

氏 名	うえの よしえ <b>上 野 義 栄</b>
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 4 9 2 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>乳酸菌由来グルタミン酸脱炭酸酵素の解析と機能性食品への 応用</b> (主査)
審 査 委 員	教授 杉村順夫 教授 原田繁春 教授 山口政光 名誉教授 小田耕平

## 論文内容の要旨

最近、乳酸菌、麹菌などを利用して、血圧降下作用やストレス低減作用を有する $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)を含む機能性食品が開発・利用されている。この GABA は、補酵素としてピリドキサルリン酸 (PLP) を要求するグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase, GAD) の作用により、L-グルタミン酸の脱炭酸反応で生成される。GAD は、種々の微生物、植物、動物など生物界に広く分布する酵素である。申請者らは、微生物由来 GAD に関する研究が進展していなかった 1997 年以来、*Lactobacillus brevis* IF012005 由来の GAD に着目し、その生化学的研究を推進してきた。この助走的研究を基に、本研究は、機能性食品への応用展開を視野に入れ、GABA 高生産性乳酸菌由来の GAD 解析と、その乳酸菌の食品への利用について検討したものであり、その内容は 4 章に分けて論述されている。

申請者は、GAD 遺伝子の単離と解析から、*L. brevis* IF0 12005 の GAD 遺伝子 (*gad B*) は、glutamate/GABA アンチポーターである *gad C* 遺伝子とオペロンを構成していること、また、この GAD 遺伝子の推定アミノ酸配列が *L. brevis* ATCC367 や *L. lactis* と高い相同性を有すること等を明らかにした。また、*L. brevis* IF0 12005 由来の GAD は、硫酸アンモニウムにより活性化されることを見出し、その活性化機構を解析した。大腸菌で発現させた組換え体 GAD を用いて検討した結果、硫酸アンモニウムとグルタミン酸ナトリウムによる活性化条件では、GAD は 2 量体 (非活性型) から 4 量体 (活性型) に変化していた。CD スペクトルなどの解析から、活性化条件下では GAD サブユニット間の疎水的相互作用が増大し、2 量体から 4 量体への構造変化が促進され、GAD とグルタミン酸との適切な結合が確保されると考察した [1 章]。

次に、産業的に利用可能な高 GABA 生産乳酸菌をスクリーニングした結果、京都産千枚漬けから L13 株を分離することに成功した。この L13 株の生化学的性質、16S rRNA の塩基配列、DNA-DNA ハイブリダイゼーション情報を詳細に検討した結果、本菌は新種であり、*Lactobacillus senmaizukei* L13 と同定・命名した [2 章]。

さらに、本菌が生成する GAD の生化学的特性について検討した。その結果、(1) 当該 GAD は活性型 4 量体 (MW=57 kDa X 4) として分離され、(2) *L. brevis* IF0 12005 由来の GAD などとは異なり、その活性化に硫酸アンモニウムや NaCl などが必要としない、(3) 反応至適 pH は 4.5 であり、(4) 酵素反応のキネテック解析から、当該 GAD は極めて高い *kcat/Km* 値 ( $kcat/Km = 9.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) を示し、*L. brevis* 由来 GAD の約 130 倍であった。本菌の高い GABA 生産能は、この極めて高い *kcat/Km* 値に

起因すると考察した[3章]。

また、*L. senmaizukei* L13 の GABA 生産性の向上を目的として、生産条件の最適化を図った。その結果、910 mM グルタミン酸ナトリウムから 830 mM GABA が生産され、その変換率は 91%に達した。また、当該菌をスターター菌として使用した千枚漬けを試作した結果、従来の製品よりも風味に優れ、且つ、GABA を 0.1%以上含む千枚漬けが、短期間で安定的に製造できることを明らかにした [4章]。

以上の研究成果は、これまで十分に研究されていなかった微生物由来 GAD の生化学的研究分野に新しい知見を与えた。また、本研究から新種として同定された *L. senmaizukei* L13 が持つ高い GABA 生産能力から、GABA 含有機能性食品への応用展開のみならず、GABA を素材とする工業的製品の創成が可能となり、今後の応用開発が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

最近、乳酸菌や麹菌などの微生物を利用して、血圧降下作用やストレス低減作用を有するγ-アミノ酪酸 (GABA) を含む機能性食品が開発・利用されている。この GABA は、それぞれの微生物が有するグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase, GAD) の作用で生産されるが、微生物起源の GAD に関する生化学的研究は大きく立ち遅れていた。申請者は、*Lactobacillus brevis* IF012005 から分離した GAD は 2 量体であり、活性がなかったが、硫酸アンモニウム存在下で活性化することを見出した。その活性化機構を明らかにするため、GAD 遺伝子の単離・同定、大腸菌での発現系を構築して組換え体 GAD を得た。この組換え体 GAD を用いて検討した結果、GAD サブユニット間の疎水的相互作用が増大し、2 量体 (非活性型) から 4 量体 (活性型) へ構造変化することを明らかにした。活性型 4 量体では、GAD とグルタミン酸との適切な結合が確保され、活性発現するものと考察した。

また、GABA 生産性の高い乳酸菌の検索を行い、京都産千枚漬けより新種菌株である *Lactobacillus senmaizukei* L13 を取得することに成功した。この菌株から得られる GAD の種々の生化学的特性を評価した結果、高い GABA 生産能は、L13 株 GAD の  $k_{cat}/K_m$  値が *L. brevis* に比べ、約 130 倍高いことに起因することを明らかにした。また、GABA 生産性を向上させる目的で培養生産条件を検討した結果、最適条件下ではグルタミン酸ナトリウムから 91%の変換率で GABA が生産できることを明らかにした。さらに、申請者は本菌の食品への応用として、GABA 含有千枚漬けの生産条件を検討した。スターター菌として当該菌を用いて千枚漬けを試作すると、GABA を 0.1%以上含む千枚漬けが安定的に、且つ、短期間で製造できることを明らかにした。

以上の研究成果は、これまで十分に研究されていなかった微生物由来 GAD の生化学的研究分野に大きく貢献すると共に、L13 菌が持つ高 GABA 生産性は、他の微生物による生産性を大きく凌駕するものであり、GABA の工業的微生物生産の路を拓くものと評価される。

学位論文は丁寧に作成されており、論理展開およびその論旨も明解に記述されていた。本論文の内容は下記の 3 編の論文にまとめられ、公表あるいは印刷中である。

[公表論文]

- 1) 上野義栄、平賀和三、森 義治、小田耕平：漬物からγ-アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌の分離と応用. 生物工学 85: 109-114 (2007)
- 2) Hiraga K, Ueno Y, Sukontasing S, Tanasupawat S, Oda K: *Lactobacillus senmaizukei* sp. nov., isolated from Japanese pickle. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (in press)
- 3) Hiraga K, Ueno Y, Oda K: Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* -Activation by ammonium sulfate. Biosci. Biotechnol. Biochem. (in press)