

氏名	渡邊 正行
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博乙第4442号
学位授与の日付	平成27年 3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第5条第2項該当)
学位論文の題目	<i>Lactobacillus</i> 属細菌の環境適応能の解析とその応用に関する研究
論文審査委員	教授 宮本 拓      教授 坂口 英      教授 上村 一雄

### 学位論文内容の要旨

乳酸菌は自然界に幅広く分布し、発酵食品のスターターとしてだけでなく、プロバイオティクスとしても利用されている。工業的に利用するには製造時、保存時の生残性が重要となる。そこで本論文では乳、植物、消化管という生育環境の異なる *Lactobacillus* 属細菌について生育条件、ストレス耐性メカニズム、ストレス耐性と生残性の向上方法について検討した。

まず、モンゴル国の伝統的アルコール発酵乳であるアイラグから分離された *Lactobacillus helveticus* SBT11261 の生育条件について調査したところ、生育至適 pH が 5.5 以下であり、酸素、アルコールの存在や栄養分の不足により、pH による生育の差がより明確になった。これは基準株を含めた分離源の異なる *L. helveticus* と生育条件が異なることが示唆された。この株は伝統的な発酵乳で他の乳酸菌や酵母などの微生物と共存した状態で生育しており、生存するためにこれらの形質を進化させてきた可能性が考えられる。

次に植物を生育環境とする *Lactobacillus plantarum* WCFS1 を用い、培地にヘミンとメナキノンを追加して培養することで呼吸鎖(ETC)を発現させた菌体と発現させない菌体で生育とストレス耐性を比較した。その結果、ETC を発現した菌体は発現しない菌体より菌体量が増加し、カタラーゼが活性化されて酸化ストレス耐性が高まることが明らかになった。これと同時に ETC を発現した菌体は低 pH ストレス耐性が低下することも明らかになった。*Bacillus cereus* などでは低 pH ストレスにより菌体内に活性酸素種 (ROS) が生成することが知られているが、*L. plantarum* WCFS1 についても ETC 発現菌体は菌体膜透過性の増大と菌体内 ROS の増加が認められ、これらが低 pH ストレス耐性に関与している可能性が示唆された。これらの結果から、呼吸状態で培養することにより、低 pH には感受性が高いが、酸化ストレスに高い耐性を持つ菌体を大量に生産できる可能性が示唆された。

さらに *Lactobacillus gasseri* SBT2055 を用い、ストレス耐性と生残性向上の方法について検討した。その結果、糖源を除去した培地で培養することで飢餓処理をした菌体は過酸化水素耐性と低 pH 耐性が向上することを見出した。飢餓処理により、各種のストレス耐性に関与する遺伝子発現量は減少し、低 pH ストレス条件下での菌体内 ROS 生成も減少した。また *Lactobacillus* 属細菌 6 株について飢餓処理をしたところ、消化管を生育環境とする *L. gasseri* SBT2055、*L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> と *Lactobacillus johnsonii* JCM2010<sup>T</sup> の 3 株のみ、保存中の生残性が向上した。消化管由来の *Lactobacillus* 属細菌に飢餓ストレスを与えることでストレス耐性と生残性が向上し、産業利用における有用性が高まる可能性を見出した。

本研究において *Lactobacillus* 属細菌は多様な生育環境に適応し、代謝経路やストレス耐性メカニズムなど異なる生存戦略を保有していることが明らかになった。

## 論文審査結果の要旨

乳酸菌は自然界に幅広く分布し、発酵食品のスターターとしてだけでなく、プロバイオティクスとしても利用されている。工業的に利用するには製造時、保存時の生残性が重要となる。そこで本論文では乳、植物、消化管という生育環境の異なる *Lactobacillus* 属細菌について生育条件、ストレス耐性メカニズム、ストレス耐性と生残性の向上方法について検討した。

まず、モンゴル国の伝統的アルコール発酵乳であるアイラグから分離された *Lactobacillus helveticus* SBT11261 の生育条件について調査したところ、生育至適 pH が 5.5 以下であり、酸素、アルコールの存在や栄養分の不足により、pH による生育の差がより明確になった。このように SBT11261 株の生育条件は、基準株を含めた生育環境の異なる他の *L. helveticus* と異なっていた。すなわち、この菌株は伝統的なアルコール発酵乳の中で他の乳酸菌や酵母などの微生物と共存した状態で生育しており、生存するためにこれらの形質を進化させてきた可能性が考えられる。

次に植物を生育環境とする *Lactobacillus plantarum* WCFS1 を用い、培地にヘミンとメナキノンを追加して培養することで呼吸鎖(ETC)を発現させた菌体と発現させない菌体で生育とストレス耐性を比較した。その結果、ETC を発現した菌体は発現しない菌体より菌体量が増加し、カタラーゼが活性化されて酸化ストレス耐性が高まることが明らかになった。これと同時に ETC を発現した菌体は低 pH ストレス耐性が低下することも明らかになった。*Bacillus cereus* などでは低 pH ストレスにより菌体内に活性酸素種 (ROS) が生成することが知られているが、*L. plantarum* WCFS1 についても ETC 発現菌体は菌体膜透過性の増大と菌体内 ROS の増加が認められ、これらが低 pH ストレス耐性に関与している可能性が示唆された。これらの結果から、呼吸状態で培養することにより、低 pH には感受性が高いが、酸化ストレスに高い耐性を持つ菌体を大量に生産できる可能性が示唆された。

さらに *Lactobacillus gasseri* SBT2055 を用い、ストレス耐性と生残性向上の方法について検討した。その結果、糖源を除去した培地で培養することで飢餓処理をした菌体は過酸化水素耐性と低 pH 耐性が向上した。飢餓処理により、各種のストレス耐性に関与する遺伝子発現量は減少し、低 pH ストレス条件下での菌体内 ROS 生成も減少した。また *Lactobacillus* 属細菌 6 株について飢餓処理をしたところ、消化管を生育環境とする *L. gasseri* SBT2055、*L. gasseri* JCM1131<sup>T</sup> と *Lactobacillus johnsonii* JCM2010<sup>T</sup> の 3 株のみ、保存中の生残性が向上した。消化管由来の *Lactobacillus* 属細菌に飢餓ストレスを与えることでストレス耐性と生残性が向上し、産業利用における有用性が高まる可能性を見出した。

以上のように、本研究において *Lactobacillus* 属細菌は多様な生育環境に適応し、代謝経路やストレス耐性メカニズムなど異なる生存戦略を保有していることを示唆する新たな知見を得た。同時に、ストレス応答を利用した発酵食品の生残性向上の方策を明らかにしたものであり、博士 (農学) の学位に値するものと判定する。