

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤喜之

本論文はヨーグルトの製造に使用される主要な乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*)と *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*)の遺伝子操作法を確立し、実用レベルで安全性を追求した組換え菌を作製することを目的として行われた研究であり、3章よりなる。

第1章では、*L. bulgaricus*の宿主・ベクター系の構築について述べている。それまで非常に困難で全く前例がなかった *L. bulgaricus* の形質転換を可能にするために、*L. bulgaricus*が保持するプラスミドの検索を行った。50株以上を調べた結果、ただ1株(M-878株)から見出し、pBUL1と命名した。本プラスミドにエリスロマイシン(Em)耐性遺伝子(*ermA*)を結合し、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*Lc. lactis*) IL1403株へ形質転換したところ、Em耐性の形質転換体を得られ、組換えプラスミド(pX3)を保持していた。M-878株のpBUL1キユアリング株BGを宿主とし、pX3を用いてエレクトロポレーションによる形質転換条件を検討し、培地の初発pHを5.5とすること、48℃で5~10分間処理すること、パルス後の培養にミルク成分を主体とするEXBG培地を用いることなどを組み合わせて、1~10/ μ g pX3と低い頻度ながら初めて *L. bulgaricus*の形質転換に成功した。

第2章では、*Lactococcus lactis*由来プラスミドpSY1の解析および乳酸菌用ベクターへの利用について検討を行っている。*Lc. lactis* M-128C株中に新規なプラスミドpSY1を見出した。次に、pSYE2に*Streptococcus bovis* α -アミラーゼ遺伝子のプロモーターおよびシグナル配列を結合して異種遺伝子分泌発現ベクターpSECE1を構築した。レポーターとして *Staphylococcus aureus nuc*、*B. subtilis amyE*⁺、*E. coli bla*を結合して *L. bulgaricus*などの乳酸菌に形質転換し、これらが培地中に分泌発現していることを確認した。

第3章では、ヨーグルト乳酸菌で利用可能な、安全な選択系の開発について述べている。薬剤耐性を用いない安全な形質転換体選択法として、チミジン合成酵素遺伝子(*thyA*)を *L. bulgaricus*および *S. thermophilus*から新規にクローニングし、選択マーカーとしての利用を検討した。*S. thermophilus* ATCC 19258株からチミジン要求性を示す *thyA*変異株を取得し、宿主とした。野生型 *thyA*をpSY1あるいはpBUL1に結合したプラスミドを形質転換すると要求性が相補され、*thyA*が安全な選択マーカーとして利用できることを示した。さらに、乳糖資化性による選択の利用を検討した。*L. bulgaricus*、*S. thermophilus*では、乳糖はlactose permeaseによって取り込まれ、菌体内 β -ガラクトシダーゼによって分解される。両菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 *lacZ*を破壊するため、遺伝子内部を欠失させた断片をpSG⁺E2に結合し、*L. bulgaricus* T-11株および *S. thermophilus* ATCC 19258株に導入して遺伝子破壊を行った。野生型の *S. thermophilus lacZ*あるいは *L. bulgaricus lacZ*とpSY1を連結し、ATCC 19258 *lacZ*破壊株を形質転換したところ、グルコースを含まないスキムミ

ルク培地プレートでコロニーが出現し、pSY1に*lacZ*が結合したプラスミドを保持していた。両菌の*lacZ*はDNA相同性が約50%しかないため、*L. bulgaricus lacZ*破壊株に対して*S. thermophilus lacZ*を選択マーカーとして持つtsプラスミドを用いて*L. bulgaricus*染色体上の遺伝子操作が可能であった。さらにその遺伝子改変株に対してpSY1(ts)と*lacZ*だけからなるプラスミドを用いて*lacZ*を再生させ乳糖資化性を元に戻すことができた。この応用例として、*L. bulgaricus lacZ*遺伝子破壊株のD-乳酸脱水素酵素(LDH)遺伝子を*S. thermophilus*由来のL-LDH遺伝子と交換し、最後に*lacZ*を野生型に戻すことが可能であることを示している。

以上、本論文は、ヨーグルト乳酸菌 *L. bulgaricus* および *S. thermophilus* の効率的で安全な遺伝子操作法を確立したものであり、学術上、応用上貢献するところが少ない。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。