

氏名	中 村 昇 二		
学位(専攻分野)	博 士(農 学)		
学位授与番号	博 甲 第 1195 号		
学位授与の日付	平成 5 年 9 月 30 日		
学位授与の要件	自然科学研究科生産開発科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	クエン酸発酵性 <i>Lactococcus lactis</i> におけるプラスミド DNA の 機能解析および代謝特性の改造に関する研究		
論文審査委員	教授 片岡 啓	教授 中村怜之輔	教授 内田 仙二
	教授 田野 達男	教授 大滝 英治	

#### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

乳業用乳酸菌の一種である *Lactococcus* 属細菌の場合，発酵上重要な性質の多くがプラスミド DNA によって支配されている例が知られている。そのため，本菌属では菌株改良を目的としたプラスミド DNA の機能解析が強く望まれている。

かかる観点から本研究では，芳香性物質生成に優れ，発酵乳製品への応用範囲が広い *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* を選定し，プラスミド DNA の機能を解析するとともに，その結果をもとに代謝特性の改造を行った。特に本菌属のラクトース代謝機能が遺伝的に不安定であることに着目し，接合法によるラクトース代謝機能の安定化を試みた。そして，単離した交配菌のプラスミド DNA 分析を通じて，ラクトース代謝機能の安定性とプラスミド DNA の存在様式に関して考察した。さらに交配菌の有効利用の一つとしてホエー発酵飲料への応用を試み，そのスターターとしての有効性を検討した。

#### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

*Lactococcus* 属細菌は，発酵乳製品の製造にとって極めて重要な乳酸菌である。そして本菌属の場合，発酵上重要な性質がプラスミド DNA によって支配されている例が見いだされていることから，プラスミド DNA を利用した菌株改良技法が注目されている。しかしながら，代謝機能とプラスミド DNA の関係が解明されているのはまだ一部の菌株にすぎず，多くの *Lactococcus* 属細菌では，菌株改良を目的としたプラスミド DNA の機能解析が

望まれている。

本論文は、かかる観点からクエン酸からの優れた芳香物質生成能を有する *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (*Lactococcus diacetylactis*) について、プラスミド DNA の検索とその機能解析を試み、それらの結果をもとに接合法による代謝特性の改造を行ったものである。

その結果、*Lactococcus diacetylactis* NIAI N-7 では、ラクトース代謝機能、クエン酸代謝機能ならびに蛋白分解機能がそれぞれ異なる 3 種のプラスミド DNA に支配されていること、そしてラクトース代謝機能に関与しているプラスミド DNA が遺伝的に極めて不安定であることを明らかにした。さらに各プラスミド DNA と酵素産生との関係について検討し、それぞれのプラスミド DNA がラクトース分解酵素、クエン酸透過酵素および蛋白分解酵素の産生に係っていることを証明した。特に、 $\beta$ -カゼインに作用する蛋白分解酵素の産生が 34Mdal と 23Mdal の 2 種類のプラスミド DNA によって支配されているという結論は、現在のところ他の菌株では知られておらず、蛋白分解機能の発現機序を考えるうえで大変興味深い知見といえる。他方、*Lactococcus diacetylactis* N-7-2E (Lac<sup>-</sup>, Prt<sup>-</sup>, Em<sup>R</sup>) を受容菌とする接合実験で、安定なラクトース代謝機能を有する交配菌 (*Lactococcus diacetylactis* 2E-52-1) を作出しており、プラスミド DNA を利用した菌株改良法の有効性を実証した。本交配菌 2E-52-1 株は、実際にホエー発酵飲料の風味増強への応用を試みているが、他の発酵乳製品への利用も期待されるであろう。

以上のように、本論文では *Lactococcus diacetylactis* NIAI N-7 におけるプラスミド DNA の機能について詳細な解析を行い、新知見を示すと同時に、プラスミド DNA を利用した菌株改良の可能性についても明らかにしている。これらの成果は、*Lactococcus diacetylactis* の代謝特性を分子遺伝学的に解析するにあたり貴重な情報をもたらすのみならず、菌株改良技法の確立にとっても貴重な知見でもあり、発酵技術の発展に大いに寄与するものと思われる。

以上によって、本論文は博士（農学）の学位論文に値するものと判定した。