

## 論文審査の結果の要旨

|   |                   |        |                     |
|---|-------------------|--------|---------------------|
| 博士の専攻分野の名称  | 博士（薬科学）           | 氏名     | MD<br>RAKHIMUZZAMAN |
| 学位授与の条件   | 学位規則第 4 条第① 2 項該当 |        |                     |
| 論文題目  |                   |        |                     |
| Development of a system of high ornithine and citrulline production by a plant-derived lactic acid bacterium, <i>Weissella confusa</i> K-28<br><br>(植物由来乳酸菌 <i>Weissella confusa</i> K-28 におけるオルニチン及びシトルリン高生産システムの構築)   |                   |        |                     |
| 論文審査担当者   |                   |        |                     |
| 主査  | 教授                | 松尾 裕彰  | 印                   |
| 審査委員  | 教授                | 古武 弥一郎 |                     |
| 審査委員  | 准教授               | 熊谷 孝則  |                     |
| 〔論文審査の結果の要旨〕  |                   |        |                     |
| <p>「プロバイオティクス」とは、適量を摂取したとき、ヒトの健康に有益な働きをする生きた微生物」と定義される。ヒトの食生活との関わりのなかで、免疫賦活作用、抗肥満作用、抗アレルギー作用を有する乳酸菌は、代表的プロバイオティクスの 1 つである。オルニチンは、タンパク質の構成アミノ酸ではないが、生体に発生する有毒なアンモニアを尿素に変えて無毒化する尿素回路において重要な働きを有する。また、睡眠の質の向上や筋肉疲労の低減化作用などの保健機能性も報告されている。シトルリンはオルニチンと同様に、尿素回路を構成するアミノ酸である。体内に取り込まれたシトルリンは、尿素回路でアルギニンに変換されるが、シトルリンはアルギニンを含めた他の多くのアミノ酸とは異なり、肝臓の初回通過効果を受けない。従って、シトルリンの摂取により、アルギニンを直接摂取する以上に体内のアルギニン濃度を高めることが出来る。また、シトルリンは生体にとって欠かせない NO 合成酵素による NO 産生を促す作用をもつ。</p> <p>本研究では、植物を分離源として、保健機能性を有する乳酸菌の探索を実施し、エビスグサの葉から取得された植物由来乳酸菌 <i>Weissella (W.) confusa</i> K-28 が、オルニチンおよびシトルリンを生産することを見出した。さらに、K-28 株を利用したオルニチンとシトルリンの高生産培養技術を開発した。</p> <p>まず、乳酸菌の培養に汎用されている MRS 培地を用い、キャップ付き試験管にて K-28 株を静置培養した。その際、オルニチンの生合成に必要な基質であるアルギニンを 0.5 w/v % 添加し、培地の初発 pH のオルニチン生産における影響を評価した。その結果、pH 4.5 から pH 9.0 のおいては、pH 5.0~8.0 の範囲で、ほぼ同程度のオルニチンを産生し、その範囲を外れると、有意に生産性が低下した。その結果から、pH 5.0~8.0 の間の中央値である pH 6.5 を培養開始時の至適 pH とした。次に、至適培養温度について評価した。20, 25, 28, 37℃で培養して、オルニチン産生量を 24 h ごとに 120 h まで測定した結果、乳酸菌の増殖性が最も高く、かつ、オルニチン生産量が高かった 28℃が至適培養温度であることを明らかにした。</p> |                   |        |                     |

決定した至適初発 pH と至適温度にて培養を行い、培地に添加する初発アルギニン濃度のオルニチン生産量への影響を解析した。0.5~3.0 (w/v %) の範囲でアルギニンを添加して K-28 株を培養した結果、添加アルギニン濃度が高くなると産生されるオルニチン濃度は上昇するが、アルギニンからオルニチンへの変換率は低下することが分かった。そこで、一定時間ごとにアルギニンをフィードしながら培養する Fed-batch 培養を試みた。その結果、培養開始時にアルギニンを高濃度添加しておくよりも、Fed-batch 培養することで変換効率が上昇することを明らかにした。

Fed-batch 培養では、オルニチンが一定濃度に達した後も、アルギニンを添加し続けると、オルニチン生産量は上昇しないにも関わらず、アルギニンが消費されることが観察された。HPLC による分析を行った結果、そのとき特異的に増加しているピークに該当する分子は、シトルリンであった。さらに、シトルリンの産生量は培養の継続によって増加し、オルニチンとほぼ同量まで達することが確認された。

K-28 株から、オルニチン生合成に関与していると考えられる 4 つの酵素遺伝子 (*wkaA-D*: arginine deiminase, ornithine carbamoyltransferase, carbamate kinase および arginine ornithine antiporter) を含む遺伝子クラスターをクローニングし、その塩基配列を決定した。これらの 4 遺伝子は、同じ向きに並んで存在することからポリシストロニックに転写されると推測された。また、転写調節因子をコードすると示唆される遺伝子 (*wkaR*) がこの遺伝子クラスターに隣接して存在することも明らかにした。さらに、K-28 株の静置培養で認められた高オルニチン生産性は、好気培養下では *wkaA-D* 転写減少と共に消失した。同時に、*wkaR* の転写も減少していたことから、*wkaR* 遺伝子はオルニチン生産を正に調節していると推測された。

以上の結果から、本論文は植物乳酸菌 *W. confusa* K-28 が、生体にとって重要なアミノ酸であるオルニチンとシトルリンを同時に生産できる優れた菌株であることを明らかにすると共に、それらの高生産培養技術を確立し、保健機能性食品としての応用開発研究につながる極めて重要な知見を示した点で高く評価され、薬学分野、特に未病・予防領域研究の発展に資するところ大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬科学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。