

学 位 論 文 題 名

醤油関連乳酸菌のアミノ酸分解とその利用に関する研究

学位論文内容の要旨

多くの細菌が有機酸、アミノ酸を脱炭酸する事が知られている。発酵食品の発酵過程でも乳酸菌による有機酸の脱炭酸が知られており、醤油諸味中でも観察されている。こうしたアミノ酸の脱炭酸の生理的意義は、比較的最近までまったく知られていなかった。

乳酸菌のアミノ酸脱炭酸は、多くの場合アミン類を生成するなど、産業上有用というよりは有害である場合が多いが、産業上有用な乳酸菌のアミノ酸脱炭酸としては、醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の一部の菌株によるアスパラギン酸の脱炭酸が挙げられる。この反応は醤油をまろやかにするため醸造上好ましいものであるが、その遺伝的背景はまったく知られていなかった。

更に、アスパラギン酸脱炭酸性の乳酸菌は有用であることはわかっていたが、実用上はファージ汚染の問題から連続的に安定して使用するのが困難であった。

このような背景のもとで本研究の目的は、醤油関連乳酸菌のアミノ酸脱炭酸の生理的意義を明らかにし、特に醸造産業上有用なアミノ酸脱炭酸菌である醤油乳酸菌のアスパラギン酸脱炭酸性の遺伝的背景を明らかにし、さらにこうしたアスパラギン酸脱炭酸性醤油乳酸菌を実用化する目的でファージ抵抗性菌株を育種することである。

1. 醤油汚染菌 *Lactobacillus* sp. Strain E1 株のグルタミン酸： γ -アミノ酪酸対向輸送に伴うエネルギー生成

減塩醤油や醤油含有調味料は細菌汚染により発泡事故を起こすことがある。こうした発泡の原因菌は乳酸菌であり、アスパラギン酸をアラニンに脱炭酸する乳酸菌とグルタミン酸を γ -アミノ酪酸(GABA)に脱炭酸する乳酸菌がある事が知られている。アスパラギン酸を脱炭酸する汚染菌 *Lactobacillus* sp. M3 株についてはアスパラギン酸脱炭酸に伴い、proton-motive metabolic cycle によりエネルギーを生成することが報告されている。

汚染菌 *Lactobacillus* sp. E1 株は醤油中のグルタミン酸を脱炭酸する乳酸菌である。この脱炭酸反応はATP生成を伴う事が観察された。このATP生成はナイジェリシンにより完全に阻害され、バリノマイシンで部分的に阻害されることから、主としてproton-motive forceの Δ pH成分が関与していることが示唆された。また、*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)によりATP生成が阻害されることから、proton-motive forceが H^+ -ATPaseによりATP生成エネルギーに変換されると考えられた。また、細胞外に高濃度のGABAが存在する時、ATP生成が阻害されたことから、グルタミン酸の取り込みはGABAとの対向輸送である事が示唆された。この菌のグルタミン酸脱炭酸酵素はピリドキサル酵素であり酵素活性は、主として細胞質画分に存在したことから、脱炭酸に共役したポンプ酵素ではないと考えられた。これらの結果から、この菌のグルタミン酸脱炭酸に伴い、グルタミン酸とGABAの電気化学的に不等価な

antiport とグルタミン酸脱炭酸に伴う細胞内プロトン消費により生成した proton-motive force を用いて、DCCD 感受性 H⁺-ATPase により ATP が生成すること、すなわち、アスパラギン酸脱炭酸菌 *Lactobacillus* sp. M3 株と同様、proton-motive metabolic cycle によりエネルギーを生成していることが示めされた。

2. 醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* D10 株のプラスミドにコードされたアスパラギン酸脱炭酸能

醤油乳酸菌 *T. halophilus* D10 は醤油諸味中のアスパラギン酸をアラニンに脱炭酸し、醤油の味をマイルドにする。この菌株を ethidium bromide によりキュアリング処理することにより、アスパラギン酸脱炭酸能を欠落した株が高頻度で得られた。このことから D10 株のアスパラギン酸脱炭酸能がプラスミド上にコードされていることが推定されたので、キュアリング株のプラスミドプロファイル調べた。アスパラギン酸脱炭酸能を欠落した株 6 株は、すべて 22kb のプラスミド pD1 が脱落していた。一方、アスパラギン酸脱炭酸能を示した株 6 株および親株はすべてこの pD1 を保有していた。pD1 は *Sa*I による制限切断で 10kb と 12kb の 2 つの断片に分かれた。10kb 断片の塩基配列を調べたところ、少なくとも 2 つの ORF が見られ、1 つはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼに相同性が見られた。アミノ酸アミノトランスフェラーゼとアミノ酸デカルボキシラーゼの近縁性からこの ORF をアスパラギン酸デカルボキシラーゼ遺伝子と推定し、AspD と名づけた。もう一つの ORF は 12 の膜貫通領域構造を持つことが推定されたことからキャリアー蛋白質と思われ、アスパラギン酸キャリアーと推定し AspT と名づけた。AspD、AspT はそれぞれの上流に RBS 配列が見られ、AspD の下流に AspT があつた。AspD 上流にはプロモーター様配列も見られた。以上より、アスパラギン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 AspD とアスパラギン酸キャリアー遺伝子 AspT からなるオペロン構造の存在が示めされた。

3. アスパラギン酸分解性醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* D10 株のファージ抵抗性株育種とその利用

アスパラギン酸脱炭酸能を有する醤油乳酸菌 *T. halophilus* D10 のファージ抵抗性菌育種を試みた。始めにファージ共存下に生育したコロニーより選択したが、それらのいくつかは不安定な溶原株と考えられた。こうした株を醤油醸造に使用すると、前培養もしくは諸味中で予期せぬファージ誘導をおこし、諸味乳酸発酵を不安定にする可能性があること、またこうした株を使い続けることにより、工場のファージレベルが上昇し、抵抗性株に感染しうる変異ファージの出現が早まると予想され、実用株には適さないと考えられた。そこでレプリカ法によりファージとの直接接触無しに抵抗性菌を 1 次選択した。さらに選択された候補株の中から、親株と同様の生育曲線を描く株を 2 次選択した。この方法で得られたファージ抵抗性株 No. 1 と No. 4 はどちらの株も親株と同様アスパラギン酸脱炭酸性を示し、糖発酵性パターンも親株と同一であつた。これらの株のファージ吸着能は変化していなかったため、吸着以降のファージ増殖過程のどこかが阻害されていると推定された。両株とも ϕ D-10 以外のファージに対する感受性の獲得は見られなかった。

No.1 株、No.4 株とも液体培地中のみならず諸味液汁や諸味中でも D10 のホモロガスファージ ϕ D-10 共存下に良好な生育を示した。また ϕ D-10 の増加もみられなかった。乳酸発酵終了時に諸味の香りを官能的に調べたところ、変異株による諸味は親株によるものと、官能的にも同等であつた。さらに酵母発酵後、5 ヶ月の熟成後でも、親株添加諸味と官能的な違いは見られなかった。以上の結果より、ファージ抵抗性変異株 No. 1、No. 4 は醤油醸造に使用しうる優良菌株であると思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

醤油関連乳酸菌のアミノ酸分解とその利用に関する研究

本論文は5章からなり、図9、表26、文献70を含む総頁数82の日本語論文である。別に参考論文5編が付されている。

多くの細菌が有機酸、アミノ酸を脱炭酸する事が知られている。発酵食品の発酵過程でも乳酸菌による有機酸の脱炭酸が知られており、醤油諸味中でも観察されている。こうしたアミノ酸の脱炭酸の生理的意義は、比較的最近までまったく知られていなかった。

産業上有用な乳酸菌のアミノ酸脱炭酸としては、醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の一部の菌株によるアスパラギン酸の脱炭酸が挙げられる。この反応は醤油をまろやかにするため醸造上好ましいものであるが、その遺伝的背景はまったく知られていなかった。

そして、アスパラギン酸脱炭酸性の乳酸菌は有用であることはわかっていても、実用上はファージ汚染の問題から連続的に安定して使用するのが困難であった。

このような背景のもとで本研究の目的は、醤油関連乳酸菌のアミノ酸脱炭酸の生理的意義を明らかにし、その中でも醸造産業上有用なアミノ酸脱炭酸菌である醤油乳酸菌のアスパラギン酸脱炭酸性の遺伝的背景を明らかにし、さらにこうしたアスパラギン酸脱炭酸性醤油乳酸菌を実用化する目的でファージ抵抗性菌株を育種することである。

1. 醤油汚染菌 *Lactobacillus* sp. Strain E1 株のグルタミン酸： γ -アミノ酪酸対向輸送に伴うエネルギー生成

汚染菌 *Lactobacillus* sp. E1 株は醤油中のグルタミン酸を脱炭酸する乳酸菌である。この脱炭酸反応はATP生成を伴う事が観察された。このATP生成はナイジェリシンにより完全に阻害され、バリノマイシンで部分的に阻害されることから、主としてproton-motive forceの ΔpH 成分が関与していることが示めされた。また、*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)によりATP生成が阻害されることから、proton-motive forceが H^+ -ATPaseによりATP生成エネルギーに変換されると考えられた。また、細胞外に高濃度のGABAが存在する時、ATP生成が阻害されたことから、グルタミン酸の取り込みはGABAとの対向輸送である事が示唆された。これらの結果から、この菌のグルタミン酸脱炭酸に伴い、グルタミン酸とGABAの電気化学的に不等価な antiport とグルタミン酸脱炭酸に伴う細胞内プロトン消費により生成し

た proton-motive force を用いて、DCCD 感受性 H^+ -ATPase により ATP が生成することが示めされた。

2. 醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* D10 株のプラスミドにコードされたアスパラギン酸脱炭酸能

醤油乳酸菌 *T. halophilus* D10 は醤油諸味中のアスパラギン酸をアラニンに脱炭酸し、醤油の味をマイルドにする。この菌株を ethidium bromide によりキュアリング処理することにより、アスパラギン酸脱炭酸能を欠落した株が高頻度で得られた。アスパラギン酸脱炭酸能を欠落した株 6 株は、すべて 22kb のプラスミド pD1 が脱落していた。pD1 は *SaI* による制限切断で 10kb と 12kb の 2 つの断片に分かれた。10kb 断片の塩基配列を調べたところ、少なくとも 2 つの ORF が見られ、推定されるアミノ酸配列からアスパラギン酸デカルボキシラーゼ遺伝子とアスパラギン酸キャリアー遺伝子と推定した。アスパラギン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 AspD とアスパラギン酸キャリアー遺伝子 AspT からなるオペロン構造の存在が示めされた。

3. アスパラギン酸分解性醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* D10 株のファージ抵抗性株育種とその利用

アスパラギン酸脱炭酸能を有する醤油乳酸菌 *T. halophilus* D10 のファージ抵抗性菌育種を試みた。始めにファージ共存下に生育したコロニーより選択したが、それらのいくつかは不安定な溶原株と考えられ、実用株には適さないと考えられた。そこでレプリカ法によりファージとの直接接触無しに抵抗性菌を 1 次選択した。さらに選択された候補株の中から、親株と同様の生育を示す株を 2 次選択した。この方法で得られたファージ抵抗性株 No. 1 と No. 4 はファージ吸着能は変化していなかった。

No.1 株、No.4 株とも液体培地中のみならず諸味液汁や諸味中でも D10 のホモログスファージ ϕ D-10 共存下に良好な生育を示した。乳酸発酵終了時に諸味の香りを官能的に調べたところ、変異株による諸味は親株によるものと、官能的にも同等であった。

以上のように今回の申請者の研究による醤油関連乳酸菌のアミノ酸分解とその利用に関する研究は、産業的に有用な醤油乳酸菌の遺伝的背景を解明するとともに新たな有用菌株の育種を行ったものである。

よって審査員一同は、樋口猛が博士（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