

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）	氏名	安武 哲也
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LP28 のゲノム遺伝子配列の特異性と細胞外多糖の特徴に関する研究			
論文審査担当者			
主査	教授 松尾 裕彰	印	
審査委員	教授 太田 茂		
審査委員	准教授 木下 英司		
〔学位論文の要旨〕			
<p><i>Pediococcus (P.) pentosaceus</i> LP28 は，ロンガン（龍眼：果物の一種）から分離された乳酸菌である。既に，LP28 菌体を経口摂取すると，高肥満マウスの脂肪肝が改善され，体重増加と体内脂肪の蓄積が抑制される現象が観察されている。更に，ヒト臨床試験を通じて，LP28 株の死菌体の摂取でさえ，BMI 値を有意に減少させることが確認されている。</p> <p>本研究では，LP28 株の抗肥満効果を解明することを最終目的として，本菌の全ゲノムを解読し，かつ，菌株特異的な遺伝子配列を調べた。さらに，特異的遺伝子産物として見出された細胞外多糖（EPS）の化学構造を解析した。</p> <p>まず，LP28 株からゲノム DNA を抽出し，2 種類の次世代シーケンサーを用いて全塩基配列を決定した。その結果，本菌株のゲノムは環状であり，総塩基数は 1,774,865 bp (GC 含有率 37.1%) で，かつ 1 種類のプラスミド(5,366 bp : GC 含有率 36.5%) を有することが明らかとなった。さらに，得られた塩基配列から open reading frame (ORF) 数を予測した結果，染色体からは 1,683 個，プラスミドからは 6 個の ORF が見出された。</p> <p>次に，環状ゲノム上に存在する 1,683 個の ORF に関して，既に全ゲノム遺伝子が報告されている他の <i>P. pentosaceus</i> 4 株のそれらと比較した。その結果，すべての株に対しアミノ酸配列の相同性が 50%以下の遺伝子が 71 個見出された。これらのうち，BLAST 検索によってタンパク質の機能予測が可能であった 53 個の遺伝子がコードするタンパク質機能は 6 種（一次代謝関連，遺伝子制御，膜輸送，外来タンパク質，細胞外多糖生合成，セルラーゼ）に分類された。この 53 個の遺伝子の中には，別種の乳酸菌が保有する遺伝子に対しても相同性が 50%以下の遺伝子が 8 個存在し，そのうちの 4 個が EPS の生合成遺伝子であった。その結果から，LP28 株が他の乳酸菌とは異なる EPS を産生すること，並びに EPS の特異的構造が本菌株の抗肥満効果に関与している可能性が示唆された。なお，プラスミド上の</p>			

ORF もすべて相同性が 50%以下であり，DNA 複製に関わる遺伝子と相同性を示す 2 個以外は機能不明であった。EPS 生合成に関与すると考えられる上記 4 つの遺伝子の近傍にある遺伝子を解析した結果，12 個の遺伝子で構成される EPS 生合成遺伝子クラスターが存在することが判明した。これら 12 遺伝子のうち，4 個は他の *P. pentosaceus* と高い相同性を有していたが，それ以外の 8 個は他の乳酸菌に対する相同性が最大でも 68%であった。また，これらの中には多糖をピルビン酸化する酵素と 35%の相同性を有するタンパク質が存在していた。次に，LP28 株が産生する EPS の化学構造を解析するため，多糖を含まない semi-defined medium (SDM) を使用して LP28 株を培養し，EPS を精製した。培養濾液にトリクロロ酢酸 (TCA) を添加してタンパク質を沈殿除去し，得られた上清のアセトン沈殿画分を採取した。その画分をヌクレアーゼ処理した後，再度，TCA 沈殿とエタノール沈殿操作を実施後，透析して粗精製 EPS を取得した。これを陰イオン交換樹脂にて分画した結果，LP28 株が産生する EPS は中性 EPS および酸性 EPS に分けられることが判明した。

LP28 由来の中性 EPS と酸性 EPS の分子量はそれぞれ約 40 kDa, 50 kDa と推定された。また，各 EPS を加水分解して HPLC 法で分析した結果，中性 EPS からは，グルコース，マンノース，グルコサミンが検出された。一方，酸性 EPS からは，グルコース，マンノース，グルコサミンのほか，ガラクトースが検出された。さらに，中性および酸性 EPS の両加水分解物中に酢酸が検出されたほか，酸性 EPS からはピルビン酸も検出された。これらの結果から，LP28 株が産生する EPS は，グルコース，マンノース，*N*-アセチルグルコサミンからなる中性 EPS と，グルコース，マンノース，*N*-アセチルグルコサミン，ガラクトース，ピルビン酸からなる酸性 EPS であることが分かった。

乳酸菌が産生するピルビン酸化 EPS については，これまで，一例しか報告されていない。しかも，本報告例とは明らかに構成糖が異なっている。すなわち，LP28 株が産生する EPS は LP28 菌株に特異的と言える。今後は，本 EPS の抗ウイルス活性を始めとする生理機能を調査するとともに，LP28 株の肥満抑制機能と EPS との関係を検証することを通じ，LP28 株の医薬品や健康サプリメントへの応用が期待される。

以上の結果から，本論文は LP28 乳酸菌に特有な新規 EPS を見出した点において高く評価される。また，得られた知見は今後の機能性多糖研究の発展に大きく寄与するものである。よって審査委員会全員は，本論文が著者に博士（薬学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。