大島 拓 石川県立大学 准教授 小柳 喬

内容の要旨

古来より日本酒は無菌的な状況ではない環境において自然と調和しながら造られている。日本酒造りは、日本の伝統文化であり、微生物発酵を利活用した世界に冠たるバイオテクノロジーである。例えば、微生物学の祖であるパスツールによる低温殺菌法の発見の300年前に日本酒造りでは低温殺菌である火入れが行われていた記録がある。日本酒造りでは、麹菌（アスペルギルス・オリゼ）と酒酵母（サツカロミケス・セレビスエ）という2つの真核微生物が重要な役割を担っている。すなわち、酒米のデンプンを麹菌が糖に変換し、その糖を酒酵母がエタノールに変換している（並行複発酵）。しかし、同じ酒米、麹菌、酒酵母を使用しても酒蔵（日本酒メーカー）によって異なる味や風味の日本酒となる。この要因の一つとして、日本酒造りにおいて混入するバクテリアに注目し、それらのバクテリアが日本酒へ与える影響について明らかにすることを本研究の目的とした。

最初に、日本酒に混入し、一時的に増殖したバクテリアの痕跡が日本酒の中にDNAとして残っていると考え、日本酒に含まれているバクテリアDNAの多様性を調べた。33の異なる酒蔵から44サンプルの澄んだ日本酒、3サンプルの濁り酒、11サンプルの酒粕に含まれるDNAからバクテリアのリボソームRNA遺伝子の一部を特異的、網羅的に増幅し、その塩基配列を比較した。その結果、バクテリアの分類体系における属レベルにおいて175属の異なるバクテリアを検出し、その組み合わせの違いに基づくクラスター解析を行ったところ、前述の58サンプルのバクテリア菌叢は3つのクラスターに分かれた。澄んだ日本酒と濁り酒は3つのクラスターに分散したのに対して、酒粕の11サンプルは1つのクラスターだけに存在し、その中で2つのサブグループを形成した。このことは、酒粕に含まれ

るバクテリアの多様性は日本酒に比べて低いことを示している。

また、仕込み水（日本酒造りに使用する水）に含まれるバクテリアDNAと日本酒のバクテリアDNAには大きな違いがあったことより、日本酒で検出されたバクテリアDNAは日本酒造りの過程で混入し、一時的に増殖したバクテリア由来であることがわかった。また、同じ酒蔵の同じ銘柄の日本酒においても製造年度が異なるとバクテリア菌叢が異なっていることを示し、毎年日本酒造りにおいて混入するバクテリアの種類（属や種）が違うことを明らかにした。

蒸米に麴菌をつけて増殖させた麴と、発酵スターターとして仕込み水と麴に酒酵母を加えて造られる酒母は別々に造られ、それらが3回に分けて混ぜ合わされる。これは3段仕込みと呼ばれ、初添え、仲添え、留添えから成り立つ。初添えから約1ヶ月の間（醪、もろみの過程）、タンクにおいてエタノール発酵が生じて、日本酒ができる。この過程におけるバクテリア菌叢の変化を調べたところ、大きな変化がないことがわかった。バクテリアは最終的には、エタノールで死滅するため、残存DNAを検出したことによるが、初添え以降の醪の過程において、タンクの中に新たなバクテリアが混入し、増殖していないことを示す。すなわち、日本酒造りにおけるバクテリアの混入は、初添え前の麴造りおよび酒母造りの過程において生じていることを明らかにした。

そこで、日本酒造りに影響を与える（味や風味を変化させる）バクテリアを分離する目的で、初添えからのバクテリアの分離を行った。ある酒蔵の異なる時期の6つの初添えからバクテリアを46株分離した。リボソームRNA遺伝子の部分塩基配列の比較より、属レベルにおいて23株がコクリアに属し、コクリアは6つの異なる初添えサンプルすべてから分離された。また、先の日本酒に含まれるバクテリアDNAにおいてコクリアDNAを調べたところ、3サンプルにおいて存在しており、それらの3サンプルすべてが初添えを提供してくれた酒蔵の産物であることがわかった。さらに、その酒蔵にあった酒瓶ケースからコクリアを分離した。これらの結果より、この分離したコクリアはこの酒蔵に住み着いている「蔵付き」バクテリアであるとした。日本酒とかわりの深いバクテリアとしては乳酸菌があり、ゲノムにおけるグアニン・シトシン含量（GC含量）の低い系統群であるファーミキューテスに属している。それに対して、コクリアはゲノムGC含量の高い系統群であるアクチノバクテリアに属しており、乳酸菌とは系統進化も機能も違っているバクテリアである。なお、これまでに日本酒にかかわりの深いアクチノバクテリアの報告はなく、本研究が初めてである。

23のコクリア分離株のリボソームRNA遺伝子比較より、2つのグループに分かれることがわかった。それぞれに属する2つの菌株（TGY1120_3およびTGY1127_2）を選び、それらのゲノム塩基配列を決定したところ、それらの株は種レベルで違っていることがわかった。その培養における温度を比べたところ、30°Cおよび5°Cよりも15°Cにおける増殖がよいことがわかった。近縁のコクリアが30°C～37°Cを至適生育温度としていることより、分離株は日本酒造りにおける温度である15°Cに適するように進化したと考えられ、これらのコクリア株はこの酒蔵に長年にわたって住み着き、進化していると考えられる。このことを裏付けることとして、これらコクリア2株には、プラスミドやトランスポゾンなどの転移性遺伝因子が存在していることがわかり、ゲノム改変が生じていると考えられた。

次に、日本酒造りに使用されている酒酵母と分離したコクリア株との共培養実験を行った。培養に用いた培地は通常使用している人工培地と市販されている麴にブドウ糖を添加した麴溶液を用いて行った。人工培地では経時的にエタノールの定量と酒酵母とコクリアの生菌数測定、麴溶液ではエタノールおよび有機酸の定量と酒酵母とコクリアの生菌数測定を行った。麴溶液の最終産物におけるアミノ酸の組成

分析も行った。その結果、共培養における酒酵母の生育はコクリアによって影響を受けず、エタノール濃度の変化も影響を受けていなかったが、コクリアは培養後期にコロニー形成ができない状態になっていた。また、麴溶液では、コクリアの有無によって、コハク酸の変化は見られなかったにもかかわらず、クエン酸や乳酸では変化が見られた(図1)。コハク酸は酵母の代謝によって増減することが報告されており、酸素存在下においては減少し、酸素が存在しない環境下では、TCA回路が還元方向へ動き、コハク酸濃度が上昇する。麴溶液の培養5日目まではコハク酸は減少し、それ以降は増加した(図1)。麴溶液における乳酸については、最初はゼロであったものが増加し続けた(図1)。これは、麴に含まれていた乳酸菌が増殖し、それとともに乳酸が増加したことを意味している。すなわち、麴溶液の培養実験では、酒母造りのような状況になっており、乳酸菌の増加から生酏造りに似たような経過をたどったと考えられた。これらの結果より、蔵付きコクリアによって、有機酸組成が変化することを明らかにし、酒酵母および麴に含まれていた乳酸菌の代謝への影響を示した。

以上の結果より、日本酒造りの過程から分離した蔵付きコクリアは、日本酒造りにおいて混入し、一時的に増殖することなどによって、酒酵母など他の微生物へ影響を与え、その結果、日本酒の味や風味が変化していることを強く示唆した。このコクリアを利活用した日本酒造りを提案する。

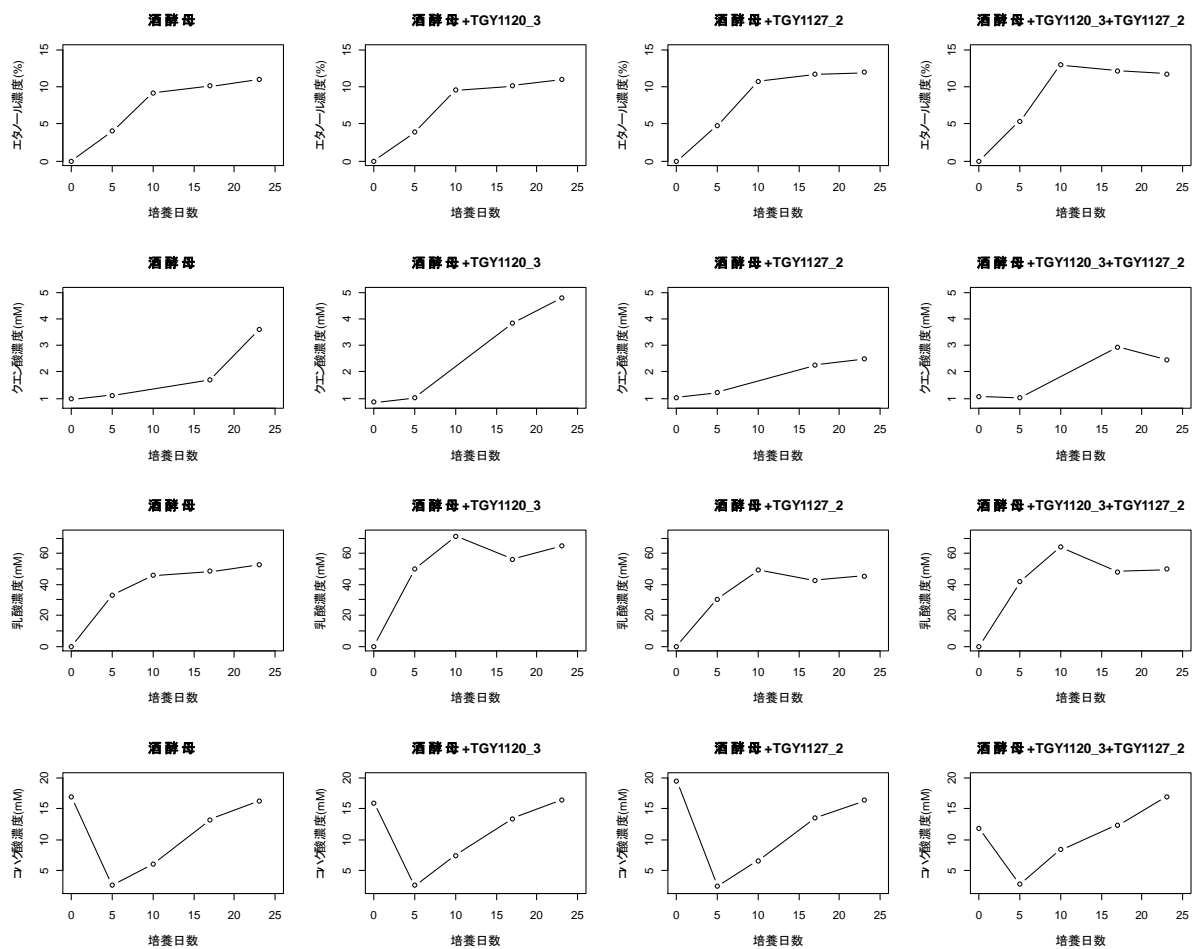


図1 酒酵母単独およびコクリアとの麴溶液での共培養におけるエタノール、クエン酸、乳酸、コハク酸の濃度変化

審査の結果の要旨

寺嶋桃香さんは、2020年11月4日に開かれた予備審査会の段階で原著論文3報（いずれも第一著者）と総説論文1報を発表しており、その中の3報（下記に引用しているもの）を論文目録に記載した。さらに、予備審査会で指摘された課題を公聴会までに解決し、そこで発表した。

寺嶋さんは、日本酒に含まれる細菌DNAに注目し、その塩基配列を比較することによって、日本酒造りの過程において混入した細菌を明らかにした（Terasaki et al., *Curr Microbiol* 74, 1432-1437）。さらに、麴と酒母が初めて混ぜられる初添えから醪（もろみ）造りの最終段階までのサンプリングを行い、経時的に細菌菌叢の変化を細菌DNAに基づいて明らかにした（Terasaki et al., *Curr Microbiol* 75, 874-879）。その結果、醪の過程において、細菌菌叢の大きな変化はなく、日本酒造りの過程で混入する細菌は、麴造りおよび酒母造りの過程で生じていることを示した。

そこで、初添えより細菌の分離を行った。その結果、ある酒蔵に特有であり、その酒蔵に住み着いている「蔵付き」細菌としてアクチノ細菌に属するコクリアを分離、同定した（Terasaki and Nishida, *Open Bioinfo J* 13, 74-82）。合計23株のコクリア分離株は、2つの系統に分かれたため、それぞれの系統に属する分離株のゲノム塩基配列決定および遺伝子アノテーションを行った。なお、ゲノム情報に関する報告は原著論文としてまとめ、寺嶋さんの4報目として現在投稿中である。ここまでが予備審査会での報告であったが、予備審査会において実際にコクリア分離株が日本酒造りおよび日本酒の構成成分へ影響しているかどうかを確かめるという課題が指摘された。

そこで、寺嶋さんは、予備審査会後に日本酒造りに実際に使用されている酒酵母とコクリア分離株の共培養実験を行った。その際、人工培地だけではなく、実際の日本酒造りに近づけるように市販の麴（無菌的ではない）に糖を入れた麴溶液を用いて共培養実験を行った。また、分離したコクリアが日本酒造りの温度である15℃に適した生育になっていることを示し、ゲノム情報が近縁であったコクリアが30℃以上に至適生育温度を持っていることを考慮すると、日本酒造りの環境に適するように蔵付きコクリアは進化してきたと考えられ、この酒蔵へ住み着いている時間が長いと考えられる。

共培養の結果、コクリアの存在は、酒酵母の生育やエタノール生産に大きな影響を与えなかったが、酒酵母の存在は、コクリアの生育に影響を与え、コロニー数は減少し、共培養20日程度においてコロニー形成が見られなくなった。麴溶液における共培養の実験において、コハク酸濃度が5日目まで減少し、その後に増加することより、培養に用いた麴溶液中の酸素が5日で消費され、その後は無酸素状態になり、酒酵母のエタノール発酵が活発化したと考えられ、それにともなってコクリアのコロニー数は減少したと考えられた。また、コクリアの有無によってクエン酸および乳酸濃度に違いが生じたことより、コクリアの存在によって乳酸菌や酒酵母の代謝が変化することを強く示唆した。他方、アミノ酸組成については、コクリアの有無による有意な差を検出することはできなかった。以上の結果より、コクリア分離株が日本酒造りの過程で実際に機能している可能性が極めて高いと結論付け、公聴会において発表した。本成果は直ちに原著論文としてまとめ、寺嶋さんの5報目として現在投稿中である。

2021年1月20日に博士論文の審査及び最終試験を実施し、寺嶋桃香さんは当該分野および周辺分野に関して博士としての十分な全般的知識を持ち、学術研究にふさわしい討論ができ、独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。