

氏 名	ハス其木格 (HASIQIMUGE)		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	農 学		
学位授与番号	博甲第	7 1 6 0	号
学位授与の日付	2 0 2 4 年 9 月 2 5 日		
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	Comparative research on antibacterial peptides, bacteriocins, produced by two strains of lactic acid bacteria, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> 406 and 213M0, isolated from Mongolian traditional fermented milk, airag (モンゴルの伝統的発酵乳アイラグから分離した乳酸菌 2 菌株 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> 406 と 213M0 が産生する抗菌ペプチドのバクテリオシンに関する比較研究)		
論文審査委員	教授 木村 康二	教授 畑生 俊光	准教授 荒川 健佑
学位論文内容の要旨			
<p>Antibacterial peptides, bacteriocins, produced by lactic acid bacteria have recently attracted attention as biopreservatives that can replace chemical preservatives. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> 406 and 213M0 were isolated from different samples of Mongolian traditional fermented milk, airag, and were previously found to produce antilisterial bacteriocin-like inhibitory substances. Although draft genome sequencing revealed that the both strains encode genes related to bacteriocins, mesentericins Y105 and B105, the antibacterial properties of the two strains were slightly different. In order to provide more scientific support for the application of strains 406 and 213M0 and their bacteriocins as effective food biopreservatives, this study aimed to clarify the differences between them by re-comparing their antibacterial properties and bacteriocin-related gene clusters, and by purifying and identifying their bacteriocins.</p> <p>Firstly, cell growth and antibacterial activity were compared between strains 406 and 213M0. As a result, strain 406 showed better growth and higher antibacterial activity against most indicator strains than strain 213M0. However, the antibacterial activity of strain 213M0 was higher than that of strain 406 against only two indicator strains. Secondly, DNA sequencing revealed two and three plasmids in strain 406 and 213M0, respectively. Each one (pLM406A and pLM213M0A) of them had almost identical sequences of the <i>mes</i> gene cluster (<i>mesIYCDEFHGBG</i>) responsible for the biosynthesis of and immunity to mesentericins Y105 and B105, except for the shorter <i>mesG</i> gene in strain 213M0. In addition, plasmid pLM213M0B in strain 213M0 harbored the secretion genes (<i>mesDE</i>) of mesentericins Y105 and B105. Subsequently, both strains completely lost the antibacterial activity by removing plasmids pLM406A in strain 406 and all three plasmids in strain 213M0, indicating that the antibacterial activity of the two strains was due to plasmid-encoded bacteriocins. Thirdly, the bacteriocins of the two strains were purified by HPLC, and then identified by peptide sequencing and mass spectrometry. It was found that strain 406 produced almost equal amounts of mesentericin Y105 and more mesentericin B105 (including the B105 oxidized form), compared to strain 213M0. In addition, only strain 213M0 produced a novel bacteriocin named as “mesentericin M” without high homology to any other known bacteriocins. The C-terminal three amino acid residues (GYG) were posttranslationally truncated to produce mature mesentericin M. The mesentericin M-related seven genes (<i>mesKJLMNE<sub>2</sub>D<sub>2</sub></i>) around the structural gene (<i>mesM</i>) were found on plasmid pLM213M0B. The secretion genes <i>mesD<sub>2</sub>E<sub>2</sub></i> were initially thought to be the genes (<i>mesDE</i>) for mesentericins Y105 and B105.</p> <p>It was concluded that the differences in the antibacterial properties between strain 406 and 213M0 were mainly due to the higher production of mesentericin B105 by strain 406 and the production of mesentericin M only by strain 213M0. The finding in this study would greatly contribute to the future application of <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> 406 and 213M0 and their bacteriocins as effective food biopreservatives.</p>			

## 論文審査結果の要旨

リステリア菌は低温環境でも増殖可能なため、欧米を中心に汚染したチルド食品等による重篤な食中毒の原因となっている。通常、食品中のリステリア菌の制御には合成保存料が用いられているが、近年、消費者の合成添加物に対する忌避傾向が強まっていることから、代替となる天然由来の保存成分、中でも乳酸菌の作り出す抗菌成分の利用が期待されている。乳酸菌が産生する抗菌物質は種々あるが、中でも抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、高い抗菌性と耐熱性、食品風味への低影響性、および安全性から、その利用が期待されている。そこで本学位論文では、食品保存成分としての利用を目指し、モンゴルの伝統的発酵乳のアイラグから分離した乳酸菌 2 菌株、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 406 および 213M0 の抗リステリア性バクテリオシンに関する詳細な比較研究を行っている。両菌株は類似した抗菌特性を有し、同一のバクテリオシン（メセンテリシン Y105・B105）の生合成遺伝子群を有していると以前の研究より明らかにされているが、微妙な特性の差異があることも示唆されていた。そこでまず、両菌株の抗菌特性の差異を明確にするために、バクテリオシンの生産性と抗菌スペクトルを比較し、406 株の方が概ね高い抗菌活性を有していることを確認した。しかし、一部の細菌株に対しては、213M0 株の方が高い抗菌性を示し、両者のバクテリオシンが異なることを示唆する結果を得た。次に、両菌株のゲノム情報からプラスミド配列を特定し、産生されるバクテリオシンがプラスミド上にコードされているメセンテリシン Y105・B105 であるという遺伝的確認を得た。そして、そのバクテリオシンの精製・分析によって、確かに両菌株がメセンテリシン Y105・B105（およびメセンテリシン B105 の酸化型）を産生することを明らかにした。また同時に、213M0 株のみによって、新奇のバクテリオシンが産生されていることを明らかにした。メセンテリシン M と命名されたこの新奇バクテリオシンは、驚くべきことに、C 末端の 3 残基が翻訳後修飾によって切断されていた。C 末端が翻訳後切断されたバクテリオシンはこれまでに報告がなく、メセンテリシン M が初めての報告例となった。また、メセンテリシン M は他に高い配列相同性のある既知バクテリオシンがなく、この点においても新奇であった。すなわち、両菌株の抗菌特性の差異は、213M0 株によってのみ産生されるメセンテリシン M に主に起因することを本研究では明らかにしている。本学位論文研究で得られた知見は、両菌株およびそのバクテリオシンを食品利用する際の基盤情報となるだけでなく、数多くの乳酸菌研究・バクテリオシン研究に新たな重要情報を提供するものと評価できる。よって、本学位論文は博士（農学）を与えるに値するものと本審査委員会では判断した。