

氏名（本籍）	朝比奈 唯		
学位の種類	博 士 （農学）		
学位記番号	博 甲 第 9853 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	チーズ中における熟成促進乳酸菌 <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> EG9株の遺伝子発現プロファイル解析		
主査	筑波大学教授	Ph.D.	田島 淳史
副査	筑波大学助教	博士(学術)	浅野 敦之
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	岡根 泉
副査	筑波大学教授	博士(学術)	中島 敏明
副査	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門 畜産物研究領域 乳製品開発ユニット ユニット長	博士(農学)	野村 将

## 論 文 の 要 旨

近年、日本におけるナチュラルチーズの消費が増加しているが、熟成タイプのチーズを製造するためには数ヶ月間にわたる熟成期間を必要とすることが製造費用増加の一因となっている。従って、熟成期間を短縮することができれば熟成タイプのチーズの製造費用を削減することができ、価格競争力の強い製品を製造することが可能になると考えられる。本研究で使用した *Lactocaseibacillus paracasei* EG9株(以下EG9株と略す)は、熟成チーズから分離された新規の非スターター性乳酸菌である(Saiki *et al.* 2018)。このEG9株をチーズ製造時に補助スターターとして添加することにより熟成に必要な期間を短縮できる可能性が示唆されているが、そのメカニズムは明らかでない。そこで本研究において著者は、EG9株を補助スターターとして用いて製造されたチーズにおけるEG9株の遺伝子発現プロファイルについて検討した。

第 1 章において著者は、乳酸発酵スターターとして*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 712株(以下712株と略す)を $10^7$  cfu/g 添加し、これに補助スターターとして $10^4$ - $10^7$ cfu/g のEG9株を添加してゴーダタイプチーズを製造し、熟成開始後 1、30、90および180日目における生菌数、pHおよび遊離アミノ酸(Free Amino Acid : 以下FAAと略す)量を測定した。その結果、EG9株の生菌数は $10^8$ - $10^9$  cfu/g まで増加し、熟成開始後180日目まで維持したのに対し、712株の生菌数は経時的に減少し、その減少率はEG9株の接種量に反比例していることが明らかになった。さらに、いずれの処理区においてもpHは熟成開始後30日目までに大きく低下し、90日で最低値をとった後、180日目までの間にわずかに上昇する傾向が認められた。それに加え、熟成開始後30日目までのpHの低下速度はEG9株の接種量に比例していることが明らかになった。一方、FAA量は処理区間に相互作用が認められたが、EG9株接種量および熟成日数の増加に比例して有意に増加した。以上の結果から、補助スターターとしてEG9株を添加することにより、pH低下とFAA生成が促進されることが示された。

そこで、第 2 章において著者は、熟成に伴うチーズ中総FAA量の増加に対するEG9株の寄与を明らかにする事を目的として、EG9株ゲノムに存在する既知の乳たんぱく質分解関連遺伝子を探索し、それらに対するEG9株特異的PCRプライマーを作成した。さらに、試験区として、712株を乳酸発酵スターター、EG9株を補助スターターとして同量添加したゴーダタイプチーズを製造し、熟成開始後1および30日目のサンプルにおける乳たんぱく質分解関連遺伝子について、リアルタイムPCRによる発現解析を行った。その際、スキムミルクに712株とEG9株を同量添加した培養液を対照区とし、発現解析結果は対照区との相対値とした。その結果、EG9株のゲノム上には31の乳たんぱく質分解関連遺伝子の相同遺伝子が見出された。熟成開始後1日目のチー

ズにおいては、この31の乳たんぱく質分解関連遺伝子のうち27遺伝子の発現量が有意に上昇し、特に一部のペプチダーゼ遺伝子の発現量が大きく上昇した。一方、熟成開始後30日目のチーズにおいては 31遺伝子のうち 25遺伝子の発現量が有意に減少し、ほとんどの候補遺伝子が非常に低い相対的発現量を示した。

第 3 章において著者は、チーズ中におけるEG9株の生育エネルギー獲得に関する代謝特性を解明するため、第 2章と同じ処理をした試験区 (熟成開始後1日目)および対照区についてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、EG9株に由来する2980遺伝子のうち651遺伝子の発現量が有意に上昇したのに対し、615遺伝子の発現が有意に減少した。これらの遺伝子に関するパスウェイ解析を行った結果、チーズ中には糖がほぼ存在しないはずであるにも拘わらず、ガラクトース代謝関連遺伝子等の糖類の代謝に関連する遺伝子の発現量が有意に上昇した。

以上の結果から、著者は、補助スターターとしてEG9株を利用した場合、乳酸発酵スターターである712株の減少を促進すること、チーズカードのpH低下を有意に促進すること並びに総FAA量を有意に増加させることを明らかにした事に加え、EG9株の全ゲノム配列を明らかにした。さらに、たんぱく質分解関連遺伝子の探索とその発現解析およびトランスクリプトーム解析により、EG9株がチーズ中のたんぱく質分解のプロセスに広く関与すること並びにスキムミルク培地中とチーズ中においては、EG9株の発現プロファイルが明らかに異なることを示した。

これらの結果は、補助スターターとしてEG9株を利用することにより、FAA含量が高い熟成チーズを製造するために必要な時間を短縮できることを強く示唆している。

### 審 査 の 要 旨

本論文は、国産の熟成タイプチーズを効率的に製造する事を最終目的とした研究の一環として、補助スターターとして*Lactocaseibacillus paracasei* EG9株を用いて製造されたゴーダタイプのセミハードチーズにおけるEG9株の遺伝子発現プロファイル解析を行った。その結果、EG9株を補助スターターとして用いた場合、チーズカードのpH低下が促進されることにより菌叢の遷移が加速されるとともに、FAAの生成が促進されることが明らかになった。これらの成果は、FAA含量が高い熟成チーズを製造するために必要な時間を短縮できる可能性を強く示唆しており、本研究は基礎学問上だけでなく産業上も重要な成果であることから高く評価される。

令和3年1月25日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。