

氏名	前野 慎太郎		
学位(専攻分野の名称)	博士(生物産業学)		
学位記番号	甲 第781号		
学位授与の日付	令和2年3月17日		
学位論文題目	ミツバチ共生フルクトフィリック乳酸菌の環境適応と代謝産物の養蜂利用への可能性		
論文審査委員	主査	准教授・博士(醸造学)	遠藤 明 仁
	査	教授・博士(獣医学)	丹羽 光 一
	査	博士(理学)	有田 正 規*
	査	准教授・博士(獣医学)	梶川 揚 申

論文内容の要旨

研究背景と目的

フルクトフィリック乳酸菌 (FLAB) は花や果物、ミツバチなどの昆虫の消化管といったフルクトース豊富な環境に生息している乳酸菌群である。一般的に乳酸菌はグルコースを糖源として最も好むのに対し、FLAB はグルコースを糖源とした培養では、ほとんど生育しないという非常に稀有な特徴を有している。また FLAB はグルコースをほとんど代謝できない一方で、培地中の糖源をフルクトースとした場合や、グルコースを糖源とする場合でも電子受容体存在下では良好な生育を見せるという特徴を示し、FLAB はこれまでの乳酸菌の概念から大きく外れている。このような特異な性質を有する FLAB にはこれまでに、*Fructobacillus* 属に分類される 5 菌種すべてと 200 菌種以上が分類される *Lactobacillus* 属細菌の中で唯一 *Lactobacillus kunkei* のみの合計 6 菌種が報告されている。本研究では、これら FLAB がフルクトース豊富な環境にどのように適応してきたのかを明らかにするために、ゲノムレベルで進化の様式に迫った。また、ミツバチから分離された FLAB の養蜂業における利用の可能性を検討した。

第一章 *Lactobacillus kunkei* と近縁菌の比較ゲノム解析から明らかにする FLAB のゲノムの特徴

第一章では、多様な生物生態学的特徴を有する *Lactobacillus* 属の中で唯一の FLAB である *L.kunkei* のゲノムの特徴を明らかにするため、*L.kunkei* と様々な *Lactobacillus* 属細菌の比較ゲノム解析を行った。その結果、*L.kunkei* はほかの *Lactobacillus* 属細菌に比べて、ゲノムサイズを小さくし、糖代謝関連遺伝子を特異的に欠落させていることが明らかになった。特に乳酸菌の主要な糖の取り込み系の一つである Phosphotransferase system (PTS) を完

*国立遺伝学研究所生命情報・DDBJセンター長・教授

全に欠損していることが明らかとなり、このような特徴は本菌が限られた種類の糖しか代謝をすることができないという生化学的な特徴と一致していた。これらのゲノムの特徴は、先に報告されていた *Fructobacillus* 属のゲノムの構造と類似していた。この結果から、FLAB はフルクトース豊富な環境に適応する過程で、遺伝子を獲得するのではなく、遺伝子を欠損するという退行的進化を行ってきたことが明らかになった。またフルクトース豊富な環境が、系統的に遠縁な乳酸菌に対して非常によく似たゲノムレベルの進化を誘導する可能性があることが強く示唆された。

ここまで、*L. kunkeei* のゲノム全体の特徴を解析したが、フルクトフィリックな特徴を有する直接的な原因に迫っていない。そこで、*L. kunkeei* の *adhE* に着目した解析を行った。一般的なヘテロ発酵乳酸菌のグルコース代謝におけるエタノール生産および酸化還元バランスの維持には、アセトアルデヒド脱水素酵素 (Aldh) 活性及び、アルコール脱水素酵素 (Adh) 活性を有する二機能性タンパク質 AdhE が密接に関わっている。しかし先の研究により、*Fructobacillus* 属細菌は AdhE をコードする遺伝子 *adhE* を欠損していることが明らかにされ、酸化還元バランスを維持することができず、グルコースを代謝することができないと考えられていた。そこで *Lactobacillus* 属細菌の *adhE* に着目したゲノム解析を行った結果、*L. kunkeei* は Adh ドメインを欠損し、Aldh ドメインのみを保持した部分的な *adhE* を有していた。ヘテロ発酵を行う *Lactobacillus* 属細菌において *adhE* を欠損しているという報告は本研究が世界で初めてである。また、*L. kunkeei* と近縁な *Lactobacillus apinorum* は *Fructobacillus* 属細菌と同じく *adhE* を完全に欠損していた。*L. apinorum* はこれまで FLAB としての特徴が報告されていなかったが、*adhE* を完全に欠損しており、Aldh および Adh 活性を持たず、グルコースをほとんど代謝しないというフルクトフィリックな特徴を有していることが明らかとなった。このことから、*L. apinorum* は *Lactobacillus* 属に分類される新たな FLAB であることが明らかになった。

第二章 *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T 株の生育特性における *adhE* 遺伝子の影響

第二章ではフルクトフィリックな特徴を決定づける鍵として考えられている *adhE* の欠損が、FLAB の生育特性に与える影響を明らかにすることを目的として、*F. fructosus* NRIC 1058^T 株を近縁菌種である *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1541^T 株の *adhE* で形質転換し、その形質転換株の生育特性を解析した。*adhE* で形質転換した *F. fructosus* は、親株と異なり、グルコースを糖源とする培地で良好な生育を見せた。このことから、*Fructobacillus* 属は *adhE* を欠損させることで、フルクトフィリックな特徴を有していることが明らかとなった。ヘテロ発酵乳酸菌は一般的に、グルコースを代謝することで、乳酸と二酸化炭素とエタノールを生産し、その過程でグルコース 1 分子から、1 分子の ATP が生産される。しかし、FLAB はエタノールではなく、acetate kinase により酢酸を生産することで、グルコース 1 分子か

ら一般的なヘテロ発酵乳酸菌の 2 倍にあたる、2 分子の ATP を生産することが可能である。このようにして、FLAB は *adhE* を欠損することで、エネルギー効率において微生物間競争を有利にしていることが示唆された。さらに、FLAB の糖代謝能が乏しい理由を明らかにするために、*F. fructosus* のゲノムデータから主要な単糖や二糖の糖代謝経路の探索を行ったところ、糖の取り込み系をほとんど見出せず、また取り込み系を保持していても代謝経路の一部が欠落しているため、代謝可能な糖の種類が少ないことが明らかとなった。

第三章 フルクトフィリック乳酸菌様 *Leuconostoc citreum* F192-5 株が行ってきた菌株特異的な進化

第三章では FLAB の生態学的研究の過程でミカンの皮より分離された、特異な *Leuc. citreum* 菌株の表現性状とゲノムの特徴を明らかにした。*Leuc. citreum* は漬物などの植物環境や動物消化管などに広く生息する一般的な乳酸菌である一方で、ミカンの皮から分離された F192-5 株は *Leuc. citreum* に分類されながら、グルコースを生育基質とした培地ではほとんど生育せず、電子受容体存在下で良好な生育を見せるというフルクトフィリック様の特徴を示す。F192-5 株のように菌株特異的にフルクトフィリックな特徴を有する乳酸菌の報告はこれまでにない。まず、F192-5 株とほかの *Leuc. citreum* 菌株の比較ゲノム解析を行った結果、F192-5 株のゲノムサイズはほかの *Leuc. citreum* 菌株と同程度の大きさで、*Fructobacillus* 属や *L. kunkeei* にみられた糖代謝関連遺伝子の特異的な欠落が F192-5 株には見られなかった。このため、F192-5 株は先の FLAB とは完全に異なる環境適応を行ってきたことが明らかになった。次にフルクトフィリックな特徴を決定づける *adhE* に着目して解析を行ったところ、F192-5 株は完全長の *adhE* を保持しているが、この遺伝子は発現しておらず、F192-5 株は Aldh および Adh 活性を有していなかった。そこでゲノム上の *adhE* の周辺配列を詳細に解析したところ、ほかの *Leuc. citreum* 菌株で見られた *adhE* 上流のプロモーター領域を F192-5 株では見出すことができず、そのためグルコースを代謝できないことが予想された。そこで、F192-5 株を近縁菌種由来の *adhE* で形質転換したところ、形質転換株はグルコースを糖源とする培地で良好な生育を示した。このことから、F192-5 株は *adhE* が不活性化することで、フルクトフィリック様の特徴を有していることが明らかとなった。このように先の FLAB に見られた代謝系をシンプルにし、*adhE* を欠損させるという進化ではなく、ほかの代謝系は欠落させず、*adhE* を不活性化することのみでフルクトフィリック様の特徴を有している F192-5 株のような乳酸菌を「シュードフルクトフィリック乳酸菌」と名付けた。乳酸菌には菌株特異的にフルクトフィリック様の特徴を有している菌株が存在していることが明らかになった。これは乳酸菌が菌種内で多様性を持つという生残戦略の一つである可能性が考えられる。

第四章 *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 株が生産するバクテリオシン kunkecin A の構造と特徴解析

第四章では *L. kunkeei* FF30-6 株が生産するバクテリオシン kunkecin A の構造と特徴を解析し、養蜂業に利用できる可能性があるのかどうかを検討した。FLAB はミツバチ消化管内の最優勢菌の一つであることから、近年その数を減少させているミツバチのプロバイオティクスとして注目されている。ミツバチ減少の要因の一つとして *Melissococcus plutonius* による腐蛆病が知られている。腐蛆病はミツバチ幼虫で発症する法定伝染病で、現在の養蜂業ではその対策として抗生物質が用いられるが、耐性菌の出現などの問題を抱えている。我々がミツバチより分離した *L. kunkeei* FF30-6 株は *M. plutonius* に特異的に抗菌活性を示すバクテリオシン様抗菌物質を生産することがこれまでに明らかになっている。まず、バクテリオシン生産関連遺伝子を探索するために FF30-6 株のゲノム解析を行った結果、nisin A と類似したアミノ酸配列を有する遺伝子がプラスミド上にコードされていた。我々は nisin A 生合成遺伝子である *nisA* 様遺伝子を含めた 8 個のバクテリオシン生合成関連遺伝子を見出した。この nisin A 様物質を精製し、構造決定したところ、nisin A と同様に異常アミノ酸であるランチオニンを含むバクテリオシンであることが明らかとなり、これを kunkecin A と名付けた。Kunkecin A は nisin A と比較すると抗菌スペクトルが狭く、ミツバチ消化管内善玉菌に対する抗菌活性試験を行ったところ、多くの菌株で nisin A よりも最少生育阻止濃度(MIC)が高かった。一方で、*M. plutonius* に対する MIC は kunkecin A の方が nisin A よりも低い値を示した。これは、kunkecin A が nisin A よりもミツバチ消化管内善玉菌への影響を小さくとどめたうえで、*M. plutonius* に対して抗菌的にはたらく可能性を示唆しており、kunkecin A は養蜂業において抗生物質の代替品として用いることができる可能性が示唆された。これについては、実際に幼虫における感染実験で確認される必要がある。

本研究の結論

本研究では FLAB がフルクトース豊富な環境で行ってきたゲノムレベルの進化の様式を明らかにするとともに、FLAB の代謝産物を養蜂業に利用する可能性の有無について検討した。FLAB は *Fructobacillus* 属にみられる属レベルの進化、*L. kunkeei* や *L. apinorum* にみられる種レベルの進化、*Leuc. citreum* F192-5 株にみられる株レベルの進化というように三階層の進化があることが本研究により明らかになった。その中でも、属レベルと種レベルの進化は特に代謝系をシンプルにすることでゲノムサイズを小さくし、*adhE* を欠損させるという点で非常によく似た進化を行っていた。一方で、菌株レベルの進化はそれらとは全く異なっており、*adhE* を不活性化させるのみでフルクトフィリックな特徴を獲得していることが明らかとなった。これらの乳酸菌はフルクトース豊富な環境に適応し、エネルギー効率を向上させたり、菌種内で多様性を持ったりすることによって微生物間競争を有利にしてきた

可能性が示唆された。FLAB はミツバチ消化管からも主要な細菌として見出され、ミツバチ消化管への親和性の高さより、養蜂業でのプロバイオティクスとしての利用が期待されているが、FLAB の代謝産物もミツバチ腐蛆病予防などの目的で利用が可能であることが示唆された。本研究では乳酸菌の多様な特徴の一端を明らかにした。乳酸菌の多様な特徴の解析は様々な応用・利用につながることから、今後もこの分野での更なる研究の発展が望まれる。

審査報告概要

本研究ではフルクトフィリック乳酸菌(FLAB)の進化の様式及び産業利用能を明らかにすることを目的とした。まず比較ゲノム解析を行い、FLAB は糖代謝関連遺伝子を含む多くの遺伝子を欠落させ、ゲノムサイズを有意に小さくするという退行的進化を行っていることを明らかにした。次に、FLAB がグルコースを代謝できない原因を検討し、FLAB は二機能性タンパク質 AdhE をコードする遺伝子を保持していないためにグルコースを代謝することができないことを明らかにした。FLAB はミツバチ消化管の最優勢菌として見出されており、一部の FLAB はミツバチ幼虫の病原性菌に殺菌的に働くバクテリオシンを産生することが知られている。このバクテリオシン産生メカニズムをゲノムレベルで明らかにするとともに、抗菌スペクトルを明らかにした。本研究結果の学問的価値は非常に高く、また乳酸菌の更なる産業利用の拡大に大きく貢献すると考えられる。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査委員一同は博士(生物産業学)の学位を授与する価値があると判断した。