

(続紙 1)

| | | | |
|---|--|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (農 学) | 氏名 | 脇中 琢良 |
| 論文題目 | Breeding of useful bacterial strains in food industry based on the analysis of metabolic systems and phage susceptibilities (代謝経路とバクテリオファージ感受性の解析に基づく食品産業において 有用な菌株の育種) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>乳酸菌やビフィズス菌は、醸造微生物や腸内細菌としてヒトとの関わりが深く、食品産業においてもしばしば利用される微生物である。本論文では、食品産業上有用なこれらの菌の、菌株ごとの性質の差異が評価された。すなわち、第一章ではビフィズス菌の糖代謝、第二章では醤油乳酸菌のアミノ酸代謝、第三章では醤油乳酸菌のバクテリオファージ (ファージ) 感受性が解析された。本論文では、これらの解析から得られた知見を、有用微生物の育種を介して産業応用する道筋が示された。</p> <p>第一章では、ビフィズス菌の糖代謝経路に焦点があてられた。ビフィズス菌は、人間の腸内細菌叢を構成する主要な細菌であり、プロバイオティクスとして商業的に使用されている。腸管下部は糖源が制限された環境であるため、ビフィズス菌は難消化性のオリゴ糖や複合糖質を栄養源として利用する。腸管下部には難消化性糖以外の糖源として、腸管上皮細胞上の糖タンパク質ムチンが存在している。ムチンの糖鎖末端にはABH型血液型抗原が発現しており、ムチン糖鎖の利用には末端の血液型抗原の分解が必要となる。本章では、A型およびB型抗原を分解するビフィズス菌が探索され、B型抗原を分解してガラクトースを遊離する菌株として、<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1254が見いだされた。この菌株のゲノムにおいて、B型抗原を分解するGH110 α-ガラクトシダーゼの候補遺伝子 (<i>agabb</i>) が見いだされ、組み換えタンパク質を用いた解析が行われた。その結果、本酵素が、B型およびAB型のヒトムチン糖鎖からガラクトースを遊離することが確認された。また、赤血球からB型の血液型抗原を除去し、輸血対象が広いO型の赤血球に変換しうることも示された。本酵素には、既報のGH110酵素にはないユニークな炭水化物結合モジュール (CBM) 51 ドメインが含まれており、CBM51がB型抗原に結合することが、一分子に多数の基質が密集するヒトムチンの効率的な分解に寄与していることが示された。</p> <p>第二章では、醤油乳酸菌<i>Tetragenococcus halophilus</i>のアミノ酸代謝に焦点が当てられた。伝統的な醤油醸造では、「蔵付き菌」と呼ばれる自然混入菌によって乳酸発酵が行われることが多かったが、<i>T. halophilus</i>の一部の菌株がヒスタミンなどの生理活性アミンを生産することが知られるようになり、野生の乳酸菌を排除してヒスタミン非生産性のスターター菌株を添加する方法が広く用いられるようになってきた。</p> <p>第一節では、アスパラギン酸脱炭酸酵素を有する好塩性乳酸菌を分離し、魚醤油発酵スターターとして利用することが検討された。アスパラギン酸脱炭酸酵素は、アスパラギン酸を脱炭酸して甘味のあるアラニンに変換することで、醸造物の味を変えることができる。魚醤油製造におけるアスパラギン酸脱炭酸の効果の評価すべく、塩蔵魚等のサンプルからアスパラギン酸脱炭酸活性を有する菌株が分離され、魚醤油発酵スターターとしての性状が、アスパラギン酸脱炭酸活性を有しない株と比較された。その結果、分離した株が魚醤油諸味においてアスパラギン酸をアラニンに変換していること、ヒスタミンの生成を抑制していることが確認された。また、アスパラギン酸がアラニンに変換された魚醤油では、甘味が増していることが官能評価によって示された。</p> <p>第二節では、醤油乳酸菌のアルギニンデアミナーゼ経路破壊株の育種が試みられた。アルギニンデアミナーゼ経路は、アルギニンを分解しオルニチンへ変換する経路</p> | | | |

である。この経路の中間代謝産物であるシトルリンが発がん性物質カルバミン酸エチルの前駆体となるなどの理由から、アルギニンデイミナーゼを有する菌株は好まれない。*T. halophilus* NBRC 12172株を親株として、pH指示薬とアルギニンを含む培地を使用し、培養後の培地の色の違いを指標とすることで、アルギニン分解性を失った変異株が取得された。アルギニンデイミナーゼ経路に関わる遺伝子クラスター領域のシーケンス解析により、変異株において、この領域における挿入配列転移が見いだされた。5株の変異株全てが挿入配列の転移によって変異したものであったという事実は、*T. halophilus*において挿入配列の転移活性が極めて高いことを示していた。NBRC 12172株およびアルギニン非分解性変異株を発酵スターターとして醤油を醸造したところ、親株、変異株とも発酵スターター非添加の対照区と比べpHの速やかな低下が観察されたが、変異株をスターターとして用いた諸味では、親株を用いたものとは異なり、アルギニン分解は認められなかった。

第三章では、醤油乳酸菌のファージ感受性に焦点が当てられた。醤油醸造では、発酵スターターである*T. halophilus*がファージ感染を受けると、乳酸発酵不良が起き、製品の劣化が引き起こされる。*T. halophilus*に感染するファージは菌株特異的に感染すると報告されていたが、そのメカニズムは未解明であった。本章では特に宿主のファージ感受性を決定する要因の特定が試みられた。

第一節では、バクテリオファージphiWJ7の結合レセプターが解析された。ファージphiWJ7に感染する*T. halophilus* WJ7株を親株として、phiWJ7非感染のファージ耐性変異株が取得された。ゲノム解析により、phiWJ7耐性変異株におけるリビトールタイコ酸合成酵素遺伝子に変異が見いだされた。親株および変異株の細胞壁からタイコ酸を抽出し加水分解して分析すると、親株ではリビトールの存在が確認されたが、変異株では確認されず、変異株はリビトールタイコ酸を欠損していることが示された。ファージ結合アッセイを実施した結果、変異株においてphiWJ7の結合活性が低下していることが明らかになった。以上の結果より、リビトールタイコ酸がphiWJ7の感染に必須の結合レセプターであり、リビトールタイコ酸合成酵素を有しない株は細胞表面にリビトールタイコ酸を発現しないため、phiWJ7の感染を受けないと結論付けられた。

第二節では、醤油乳酸菌のファージ感受性を決定するcapsular polysaccharide (CPS)の合成遺伝子群が同定された。*T. halophilus* YA5株に感染するファージphiYA5_2と、YG2株に感染するファージphiYG2_4に対し、それぞれ耐性変異株が取得され、ゲノムが解析された。その結果、YA5株、YG2株に由来するいずれの変異株においてもCPS合成酵素遺伝子に変異が見いだされた。phiYG2_4はCPS欠損変異株に吸着しなくなり感染性を失っていたため、YG2株のCPSがphiYG2_4の特異的なレセプターであると推定された。phiYA5_2はYA5株のCPS構造変異株に吸着・感染しなかった。このファージはYG2株に吸着・感染しないにもかかわらず、YG2株のCPS欠損変異株に吸着・感染した。そのため、phiYA5_2のレセプターはYA5株とYG2株に共通して存在するが、YA5株のCPS構造変異株やYG2株に存在するCPSがレセプターを覆うことでphiYA5_2の吸着を阻害していることが想定された。紫外線照射により感染性を失ったphiYA5_2がYA5株の菌体分解活性を有していたことより、phiYA5_2のファージ粒子にはCPS分解酵素が発現しており、phiYA5_2によるYA5株CPSの特異的分解が、レセプターへの接触を可能としていることが推定された。以上の結果より、*T. halophilus*のCPSはファージの結合レセプター、または、結合阻害因子として機能し、その多様性がファージ感染における菌株特異性の一因となっていると推定された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

乳酸菌やビフィズス菌は、醸造微生物や腸内細菌としてヒトとの関わりが深く、食品産業においてもしばしば利用される微生物であるが、菌株ごとの性質の差異が大きい。そのため、健康上・食品製造上の課題やニーズに合わせた菌株の育種が、盛んに行われている。本論文では、食品産業上有用なこれらの菌の、菌株ごとの性質評価と育種が、糖代謝、アミノ酸代謝、バクテリオファージ感受性の解析に基づき展開されている。評価すべき点として、以下の5点が挙げられる。

1. ビフィズス菌由来の α -ガラクトシダーゼが、ムチンや赤血球の B 型血液型抗原に特異的に作用すること、また、本酵素のユニークな炭水化物結合モジュールがムチン等の多価基質の効率的分解に寄与することを示した。
2. 発酵食品から分離したアスパラギン酸脱炭酸酵素を有する *T. halophilus* を魚醤油の発酵スターターとして用いると、アスパラギン酸がアラニンに変換され、甘味が増強され、アレルギー症状の原因物質となるヒスタミンの蓄積が抑制されることを示した。
3. *T. halophilus* のアルギニン非分解性株を育種し、アルギニン分解関連遺伝子に高頻度に転移した新奇な挿入配列を発見した。
4. *T. halophilus* の細胞壁に存在するリビトールタイコ酸がバクテリオファージ phiWJ7 の感染に必須の結合レセプターであり、タイコ酸構造がファージ感受性を決定する一因であることを示した。
5. *T. halophilus* 表層の CPS がファージの結合レセプターとして、またはファージの結合阻害因子として機能することを示し、*T. halophilus* のファージ感受性の違いが CPS 構造の多様性に起因することを示唆した。

以上のように、本論文は、乳酸菌およびビフィズス菌における糖・アミノ酸代謝経路とバクテリオファージ感受性を解析するとともに、得られた知見に基づき、醤油の生産に有用な菌株の育種を達成した。加えて、育種された有用菌株が醸造食品の品質向上に寄与することを示したものであり、発酵生理及び醸造学、応用微生物学、応用生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和5年11月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）