

## 論文の内容の要旨

論文題目    乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* が生産する多糖類の増産を  
目的としたパルス電界処理に関する研究

氏    名    大羽哲郎

### 1. 研究の背景と目的

乳酸菌による多糖類生産に関する研究としては、多糖類の一次構造解明、ゲル形成能や粘弾性などの物性研究、多糖類が示す保健機能、さらには、多糖類が生合成されるメカニズムや生合成に関わるゲノム研究などが行われてきた。中でも *Lactococcus lactis* 種の乳酸菌は、発酵乳やフレッシュチーズ製造に伝統的に利用されており、特に北欧の国々やコーカサス地方で利用されてきた多糖類産生能を有する亜種 *cremoris* 乳酸菌 (*L. cremoris* 菌) は、生産された多糖類がもたらす特有の物性や、免疫賦活作用やインフルエンザウィルス感染抑制効果などの保健機能が注目されている。ところが、多糖類生産を制御する発酵技術に関する研究には大きな進歩はなく、発酵温度や時間、発酵基質や発酵調整剤などによる技術にほかならない。

一方、遺伝子組み換えを実施する際において、細胞や核への物理的な遺伝子導入手段として利用されてきたパルス電界処理は、近年、加熱処理に替わる殺菌技術としても実用化されており、電気穿孔がもたらす細胞構造の破壊による殺菌効果を食品加工へ応用した技術である。電界処理は、細胞質内外の電解質にモーメントを与えることから、電気穿孔に至るほどの電界でなくても、細胞における代謝や生命活動に影響を与えるものと考えられる。本研究の新規性は、電気穿孔で菌体を物理的に破壊し殺菌に至らしめるようなパルス電界処理ではなく、菌の生活性を一定レベルで維持する穏和な処理条件により、多糖類の生合成に有益な効果をもたらす新たなエンジニアリング技術開発にあり、有益な効果が認められる場合にはその作用機序を解明し、産業レベルでの応用を前提とした技術確立までを目標とした。

## 2. 各章の研究で得られた知見

第1章は乳酸菌による多糖類に関する既存の研究に関する総説であり、多糖類の一次構造の解明、ゲル形成能や粘弾性などの物性研究や多糖類が示す保健機能の研究、さらには、多糖類が生合成されるメカニズムや生合成に関わるゲノム研究で得られた知見の概要をとりまとめた。また、限られた知見ではあるものの、パルス電界処理を殺菌目的以外で微生物に応用した研究例についても紹介し、本研究の目的および全体構想についてまとめた。

第2章では、*L. cremoris* 菌 0495 株および C4 株に関して、培地成分や培養方法を変化させることにより、発酵特性や多糖類生産性および多糖類の構成糖がどのように変化を示すか調べた。その結果、既報の知見も含めて *L. cremoris* 菌株間で構成糖や構造の相同性があり、いずれもグルコース・ガラクトース・ラムノースにリン酸基を含んだ酸性多糖類であることが示唆された。また、多糖類生産は対数増殖期後半から定常期にかけて活発化することから、パルス電界処理はその生育ステージで実施すべきであることを結論した。

第3章では、*L. cremoris* 菌が生産するリン酸化多糖類が示す物性について調べ、パルス電界処理を行う上で障害となるようなゲル形成能を示さないこと、リン酸基によるマイナスチャージが分子間・分子内のもつれにおいて静電的反発力となっていることなどが明らかとなった。これにより、発酵中のパルス電界処理が可能であるものの、多価電解質であるリン酸化多糖類やその生合成において、パルス電界処理がもたらす影響を考察することが重要であることが示唆された。

第4章では、*L. cremoris* 菌によるリン酸化多糖類の生合成を解明するため、菌体から抽出した糖前駆体や多糖類重合ユニット構造の中間体を分析した。その結果、ウンデカプレノールを中間体キャリアーとして、グルコース、ガラクトース、ラムノースの順でユニットの合成が進むことを明らかにした。完成したユニットが細胞質膜外側に転送され、さらに重合途上の中間体に組み込まれるように進行する重合反応に対して、パルス電界処理による細胞質内の電解質に与えるモーメントがどのような影響を与え、さらに、パルス電界の中で細胞質膜外面での重合反応がどのような影響を受けるかが、本エンジニアリング技術のポイントとなることが示唆された。

第5章では、化学合成培地で発酵中の *L. cremoris* 菌に対して初めてパルス電界処理を検討し、電気穿孔の閾値とされている  $1 \text{ V}/\mu\text{m}$  ( $= 10 \text{ kV}/\text{cm}$ ) を下回る  $8 \text{ kV}/\text{cm}$  のパルス電圧で、 $1 \mu\text{s}$  の幅のパルスを供試菌 1 世代時間中に平均で 200 回印加する穏和な処理

において、多糖類生産が促進され最大で生産量が約 2 倍となることが明らかとなった。なお、パルス電界処理により多糖類の分子量が低下することが判明し、細胞質膜外側にウンデカプレノールで固定されている重合途中の中間体が、パルス電界処理により解放され培地中に放出されたとする仮説を提起した。

第 6 章では、パルス電界処理による多糖類増産効果についての仮説を検証するために、メタボローム解析・走査電子顕微鏡観察・ウンデカプレノールの形態分析などを行った。メタボローム解析の結果からは、細胞質膜の修復に関与すると見られる脂肪酸の濃度低下以外には、パルス電界処理の有無による大きな変化は見られなかったことから、本技術を発酵乳製品のような食品に応用したとしても、発酵物の風味に大きな影響を与える技術ではないことが示唆された。一方、電子顕微鏡観察やウンデカプレノールの形態分析の結果から、乳酸発酵が進み pH が低下した状態でパルス電界処理を行うことにより、細胞表面で水素イオンの電気濃縮が起こり、糖鎖中間体とウンデカプレノールとを結合するリン酸 2 エステル結合が開裂したことが示唆された。それによりウンデカプレノールのリサイクルが向上し、多糖類の増産効果となったことが検証された。

第 7 章では、多糖類増産効果を目的としたパルス電界処理条件の至適化について検討し、パルス電界の極性、パルス幅、パルス電圧、パルス周波数などの処理条件の違いによる、多糖類増産効果や菌体の生活性への影響を調べ、本技術を産業スケールで応用するための基礎的知見をまとめた。パルス電界における極性の変化は影響が無かったものの、パルス周波数が高いほど多糖類増産効果が低下する傾向が明らかであり、パルス電圧を低下させて平均電流を一定にする補正をしても、パルス周波数が高いほど多糖類増産効果が低下した。なお、多糖類増産効果の要因である水素イオンの電気濃縮は、パルスピーク時の電流や平均電流と相関のある現象であり、実験で行われた処理条件内であれば、電流値が高いほど多糖類増産効果も高くなることが示唆された。パルス電圧については 8 kV/cm 以下で全ての実験を行ったが、ピーク電流で 3 A 以上または平均電流で 10 mA 以上印加し、その際パルス周波数を 3,000 Hz 以下とすることにより、高い多糖類増産効果が得られることが明らかとなった。

第 8 章では、本研究で新規発見となったパルス電界処理による乳酸菌の多糖類増産効果を踏まえ、多糖類発酵におけるエンジニアリング技術として総括し、実用化のために要する検討事項についてまとめた。また、穏和なパルス電界処理がもたらす細胞表層への影響から考えられる、微生物発酵におけるエンジニアリング技術としての潜在性についてまとめた。

### 3. 研究総括

所期の目的どおり、パルス電界処理が *L. cremoris* 菌における多糖類生産を高める効果を有する新規知見を得て、さらにその作用機序を解明するとともに、各種のパルス処理条件と多糖類増産効果との関連を明らかにすることができた。電気化学的な処理が多糖類の生合成プロセスに作用することで起こる現象が、結果的に多糖類の増産効果となっており、乳酸菌の発酵途中にパルス電界処理を行うユニークな技術の基盤を構築することができた。パルス電界処理を行いながら発酵を継続して生産される多糖類は、通常発酵で生産される多糖類と比較すると分子量が低下するため、粘度などの物性が同等にはならない。従って、*L. cremoris* 菌による発酵乳の特有の物性をさらに差別化する目的には、本技術は適さないかもしれないが、リン酸化多糖類が示す免疫賦活作用やインフルエンザウィルス感染抑制効果などの保健機能は、その構造に依存するものであるため、パルス電界処理で生産量を高めることができるのは大きな利点となる。

本研究の供試菌株である球菌で認められた多糖類増産効果が、他のどのような乳酸菌であっても、また、どのような構造の多糖類であっても同様に現れるのかという疑問に対して十分な回答はできないが、桿菌の長さの向きとパルス電界の電気力線が一致する場合には、クーロン力が高まり電気穿孔による菌体破壊で多糖類が十分に生産されなくなる可能性や、多糖類に電氣的チャージがある方が多糖類中間体を切り離す効果が高まる可能性が考えられるが、検証の余地を残している。

パルス電界処理は微生物の細胞表層の状態に変化を与え、生合成される複合糖質の存在形態にも変化を与えるものと思われ、菌体同士の連結や生育環境への接着など、菌体表面において複合糖質の糖鎖が本来果たすべき機能や、それを受容体として認識する現象に変化をもたらす可能性が考えられる。乳酸菌の発酵でしばしば問題となるバクテリオファージによる感染も、細胞表層の糖鎖したタンパク質を受容体とすることが知られており、発酵中にパルス電界処理を継続することにより、バクテリオファージの感染を防ぐ効果を高める可能性も期待される。乳酸菌の発酵中に穏和なパルス電界処理を組み合わせるといふ、全く新たな発酵エンジニアリング技術として、新たな研究への発展や新たな食品加工技術として今後さらに発展していくことを期待したい。