



# @ High School

愛媛大学附属高等学校

森本日向, 田中千遥 (顧問: 松本浩司)

## 酢屋で継代培養されてきた酢酸菌の遺伝子比較

本研究は、日本農芸化学会 2019 年度大会（開催地：東京農業大学）の「ジュニア農芸化学会」で発表されたものである。発表者らは、全国で伝統的な静置発酵によるお酢づくりを続けている 23 の企業から酢酸菌を含む発酵液サンプルの提供をうけ、その菌叢解析、酢酸菌の単離、同定を行った。また、最も多くのサンプル中に確認された酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* を対象に、系統解析を行った。

本研究の目的、方法および結果

### 【目的】

酸味を感じる調味料の代表である酢は、人類最古の調味料とされる<sup>(1)</sup>。造酢技術の一つである伝統的な静置発酵は、江戸時代後期に確立されて現在まで続いている。静置発酵では、酢酸発酵が終了した発酵液の一部を種酢として残し、そこに新しいお酒などのアルコールを投入して、発酵が終了するまで静置する。このようにして、各企業は自社の酢酸菌を絶やさぬよう大切に培養し続けてきた。これまでの私たちのアンケート調査の結果から、地震や震災、猛暑などによって酢酸菌を全滅させた経験をもつ企業があることがわかっている（未発表）。こうした際や、そもそもの創業時には、近隣の同業他社、あるいは県を超えて、種酢を譲り受けた記録をもつ企業もあった。しかしほとんどの企業では、創業時の記録や、災害復興時の種酢の授受の記録は残っていなかった。

そこで私たちは、酢酸菌の DNA 塩基配列を解読し、その系統解析を行うことにした。これによって、各企業の酢酸菌がどの企業から受け渡されたのかを明らかにできないかと考えたからである。創業時に必ず種酢の授受

が行われ、かつ、系統解析でそれを証明できるとすれば、江戸時代から続く静置発酵による酢づくりの文化がどの様に全国に伝播していったのかまで解明できるかもしれない。

### 【方法】

#### 1. 酢酸菌の収集と 16S rDNA PCR-DGGE 解析

伝統的な静置発酵でお酢を作り続けている全国の 45 企業に対し、種酢の提供を依頼した。協力していただける場合は企業を訪問し、50mL の種酢をサンプリングし、発泡スチロール箱に保冷剤とともにに入れて学校にもって帰るか、郵送した。もち帰ったサンプルは、近隣の企業の発酵液を真似た再現液体培地<sup>(2)</sup>（市販の醸造酢 10% + 市販の日本酒 30% + 水 60%）に対してサンプルが 10% 容量となるようになるように植え継ぎ、30°C の恒温器の中で微生物の培養を行った。その後、各サンプルを植え継いだ各再現培地内の菌叢を調べるため、16S rDNA PCR-DGGE 解析<sup>(3)</sup>（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法。60°C、電圧 80V、15 時間）を行った。

#### 2. 酢酸菌の単離と同定

培養液から菌体を単離するため、1. の再現液体培地で培養後の培地を、再現平板培地（再現液体培地に寒天 1.5% と乾燥酵母エキス 0.3% を加えて滅菌後、シャーレで固化したもの）に白金耳でストリークし、数日間培養した。こうして得られたシングルコロニー（以下 AiTV 株）のうち、遺伝的に同じ株を排除するため rep-PCR DNA フィンガープリンティング法<sup>(4)</sup>による比較解析を行い、得られたバンドパターンが同一の株を排除した。このようにして得られた AiTV 株だけを対象に、16S rDNA 領域を PCR 法で増幅し、その産物を精製後、

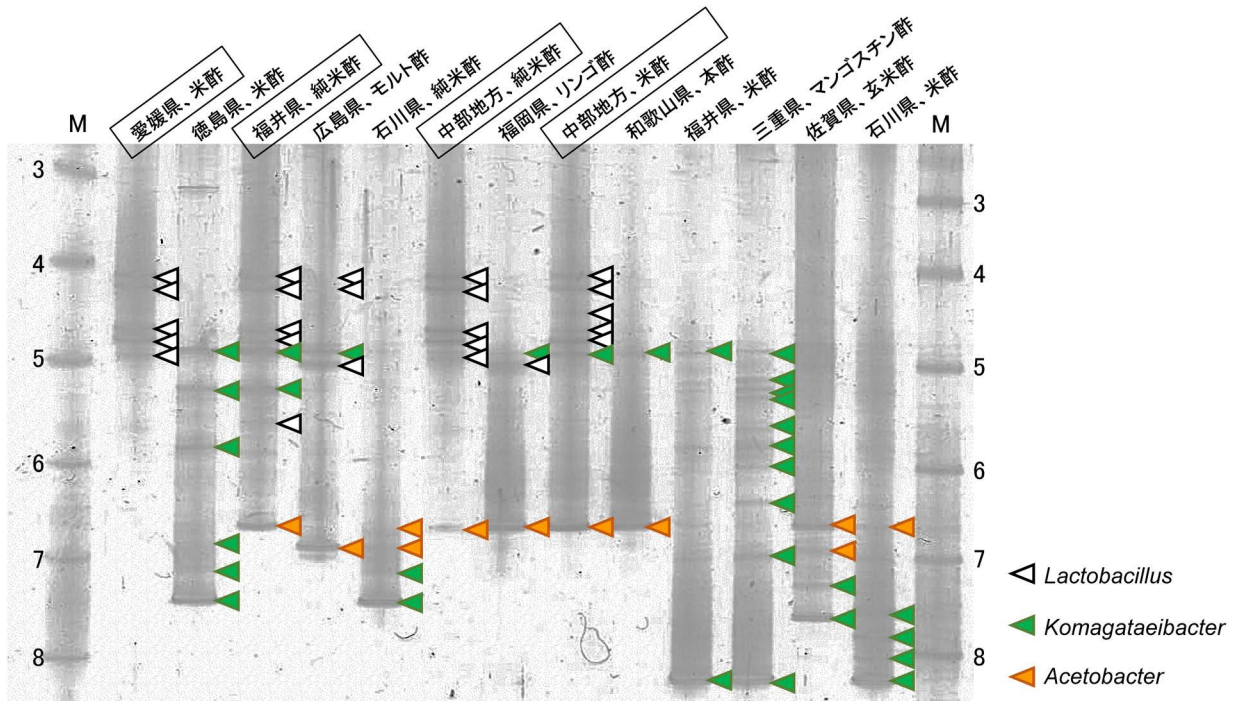


図1 ■ 酢屋の発酵液の16S rDNA PCR-DGGE解析結果

一つのバンドが一つの株を示している。遺伝子内のGC含有が高い株ほど長い距離を移動するためバンドが下方に現れ、GC含有が低い株ほど、短い距離しか移動しないため上方に現れる。ゲルごとのバンド比較のために、DGGE maker (M; ニッポンジーン製DGGE Maker II, 10 fragments) とともに泳動した。四角で囲んだ4つの企業の菌叢は、非常によく似ている。

DNAシーケンス解析サービスに依頼して塩基配列を決定した。その結果をBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で検索し、種を同定した。

### 3. ADHによる系統解析

2.で単離・同定できた菌のうち、最も多くの企業に存在していた酢酸菌1種を選んだ。その種の全塩基配列を解析する予算はないため、特定の遺伝子領域だけを比較することにした。一般に酢酸菌は易変異性が報告されており、実験室での10回程度の植え継ぎによって高温への適応能力が現れることが報告されている<sup>(6, 6)</sup>。そのため、解析対象とする遺伝子領域は、適度に共通性を保った領域でなければならない。私たちは、以下の理由からアルコール脱水素酵素 (ADH) 解析をすることにした。酢酸菌のADHの一部を用いた系統解析結果において、16S rDNA配列に基づいた系統分析と高い類似性が見られるという報告がある<sup>(7)</sup>。ADHはエタノールから酢酸を生成する中心的な役割をもち、酢酸菌が自身の生命活動のエネルギーを得るためにも重要な酵素である。また、食酢製造の工程で最も機能するこの酵素の遺伝領域が大きく損なわれると、企業はその変異株を仕込み桶ごと排除する。したがって、ADHは保存性が高いと考えられる。

得られた塩基配列の情報は、近隣結合法 (Neighbor-

Joining法) で解析し系統樹を描いた。なお解析サンプルについては、企業の譲渡 (提供) サンプルから単離した株だけではなく、ゲノム情報が公開されている3株 (SKU1108, NBRC3283, NBRC3191) も含めて行った。

### 【結果と考察】

#### 1. 酢酸菌の収集とDGGE解析

福島県、千葉県、中部地方、石川県、福井県、三重県、和歌山県、兵庫県、岡山県、広島県、山口県、香川県、愛媛県、徳島県、高知県、福岡県、佐賀県、長野県にある合計23の企業からサンプルを提供していただいた。16S rDNA PCR-DGGE解析の結果、発酵液中にはさまざまな菌がみられたが (図1)、*Acetobacter* 属や *Komagataeibacter* 属といった酢酸菌のほか、乳酸菌も多く存在していた。ほとんどのサンプルで、複数の酢酸菌が確認された。また各サンプル間で菌叢は異なっていたが、似ているバンドのパターンも複数あった。しかしこの結果から、地域における菌叢の特徴や、種酢の授受の歴史を判断することなどはできなかった。

#### 2. 酢酸菌の単離と同定

提供されたすべての発酵液から単離した81株のうち、同定を試みた結果、74株の酢酸菌を同定することができた。16S rDNA配列から酢酸菌と同定されたものうち、*Acetobacter* 属が44株と最も多く、そのうちの35株

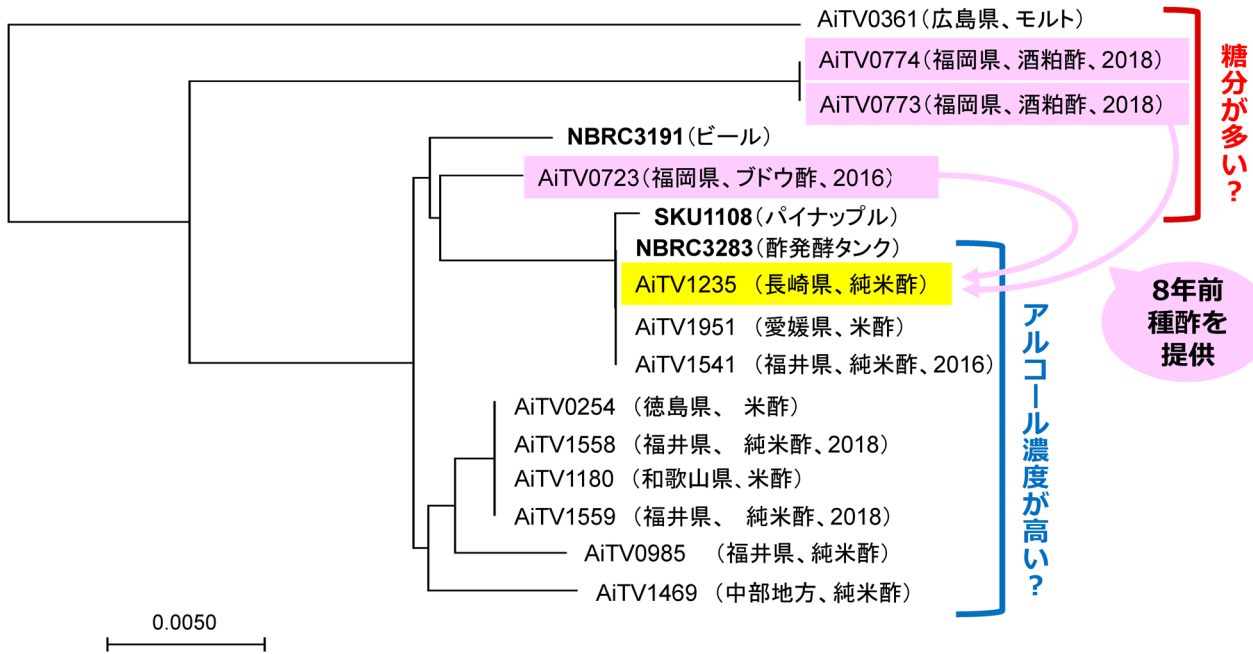


図2 ■ ADH 遺伝子領域の分子系統樹

AiTVからはじまる株が、本研究で単離した株。現在、解析対象の株数を増やしている。同じ企業でも原料が異なれば系統的に近くなく、地理的に離れた企業同士でも、原料が同じであれば系統が近かった。8年前に発酵液の提供を受けた記録のある企業の株は、提供元の企業の2株のどちらとも近くなかった。

は *Acetobacter pasteurianus* であった。また *Gluconacetobacter* 属が15株、*Komagataeibacter* 属が12株、*Tan-ticharoenia* 属が2株、*Gluconobacter* 属が1株であった。これらのことから、酢屋の発酵液中では *A. pasteurianus* と *Gluconacetobacter* が優占していると考えられた。

### 3. *A. pasteurianus* 酢酸菌の単離と同定

最も多く得られた *A. pasteurianus* を対象に、ADH 全塩基配列 (*adhA*) を解析し、系統解析を行った結果が図2である。解析結果の中でも注目したのは、アンケート調査によって、8年前に福岡県の企業から長崎県の企業へ種酢が渡されたことがわかっているサンプル同士の関係であった。これらは遺伝的に同一、もしくは極めて近い株としてグループ分けされると考えていたが、予想に反して系統は近くなかった (図2)。また、距離的に近い企業は系統も近くなるのではないかと、そして同じ企業から単離された *A. pasteurianus* であれば、遺伝的に同一か、極めて近い株として分けられると予想していたが、どちらも予想とは異なっていた (図2、福井県、福岡県の例など)。今回の解析結果では原料によって系統が分かれる傾向があり (図2)、米酢や純米酢といった商品名で販売されている日本酒 (醸造用アルコール使用を含む) を原料に含む、アルコール濃度が高い中で生育している系統と、ブドウ酢やビールなどのアルコールに加えて比較的糖分の多い原料の中で生育している系統と

いう2つのグループに大別されると考えられた。この解釈が本当に正しいのか、なぜADHが原料の影響を強く受けるのかについては、今後さらなる研究が必要であるが、少なくとも同じ種酢を由来とする企業をグループ分けしたり、お酢づくりのルーツを探ったりする研究対象としては、ADHは適していないと考えられた。現在は野外の酢酸菌を集め、そのADHを調べることを、また、ADH以外の領域を対象として比較することを目的に、研究を進めている。

#### 【まとめ】

伝統的な静置発酵によってお酢を生産する企業の種酢の菌叢は企業ごとに異なっており、多くの企業では *A. pasteurianus* が、次いで *Gluconacetobacter* 属の酢酸菌が優占していることがわかった。また、酢酸菌のADH遺伝子の突然変異は、原料の影響を受けているかもしれないことが示唆された。過去の種酢の受け渡し記録の分子生物学的証明や、同手法による日本のお酢づくり手法の伝播経路の解明などは不可能と考えられた。

#### ● 本研究の意義と展望

何となく酢酸菌を題材として始まった先輩の研究と、1軒のお酢屋さん<sup>(2)</sup>との出会いがきっかけで、研究仲間と解明したい研究テーマが増えました。日本全国のお酢

屋さんに連絡をとり、気がつけば、貴重で多様な酢酸菌を保有するに至ると同時に、江戸時代から続く醸造文化を守りたいという活動にまで発展しています。酢酸菌を対象として研究するために大学に進学した先輩たち、地域のお酢屋さんをテーマとした地域振興を目的に大学進学した先輩とともに、今後も研究を進めていく予定です。

謝辞：本研究に協力していただいた日本全国23の酢蔵の皆様、終始ご指導ご助言をいただきました愛媛大学大学院農学研究科生命機能学専攻応用生命化学コース発酵化学教育分野の阿野嘉孝先生をはじめとする研究室の方々に、この場を借りて深く御礼申し上げます。この研究は、2018年度武田科学振興財団研究助成を受けて行われました。

## 文献

- 1) 酢酸菌研究会（外内尚人代表編）：“食物と健康の科学シ

リーズ 酢の機能と科学”，朝倉書店，2012。

- 2) 實好琴葉，小山絵風：化学と生物，**56**, 59 (2018)。
- 3) L. De Vero & P. Giudici: *Int. J. Food Microbiol.*, **125**, 96 (2008)。
- 4) A. E. Yetiman & Z. Kesmen: *Int. J. Food Microbiol.*, **204**, 9 (2015)。
- 5) Y. Azuma, A. Hosoyama, M. Matsutani, N. Furuya, H. Horikawa, T. Harada, H. Hirakawa, S. Kuhara, K. Matsushita, N. Fujita *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5768 (2009)。
- 6) M. Matsutani, M. Nishikura, N. Saichana, T. Hatano, U. Masud-Tippayasak, G. Theergool, T. Yakushi & K. Matsushita: *J. Biotechnol.*, **65**, 109 (2013)。
- 7) J. Trcek: *Syst. Appl. Microbiol.*, **28**, 735 (2005)。

Copyright © 2019 公益社団法人日本農芸化学会

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.57.712