

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 元島 英雅

チェダーチーズなどの産業的に極めて重要なチーズにおいて、しばしば苦みの欠陥が見られ、製品で苦みが発生すると、経済的にも大きな損失につながる。これは、チーズ中に蓄積される苦みペプチドが主要原因であることがすでに解明されている。それ故、これを解決することは、産業的にも重要な課題である。本論文は、カゼイン加水分解物の苦味を効率的に低減する効果のあるアミノペプチダーゼ、特に、高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* YT-1 株のアミノペプチダーゼ T (AP-T) と乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* YRC 001 株のリシルアミノペプチダーゼ (AP-YRC) に関して研究を行ったものである。

緒論で本研究の背景と意義について概説した後、第 1 章において AP-T を精製し、N-末端アミノ酸配列を確認している。第 2 章において AP-T 遺伝子をクローニングし、全配列を初めて決定した。AP-T 遺伝子は 408 アミノ酸をコードしており、2 量体のサブユニットの推定分子量は 44,820 であった。アミノ酸配列は、*B. stearothermophilus* NCIB8924 株のアミノペプチダーゼ II (APII) との相同性が示唆された。第 3 章では、部位特異的変異の手法を用いて、大腸菌で AP-T を生産することに成功した。

第 4 章では AP-T と相同性がある *Thermus thermophilus* HB8 株のアミノペプチダーゼ (AP-Th) 遺伝子と、*B. stearothermophilus* NCIB8924 株の APII 遺伝子の配列を決定している。この結果、AP-T はこれらの酵素と共にアミノペプチダーゼ T ファミリーを形成していることを示した。

第 5 章では、AP-T と同様に苦味低減効果が期待できるアミノペプチダーゼ (AP-YRC) を乳酸菌 YRC 001 株から精製し、性状を決定し、クローニングした結果について述べている。AP-YRC 遺伝子は 849 アミノ酸をコードしており、推定分子量は 96,434 であった。AP-YRC は性状と DNA 配列から、リシルアミノペプチダーゼであることが明らかとなった。精製 AP-YRC をトリプシン処理した還元脱脂乳に作用させると有意にその苦味を低減した。

第 6 章においては、AP-YRC 遺伝子をチーズ用乳酸菌に導入するために、乳酸菌での発現系の構築を行っている。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 由来のクエン酸プラスミドをベースにアミノペプチダーゼ遺伝子発現ベクターを構築し、各種の乳業用 *Lactococcus* 株を形質転換した。どの株も不和合性の問題なく形質転換でき、選択圧がなくてもプラスミドは比較的安定であった。形質転換体は YRC001 株に比べて約 4 倍のアミノペプチダーゼ活性があり、その実用性が示唆された。

第 7 章においては、カゼイン加水分解物に対するアミノペプチダーゼ処理の免疫学的な影響を知るために、全カゼインのエンドペプチダーゼ分解物を AP-T で処理した場合の、苦味低減とその免疫学的性質について検討している。サチライシン、サーモリシン、あるいはトリプシンで分解した全カゼイン加水分解物では、特にトリプシン分解物が極めて苦味が高かった。これらの加水分解物を、AP-T で分解し、官能評価したところ、苦味が有意に低減した。サチライシン加水分解物とサーモリシン分解物は低い抗原性を有していたが、トリプシン分解物は抗原性が高かった。トリプシン分解物を AP-T で処理すると、抗原性が効果的に低下した。AP-T で処理すると免疫原性も顕著に減少することが示された。AP-T で処理すると牛乳アレルギー患者の血清中に存在する IgE 抗体に結合する特異的抗原の量が減少した。

それ故、AP-T 処理は、苦味を低減すると同時に、カゼインのアレルゲン性を低減できることが示された。

以上、本論文は、苦味低減効果を有するアミノペプチダーゼという観点で、高度好熱性細菌のアミノペプチダーゼTおよび乳酸菌のリシルアミノペプチダーゼの研究を行ったもので、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。