

Title	Streptococcus thermophilus を用いたヒアルロン酸生産に関する研究
Author(s)	伊澤, 直樹
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59232
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【44】

氏名	伊 澤 直 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (工学)
学位記番号	第 24983 号
学位授与年月日	平成23年12月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Streptococcus thermophilus を用いたヒアルロン酸生産に関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 大竹 久夫 (副査) 教 授 仁平 卓也 教 授 清水 浩 招聘教授 大政 健史

論 文 内 容 の 要 旨

ヒアルロン酸 (HA) は D-glucuronic acid (GlcA) と D-N-acetylglucosamine (GlcNAc) が交互に繰り返して結合したユニットが直鎖状に繋がった多糖であり、粘性や水分保持能に優れ、医薬品、化粧品、食品分野で広く利用されている。現在、HAは鶏冠からの抽出法や、*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* などの病原性微生物を無毒化した微生物による発酵法によって製造されているが、エネルギー物質や毒素の混入の危険性が考えられ、より安全な生物資源を用いた生産が求められている。本論文では、株毎に異なる多様な細胞外多糖 (EPS) を産生し、食経験が豊富な *Streptococcus thermophilus* に注目し、同菌による HA 生産法の確立を行った。

第1章ではHAの用途や製造上の問題点、および *S. thermophilus* に注目した理由を詳細に述べた。

第2章では46株の *S. thermophilus* より skim milk 培地とした培養から HA 生産株を単離した。HA の測定法として従来法よりも高感度で測定可能な HA binding protein を用いた競合的バインディングアッセイを構築し導入した。検討を行った46株中、6株の培養液中にHAが検出され、*S. thermophilus* YIT 2084において最も高い8 mg/LのHAを培養液中に検出した。さらに分子量分布、構成糖、NMRの各分析により同菌株が産生するEPSの高分子成分をHAと同定した。

第3章では、得られた生産株における生産性の向上を目指し、培地および培養条件の検討を行い、大豆タンパク質由来オリゴペプチド(ハイニュートDII) 1%を含む10% skim milkを培地とし、pH 6.8、温度40°C、100 rpm、通気なしで培養することにより約200 mg/Lの最終生産濃度を達成した。

第4章では、*S. thermophilus* YIT 2084にHA合成に関する遺伝子を導入することにより、さらなるHA高生産株を取得した。HA合成の最終段階に関わっていると考えられる遺伝子として*S. thermophilus* YIT 2084より*hasA*、*hasB*および*glmI*を単離した。単離した遺伝子を*E. coli-Enterococcus faecalis*シャトルベクター-pBE31に組み込み、発現ベクターを構築後、*S. thermophilus* YIT 2084に導入、発現させた。その結果、*hasA*、*hasB*単独あるいは*hasA*と*hasB*を同時に発現させた株でHAの生産量が増加し、*hasA*および*hasB*同時発現株において最も高い約1,200 mg/LのHA最終生産濃度を達成した。以上の研究結果により、食経験が豊富で安全な*S. thermophilus*によるHA生産法を確立した。

また、本研究で示した方法は*S. thermophilus* YIT 2084のHA生産のみならず、他の*S. thermophilus*のEPS生産にも適用可能であると考えられる。*S. thermophilus*は多様性のあるEPS産生菌として注目されており、本研究で得られた成果を基に、今後様々な有用多糖の生産への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

ヒアルロン酸(HA)はD-glucronic acid (GlcA)とD-N-acetylglucosamine (GlcNAc)が交互に繰り返し結合したユニットが直鎖状に繋がった多糖である。粘性や水分保持性に優れ、医薬品、化粧品、食品分野で広く利用されている。現在、鶏冠からの抽出法や、*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*などの病原性微生物を無毒化した微生物による発酵法によって製造されているが、アレルギー性物質や毒素の混入の危険性がゼロではないという問題点があり、より安全な生物資源を用いた生産が求められている。本論文では、株毎に異なる多様な細胞外多糖(EPS)を産生し、食経験が豊富な*Streptococcus thermophilus*に注目し、同菌によるHA生産法の確立を目指し、検討を行っている。

第2章では46株の*S. thermophilus*をskim milkを培地として培養し、HAの測定法としてHA binding proteinを用いた競合的バインディングアッセイを構築・導入している。本アッセイを導入することで、これまで困難であったskim milk中の微量なHAの測定を可能とし、46株中6株の培養液にHAを検出し、特に*S. thermophilus* YIT 2084の培養液中に最も高い8 mg/LのHAを検出している。さらに分子量分布、構成糖、NMRの各分析を行い、同菌株が産生するEPSの高分子画分をHAと同定している。

第3章では、生産性の向上を目指し、培地および培養条件の検討を行っている。pH、攪拌回転数、通気、温度、培地添加物について検討を行った結果、大豆タンパク質由来オリゴペプチド(ハイニュートDII) 1%を含む10% skim milkを培地とし、pH 6.8、温度40°C、100 rpm、通気なしで培養することに決定し、同条件で約200 mg/Lの最終生産濃度を達成している。

第4章では、さらに生産性を向上させるため、*S. thermophilus* YIT 2084を形質転換し、HA高生産株の取得を試みている。*S. thermophilus* YIT 2084のglycosyltransferase配列をシークエンスし、HAを合成する能力があることを推定後、*S. thermophilus* YIT 2084において、HA合成の最終段階に関わっていると考えられる遺伝子(*hasA*、*hasB*および*glmI*)を単離している。単離した遺伝子を*E. coli-Enterococcus faecalis*シャトルベクター-pBE31に組み込んで発現ベクターを構築し、*S. thermophilus* YIT 2084に導入、発現させている。その結果、*hasA*、*hasB*単独あるいは*hasA*と*hasB*を同時に発現させた株でHAの生産量が増加し、特に*hasA*および*hasB*同時発現株において約1,200 mg/LのHA最終生産濃度を達成している。

以上のように、本論文は食経験が豊富な乳酸菌*S. thermophilus*によるHA生産を生物化学工学的、分子生物学的観点から詳細に検討し、実用レベルまで生産性を向上させるとともに、今後の*S. thermophilus*による有用多糖生産に応用可能な知見を多く与えており、その成果は生命先端工学の発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。