

学 位 論 文 題 名

乳酸菌の H^+ -ATPase 欠損変異株に関する研究

学位論文内容の要旨

主に欧米諸国・中央アジアで消費されてきた発酵乳は、わが国でも生活スタイルが変化するに伴い年々消費量が増大しており、新しい機能を持ったスターター乳酸菌の育種が強く求められている。そのひとつとして、わが国ではヨーグルト中の乳酸菌の生菌数が 10^7 個/g以上に維持されていることが法的に定められているため、酸性条件下でも死滅しない耐酸性菌の育種が求められている。加えて、乳酸菌のヒト腸管内への定着には個々の菌種の耐酸性が重要なファクターとなるため、乳酸菌に耐酸性を付与することは、比較的酸性感受性であるビフィズス菌の製品中での生菌数維持・腸管内への定着や、最近注目を集めている経口ワクチンとしての乳酸菌の利用において重要であると考えられる。一方、以前より乳業界では発酵乳製品の保存中における酸度の上昇、いわゆるポストアシディフィケーションによる製品の風味劣化が問題となっている。これは、低温下においても乳酸菌がある程度発酵能をもつために起こることで、低温感受性スターターの開発、ラクトパーオキシダーゼの製品への添加などの解決法が考えられているが、他にも酸性条件下で発酵を行わない酸性感受性菌の育種が望まれている。

このように乳酸菌の酸性条件下における挙動は、製品の善し悪しに直接関わってくる重要な問題であるばかりでなく、人類の健康維持、疫病の予防という新しい乳酸菌利用の分野にも関わる興味深いテーマである。当研究室において今まで研究を行ってきた、大腸菌の H^+ -ATPase欠損変異株に関する知見、および今までに報告されたいくつかの乳酸菌における H^+ -ATPaseに関する知見から、乳酸菌においても本酵素の欠損を導入することにより今までにない新しい機能を持ったスターター乳酸菌が取得できると考えられた。また、乳業用乳酸菌においては今まで詳しく解析されていなかった本酵素の機能を、欠損株を用いてより直接的に解析することにより、乳酸菌のエネルギー代謝に関する新しい知見の蓄積にも貢献できると期待された。よって本研究では代表的な乳業用乳酸球菌である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* から H^+ -ATPase 欠損変異株を誘導し、その特徴を親株と比較した。

本研究の結果を要約すると以下のとおりである。

1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2株より分離した H^+ -ATPase欠損変異株No. 1016-51株の特徴

ネオマイシン、ゲンタマイシンのようなアミノグリコシド系の抗生物質の取り込みにはプロトン駆動力が必要と考えられている。 H^+ -ATPase欠損変異株ではプロトン駆動力の形成能が低いと考えられること、また H^+ -ATPase欠損変異株ではエネルギーレベルの

低下、または酸性感受性のため親株に比べて生育が低下すると考えられたため、本菌のネオマイシン自然耐性株の中より親株に比べて生育の低下した株を選択し、それらの H^+ -ATPase活性を測定した。その結果、 H^+ -ATPaseの特異的阻害剤であるジシクロヘキシルカルボジイミド感受性の H^+ -ATPase活性が親株の約30%にまで低下した変異株No. 1016-51株を分離した。*Lactococcus*からの H^+ -ATPase欠損変異株の分離、また乳酸菌のネオマイシン耐性株からの H^+ -ATPase欠損変異株の誘導はこれが始めてである。

親株と変異株を中性から酸性の種々のpHに制御したジャー培養に供したところ、中性において両株の発酵パターン、特に生育に全く差が見いだされなかったことから、本菌は本培養条件下において H^+ -ATPaseによるATP合成は行っていないと考えられた。一方、酸性条件下において変異株の生育、乳酸生成量、また菌体当たりの乳酸生成量が親株に比べてそれぞれ60、36、60%と顕著に減少していたことから、変異株では糖代謝系が酸性感受性になっていると考えられた。さらに酸性条件下（pH 4.0、3.5）において変異株の生菌率は親株に比べて顕著に減少していた。また休止菌体系を用いた細胞内pHの測定の結果、親株では中性から酸性条件下を通して比較的中性の細胞内pHを維持していたのに対し、変異株ではpH 5.0以下で細胞内pHを高く維持できず、pH 4.0においては細胞内pHを全く上昇させることができなかった。

以上の結果より、*L. lactis* subsp. *lactis*において H^+ -ATPaseは大腸菌などとは違い、ATP合成ではなくATPを分解して細胞内プロトンを排出する方向に働き細胞内pHの維持に機能していること、変異株は本酵素の欠損のため酸性条件下で細胞内pHを維持できないことから酸性感受性となっていることが明らかとなった。本変異株の酸性感受性はポストアシディフィケーションの防止や、低酸度発酵乳の製造に応用可能であると考えられる。

2. 中性および酸性条件下における H^+ -ATPase活性とその遺伝子発現

中性および酸性条件下における両株の H^+ -ATPase活性と遺伝子発現レベルの比較をジャー培養菌体を用いて行った。その結果、親株では培養pHが7.0から4.5に低下すると、 H^+ -ATPase活性が約2.8倍に上昇していたのに対し、変異株ではそれほど大きな上昇は認められなかった。各条件下における両株の粗酵素の至適pH、 K_m 値に変化はなかった。ノーザン解析に必要なプローブを構築するため、 H^+ -ATPaseの活性中心である β サブユニット遺伝子の一部をPCRによって増幅し、塩基配列を決定したところ、他の乳酸菌を含むグラム陽性菌（*Enterococcus hirae*、*Lactobacillus casei*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus stearothermophilus*）とアミノ酸配列でいずれも85%以上の高い相同性を有していた。中性、酸性条件下で培養した両株の菌体より総RNAを取得し、上記のPCR産物をプローブとしてノーザンブロット解析を行った。その結果親株の H^+ -ATPase活性の酸性領域における増大が転写の活性化を伴うことが明らかとなった。一方、変異株も酸性条件下では転写が活性化しており、変異株の変異は転写レベルでは起こっていないことが明らかとなった。さらに*E. hirae*及び好熱性細菌PS-3の H^+ -ATPase抗体を用いたウェスタンブロット解析より酸性条件下で実際に両株の H^+ -ATPaseタンパク量が増大していることが示唆された。

これより親株では酸性条件下で H^+ -ATPase遺伝子の転写活性を高め、酵素タンパク

量を増加させて細胞内pHを維持していることが明らかとなった。変異株の変異は、酵素タンパク当たりの活性に関わるサブユニットの構造遺伝子中の変異と推測された。

今後これらの知見を応用し、他の乳酸菌種においても H^+ -ATPase欠損による酸性感受性菌の構築、また H^+ -ATPase遺伝子をクローニング後その発現を制御することによって、種々のレベルの酸性感受性株、さらには耐酸性株の構築が可能であると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 本 間 守
副 査 助教授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

乳酸菌の H^+ -ATPase 欠損変異株に関する研究

本論文は、和文86頁、図21、表7、引用文献73、5章からなり、ほかに参考論文4編が付されている。

近年わが国でも生活スタイルが変化するに伴い年々発酵乳の消費量が増大しており、酸性耐性や酸性感受性といった新機能をもつスターター乳酸菌の育種が強く求められている。乳酸菌の酸性条件下における挙動は、製品の善し悪しに直接関わってくる重要な問題であるばかりでなく、ビフィズス菌やプロバイオテック乳酸菌の腸管粘膜への定着といった、乳酸菌を利用した人類の健康維持にも関わる興味深いテーマである。当研究室で研究を行ってきた大腸菌の H^+ -ATPase欠損変異株に関する知見などから、乳酸菌においても本酵素の欠損を導入することにより今までにない新機能を持ったスターターが取得できると考えられた。また、乳業用乳酸菌においては今まで詳しく解析されていなかった本酵素の機能を、欠損株を用いて解析することにより、乳酸菌のエネルギー代謝に関する新しい知見の蓄積にも貢献できると期待された。

よって本研究では代表的な乳業用乳酸球菌である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* から H^+ -ATPase欠損変異株を誘導し、その特徴を親株と比較した。

1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2株より分離した H^+ -ATPase欠損変異株No. 1016-51株の特徴

本菌のネオマイシン自然耐性株の中より、親株に比べて生育の低下した株を選択し、 H^+ -ATPase活性が親株の約30%にまで低下した変異株No. 1016-51株を分離した。親株と変異株を種々のpHに制御したジャー培養に供したところ、中性において両株の発酵パターン、特に生育に全く差が見いだされなかったことから、本菌は本培養条件下において H^+ -ATPaseによるATP合成は行っていないと考えられた。一方、酸性条件下において変異株の生育、乳酸生成量、また菌体当たりの乳酸生成量が親株に比べて顕著に減少していたことから、変異株では糖代謝系が酸性感受性になっていると考えられた。さらに酸性条件下において変異株の生菌率は親株に比べて顕著に減少していた。また休止菌体系を用いた細胞内pHの測定の結果、親株では中性から酸性条件下を通して比較的

中性の細胞内pHを維持していたのに対し、変異株ではpH 5.0以下で細胞内pHを高く維持できず、pH 4.0においては細胞内pHを全く上昇させることができなかった。

以上の結果より、*L. lactis* subsp. *lactis*において H^+ -ATPaseは大腸菌などとは違い、ATP合成ではなくATPを分解して細胞内プロトンを排出する方向に働き細胞内pHの維持に機能していること、変異株は本酵素の欠損のため酸性条件下で細胞内pHを維持できないことから酸性感受性となっていることが明らかとなった。本変異株の酸性感受性はポストアシディフィケーションの防止や、低酸度発酵乳の製造に応用可能であると考えられる。

2. 中性および酸性条件下における H^+ -ATPase活性とその遺伝子発現

中性および酸性条件下における両株の H^+ -ATPase活性と遺伝子発現レベルの比較をジャー培養菌体を用いて行った。その結果、親株では培養pHが7.0から4.5に低下すると、 H^+ -ATPase活性が顕著に上昇していたのに対し、変異株ではそれほど大きな上昇は認められなかった。ノーザン解析に必要なプローブを構築するため H^+ -ATPaseの β サブユニット遺伝子の一部をPCRによって増幅し塩基配列を決定したところ、他の乳酸菌を含むグラム陽性菌とアミノ酸配列でいずれも85%以上の高い相同性を有していた。中性、酸性条件下で培養した両株の菌体より総RNAを取得し、上記のPCR産物をプローブとしてノーザン解析を行った結果、親株の H^+ -ATPase活性の酸性領域における増大が転写の活性化を伴うことが明らかとなった。一方、変異株も酸性条件下では転写が活性化しており、変異株の変異は転写レベルでは起こっていないことが明らかとなった。さらに*Enterococcus hirae*及び好熱性細菌PS-3の H^+ -ATPase抗体を用いたウェスタン解析より酸性条件下で実際に両株の H^+ -ATPaseタンパク量が増大していることが示唆された。

これより親株では酸性条件下で H^+ -ATPase遺伝子の転写活性を高め、酵素タンパク量を増加させて細胞内pHを維持していることが明らかとなった。変異株の変異は酵素タンパク当たりの活性に関わるサブユニットの構造遺伝子中の変異と推測された。

以上のように本研究は乳酸菌に関する学術的な寄与が大きいものであるとともに、今後これらの知見を応用し、他の乳酸菌種においても H^+ -ATPase欠損による酸性感受性菌の構築、また H^+ -ATPase遺伝子をクローニング後その発現を制御することによって、種々のレベルの酸性感受性株、さらには耐酸性株の構築など応用的にも寄与するところが大きな成果である。

よって、審査員一同は、天 知 誠 吾が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。