

審査委員会報告書

審査委員会報告書

[課程博士用]

報告番号	甲 第 号	授与年月日	平成 年 月 日
学位記番号	第 号	研究科名	環境共生学 研究科
学位 (専攻分野)	博 士 (環境共生学)	専攻名	環境共生学 専 攻
ふりがな 氏 名	かわはら あい 河原 あい	生年月日	平成7年 1月 15日生
		国 籍	(外国人のみ)
論文課題	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PUK6 の特性と その多成分バクテリオシンに関する研究		
主論文の冊数	1 冊		
審査 委員 会 委員	主査 熊本県立大学 教授 松崎 弘美 副査 熊本県立大学 教授 白土 英樹 副査 九州大学大学院 准教授 善藤 威史		
審査の結果の要旨 最終試験の結果の要旨	別 紙 1		
	別 紙 2		
審査委員会 の 意 見	審査の結果、博士 (環境共生学) の学位を授与できると認める。		

- 【注】 1 報告番号は、事務局 (学生課) において記入する。
 2 学位記番号は、授与年月日は、研究科教育会議の審議後に研究科において記入する。
 3 国籍は、外国人のみ記入する。

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 河原 あい

乳酸菌が生産するタンパク質性の増殖阻害物質、バクテリオシンはその安全性の高さから化学合成の食品添加物に代わる天然の食品保存料として期待されている。現在実用化されているバクテリオシンに nisin A があるが、酸性領域でのみ安定であり、中性～アルカリ性では不可逆的に失活すること、単独使用ではグラム陰性菌には抗菌活性を示さない、などの特性から使用用途が一部の食品に限定されている。そこで、多種多様なバクテリオシンおよびそれを生産する乳酸菌の探索が行われている。

本研究では、熊本県球磨地方で 800 年以上食されてきた味噌漬け豆腐からバクテリオシン生産乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 を分離・同定した。味噌漬け豆腐の保存性の高さの要因の一つに、バクテリオシン生産乳酸菌が寄与し、有害菌を排除していることが考えられる。*L. plantarum* の多くは、発酵食品のスターター菌として使用されるとともに、一部の株はヒトに有益な効果をもたらすプロバイオティクスとしても知られる。そこで、PUK6 株の特性を調べ、乳酸菌の発酵食品における応用可能性を評価し、PUK6 株が生産するバクテリオシンの精製、同定、バクテリオシン生合成関連遺伝子群の同定および解析、新規バクテリオシン様遺伝子の機能解析、そして PUK6 株が生産する多成分バクテリオシンそれぞれの抗菌スペクトルを調べることを目的とした。

PUK6 株の特性を調べた結果、PUK6 株は 7.5% NaCl に耐性を示し、L-乳酸よりも D-乳酸を多く生産することがわかった (D/L 乳酸比は 1.42)。また、PUK6 株は人工胃液 (0.32 % ペプシン含有 MRS 液体培地、pH 2.5) 中で 100% 生残し、コレステロール (最終濃度 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、0.2% タウロコール酸ナトリウムおよび 0.2% チオグリコール酸ナトリウムを含む MRS 液体培地でも増殖が良好で、菌体へのコレステロール吸収・吸着率は 28.7 % であった。したがって、PUK6 株を食事とともに摂取した場合、プロバイオティクスの条件である胃酸や胆汁酸に耐えて生きて腸に届き、コレステロールの菌体への吸収・吸着作用によるコレステロール低下作用が期待された。

PUK6 株の培養液上清から、硫安沈殿、透析、逆相系前処理カラム Sep-Pak Plus tC18 および逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を行い、バクテリオシンを精製した。RP-HPLC により、複数のピークで抗菌活性が検出され、それぞれを分取してアミノ酸配列分析を行った結果、既知バクテリオシンの plantaricins A、F および NC8 β と同定性を示した。続いて、それらのバクテリオシンに特異的なプライマーを用いて PUK6 株ゲノム DNA の PCR、PCR 増幅産物のクローニング、プライマーウォーキングを行い、PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の全塩基配列 (約 20 kb) を決定した。その結果、PUK6 株が plantaricins A、EF、NC8 の 3 種類のバクテリオシン (plantaricins EF および NC8 は 2 分子ペプチドからなるバクテリオシン) を生産することを明らかにしたこと。さらに、*pln* locus 上の 2 つの機能不明遺伝子 (*orf1* および *orf2*) の推定翻訳産物にバクテリオシン前駆体に特徴的なダブルグリシン (Gly-Gly) 配列が存在することを見出し、RT-PCR により *orf1* および *orf2* の転写を確認した。Orf1 および Orf2 の推定成熟ペプチド (mOrf1 および mOrf2) を化学合成し、指標菌 *Lactilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T に対する作用機序を調べた結果、mOrf2 は指標菌の増殖に影響せず、mOrf1 は増殖を抑制し静菌作用を示した。さらに mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物は指標菌に対して殺菌作用を示し、相乗作用が見られた。これについては、DAPI および PI の蛍光染色によって、指標菌の細胞膜破壊が蛍光顕微鏡により観察された。以上より、*orf1* および *orf2* をそれぞれ *plnPUK6a* および *plnPUK6b* 遺伝子と名付け、それらから発現した新規の 2 分子ペプチドバクテリオシンを plantaricin PUK6 と命名した。PUK6 株が 4 種類のバクテリオシン (plantaricins A、EF、NC8 および PUK6) を生産することを明らかにし、化学合成ペプチドを用いた抗菌活性試験を行った結果、抗菌スペクトルはそれぞれ異なることが明らかと

なった。

以上より、*L. plantarum* PUK6 は耐塩性、DL-乳酸生産性、胃酸・胆汁酸耐性、コレステロール吸収・吸着作用を有することを明らかにした。さらに新たに見出した新規バクテリオシンの plantaricin PUK6 を含めて、抗菌性が異なる少なくとも 4 種類のバクテリオシンを生産することを明らかにし、それらバクテリオシンの生合成機構を提唱した。

上記の研究成果は、乳酸菌が生産する多成分バクテリオシンの生合成機構の解明とバクテリオシンの食品分野等への利用に大きく貢献すると考えられる。多成分バクテリオシンを生産する *L. plantarum* PUK6 を発酵食品製造におけるスターター菌として利用することで、耐性菌の出現が抑制され、その保存性を向上させるとともに、プロバイオティクスとしての健康機能性も期待でき、本研究分野の発展に寄与するものである。よって、河原あい氏の本研究は、博士（環境共生学）の学位に相応しいものと認める。

主 査 熊本県立大学 教授 松崎 弘美

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 河原 あい

成 績 ・ 合 格

審査委員一同は、令和4年 2月 9日、本論文申請者に対し論文の内容および関連事項について試験を行った結果、博士（環境共生学）の学位を受けるに必要な学識を有する者と認め、合格と判定した。

主査	熊本県立大学	教授	松崎 弘美	
副査	熊本県立大学	教授	白土 英樹	
副査	九州大学大学院	准教授	善藤 威史	