

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朴 相熙

バクテリオシンは細菌が産生する抗菌性タンパク質である。最も広く研究されているバクテリオシンの一つ、nisinは50以上の国で食品の保存料として現在用いられている。また、獣医および医療分野において治療薬の候補として考えられて、牛の乳腺炎治療やヒトの消化性潰瘍の治療薬として可能性を持っており、抗生物質耐性菌に対しても効果があると期待されている。バクテリオシンの研究は、効果的な食品保存料や抗菌性物質としての利用につながると考えられる。

本論文の目的は、種々の材料からバクテリオシンを産生する菌株を検索し、そのバクテリオシンの特性を明らかにすることである。本論文は3章から構成され、各章は以下のとおりである。

第一章では種々の材料から病原菌や抗生物質耐性菌を抑制するバクテリオシンを産生する細菌を検索した。バクテリオシン感受性菌株 *Lactobacillus plantarum* NCD0 955 およびグラム陰性の病原菌3株、グラム陽性の病原菌3株、抗生物質耐性菌5株を標的菌として検索した。種々の材料からの分離菌1602株のうち、キムチと漬物からバクテリオシンを産生する18株が分離された。12株が *Lactobacillus*、5株が *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、1株が *Pseudomonas fluorescens* であった。この内 *Lactobacillus* は *L. plantarum* NCD0 955 だけを抑制したが、*Lc. lactis* subsp. *lactis* はグラム陽性の病原菌にも抑制効果を示した。漬物から分離された *P. fluorescens* は broth 培養では標的菌の抑制効果が確認できなかった。

また、バクテリオシン産生に関して検討されていなかった基準株や参照株54株について検討したところ、1株 *Enterococcus faecium* JCM 5804^T でバクテリオシンの産生が確認された。

第二章では第一章でキムチから分離された5株の *Lc. lactis* subsp. *lactis* が産生するバクテリオシンの特性を検討した。そのバクテリオシンはグラム陽性の病原菌である *Listeria monocytogenes*、*Clostridium perfringens*、*C. difficile*、vancomycin 耐性

Enterococcus (VRE)、methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 4 株中 1 株および近縁の乳酸菌に対して抗菌効果を示した。このバクテリオシンは幅広い pH の条件と高温にも比較的安定であった。プロテアーゼ処理により活性を失い、ライソザイムやリパーゼやカタラーゼや β -グルコシダーゼ処理に対しては安定であった。Tricine-SDS-PAGE でこのバクテリオシンは約 3.5kDa の nisin Z と同じ位置にバンドが検出された。さらに nisin 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR と direct sequence method でこのバクテリオシンに関与する遺伝子配列を分析したところ、分離菌株は nisin Z を生産する遺伝子を保有していることが確認された。しかし、分離菌株の nisin 分泌に関与する *nis B* の塩基配列は nisin Z を生産する *Lc. lactis* JCM 7638 と比較して 2 塩基が異なっていた。キムチからの分離菌株の中で nisin Z を生産する *Lc. lactis* が見つかったのは本研究が最初で、今まで報告された他の nisin Z と比べてプロテアーゼや熱に対して異なる特性を示した。そのプロテアーゼ感受性はヒトや動物の腸内フローラに影響を与えない安全な食品保存料として利用される可能性を示唆している。

第三章では第一章で確認された *E. faecium* JCM 5804^T が生産するバクテリオシンの特性を検討した。そのバクテリオシンは *Lactobacillus*、*Enterococcus*、*C. perfringens*、*C. difficile*、*L. monocytogenes*、VRE を抑制したが、グラム陰性菌、*Weissella*、*Leuconostoc*、*Lactococcus*、MRSA に対して効果は認めなかった。このバクテリオシンは幅広い pH の条件と高温にも比較的安定であった。プロテアーゼ処理に対して感受性、ライソザイム、リパーゼ、カタラーゼ、 β -グルコシダーゼ処理に対して抵抗性があった。Tricine-SDS-PAGE によるとバクテリオシンの分子量は約 4kDa であった。既知の enterocin 遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR および direct sequence method でこのバクテリオシンに関与する遺伝子配列を分析したところ、enterocin A、enterocin B、enterocin P 類似遺伝子の 3 種の異なる遺伝子を保有することが明らかになった。近年、enterocin A と enterocin B を生産する *E. faecium* に対する報告があり、enterocin A と enterocin B は相乗作用によって乳酸菌、病原菌を抑制することも知られている。また、enterocin P は別の *E. faecium* が enterocin 50 とともに生産すると報告されている。しかし、3 種の enterocin を生産する菌株として *E. faecium* JCM 5804^T は初めての報告ある。この株は 3 種の enterocin を生産し、これらの相乗作用によって乳酸菌、病原菌を抑制する可能性があると考えられた。

以上、本論文は乳酸菌のバクテリオシンを食品保存料と抗菌性物質として応用するための研究に重要な知見を与えると考えられる。よって審査員一同は、本論文が獣医学博士の学位論文として価値あるものと認めた。