

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 若井 丈人

一般的に乳酸菌は、乳中の蛋白質からアミノ酸を獲得するため蛋白質分解系を保持する。乳酸菌の中で最も高い蛋白質分解活性を有する *Lactobacillus helveticus* 種は、血圧降下作用を有するトリペプチドである VPP、IPP を乳中の蛋白質である β カゼインから切り出し、高濃度に蓄積することが示され、VPP、IPP を含む *L. helveticus* 発酵乳は血圧降下作用を有する特定保健用食品として、実用化へと至っている。一方で、*L. helveticus* 発酵乳の VPP、IPP の理論収率は 25%程度と低く、また *L. helveticus* において、VPP、IPP の切り出しに関わる、発現調節機構を含めた蛋白質分解系について十分に解明されていないのが現状であった。本研究は、*L. helveticus* における蛋白質分解系遺伝子群の発現調節機構について、詳細に検討したものである。

第 1 章の序論に続き、第 2 章では蛋白質分解活性が高い *L. helveticus* CM4 株のゲノム解析を行い、血圧降下ペプチド VPP、IPP の産生に関与する蛋白質分解系遺伝子群の推定を実施した。その結果、CM4 株ゲノムには 2 種類の菌体外プロテイナーゼと、26 種類の菌体内ペプチダーゼが存在することを明らかにした。さらに、VPP、IPP の切り出しに関与すると推定される CM4 株の菌体内ペプチダーゼについても、アミノペプチダーゼ群、エンドペプチダーゼ群、X-プロリルジペプチジルアミノペプチダーゼ (XPDAP) に分類される遺伝子の存在と配列を明らかにすることができた。

第 3 章においては、*L. helveticus* 種において、これまでに示唆されていた、過剰なアミノ酸やペプチドによって蛋白質分解系の活性が抑制をうける現象に着目し、その調節機構の理解を目的とし CM4 株発酵乳中へのペプチド混合物添加が、蛋白質分解系遺伝子群の転写量に与える影響を網羅的に解析した。その結果、乳培地へのペプチド混合物の添加によって、多くの蛋白質分解系遺伝子群の転写が顕著に抑制されるのと同時に、菌体外プロテイナーゼ活性ならびに VPP、IPP 産生量が著しく低下することを明らかとした。また、分岐鎖アミノ酸 (BCAAs) を含む単独のアミノ酸の乳への添加が VPP、IPP 産生量を抑制することを明らかとし、菌体内アミノ酸濃度に応答して、蛋白質分解系の転写活性が抑制されている可能性が示唆された。

第 4 章においては、菌体内アミノ酸濃度に応答した転写調節機構の解明を目指し、蛋白質分解系遺伝子上流にアミノ酸濃度依存的に結合する転写調節因子の探索を実施した。その結果、26 kDa の蛋白質を単離・同定した。DNA 結合アッセイにより、この蛋白質が蛋白質分解系遺伝子上流領域に結合すること、またその結合が BCAAs の添加によって促進されることが明らかになった。さらに、大腸菌を用いた転写量解析により、BCAAs を含む培地では 26 kDa 蛋白質の発現が *pepV* 遺伝子の転写を抑制する可能性を示唆することができた。以上より、単離した 26 kDa 蛋白質は新規な BCAAs 応答性転写制御因子 (BCARR) であることが示された。さらに、BCARR の結合 DNA 配列の探索を実施し、BCARR の結合配列を推定した。

これら得られた結果より *L. helveticus* CM4 株における蛋白質分解系の全体像について、以下のように推察された。最初に菌体外プロテナーゼによって、乳中のカゼインが切断されオリゴペプチドが遊離し、オリゴペプチドトランスポーターを介して菌体内に取り込まれる。その後、菌体内の多くのペプチダーゼによってペプチド、アミノ酸に分解される。一方、菌体内に蓄積した BCAAs 濃度の上昇を感知した BCARR は、蛋白質分解系遺伝子上流に存在する結合配列に結合し、その転写を抑制する。その結果、蛋白質分解活性が負のフィードバックを受け抑制され、蛋白質分解系の過度の発現を抑える。その結果として VPP、IPP の産生も同時に抑制されると考えられた。

以上、本研究では、*L. helveticus* CM4 株の蛋白質分解系遺伝子群の網羅的な理解や、BCAAs に応答する蛋白質分解系遺伝子群の転写調節機構の一部を解明することができた。本研究は、*L. helveticus* の蛋白質分解系発現調節機構について全く新規な知見を提供するとともに、蛋白質分解活性がさらに高い乳酸菌株の育種や蛋白質分解度を高める発酵方法の開発を通して血圧降下ペプチドを含む様々な機能性ペプチドの生産を強化する手段を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。