

学 位 論 文 題 名

乳業用乳酸球菌のプラスミドに関する研究

学位論文内容の要旨

豊富な栄養素を含む牛乳は、タンパク質3.1%、脂質3.6%、糖質4.6%、無機質0.7%前後の組成からなり、ビタミンB群の含量が高く、有機酸としてクエン酸を0.1%程度含んでいる。発酵乳製品のスターターとして用いられる乳酸菌は、牛乳中の糖質の99%を占めるラクトースを分解する乳酸発酵でエネルギーを獲得し、遊離アミノ酸の少ない条件下でカゼインの分解からアミノ酸要求性を満たし、また、クエン酸を分解しピルビン酸からジアセチルを生じさせている。その結果、製品には特有のテクスチャーやフレーバーが付与される。しかし、中温性チーズスターターとして用いられる乳酸球菌 (*Lactococcus lactis*) では、これらの性質が比較的不安定であることが知られている。本研究では、これらの諸性質がプラスミドに関わるものであることを明らかにし、基礎的な知見を得る目的でそれぞれの遺伝子を解析した。

本研究の結果を要約すると以下のとおりである。

1. 農林水産省畜産試験場で保有する *Lactococcus lactis* からプラスミドDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動法により分析した結果、供試37株全てにプラスミドが存在し、その大きさは1から80 MDa、1から12種類の多様な分布パターンが示された。さらに、キュアリング処理によるプラスミドの脱落が、ラクトース発酵性、プロテイナーゼ生産性やクエン酸資化性に関与することが確かめられた。
2. *L. lactis* における形質転換法を開発する目的でプロトプラストの形成と再生条件を検討し、リゾチームと粗  $\alpha$ -アミラーゼ処理による効率的なプロトプラスト形成法を開発した。粗  $\alpha$ -アミラーゼは、夾雑するプロテアーゼ活性による溶菌促進効果に加えて何らかの細胞壁保護効果を働かせていることが示唆された。また、浸透圧調節剤として20%スクロースを用い、2.5 mM塩化マグネシウム、2.5 mM塩化カルシウム、2.5%ゼラチンを加えた細胞壁再生用培地を開発した。
3. *L. lactis* のプロトプラストを用いポリエチレングリコール (PEG) 処理による形質転換法の条件を検討した。マレイン酸緩衝液中PEG6000 (終濃度24%) 室温30分処理により、エリスロマイシン耐性プラスミド pAM  $\beta$  1 で  $10^4/\mu\text{g}$  DNA の形質転換効率を得られた。
4. さらに、エレクトロポレーションによる形質転換法の条件を検討した。40 mM DL-トレオニンを含む培地で培養した対数増殖期の細胞を0.3 Mスクロースに懸濁し、0.2 mmギャップキュベットを用いて、電圧10 kV/cm、電気容量25  $\mu\text{F}$ 、抵抗200  $\Omega$  の条件で1回パルス印加することで、ベクター pGKV21 を用いた場合に  $10^5/\mu\text{g}$  DNA の形質転換効率を得られた。

5. ラクトース非発酵性となった*L. lactis*プラスミドフリー株を受容菌として用い、ラクトースプラスミドの形質転換によりラクトース発酵性が回復することを確認した。*L. lactis*では、ホスホエノールピルビン酸依存ホスホトランスフェラーゼ系 (PEP - PTS) によるラクトース輸送系が知られ、細胞内に取り込まれたラクトース-6-リン酸はホスホ- $\beta$ -ガラクトシダーゼにより分解される。そこで、ホスホ- $\beta$ -ガラクトシダーゼを大腸菌にクローン化して解析した。ホスホ- $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を発現した4.4kb *Xho* Iフラグメントは、塩基配列の解析から468アミノ酸をコードする*lacG*遺伝子を含み、*Staphylococcus aureus*や*Lactobacillus casei*の*lacG*遺伝子とそれぞれ82%、54%のDNAレベルでの相同性を示した。*lacG*遺伝子の上流には568アミノ酸をコードするPEP - PTS系の*lac E*遺伝子が存在していた。

6. クエン酸利用性*L. lactis*のいくつかの株で8.3 kbクエン酸プラスミドを確認し、制限酵素地図を作製した。ベクターpGKV259に*Eco* RIユニークサイトで連結後、*L. lactis*に導入した。クエン酸利用性*L. lactis*から得られたプラスミドフリー株では、クエン酸パーミターゼ遺伝子の導入によりクエン酸利用性が回復し、クエン酸非利用性*L. lactis*に導入した場合でも菌体内へのクエン酸の取り込みが認められたことから、この遺伝子単独でクエン酸の取り込みを行い、その他のクエン酸代謝に関わる酵素の遺伝子は染色体上にコードされると示唆された。さらに、*L. lactis* 13675のクエン酸プラスミドからサブクローン化した2.2 kb *Bgl* II - *Xba* Iフラグメントの解析から、442アミノ酸をコードする疎水性膜タンパク質のクエン酸パーミターゼ遺伝子が同定された。

7. *L. lactis* 5株のプラスミドからプロテイナーゼ活性を発現するフラグメントをクローン化し、*L. lactis* 565由来のプロテイナーゼ遺伝子(*prt P*) については、完全な長さの塩基配列を決定した。制限酵素地図から既に報告のある*L. lactis*のプロテイナーゼ遺伝子(*prt P*) と相同性が高い細胞壁結合型セリンプロテイナーゼであると示唆されたが、プロモーター領域にわずかな違いが認められた。さらに、*L. lactis* 565由来*prt P*の塩基配列解析から、このプレプロ構造を含め1960アミノ酸をコードするプロテイナーゼは、活性中心がAsp30、His94、Ser433の三つ組み触媒基で構成され、*Bacillus subtilis*のセリンプロテイナーゼと相同性が高いことが示された。*L. lactis* Wg2, 763, SK11のプロテイナーゼとそれぞれ29、31、66アミノ酸が異なっていたが、特徴的なシグナルペプチド、メンブランアンカーなどのモチーフは保存されていた。*prt P*遺伝子の上流には、ATリッチなプロモーター領域をはさんで逆向きに転写されるきわめて保存性の高い*prt M*遺伝子が存在し、その産物は分泌型リポタンパク質で、プロテイナーゼの活性型への成熟に関わっている。

8. *L. lactis* DRC - 1のバクテリオシン生産性について検討した結果、分子の大きさが60 kbのプラスミドpDR1-6が関与していることが判明し、バクテリオシン非生産プラスミドフリー株*L. lactis* DRC1021を用いてクローニングを行った。バクテリオシン活性を発現する*Hin* dIII 0.4 kbフラグメントは塩基配列の解析からラクトコクシンAオペロンの一部であると同定され、*lcn D*, *lcn A*, *lci A*の完全なORFを含んでいた。*lcn A*のコードするラクトコクシンAは*L. lactis*の生産する小分子量熱安定性のバクテリオシンとして知られ、21アミノ酸のシグナルペプチドを持つ分泌型疎水性ペプチドで、54アミノ酸からなる活性型ペプチドは、リセプターを介して細胞質膜に作用すると考

えられている。*lci A*はこれに対する免疫作用を持つ98アミノ酸のペプチドをコードしている。*lcn D*はその上流の*lcn C*（完全にはクローン化されなかった）とともにバクテリオシンの分泌輸送系を構成している。さらに、*lcn D*を含む領域をプローブとして用い、やはりバクテリオシン活性を発現する9.5 kb *Eco RI*フラグメントをクローン化した、これは*lcn D*、*lcn M*、*lcn N*、*lci M*で構成されるラクトコクシンMオペロンと同一と定された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 本 間 守

## 学 位 論 文 題 名

### 乳業用乳酸球菌のプラスミドに関する研究

本論文は、和文160頁、図40、表12、引用文献334、7章からなり、ほかに参考論文17編が付されている。

*Lactococcus lactis*は主として発酵乳製品のスターターとして用いられる乳酸菌であり、牛乳中のラクトースを分解して乳酸を生成し、カゼインを分解することで、製品に特有のテクスチャーやフレーバーを与えている。しかし、これらの産業上重要な性質は比較的不安定であり、その原因の解明が期待されていた。

本研究では、これらの諸性質がプラスミドに関わるものであることを明らかにし、基礎的な知見を得る目的で、それぞれの遺伝子を解析したものである。結果は、第3章実験の部で以下の8つの節により述べられている。

第1節では、プラスミドの分布について述べられ、次の内容が含まれている。

農林水産省畜産試験場で保有する*Lactococcus lactis*を実験材料として用い、プラスミドDNAをアガロースゲル電気泳動法により検出した結果、供試37株全てにプラスミドが確認された。さらに、キュアリング処理によるプラスミドの脱落が、ラクトース発酵性やクエン酸資化性に関与することが確かめられた。

第2節では、プロトプラストの形成および再生法について述べられ、次の内容が含まれている。

*L. lactis*において、リゾチームと粗 $\alpha$ -アミラーゼ処理による効率的なプロトプラスト形成法と浸透圧調節剤として20%スクロースを用いた再生用培地を開発した。

第3節では、プロトプラスト形質転換法について述べられ、次の内容が含まれている。*L. lactis*のプロトプラストを高張緩衝液中でポリエチレングリコール処理することで、プラスミドDNAによる形質転換が可能となった。

第4節では、エレクトロポレーション法について述べられ、次の内容が含まれている。DL-トレオニンを含む培地で培養後、0.3 Mスクロースに懸濁、10 kV/cm以上の電圧でパルスをかけることで、より簡便で効率的な形質転換法を開発した。

第5節では、ラクトース発酵性について述べられ、次の内容が含まれている。

*L. lactis*では、PEP-PTS系によるラクトース輸送系が知られ、細胞内に取り込まれたラクトース-6-リン酸はホスホ- $\beta$ -ガラクトシダーゼにより分解される。クローン化された4.4 kb *Xho*Iフラグメントはホスホ- $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を大腸菌で発現し、塩基配列の解析から、*Staphylococcus aureus*の*lac G*遺伝子と相同性が高いことが確かめられた。*lac G*遺伝子の上流にはPEP-PTS系の酵素IIの存在が認められた。

第6節では、クエン酸利用性について述べられ、次の内容が含まれている。

クエン酸プラスミドの導入により、*L. lactis*でのクエン酸パーミアーゼの発現が認められた。サブクローン化した2.2 kb *Bgl* II-*Xba* Iフラグメントの解析から、442アミノ酸をコードする疎水性膜タンパク質のクエン酸パーミアーゼ遺伝子が同定された。

第7節では、プロテイナーゼ生産性について述べられ、次の内容が含まれている。

*L. lactis* 5株からプロテイナーゼ活性を発現するフラグメントをクローン化した。さらに、塩基配列の解析からこのプレプロ構造を含め1960アミノ酸をコードする細胞壁結合型プロテイナーゼ遺伝子(*prt P*)は、*Bacillus subtilis*のセリンプロテイナーゼと相同性が高いことが示された。*prt P*遺伝子の上流には、ATリッチなプロモーター領域をばさんで逆向きに転写される*prt M*遺伝子が存在し、その産物は分泌型リポタンパク質で、プロテイナーゼの活性型への成熟に関わると考えられている。

第8節では、バクテリオシン生産性について述べられ、次の内容が含まれている。

*L. lactis* DRC-1のバクテリオシン生産性には、プラスミドpDR1-6が関与していることを明らかにした。クローニングで得られた、バクテリオシン活性を発現する*Hin* dIII 4.0 kbフラグメントは、ラクトコクシンAオペロンの一部であると同定され、*lcn D*, *lcn A*, *lci A*の完全なオープンリーディングフレームを含んでいた。さらに、*lcn D*を含む領域をプローブとして用い、やはりバクテリオシン活性を発現する9.5 kb *Eco* RIフラグメントをクローン化した。これはラクトコクシンMオペロンと同定された。

以上、*Lactococcus lactis*について産業上重要な性質としてのラクトース発酵性やプロテイナーゼ生産性がプラスミドに関与することを明らかにし、これらの遺伝子を解析し基礎的知見を得た。これらは乳業用乳酸球菌の分野において基礎的及び産業的な貢献を果たすものである。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と併せて、本論文の提出者藤田 泰仁は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。