

学 位 論 文 題 名

Studies on Thermotolerant Lactic Acid Bacteria

(耐熱性乳酸菌に関する研究)

学位論文内容の要旨

乳酸菌は内生孢子非形成グラム陽性細菌の多様なグループから成り、発酵食品生産に広く関与し、最近ではプロバイオティクスとして大きく注目されている。乳酸菌の分野ではこれまでに多くの研究が行われているが、耐熱性という視点からの研究はほとんど見当たらない。ここで耐熱性乳酸菌 (TLAB) とは、中温菌に属するが、より高い温度でも生育することが可能なものと定義した。いくつかの酪農スターター乳酸菌、即ち *Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus helveticus*、*Streptococcus thermophilus* は、その生育温度の範囲から耐熱性を持つ種であると考えることができ、自然界から実際にどのような TLAB が分離されるのかは不明である。

このような背景から、本研究は耐熱性に着目して、日本、タイ両国の様々なサンプルから多くの TLAB を分離し、それらを生理学的及び分子生物学的手法により同定し、乳酸菌の多様性解析を目的として行われたものである。その結果、収集した TLAB の中に新種を発見し、*Lactobacillus thermotolerans* と命名して登録した。諸性質を検討した結果、本菌種はこれまで知られている *Lactobacillus* 属乳酸菌の中で最も高い生育適温を示し、調べた範囲では鶏の腸管に特異的に分布することが明らかになった。

1. TLAB の分離及び同定

日本、タイ両国の様々な自然界のサンプルから比較的高温、即ち 40～50℃、の培養条件を用いて 162 株の TLAB を分離した。これらについて、まずグラム染色性、形態、カタラーゼ活性、乳酸生成能を調べた。さらに大腸菌の V1 と V3 領域に相当する保存性の低い 16S rRNA 遺伝子の約 500 塩基を PCR で増幅し、その配列を決定することにより同定を行った。得られた塩基配列を GenBank の登録配列と比較した結果、分離株は *Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Bacillus* 属に分類され、大部分の株が GenBank に登録された既知の菌株と 99% 以上の相同性を示した。しかし、タイ国の鶏糞から分離された 6 株は例外であり、様々な *Lactobacillus* spp. と最高でも 92.0% の相同性であった。これらの分離株については、さらに 16S rRNA 遺伝子の全長の相同性を調べた結果、5 株 (G12、G22、G24、G35、G43、G44) において 95% と低い値を示した。したがって、これらは新種であることが期待された。

2. 新規 TLAB の特徴

タイ国の鶏糞から得られた 5 株の完全長 16S rRNA 遺伝子の配列と、データベースから得られたこれらの相同配列をもとに新種と思われる株の系統分類を行った。得られた系統樹は、これら 5 株が *Lactobacillus* 属の *Lactobacillus casei*/Pediococcus グループに属することを示した。G35 株にもっとも近縁の種は *Lactobacillus mucosae* DSM 13345^T と *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931^T で、それぞれ相同性は 95.1%と 95.0%であった。分離 5 株のクラスターと *L. fermentum* ATCC 14931^T との分岐パターンは高いブーツストラップ値で支持された。これら 5 株は、G+C 含量、脂肪酸組成と DNA-DNA 相同性試験などの生理的および分子生物学的特徴の比較においても、近縁種 *L. mucosae* や *L. fermentum* とは明確に区別された。G+C 含量は 50 mol%であり、直鎖不飽和脂肪酸 C_{18:1} を主成分として含んでいた。*L. fermentum* と *L. mucosae* との DNA-DNA 相同性は 25 %以下であり、これらが *Lactobacillus* 属における新しいグループを代表するものであることが明らかとなった。これら 5 株はヘテロ乳酸発酵を行い、至適生育温度は 42°C、許容最大生育温度は 48-50°C であり、*Lactobacillus* 属としては最も高い生育温度特性を示した。従ってこれらの分離株に対し *L. thermotolerans* の命名を提案し、G35 を基準株として全株を我が国およびドイツの公的菌株保存機関に寄託した (JCM 11425^T=DSM 14792^T)。

3. 分子学的手法を用いた糞便サンプル中の *L. thermotolerans* の検出と定量

鶏糞中の *L. thermotolerans* を検出するため、本菌および鶏糞中に菌数が多い *Enterococcus* 属乳酸菌に特異的な 16S rRNA を標的としたオリゴヌクレオチドプローブをデザインした。これらのプローブの特異性を、ドットブロットハイブリダイゼーション (dot blot hybridization) や FISH (fluorescent in situ hybridization)により確認した。真性細菌の 16S rRNA 領域に相補的な EUB338 ユニバーサルプローブを、サンプル中に存在するすべての細菌を検出するポジティブコントロールとして使用した。プローブ EUB338 による定量では、鶏糞中の全細菌細胞数はサンプルによって 2×10^{10} から 9×10^{10} cells/g dry weight の間で変化した。すべてのサンプルにおいて優占するグループは enterococci グループで、全細菌数の 7.1%に相当した。lactobacilli グループと bifidobacteria グループに対するプローブで検出された細胞は、全細胞数に対し、それぞれ平均 1.7%と 2.2%であった。*L. thermotolerans* 特異的プローブに対しては、タイ国の鶏糞だけでなく北大農場 (北方生物圏フィールド科学センター)の鶏糞からも、全細菌数の平均 0.1%の割合で検出された。DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)を用いて鶏以外の動物における本新種の分布を検討した結果、本種は馬、ロバ、ブタ、ヒトの糞便には存在しないことが示された。したがって、本種は鶏の腸管に特異的に存在する乳酸菌であることが強く示唆された。

以上の様に、本研究は TLAB の多様性解析を行う中で新規 TLAB を発見し、これを新種 *L. thermotolerans* として確立、登録したものであり、学術的価値が高いだけでなく、家禽の腸管微生物の分類学および生態学に基礎的知見を加えるものである。さらに将来、本菌種が家禽のプロバイオティクスとして利用されるなどの可能性も期待されるところである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横田	篤
副査	教授	富田	房男
副査	教授	松井	博和
副査	助教授	浅野	行蔵

学位論文題名

Studies on Thermotolerant Lactic Acid Bacteria

(耐熱性乳酸菌に関する研究)

本論分は、5章からなり、図12、表16、文献81を含む総頁数108の英文論文であり、他に参考論文1編が添えられている。

乳酸菌は内生孢子非形成グラム陽性細菌の多様なグループから成り、発酵食品生産に広く関与している。最近ではプロバイオティクスとして大きく注目され、これまでに多くの研究が行われているが、耐熱性という視点からの研究がほとんど見当たらない。ここで耐熱性乳酸菌 (TLAB) とは、中温菌に属するが、より高い温度でも生育することが可能なものと定義した。いくつかの酪農スターター乳酸菌は、その生育温度の範囲から耐熱性を持つ種であると考えられることができるが、自然界から実際にどのような TLAB が分離されるのかは不明である。

そこで本研究は、耐熱性に着目して、日本、タイ両国の様々なサンプルから多くの TLAB を分離後、それらを生理学的及び分子生物学的手法により同定し、乳酸菌の多様性解析を目的として行われた。その結果、収集した TLAB の中に新種を発見し、*Lactobacillus thermotolerans* と命名して登録した。諸性質を検討した結果、本菌種はこれまで知られている *Lactobacillus* 属乳酸菌の中で最も高い生育適温を示し、調べた範囲では鶏の腸管に特異的に分布することが明らかになった。

1. TLAB の分離及び同定

日本、タイ両国の様々な自然界のサンプルから、40～50℃の培養条件を用いて 162 株の TLAB を分離した。これらについて、まずグラム染色性、形態、カタラーゼ活性、乳酸生成能を調べた。さらに大腸菌の V1 と V3 領域に相当する 16S rRNA 遺伝子の約 500 塩基を PCR で増幅し、その配列を決定した。得られた塩基配列を GenBank の登録配列と比較した結果、分離株は *Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Enterococcus*、*Streptococcus*、*Bacillus* 属に分類され、その多くが既知の菌株と 99%以上の相同性を示した。しかし、タイ国の鶏糞から分離された 6 株は例外であり、さらに 16S rRNA 遺伝子の全長の相同性を調べた結果、5 株において様々な *Lactobacillus* spp. との相同性が 95%と低いことから、これら

は新種であることが期待された。

2. 新規 TLAB の特徴

タイ国の鶏糞から得られた 5 株の完全長 16S rRNA 遺伝子の配列と、データベースから得られたこれらの相同配列をもとに新種と思われる株の系統分類を行った。得られた系統樹は、これら 5 株が *Lactobacillus* 属の *Lactobacillus casei*/*Pediococcus* グループに属することを示した。もっとも近縁の種は *Lactobacillus mucosae* DSM 13345^T と *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931^T であるが、分離 5 株のクラスターと *L. fermentum* ATCC 14931^T との分岐パターンは高いブーツストラップ値で支持された。これら 5 株は、G+C 含量 50 mol%、直鎖不飽和脂肪酸 C_{18:1} を主成分として含んでおり、生理的および分子生物学的特徴の比較においても、近縁種 *L. mucosae* や *L. fermentum* とは明確に区別された。*L. fermentum* と *L. mucosae* との DNA-DNA 相同性は 25 % 以下であり、これらが *Lactobacillus* 属における新しいグループを代表するものであることが明らかとなった。これら 5 株はヘテロ乳酸発酵を行い、至適生育温度は 42℃、許容最大生育温度は 48-50℃ であり、*Lactobacillus* 属としては最も高い生育温度特性を示した。従ってこれらの分離株に対し *L. thermotolerans* の命名を提案し、G35 を基準株として全株を我が国およびドイツの公的菌株保存機関に寄託した (JCM 11425^T=DSM 14792^T)。

3. 分子学的手法を用いた糞便サンプル中の *L. thermotolerans* の検出と定量

鶏糞中の *L. thermotolerans* を検出するため、本菌および鶏糞中に菌数が多い *Enterococcus* 属乳酸菌に特異的な 16S rRNA を標的としたオリゴヌクレオチドプローブをデザインした。これらのプローブの特異性を、ドットプロットハイブリダイゼーション (dot blot hybridization) や FISH (fluorescent in situ hybridization) により確認した。真性細菌の 16S rRNA 領域に相補的な EUB338 ユニバーサルプローブを、サンプル中に存在するすべての細菌を検出するポジティブコントロールとして使用した。すべてのサンプルにおいて優占するグループは enterococci グループで、全細菌数の 7.1% に相当した。lactobacilli グループと bifidobacteria グループに対するプローブで検出された細胞は、全細胞数に対し、それぞれ平均 1.7% と 2.2% であった。*L. thermotolerans* 特異的プローブに対しては、タイ国の鶏糞だけでなく北大農場 (北方生物圏フィールド科学センター) の鶏糞からも、全細菌数の平均 0.1% の割合で検出された。DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) を用いて鶏以外の動物における本新種の分布を検討した結果、本種は馬、ロバ、ブタ、ヒトの糞便には存在しないことが示された。したがって、本種は鶏の腸管に特異的に存在する乳酸菌であることが強く示唆された。

以上の様に、本研究は TLAB の多様性解析を行う中で新規 TLAB を発見し、これを新種 *L. thermotolerans* として確立、登録したものであり、学術的価値が高いだけでなく、家禽の腸管微生物の分類学および生態学に基礎的知見を加えるものである。さらに将来、本菌種が家禽のプロバイオティクスとして利用されるなどの可能性も期待されるところである。

よって審査員一同は、ピアヌッチ ニャンサップが博士 (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。