

チーズ中における熟成促進乳酸菌 *Lacticaseibacillus paracasei* EG9 株の

遺伝子発現プロファイル解析

2021年1月

朝比奈 唯

チーズ中における熟成促進乳酸菌 *Lactocaseibacillus paracasei* EG9 株の

遺伝子発現プロファイル解析

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物圏資源科学専攻

博士(農学) 学位論文

朝比奈 唯

チーズ中における熟成促進乳酸菌 *Lacticaseibacillus paracasei* EG9 株の

遺伝子発現プロファイル解析

序論.....	1
日本におけるチーズの現状	1
チーズ製造と乳酸菌	2
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> EG9 株	4
1. EG9 株がチーズ熟成に与える影響の検証	5
1.1. 目的.....	5
1.2. 材料と方法.....	5
1.2.1. 使用菌株と培養条件	5
1.2.2. PCR 法による EG9 株の特異的検出	6
1.2.3. チーズ製造.....	7
1.2.4. サンプルング	8
1.2.5. チーズの分析	9
1.2.6. 統計解析.....	10
1.3. 結果.....	11
1.3.1. PCR 法による EG9 株の特異的検出	11
1.3.2. チーズ中生菌数の測定.....	11
1.3.3. 熟成中のチーズ pH の変化.....	12
1.3.4. 熟成中のチーズ中 FAA プロファイル.....	12
1.4. 考察.....	13
2. 熟成チーズ中における EG9 株のたんぱく質分解関連遺伝子の発現解析	20
2.1. 目的.....	20
2.2. 材料と方法.....	21
2.2.1. 使用菌株と培養条件	21
2.2.2. EG9 株ゲノム配列の解読.....	21
2.2.3. BLAST 検索による候補遺伝子の探索	22

2.2.4.RNA 抽出と cDNA 合成.....	22
2.2.5.プライマー設計と動作確認.....	23
2.2.6.リアルタイム PCR.....	24
2.2.7.統計解析.....	25
2.3.結果.....	26
2.3.1.EG9 株ゲノム配列の解読.....	26
2.3.2.BLAST 検索による候補遺伝子の探索.....	27
2.3.3.プライマーの動作確認.....	28
2.3.4.チーズ中における候補遺伝子の発現.....	29
2.4.考察.....	30
3.熟成チーズ中における EG9 株の代謝特性の解析.....	40
3.1.目的.....	40
3.2.材料と方法.....	40
3.2.1.使用菌株と培養条件.....	40
3.2.2.RNA 抽出.....	41
3.2.3.トランスクリプトーム解析.....	41
3.2.4. Differentially Expressed Gene(DEG)解析.....	41
3.2.5.Gene Ontology(GO)解析.....	42
3.2.6.パスウェイ解析.....	42
3.3.結果.....	43
3.3.1 トランスクリプトーム解析.....	43
3.3.2.DEG 解析.....	44
3.3.3.GO 解析.....	44
3.3.4.パスウェイ解析.....	45
3.4.考察.....	45
4.EG9 株のプラスミドバリエーションの発生と生育特性の変化.....	58
4.1.目的.....	58
4.2.材料と方法.....	58

4.2.1.使用菌株と培養.....	58
4.2.2. PCR 法による EG9 株プラスミドの特異的検出.....	59
4.2.3. EG9 株のプラスミドの安定性の検証.....	59
4.2.4. プラスミドバリエントの取得.....	60
4.2.5. プラスミドバリエントの生育特性	60
4.2.6. チーズ中におけるバリエントの存在比率.....	60
4.3.結果.....	61
4.3.1. PCR 法による EG9 株プラスミドの特異的検出.....	61
4.3.2. EG9 株のプラスミドの安定性の検証.....	62
4.3.3. プラスミドバリエントの取得.....	62
4.3.4. プラスミドバリエントの生育特性	62
4.3.5. チーズ中におけるバリエントの存在比率.....	63
4.4.考察.....	63
5.結論.....	73
6.要約.....	74
7.謝辞.....	79
8.参考文献	81

序論

日本におけるチーズの現状

第二次大戦後、日本の食生活は大きく変化した。食の欧米化に伴い、それまでの日本ではあまり馴染みのなかった料理や食材が一般家庭にまで広く浸透した。チーズもそうした食品の一つである。1975年には年間一人当たりの消費量は0.5kg程度であったが、イタリア料理の流行による料理や菓子への使用、ワインブームに伴う需要の増加、健康機能が評価されたこと等の要因から上昇傾向で推移し、2019年には2.7kgにまで増加している。日本国内におけるチーズの総消費量も2019年に358,229tとなり、過去最高であった。

ところが、日本国内におけるナチュラルチーズ生産量は、過去10年程約45,000t前後でほぼ横ばいに推移している(チーズの需給表、農林水産省)。

このうちプロセスチーズ原料用の生産量は低下傾向にある。対して輸入量は増加を続けていることから、輸入品との競合において形勢不利の状況にあると考えられる。

一方、直接消費用は増加傾向にあり、大手乳業者を除く中小規模のチーズ工房数は2010年の約150カ所から2019年には323カ所に倍増している(各地で活躍するチーズ工房の例、農林水産省)。このような工房で生産されたチーズが国際コンクールで上位入賞を果たすなど海外からの評価も高まっており、国産ナチュラルチーズの輸出量は過去10年で大幅に増加している。

これらの情勢を鑑みるに国産ナチュラルチーズの生産量増加を目指す上で海外製品との競合は必至であり、製造効率あるいは品質の向上といった競争力の強化が必要となる。

数か月から数年程の長い熟成期間を必要とするハード、セミハードタイプのチーズを製造する場合、熟成環境の維持管理、熟成庫や空調等の関連設備が製造コストの一要因となる。よって何らかの方法で熟成期間を短縮することがコストダウンにつながり、製品の競争力を高めることができる。

チーズ製造と乳酸菌

チーズ製造において、熟成は固有の風味やテクスチャーといった、チーズの出来上がり
に大きな影響を与える非常に重要な工程である。チーズの熟成中には凝乳酵素、原料乳由来の酵素、乳酸菌など様々な要因が関与し、チーズ中に微生物学的及び生化学的変化を引き起こす(Crow et al., 2001; Gatti et al., 2014; McSweeney, 2004)。中でも乳酸菌はチーズの品質を決定する主要因子である。チーズの製造過程において、乳酸発酵を目的として人為的にスターター乳酸菌(starter lactic acid bacteria: SLAB)が添加される。SLABは製造直後に生菌数が最大となり、その後熟成が進むにつれて減少する(Blaya et al., 2018; Lynch et al., 1996; Settanni & Moschetti, 2010)。この過程でSLABの持つ酵素が溶菌によりチーズ中に放出され、チーズのたんぱく質分解を進めると言われている(Beresford, Fitzsimons et al., 2001; Blaya et al., 2018; Gatti et al., 1999; Gobbetti et al., 2018)。

同時に、特に熟成期間の長いチーズには、人為的に添加された SLAB とは異なる乳酸菌も存在する。これらは非スターター性乳酸菌(non-starter lactic acid bacteria: NSLAB)と呼ばれ、原料乳やチーズの製造環境に由来すると考えられている。チーズ製造中の NSLAB の生菌数は非常に少なく(2–3 log cfu g⁻¹ milk)、また SLAB と異なり乳酸発酵にはほぼ関与しないとされている(Blaya et al., 2018)。しかし NSLAB は熟成中に増殖して最大生菌数に達し(>7 log cfu g⁻¹ cheese)、熟成後期まで生菌数を維持、生存することが報告されており(Beresford et al., 2001; Crow et al., 2001; Gatti et al., 2014; Lynch et al., 1996; Settanni & Moschetti, 2010)、これは NSLAB が持つ最大の特徴と言える。

これまでに、チーズの品質向上を目的として NSLAB を補助スターターとして利用する試みが行われてきた(Bancalari et al., 2020; Beresford et al., 2001; Crow et al., 2001; Galli et al., 2019; Lynch et al., 1996; Settanni & Moschetti, 2010)。チーズ製造時にスターターとともに、選抜した NSLAB を補助スターターとして添加し、チーズカード中のたんぱく質分解や脂質分解を促進させることでチーズの品質や風味を向上させる(Blaya et al., 2018; Gatti et al., 2014; Gobbetti et al., 2015; Gobbetti et al., 2018; Lynch et al., 1996; Lynch et al., 1999; Poveda et al., 2015; Van Hoorde et al., 2010)。

***Lacticaseibacillus paracasei* EG9 株**

Lacticaseibacillus paracasei EG9 株は、チーズ熟成促進用補助スターターの探索を目的として熟成チーズ中から分離された新規 NSLAB である(Saiki et al., 2018)。先行研究より、チーズ製造時にスターターと同量の EG9 株を添加することで、チーズ中遊離アミノ酸(Free amino acid: FAA)生成を促進することが示されたことから、EG9 株は熟成チーズ中でのたんぱく質分解に優れ、チーズの熟成促進に有用な株であることが推測された(Saiki et al., 2018)。一方、新規獲得株であることから本株の遺伝的特徴や生育の特性等、明らかにされていない面も多い。チーズ中のたんぱく質分解に寄与することは示されたが、その作用機序や活動の動態は不明である。EG9 株の利用を考えるうえで、その特性をメカニズムも含め理解、把握することは重要である。利用方法が分かっているとはいえ、理論が明らかでないままブラックボックスと化すのは望ましくない。

本研究では、EG9 株のチーズの熟成促進効果に関わる活動の動態を、特に遺伝的特徴とその発現に着目して明らかにすることを目的とする。

なお、*Lacticaseibacillus paracasei* は、以前は *Lactobacillus paracasei* と呼称されていた。2020 年 4 月の *Lactobacillus* 属の再定義にともない、*Lactobacillus casei* グループ (*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus rhamnosus*) は新設された *Lacticaseibacillus* 属に移行された。本論文では新表記 *Lacticaseibacillus paracasei* を用い、初出以降は *Lb. paracasei* と略記する。

1. EG9 株がチーズ熟成に与える影響の検証

1.1. 目的

先行研究より、チーズ製造時に補助スターターとして EG9 株をスターターと同量添加することでチーズ中 FAA 生成が促進されることが示されている(Saiki et al., 2018)。チーズ中の微生物の活動は、他の微生物との共生あるいは競合といった関係性や、チーズの構成成分や pH 等、熟成中に生じる環境の変化に影響を受ける可能性が高い。本章では EG9 株がチーズ熟成に与える影響をより詳細に明らかにすることを目的として、EG9 株の接種量を段階的に調整してゴーダタイプチーズを製造し、チーズ中の SLAB 及び NSLAB の生菌数、pH、FAA 量の変化について検証した。

1.2. 材料と方法

1.2.1. 使用菌株と培養条件

Lacticaseibacillus. paracasei EG9 (NSLAB) は長期熟成チーズから分離した(Saiki et al., 2018)。チーズ製造における乳酸発酵スターターとして *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 712 (SLAB) を農研機構畜産研究部門の菌株コレクションから用いた(Nomura, Kimoto, Someya, Furukawa, & Suzuki, 1998)。 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM8130^T は、EG9 株の属する *paracasei* 種の標準株として、理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室(RIKEN BRC, Tsukuba, Japan)より購入し

た。EG9 株と JCM8130^T 株、および 712 株の培養には、それぞれ lactobacilli MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA) および 10%(w/v) スキムミルク培地を用いた。使用時には新しい培地に一白金耳接種し、30℃で一晩静置培養して活性化した。

1.2.2. PCR 法による EG9 株の特異的検出

サンプル中の EG9 株を特異的に検出するために、EG9 株染色体の配列をもとに特異的プライマーを作成し、PCR 法による検出法を確立した。なお、EG9 株のゲノム配列の解読については「2.2.2.EG9 株ゲノム配列の解読」および「2.3.1.EG9 株ゲノム配列の解読」にて詳述する。

希釈したサンプルを寒天培地に塗布、培養して生じたコロニーを滅菌水 100 μ L に懸濁し、テンプレートとした。PCR には KOD-Plus-Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用し、10 \times PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 0.5 μ L、2 mM dNTPs 0.5 μ L、25 mM MgSO₄ 0.3 μ L、各プライマー(10 μ M) 0.2 μ L、KOD-Plus-Neo 0.1 μ L、テンプレート菌体懸濁液 0.5 μ L、滅菌水 2.7 μ L を含む総量 5 μ L の PCR 混合液を TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (TaKaRa, Shiga, Japan)を用いて PCR に供した。PCR 条件は初期変性 94 $^{\circ}$ C 2 分、変性 98 $^{\circ}$ C 10 分、伸長 68 $^{\circ}$ C 1 分を 25 サイクルとした。

PCR 反応液に 6 × Loading Buffer (TaKaRa)1 μL を加え、1%アガロースゲルにセットして電気泳動した。アガロースゲルは GelRed™ (Biotium, Fremont, CA, USA)で染色し、青色 LED ライト下で観察した。

プライマーの特異性を検証するため、EG9 株のプラスミドバリエーション P1(Wild type)と P11(Plasmid free)(EG9 株のプラスミドバリエーションについては「4.EG9 株のプラスミドバリエーションの発生と生育特性の変化」にて詳述する)および JCM8130^T 株の菌体懸濁液をテンプレートとして PCR を行った。

1.2.3.チーズ製造

農研機構畜産研究部門で飼育されているホルスタイン牛の、チーズ製造日前日の生乳 150kg を使用した。生乳はチーズ製造まで 4°C で保管し、チーズ製造時に、72°C、15 秒殺菌した。殺菌後、35°C 程度まで冷ましてから、5 つの寸胴に 30 kg ずつ分注した。牛乳成分は Milko-Scan FT1 (FOSS ELECTRIC, Hilleroed, Denmark)を用いて測定した。712 株は、スキムミルク培地 2L に前培養液を 1%(v/v)接種し、30°C で一晚培養した。EG9 株は MRS 液体培地 400mL に前培養液を 1%(v/v)接種し、30°C で一晚培養した。これを 5,800 × g で 10 分遠心して菌体を得、0.85%(w/v)NaCl 溶液 50mL で 3 回洗浄した。最後にスキムミルク 400mL に懸濁し、チーズ添加用菌液とした。

EG9 株は乳中における pH 低下能が乏しいため、乳酸発酵スターターとして原料乳に 712 株を $7 \log \text{cfu g}^{-1}$ になるよう接種した。そして補助スターターとして EG9 株を $7 \log \text{cfu g}^{-1}$ (処理区 A), $6 \log \text{cfu g}^{-1}$ (B), $5 \log \text{cfu g}^{-1}$ (C), $4 \log \text{cfu g}^{-1}$ (D), 非接種(E) の 5 処理区の設定のもと添加した。なお各株の接種量は、712 株のスキムミルク培養、及び EG9 株の MRS 培養の生菌数がおおよそ $9 \log \text{cfu mL}^{-1}$ になることから算出した。各寸胴に乳酸菌スターターを各々添加して 30°C で 10 分静置した後レンネット(FROMASE® 2200 TL GRANULATE, DSM Food Specialties, Heerlen, Netherlands)を $0.9 \text{ g } 30 \text{ kg}^{-1}$ 添加し、 30°C で 1 時間静置した。これを約 $1\text{--}3 \text{ cm}^3$ にカッティングし、攪拌しながら温度を 30°C から 36°C まで上昇させた後、 36°C で維持し、1 時間半程度攪拌を続けた。昇温速度は 5 分につき 1°C とした。その後カードを集めてホエー排除を行い、モールドディングした後重石を載せて 35°C で 4 時間圧搾した。圧搾後、チーズカード塊を 8%塩水に 10°C で 20 時間浸漬した。チーズカード塊を塩水から取り出し、水分を拭き取ってから 10°C で保持した。その後 1 日おきに反転させながら一週間乾燥を続け、1 個ずつ真空包装し、 10°C で熟成させた。

1.2.4. サンプルング

塩漬終了時を製造後 0 日として、製造後 0、30、90、および 180 日後にサンプルングを行った(Fig.1)。各チーズを半月状に切り分け、片方を保管用として、もう片方をサンプリ

ング用としてそれぞれ真空包装した。サンプリング用のチーズを中心から放射状に切断し、前回の切断面部分を取り除いた後みじん切りにして保存用カップに入れ、 -20°C で保管した。残ったチーズ塊は再度真空包装して 10°C で熟成させ、次回以降のサンプリングに用いた。

1.2.5. チーズの分析

生菌数測定はコロニーカウント法で行った。サンプリングしたチーズ 1g を 2%(w/v)クエン酸三ナトリウム水溶液 50mL に加え、ホモジナイザーを用いて室温、12,000 rpm で 1 分粉碎し、溶解させた。溶解液を 0.85%NaCl 溶液で適宜希釈し、アガープレートに塗布した。なお、712 株と EG9 株の生菌数は、それぞれプロモクレゾールパープル(BCP)添加 10%スキムミルク寒天培地および Rogosa 寒天培地(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を用いて選択的に計数した。これらのプレートをアネロパッケンキ(Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Japan)を用いて 30°C で嫌気培養し、コロニー数の測定を行った。測定の下限は、チーズ溶解液 50 μL を寒天培地に塗布した際に検出可能な 3 log cfu g^{-1} とした。なお、Rogosa 寒天培地上に生じたコロニーを各プレートにつきランダムに 16 個選択し、「1.2.2. PCR 法による EG9 株の特異的検出」の方法で菌株の判別を行った。

pH はチーズ 2.5g に 5mL の滅菌水を加えた懸濁液を用いて測定した。

FAA 量の測定は、野村らの方法(Nomura et al., 1998)をもとに一部変更して行った。サンプリングしたチーズ 2.5g を 5mL の 7.5%TCA 溶液に加え、ホモジナイザーを用いて室温、12,000rpm で 1 分粉碎した。ホモジネートを 4°C、20,700×*g* で 10 分遠心し、水層 200μl を 800μl の 0.05N HCl と混合し、0.20μm のフィルターでろ過した。これをアミノ酸分析機(L-8900, HITACHI Ltd., Tokyo, Japan)の高速生体成分標準分析に供した。アミノ酸スタンダードはアミノ酸混合標準液 ANII 型と B 型(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を用いた。

1.2.6.統計解析

チーズの製造は各処理区について製造した約 3kg のカードを 3 分割して約 1kg/個のチーズとしてモールドイングし、3 反復とした。

チーズの pH および総 FAA 量について、処理と熟成期間を固定効果、各チーズを変量効果とする混合効果分散分析モデルを適用し、Statistical Analysis System(SAS)(version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた解析を行った。なお、pH については Tukey-Kramer 法、総 FAA 量については Tukey 法を用いて多重比較を行った。

1.3.結果

1.3.1.PCR 法による EG9 株の特異的検出

EG9 株特異的プライマーセットとして、EG9chr Fw(5'-ATCTCTAACCTTGACACACCATAC-3')と EG9chr Rv(5'-GGACGGTAAATTCAACACATCTAG-3')を作成した。PCR による特異性検証の結果、EG9 株 P1 および P11 では単一のバンドが確認され、JCM8130^T 株ではバンドは検出されなかった(Fig. 2)。

1.3.2.チーズ中生菌数の測定

製造に用いた原料乳の成分組成は、脂肪 3.66%、たんぱく質 3.74%、乳糖 4.86%、無脂固形分 9.35%であった。全ての処理区において EG9 株、712 株ともに、塩漬終了時である製造後 0 日には接種菌数より 10^2 – 10^3 倍に増加していた。その後 EG9 株は 8 – $9 \log \text{cfu g}^{-1}$ 程度まで増加した後 180 日間生菌数を維持したのに対し、712 株は時間の経過とともに減少した (Fig. 3)。さらに一部のサンプルでは 712 株の生菌数が検出の下限に達し、観察されなくなった(Fig. 3a, 90 and 180 days; Fig. 3b, 180days; Fig. 3c, 180days)。なお、チーズ E(EG9 株非接種区)からも製造後 0 日時点で EG9 株が検出された。これは 5 処理区のチーズを同時に製造するために他 EG9 株接種区のチーズバットと近接した状態で製造したことによる混入と考えられる。結果的に 5 種類の EG9 株接種レベルのチーズサン

プルを得ることとなり、チーズ E の EG9 株生菌数は製造後 90 日に $8 \log \text{cfu g}^{-1}$ に到達した後、他の処理区と同様に、製造後 180 日まで維持された。また EG9 株の接種量が多いほど、712 株の減少が早い傾向が見られた。なお、Rogosa 寒天培地上に生じたコロニーは、EG9 株特異的プライマーを用いた PCR によって EG9 株であることが確認された。

1.3.3. 熟成中のチーズ pH の変化

チーズ pH に対して、EG9 株接種量、熟成期間及びこれらの相互作用が有意に影響を与えることが示された (Table 1, Fig. 4a)。EG9 株の接種量が多いほど pH が低下し、処理 A と D 間では有意な差が認められた (Table 1)。また熟成期間による有意な効果が認められ、製造後 30 日に大きく低下した後 90 日で最低値をとり、180 日にわずかに上昇した (Table 1)。処理 A のチーズのみ、製造後 0 日に他の処理区と比較して有意に低い pH を示したが、30 日以降は全ての処理区において 5.0~5.1 の間でほぼ揃った値を示した (Fig. 4a)。

1.3.4. 熟成中のチーズ中 FAA プロファイル

チーズ中総 FAA 量の変化に対して、EG9 株接種量、熟成期間及びこれらの相互作用が有意な効果を示した (Table 1, Fig. 4b)。EG9 株接種量が多いほど総 FAA 量も増加し、特に処理 A と B では有意な増加が認められた (Fig. 4b)。また熟成期間の経過に伴って総 FAA 量も有意に増加した (Table 1)。

チーズ中の各アミノ酸含有量について、チーズ E を含め、全ての処理区で同様の動態を示した。特にグルタミン酸、バリン、ロイシン、フェニルアラニン、GABA は熟成の後半に大きく増加する傾向が見られた(data not shown)。

1.4. 考察

本研究では、NSLAB 由来補助スターターである *Lb. paracasei* EG9 添加の影響を、熟成中の pH と FAA 量の変化から検証した。

チーズ熟成中の NSLAB の増殖は一般的に観測される事象であり (Beresford et al., 2001; Blaya et al., 2018; Crow et al., 2001; Lynch et al., 1996; Settanni & Moschetti, 2010)、本研究で用いた NSLAB 由来の EG9 株においても同様の結果が得られた。加えて EG9 株の接種量が多いほど 712 株の減少が早まる傾向が見られた。一般的に乳酸菌の生育が阻害される要因として、酸によるプロトン駆動力の低下や細胞内物質の損傷、活性酸素による細胞内物質の損傷、低温による核酸の転写・翻訳・修復効率の低下、浸透圧変動による細胞機能の崩壊、栄養分の不足などが知られている (Van de Guchte et al., 2002)。712 株の生菌数の減少は主に製造・熟成中の pH の低下、低温、増殖した EG9 株との競合といった複数の要因によるものと推測でき、EG9 株接種量による pH 低下や栄養欠乏の程度の変化が 712 株の減少の早さに影響を与えたと考えられる。

そして EG9 株接種量、熟成期間及びこれらの相互作用がチーズ pH と総 FAA 量に対して有意に影響を与えることが明らかになった。

チーズ pH では特に製造後 0 日に EG9 株接種量の影響が明確に見られ、EG9 株接種量が多いほど pH は低下した。これは EG9 株の生菌数に応じて製造中の乳酸生成量も多くなったためと考えられる。その後酸性環境への応答、代謝の変化、糖の枯渇等の要因により乳酸生成が沈静化し、安定したと推測される。

また、チーズ中総 FAA 量は EG9 株接種量が多いほど増加した。EG9 株の補助スターター利用によってチーズ中総 FAA 量が増加するという結果は先行研究(Saiki et al., 2018)と一致しており、チーズ熟成における EG9 株のたんぱく質分解促進効果を支持した。

Table 1. Effects of treatment and ripening period on cheese pH and total FAA amount.^a

	pH			Total FAA amount ($\mu\text{mol g}^{-1}$)		
Treatment	*b			*		
A	5.11	\pm 0.01	b	53.40	\pm 0.83	a
B	5.13	\pm 0.01	ab	46.61	\pm 0.83	b
C	5.15	\pm 0.01	ab	42.17	\pm 0.83	c
D	5.16	\pm 0.01	a	43.02	\pm 0.83	c
E	5.15	\pm 0.01	ab	40.27	\pm 0.83	c
Ripening period(day)	*			*		
0	5.44	\pm 0.01	a	12.28	\pm 0.74	d
30	5.05	\pm 0.01	b	30.01	\pm 0.74	c
90	5.01	\pm 0.01	c	50.19	\pm 0.74	b
180	5.05	\pm 0.01	b	87.89	\pm 0.74	a
Treatment \times Ripening period	*			*		

a Values were expressed as least squares means \pm SE; different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

b * $p < 0.05$,

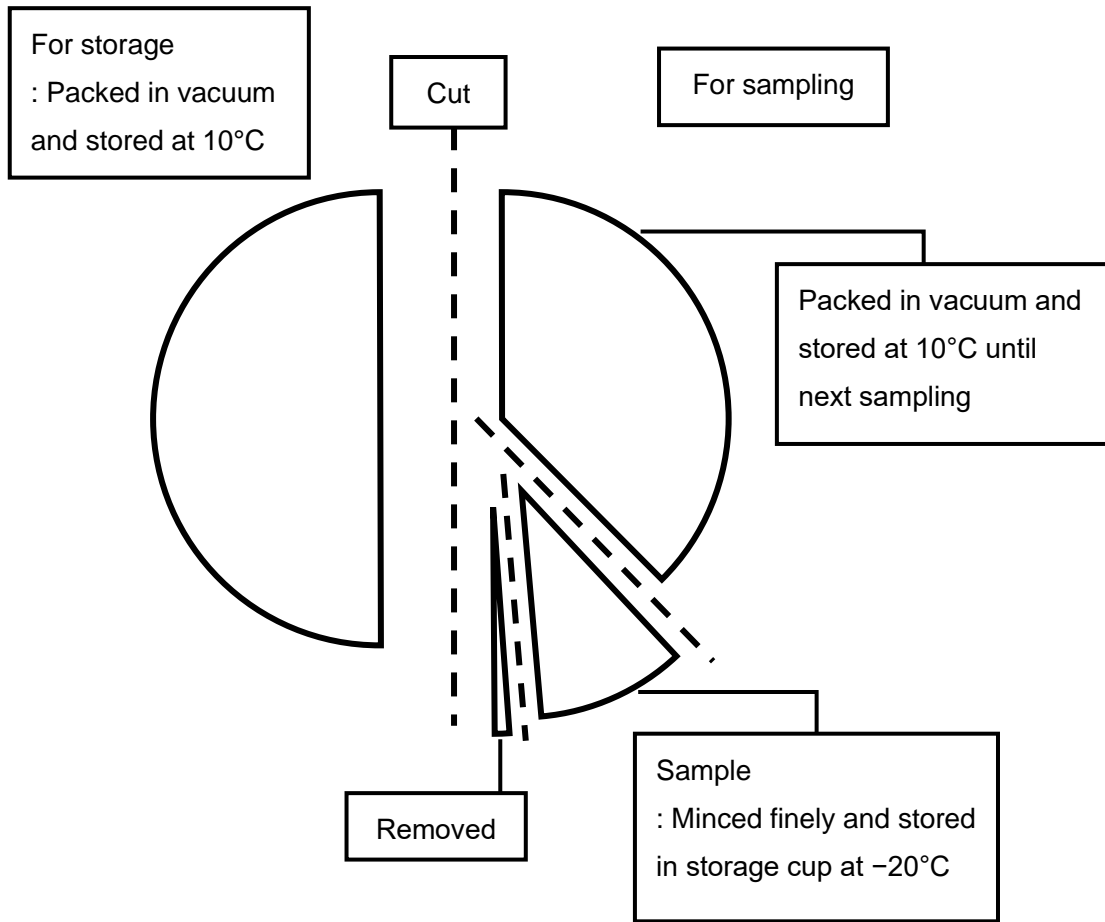


Figure 1. A schematic diagram of cheese sampling.

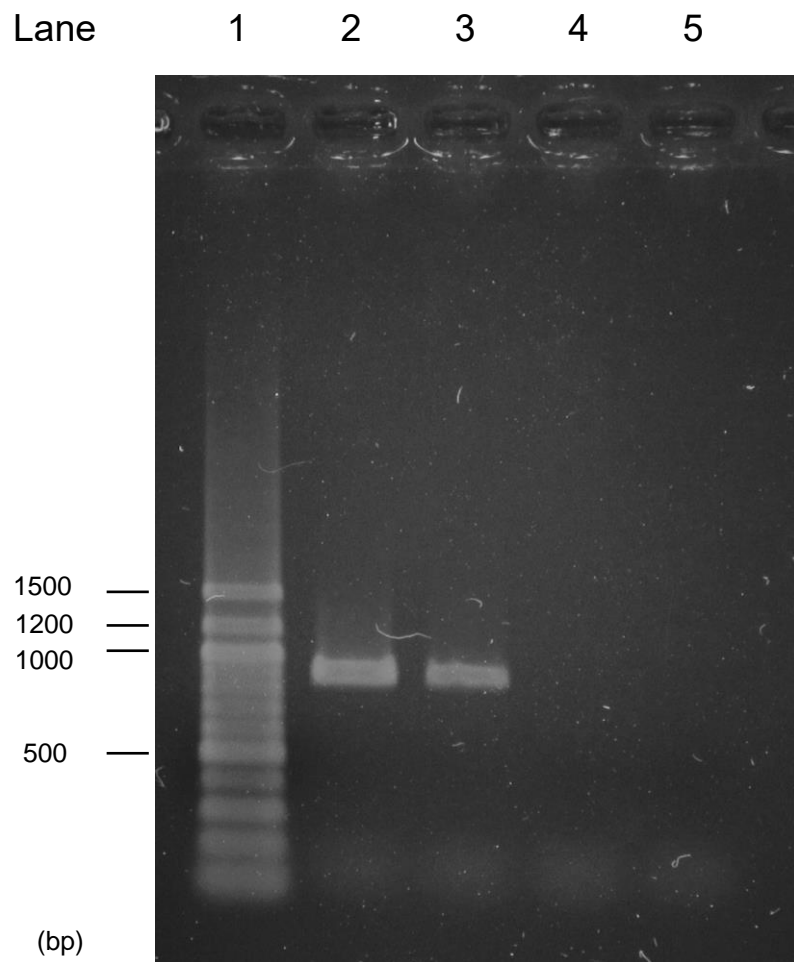


Figure 2. Electrophoresis gel of PCR products using EG9 chromosome specific primer. Lane 1, ladder marker; lane 2, EG9 P1(Wild type); lane 3, EG9 P11(Plasmid free); lane 4, JCM8130^T; lane 5, diluted water (negative control).

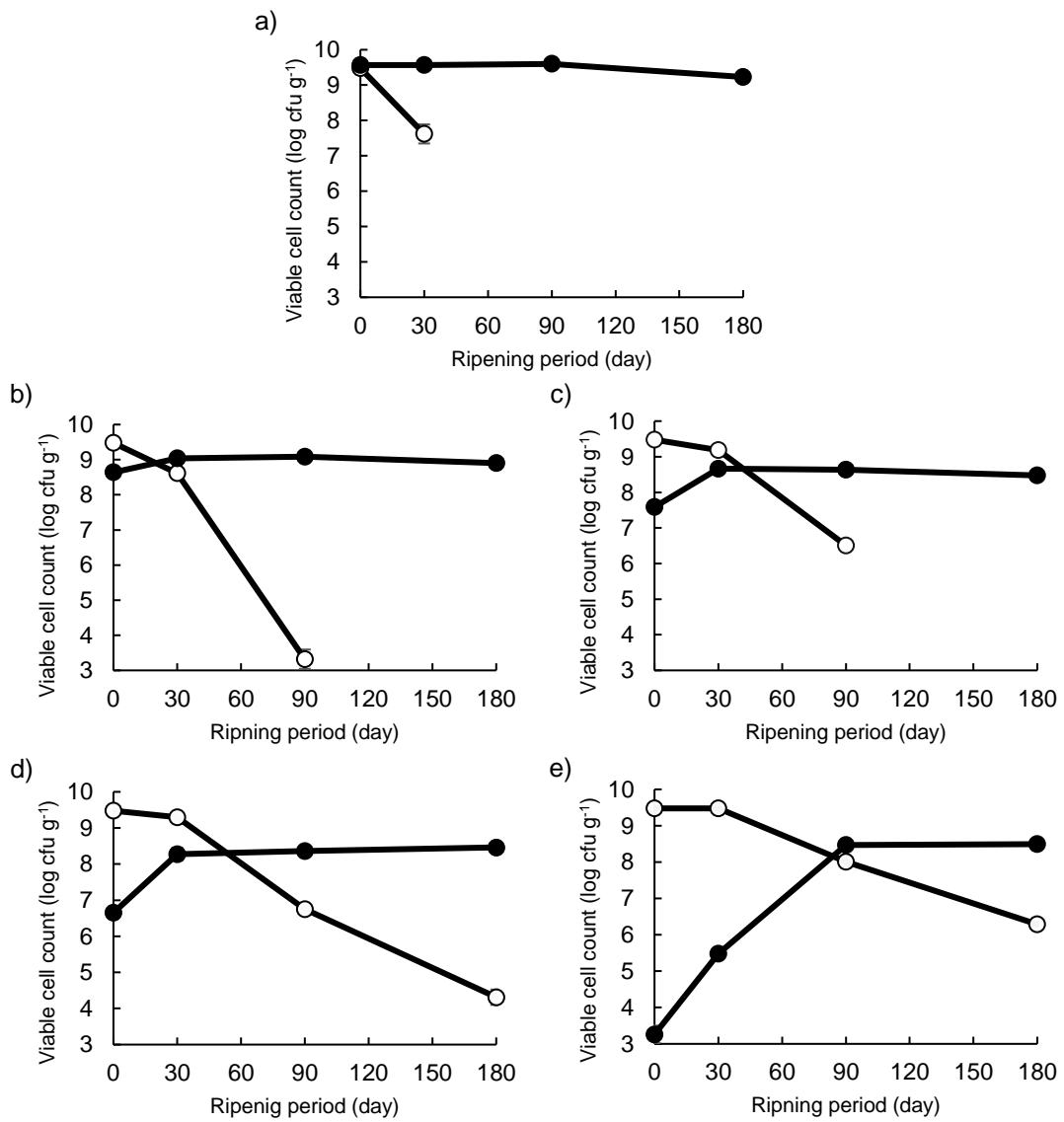


Figure 3. Changes of viable cell count of the experimental cheeses A (a), B (b), C (c), D (d) and E (e): \circ , *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 712; \bullet , *Lb. paracasei* EG9. The lower detection limit is 3 log cfu g⁻¹.

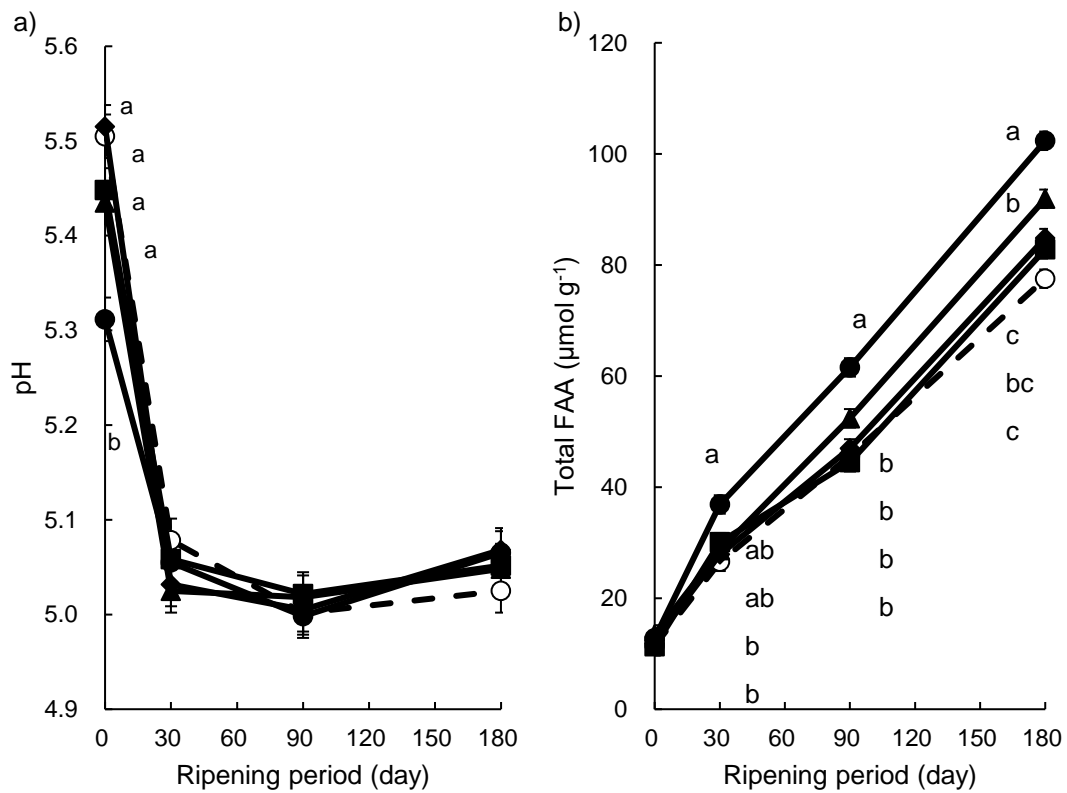


Figure 4. Effects of treatment and ripening period on cheese pH (a) and total FAA amount (b): ●, treatment A; ▲, treatment B; ■ treatment C; ◆, treatment D; ○, treatment E. Values are expressed as least squares means±SE. Different letters with each measurement day indicate significant difference (p<0.05).

2. 熟成チーズ中における EG9 株のたんぱく質分解関連遺伝子の発現解析

2.1. 目的

第 1 章において EG9 株の補助スターター利用がチーズ中の FAA 生成を促進する効果を持つことが改めて示された。一方で EG9 株がチーズ中のたんぱく質分解にどのように寄与しているのかは明らかではない。

乳酸菌のたんぱく質分解機構について、これまでに様々な菌体内外の分解酵素、トランスポーターなどの関与が報告されている(Blaya et al., 2018; Gatti et al., 1999; McSweeney, 2004)。細胞壁結合型プロテイナーゼ(Cell-envelope proteinase: CEP)は菌体外側の細胞膜上に存在し、乳中においてはカゼインを分解しオリゴペプチドを生成する。これらのオリゴペプチドはペプチドトランスポーターによって菌体内に取り込まれ、菌体内ペプチダーゼによって短鎖のペプチド及びアミノ酸が生成される。これら関連酵素のプロファイルは菌種により異なる。また、同じ役割を持つと考えられる酵素が、菌種によって異なる配列や構造でコードされることもある(Siezen, 1999)。

本研究では、熟成チーズ中における NSLAB 由来補助スターターEG9 株のたんぱく質分解の特性を解明することを目的として、既知の配列をもとに EG9 株ゲノム上のたんぱく質分解関連遺伝子を探索した。そして EG9 株を補助スターターとして添加したゴーダタイプチーズを製造し、チーズ中における EG9 株たんぱく質分解関連遺伝子の発現を調査した。

2.2.材料と方法

2.2.1.使用菌株と培養条件

Lb. paracasei EG9 と *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 712 を使用した。培養条件は 1.2.1 に準じた。

2.2.2.EG9 株ゲノム配列の解読

MRS 液体培地で培養した対数増殖期の EG9 株菌体から、アルカリ SDS 法(Saito & Miura, 1963)を一部改変して長鎖 DNA を調製した。これをサンプルとして、single molecule real-time (SMRT) technology (Eid et al., 2009)を用いたシーケンス解析により、EG9 株の全ゲノム配列を構築した。

詳細は次の通り; PowerClean DNA cleanup kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA)によってゲノム DNA を精製した後 20kb を目安にライブラリ調製した。サイズセレクトクションは行わなかった。そして PacBio RS II platform (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA)の 7 つの P6-C4 系 SMRT cells (a 240-min movie per cell)によるシーケンシングを行った(Nakano et al., 2016)。得られたシーケンスデータは Hierarchical Genome Assembly Process version 2(Chin et al., 2013) を用いて *de novo* アセンブリに供した。

2.2.3. BLAST 検索による候補遺伝子の探索

National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースから乳加工に関わる乳酸菌の既知の乳たんぱく質分解関連遺伝子のアミノ酸配列を得てリファレンス配列とし、EG9 株全ゲノム配列(前項 2.2.2)をもとに Translated BLAST searches を行った。

GENETYX® (Ver.13.0.3, GENETYX, Tokyo, Japan) を用いてリファレンス配列と 98% 以上の同一性(identity)を示す配列を含む Open Reading Frame(ORF)を検索し、このうちアミノ酸残基数がリファレンス配列と近いものを EG9 株における推定相同遺伝子(候補遺伝子)とした。また ORF の identity が 98% 未満であっても、類似性(similarity)が概ね 80% を超えており、かつアミノ酸残基数がリファレンス配列と近い場合は候補遺伝子に含めた。

2.2.4. RNA 抽出と cDNA 合成

Total RNA は RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出し、RNA サンプルの DNase 処理には RNase-Free DNase set (QIAGEN) を用いた。抽出した RNA は Eppendorf BioSpectrometer basic (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて 260 nm の吸光度を測定して収量を算出した。

cDNA 合成は PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)を用いて、萩らの方法(Hagi, Kobayashi, & Nomura, 2014)をもとに一部変更して行った。滅菌水で総量 10 μ L に調製した、Random 6 mers 1 μ L、dNTP Mixture 1 μ L、total RNA 1 μ g を含む溶液を C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)を用いて 65 °C で 5 分変性処理した。これに 5× PrimeScript II Buffer 4 μ L、RNase Inhibitor 0.5 μ L、PrimeScript II RTase 1 μ L、滅菌水 4.5 μ L を含む逆転写 PCR 混合液 10 μ L を加えて総量 20 μ L とし、C1000™ thermal cycler を用いて逆転写 PCR に供した。PCR 条件は 30 °C 10 分の前処理の後、42 °C 60 分、その後 72 °C 15 分とした。得られた cDNA 溶液は滅菌水 80 μ L を加えて希釈し、リアルタイム PCR のテンプレートとした。

2.2.5.プライマー設計と動作確認

EG9 株ゲノム上に見出された 31 の候補遺伝子と EG9 株の 16S rRNA をそれぞれ特異的に検出するプライマーを作成した。作成したプライマーの動作確認にあたって結果が遺伝子発現レベルに左右されることを防ぐために、EG9 株を(1)MRS 液体培地で 30 °C で一晩、(2)NaCl を 1.7%加えた MRS 液体培地で 10 °C で 5 日、の 2 条件で培養した。712 株は MRS 液体培地で 30 °C で一晩培養した。これらの培養液 1mL から RNA を抽出して cDNA を合成し、これをテンプレートとした。PCR と電気泳動は「1.2.2. PCR 法による EG9 株の特異的検出」に記載した方法に準じて行った。

また増幅産物の鎖長とシーケンス解析によってプライマーセットの特異性を検証した。

2.2.6.リアルタイム PCR

新鮮サンプルからの RNA 回収のため、「1.2.3.チーズ製造」の方法に準じて処理区 A と同条件のチーズを製造した。チーズ 1g を 2%(w/v)クエン酸三ナトリウム水溶液 9mL に加え、ホモジナイザーを用いて室温、12,000 rpm で 1 分粉碎した。懸濁液 10mL を 4℃、 $6,000 \times g$ で 5 分遠心して菌体を収集し、1 mL of TE buffer (10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0) で 3 回洗浄した。

また遺伝子発現解析の対照区である定常期の EG9 株菌体を得るために、EG9 株と 712 株を 10%スキムミルク液体培地で 30 °C で 20 時間共培養した。この共培養液 1 mL に 200 μL の 2%(w/v)クエン酸三ナトリウム水溶液を加えて攪拌し、室温、 $13,000 \times g$ で 3 分遠心して菌体を収集した。菌体は 1mL の 2%(w/v)クエン酸三ナトリウム水溶液で 2 回洗浄した。

Ulve らの方法(Ulve et al., 2008)をもとに一部変更して、収集した菌体から Total RNA を抽出した。菌体を TE buffer (20mmol L⁻¹ Tris-HCl, 2 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0) と RLT buffer (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN) を 3:7 で混合した混合液 500 μL に懸濁した。Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) に SDS (10%) 50 μL、phenol (nakalai tesque, Kyoto, Japan) 500 μL、菌体懸濁液を加え、FastPrep-24™ Classic bead beating

grinder and lysis system (MP Biomedicals)を用いて 4.0 m s^{-1} で 1 分、3 回振盪して菌体を破碎した。なお、1 回振盪するごとに 2 分間氷上で冷却した。これに $200 \mu\text{L}$ のクロロホルムを加えて攪拌し、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12,000 \times g$ で 20 分遠心した。水層を新しいチューブに移して同量の 70%エタノールと混合し、RNeasy® spin column (QIAGEN)を用いて RNA を回収した。カラムに $30 \mu\text{L}$ の RNase-free water を加え、2 回溶出させた。DNase 処理、RNA 定量、cDNA 合成は前述の通りに行った。

リアルタイム PCR は萩らの方法(Hagi et al., 2014)をもとに一部変更して行った。

THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) $10 \mu\text{L}$ 、テンプレート cDNA $1 \mu\text{L}$ 、各プライマー($10 \mu\text{M}$) $1 \mu\text{L}$ 、滅菌水 $7 \mu\text{L}$ を含む総量 $20 \mu\text{L}$ のリアルタイム PCR 混合液を C1000™ Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System (BIO-RAD)を用いてリアルタイム PCR に供した。PCR 条件は初期変性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 秒の後、変性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 秒、アニーリング及び伸長 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 秒を 40 サイクルとした。

2.2.7.統計解析

候補遺伝子の相対的発現量について、一つのサンプルにつき 3 反復で測定して Ct mean を算出し、これを各サンプルの Ct 値とした。この Ct 値を用いて、16S rRNA を内在性コントロール、10%スキムミルク培地を用いて 712 株と共に $30 \text{ }^\circ\text{C}$ で 20 時間共培養した定常期の EG9 株菌体(「2.2.8 リアルタイム PCR」参照)における発現を対照として $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

method (Livak & Schmittgen, 2001)による解析を行った。また各候補遺伝子における対照とチーズ間の相対的発現量の差について Student の t 検定を行った($p < 0.05$)。

2.3.結果

2.3.1.EG9 株ゲノム配列の解読

EG9 株ゲノムとして、1つの染色体(2,927,257 bp; GC content, 46.59%) および3種類のプラスミド pEG9A (79,815 bp; GC content, 43.67%)、pEG9B (55,299 bp; GC content, 43.10%)、pEG9C (12,035 bp; GC content, 40.61%)が見出された。

PGAP によるアノテーションから、EG9 株染色体、pEG9A、pEG9B、pEG9C はそれぞれ 3,025、102、72、13 の推定コード配列を持つことが分かった。また BLAST による相同性解析では、EG9 株染色体および pEG9C は *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T の染色体 (query cover, 89%; identity, 99%; GenBank accession number AP012541) およびプラスミド pLBC-2 (query cover, 89%; identity, 100%; GenBank accession number AP012543) と密接に関連していることが明らかになった。pEG9A および pEG9B はそれぞれ *Lb. paracasei* N1115 のプラスミド(query cover, 49%; identity, 96%; GenBank accession number CP007124) および *Lb. casei* LC2W のプラスミド pLC2W (query cover, 22%; identity, 99%; GenBank accession number CP002617) と部分的な相同性を示した。

2.3.2. BLAST 検索による候補遺伝子の探索

乳酸菌の既知のたんぱく質分解関連遺伝子として、19 のペプチダーゼ、5 つの細胞壁結合型プロテイナーゼ(cell-envelope proteinase : CEP)、12 のペプチド輸送系、2 つのたんぱく質分解関連遺伝子制御因子(Alcántara et al., 2016; Doeven, Kok, & Poolman, 2005; McSweeney, 2004; Pastar et al., 2003; Siezen, 1999)について、EG9 株ゲノムにおける相同配列を検索した(Table 2)。調査した 38 遺伝子のうち、18 のペプチダーゼ、1 つの CEP、11 のペプチド輸送系、1 つのたんぱく質分解関連遺伝子制御因子について相同配列が見られた一方、*prtP*、*prtB*、*prtH*、*scpA*、*codY*の相同配列は見られなかった(Table 2)。同一名だが配列が異なるリファレンス遺伝子配列に対して EG9 株ゲノム上の複数の ORF がヒットしたため、探索した候補遺伝子は、遺伝子名に EG9 株ゲノム上において MiGap(Sugawara, Ohyama, & Kurokawa, 2009)によるアノテーションで付与された遺伝子番号をつけて呼称することとした。Table 2 に各候補遺伝子に該当する DDBJ の locus tag を併記した。全ての候補遺伝子は染色体上にコードされ、プラスミド上では確認されなかった。*pepE*には *pepC2355* に該当したものと同一 ORF がヒットしたが、*pepC*との相同性のほうが高かったため、*pepE*は該当なしとした。*dppP*については該当する ORF が *dppA2028* に該当した ORF 内に存在したため、該当なしと判断した。Dpp, Opp 輸送系について、*dppP*を除き、それぞれ全ての構成遺伝子に該当する配列が見られ、それらが

EG9 株ゲノム上でもオペロンを構成していることが確認された。EG9 株ゲノム上に *Lc. lactis* subsp. *cremoris* の *prtP* と 93%以上の identity を示す領域が見つかったが、トランスポーズの挿入により 2 つのフラグメントに分かれていた。また *prtR* に該当する ORF として、*Lacticaseibacillus casei* JCM 1134 の *prtR* と 99%の identity を示すものと、*Lacticaseibacillus rhamnosus* BGT10 の *prtR* と 44%の identity 及び 84%の similarity を示すものの 2 つが見つかった。しかし *Lb. rhamnosus* BGT10 の配列と類似する方の ORF は BGT10 株の *prtR* の配列と相同性を示す領域が 1,281/1,480 残基に限られており、その領域内の配列は挿入及び欠失を多く含んでいたため、候補遺伝子から除外した。

なお上記の候補遺伝子の他に、ゲノム配列のアノテーションの結果からたんぱく質分解に関連すると考えられる遺伝子は見出されなかった。

2.3.3.プライマーの動作確認

2 つの条件下で培養した EG9 株の cDNA をテンプレートとした PCR およびシーケンス解析の結果、どちらの培養条件においても設計通りのサイズと配列を持つ増幅産物が得られた。712 株の cDNA をテンプレートとした PCR ではバンドは検出されなかった。本実験で作成した、EG9 株の 31 の各候補遺伝子と 16S rRNA の特異的プライマーセットの配列を Table 3 に示した。またこの PCR により、EG9 株において全ての候補遺伝子が実際に発現していることが確認された(data not shown)。

2.3.4. チーズ中における候補遺伝子の発現

RNA回収のため再製造した処理Aのチーズについて、pH、生菌数、総FAA量は前述のチーズAの結果と同等だった(data not shown)。10%スキムミルク培地中で712株と30℃で共培養した定常期のEG9株の発現を対照とした、チーズ中EG9株の各候補遺伝子の相対的発現量をFig. 5に示した。総FAA量の変化から、FAA生成が活発に行われていると考えられた製造後0日と30日のチーズを試料とした。

製造後0日のチーズ中では、31の候補遺伝子のうち27遺伝子の発現が、対照の発現と比較して有意に上昇した(Fig. 5)。特に *pepO1010*、*pepA308*、*pepP304* は10倍を超える発現上昇を示した。一方でペプチドトランスポーターの一部の遺伝子では発現の変動が見られなかったことから、これらの遺伝子の発現は、対照であるスキムミルク培養の定常期EG9株と同様だったことが示された。

製造後30日のチーズ中では、31遺伝子のうち25遺伝子の発現が有意に減少した。また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ており、EG9株菌体が活動を休止していることが推察された。

2.4. 考察

本研究では EG9 株ゲノム上のタンパク質分解関連遺伝子を調査し、ペプチダーゼ、ペプチドトランスポーター、CEP を含む 31 の候補遺伝子を見出した。

乳発酵において、乳中のたんぱく質は乳酸菌が産生する様々なプロテアーゼによってペプチドや FAA に分解される。これまで、乳たんぱく質分解に関連する遺伝子は、発酵スターターとして利用される *Lc. lactis* や *Lactobacillus* sp. において主に研究が進められてきた (Fox & McSweeney, 2017; McSweeney, 2004)。本研究は NSLAB 由来の EG9 株においてこれらの相同遺伝子を調査し、EG9 株が 18 のペプチダーゼ、1 つの CEP、11 のペプチドトランスポーター構成遺伝子、1 つのたんぱく質分解関連遺伝子制御因子をコードしていることを明らかにした。

オリゴペプチドトランスポーターを構成する *opp* 遺伝子群とエンドペプチダーゼの一つである *pepO* について、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* は *opp* オペロンの下流に *oppA* のホモログである *oppA₂* をコードする (Peltoniemi, Vesanto, & Palva, 2002)、あるいは *L. lactis* は *opp* オペロンの下流に *pepO* をコードする (Tynkkynen et al., 1993) との報告がある。しかし EG9 株においては *oppA₂* は存在せず、*pepO* は *opp* オペロン下流ではなく別の位置にコードされていた。また今回 *Lc. lactis* の *oppA* と 42% の identity、82% の similarity を持ち、アミノ酸残基数も近い EG9 株の ORF を *oppA1553* として見

出したが、*Lb. paracasei* の標準株である *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T では *oppA* はフレームシフト変異により 2 つのたんぱく質に分割されていた。

CEP は複数のドメインから構成される、細胞表面に位置するプロテアーゼであり、cell surface proteinase、cell wall-bound proteinase、lactocepin とも呼ばれる。乳発酵において、CEP はたんぱく質分解の第一段階としてカゼインを長鎖ペプチドに分解する役割を持つ。これまでに、異なる配列と構造を持つ 5 種類の CEP の存在が明らかにされており (Siezen, 1999)、*Lb. paracasei* では *prtP* タイプの遺伝子を持つことが報告されているが (Holck & Naes, 1992; Vukotić et al., 2016)、今回 EG9 株では *prtR* タイプの遺伝子 (*prtR435*) が見つかった。しかし、EG9 株ゲノム上の、*prtR435* とは異なる位置に *Lc. lactis* subsp. *cremoris* の *prtP* と 93% の identity を示す領域があり、この箇所の ORF はトランスポゼースの挿入により 2 つの断片に分かれていたことから、EG9 株は *prtP* の痕跡を保持しているものの、活性は持たないと推察された。加えて、*prtR435* とは異なる ORF に *Lb. rhamnosus* BGT10 の *prtR* と 44% の identity 及び 84% の similarity を持つ相同配列があることが分かった。この ORF は、相同性を示す配列の領域(1,291 amino acids)が BGT10 株の *prtR*(1,480 amino acids)よりも約 200 残基短いため、本研究では候補遺伝子から除外した。しかしこの相同配列を含む ORF 自体は 1,554 amino acids の残基数を持つことから、EG9 株が *prtP* と *prtR* と異なるタイプの CEP を持つ可能性がある。

リアルタイム PCR による発現解析によって、EG9 株の全ての候補遺伝子が実際に発現していることが確かめられた。この結果は EG9 株がチーズの熟成中に、カゼイン分解からペプチドの取り込みを経て FAA を生成するといった、たんぱく質分解のプロセスに広く関与していることを示唆した。特に、ペプチド鎖の N 末端からグルタミン酸またはアスパラギン酸を遊離するアミノペプチダーゼである *pepA*(Niven, 1991) の発現は著しく上昇した。これらのアミノ酸はうま味の誘発に関与することから(Fuke & Shimizu, 1993)、*pepA* の発現上昇はチーズの FAA 生成やうま味の増加に影響を与える可能性がある。なお *pepA* は細胞内に存在するが、本研究で *dtpT*、*opp* 系、*dpp* 系のペプチドトランスポーターの発現が確認されたこと、たんぱく質分解には関連しないため本研究では取り上げていないがアミノ酸を細胞内外に移動させるトランスポーターが存在することから、EG9 株がペプチドを細胞内に取り込み、細胞内の *pepA* でグルタミン酸およびアスパラギン酸を遊離して細胞外に放出する経路が考えられる。また EG9 株の溶菌により菌体内酵素がチーズ中に流出してチーズ基質に直接作用する可能性も大いにある。どちらの場合においても、本研究で示された *pepA* の著しい発現上昇は EG9 株がチーズ熟成を促進する補助スターターとして有用である可能性を示している。

チーズを模した条件下で培養した *Lb. rhamnosus* について、MRS 培地で培養した場合よりもたんぱく質分解活性が高まることが報告されている。この現象は微生物の環境適応戦略に起因するとされる(Bove et al., 2012)。加えて、低温ストレス耐性にアミノ酸が関与す

るとの報告もある(Borezee et al., 2000; Lee et al., 2015)。よって、EG9 株におけるたんぱく質分解関連遺伝子の発現上昇はチーズ中の環境への適応に関連する可能性が考えられる。

第 1 章において、EG9 株の接種量を変えてゴータタイプチーズを製造した場合、接種量の増加に従ってチーズ中総 FAA 量が増加することが観察された。この結果は EG9 株がチーズのたんぱく質分解に関与するという考えを支持している。一方で、EG9 株の接種量が多いほど 712 株の減少が早くなる傾向が見られたことから、溶菌した 712 株から流出した菌体内酵素が FAA 量の増加に寄与している可能性も十分に考えられる。熟成チーズ中の SLAB の溶菌と菌体内酵素の放出について言及した研究も報告されている(Blaya et al., 2018; Gatti et al., 2014, 1999, 2008; Gobbetti et al., 2018)。しかし、EG9 株のたんぱく質分解関連遺伝子発現が製造後 0 日のチーズ中で上昇し、製造後 30 日では減少したという結果は、チーズ中総 FAA 量の変化の動きとも一致している。よって、EG9 株は熟成チーズ中のたんぱく質分解に重要な影響を与えうると言える。

また、チーズ熟成を模してチーズスラリー中で *Lb. paracasei* ATCC 334 と *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SK11 を共培養した実験において、ATCC 334 株のたんぱく質及びペプチド分解に関連する遺伝子が過剰発現したという報告がある(Desfossés-Foucault et al., 2014)。これは EG9 株の遺伝子発現が 712 株の影響を受けている可能性を意味している。チーズ中の環境や成分組成の変化は非常に複雑である。よって、熟成チーズ中のたんぱく

質分解における EG9 株の作用機序を解明するには、SLAB や他の微生物との相互作用の影響を考慮することが不可欠である。

Table 2. Putative homologous genes of strain EG9 related to milk proteolysis.^a

Gene	Gene No. and Locus tag	Reference sequence		Accession No.	Identity
		Amino acid residue (EG9 ^b / ref)	Source		
Peptidase					
<i>pepO</i>	gene_1413 LPEG9_07465	634 / 634	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN71691	100%
	gene_1010 LPEG9_05385	642 / 634	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN71298	99%
<i>pepF</i>	gene_962 LPEG9_05135	601 / 601	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN71253	99%
	gene_663 LPEG9_03470	603 / 603	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN70969	99%
	gene_245 LPEG9_01260	599 / 599	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN70534	99%
<i>pepN</i>	gene_436 LPEG9_02260	855 / 844	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN70730	99%
<i>pepC</i>	gene_2356 LPEG9_12310	448 / 448	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN72555	100%
	gene_2355 LPEG9_12305	439 / 439	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN72554	100%
<i>pepL</i>	gene_1025 LPEG9_05465	429 / 411	<i>Lb. casei</i>	AJE63369	98%
<i>pepA</i>	gene_308 LPEG9_01580	346 / 346	<i>Lb. paracasei</i>	GAV18016	99%
<i>pepT</i>	gene_310 LPEG9_01590	425 / 409	<i>Lb. rhamnosus</i> GG	CAR86253	90%
<i>pepV</i>	gene_729 LPEG9_03830	467 / 467	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN71034	100%
<i>pepX</i>	gene_1594 LPEG9_08415	799 / 797	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN71869	99%
<i>pepI</i>	gene_2702 LPEG9_14105	311 / 311	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302	EEl69455	100%
<i>pepR</i>	gene_1939 LPEG9_10155	301 / 301	<i>Lb. casei</i> BL23	CAQ67229	100%
<i>pepQ</i>	gene_724 LPEG9_03805	367 / 367	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302	EEl67969	100%
<i>pepP</i>	gene_1587 LPEG9_08375	355 / 355	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN71862	100%
	gene_304 LPEG9_01550	359 / 359	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130	BAN70585	98%
<i>pepE</i>	-	- / 439	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 8530	AER65088	87%
cell-envelope proteinase : CEP					
<i>prtR</i>	gene_435 LPEG9_02250	1869 / 1842	<i>Lb. casei</i> JCM 1134	KRK16171	99%
<i>prtP</i>	-	999 / 1962	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	A32634	95%
<i>prtB</i>	-	619 / 1946	<i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	L48487.2	42%
<i>prtH</i>	-	751 / 1849	<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	AF133727_1	57%
<i>scpA</i>	-	661 / 1167	<i>Streptococcus pyogenes</i>	AAA26960	26%
peptide transporter					
<i>dtpT</i>	gene_1755 LPEG9_09250	479 / 490	<i>Lb. plantarum</i> CMPG5300	KGH43909	63%

Table 2. cont.

<i>dppA</i>	gene_2028	LPEG9_10570	540 / 550	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AAK58896	35%
<i>dppB</i>	gene_2027	LPEG9_10565	307 / 278	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AAK58898	50%
<i>dppC</i>	gene_2026	LPEG9_10560	332 / 343	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AAK58899	47%
<i>dppD</i>	gene_2025	LPEG9_10555	350 / 349	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AAK58900	66%
<i>dppF</i>	gene_2024	LPEG9_10550	325 / 312	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AAK58901	62%
<i>oppD</i>	gene_1557	LPEG9_08215	330 / 338	<i>Lc. lactis</i>	AAB00533	53%
<i>oppF</i>	gene_1556	LPEG9_08210	317 / 319	<i>Lc. lactis</i>	AAB00534	62%
<i>oppB</i>	gene_1555	LPEG9_08205	320 / 319	<i>Lc. lactis</i>	AAB00535	50%
<i>oppC</i>	gene_1554	LPEG9_08200	302 / 294	<i>Lc. lactis</i>	AAB00536	49%
<i>oppA</i>	gene_1553	LPEG9_08195	597 / 600	<i>Lc. lactis</i>	AAB00537	42%
<i>dppP</i>	-	-	- / 235	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	AAK58897	45%
response regulator						
<i>prcR</i>	gene_1623	LPEG9_08560	240 / 228	<i>Lb. casei</i> BL23	CAQ66977	100%
<i>codY</i>	-	-	90 / 262	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403	NP_266317	21%

^a *Lb.*, *Lactobacillus*; *Lc.*, *Lactococcus*.

^b Amino acid residues number of EG9 gene conforms its ORF detected by GENETYX®(Ver.13.0.3)

Table 3. EG9-specific primers for real-time PCR.

Target gene	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)
<i>pepO</i> 1413	CCAGACGGTGCATCAACAG	GCGATTCTTAAGCTCGACAAGATGG	183
<i>pepO</i> 1010	GTGCTGCAAGACTTCTTTATTGCC	GCTTTGCGGGCAGTCGATAC	199
<i>pepF</i> 962	CGTGGTCGTTAGCTGATCGAAAG	GACATTGGCAAAGGCCTAGCTAC	195
<i>pepF</i> 663	GGTCGCCTGTTTCGATGTCTTG	CGACGTGATTATGCACGATCTGG	172
<i>pepF</i> 245	CAGCAAATTGAGCCTGACGGAAGA	CTTCGTCGCAGAAATTGCCTCAAC	152
<i>pepN</i> 436	GGTTCACGTGCAGGTGGAAG	CTGCGTTGCCAACTTGTGAG	170
<i>pepC</i> 2356	GAAGTTCGGCACTTGAACCTC	CAATTGCCGATCAGAACTCTGAC	120
<i>pepC</i> 2355	GTATACCATCGCTTCAGCGAACAC	CGATCCATATCAGCGAGCACATC	153
<i>pepL</i> 1025	GTGGATCCAGTCCTGCTAGGTTG	CAAGTTCAGTGGCAGATGATCTG	178
<i>pepA</i> 308	TCGTGCGCACCATATAGCCA	GTCCAACGAAGGCGAGGTTTC	173
<i>pepT</i> 310	GGATCGCCATTGTCCAAAGTGTAG	CTGTTGGCTCATCCGGAAGTG	140
<i>pepV</i> 729	GTAAGTTTGACGCCAGCCTCATC	CAGCTGAGTTAACGCTCACCAAC	148
<i>pepX</i> 1594	GCAGAGCATGTGACCAACACTC	GGCTATTGGCATAAGCACTGTTAGG	160
<i>pepI</i> 2702	CCGACTGTTGGCGAAGAGATG	GATTAGCGACTTCGATGTAACCGA	154
<i>pepR</i> 1939	CCACGCCTGTCTACAATGCTTTCC	CGTGTGGGATGACCTCAGCCATAC	180
<i>pepQ</i> 724	GTCGCGGGCAATCTTATCGAG	CGACCTTGGGACTGACAACC	178
<i>pepP</i> 1587	GCAAACGTGCGGGTTAAATCAGAC	GATTTCTTCATGCGCGGACTTGG	185
<i>pepP</i> 304	CAGCCGCTTCATTGCGATATCGG	CGATGCAGGCAATTGACGCCTTAC	147
<i>prtR</i> 435	CTTGATCGACGGCTTCCAAC	CAGTAACGGCAGCAATGTCC	179
<i>dtpT</i> 1755	CCAATGGGCGAACATCTTCAGG	CAACTTCGGATCGCTCATTGCAC	197
<i>dppA</i> 2028	GAGCGCTTAGCATTGGTCGTATC	GACGGCATCTAAAGCTGAATCCTC	144
<i>dppB</i> 2027	CAGGGATCGCAAAGATGTTCTC	GCGAACTGAAATGGTCGATGTG	194
<i>dppC</i> 2026	GAAGATCGCTGTGCGAATGGTG	CCATGGCTCGACTCATTCTGTG	173
<i>dppD</i> 2025	GGAATGGCGTACAGTCGATCACTC	CCATGACCTTGGCGTAGTTGCTG	180
<i>dppF</i> 2024	CCTTGGCGATCCTGAATGTCC	CGATCACGCAACTCGCTATCC	180
<i>oppD</i> 1557	CGAAGTAACTGCGCGTGTATGG	AGGCCCAAATCCTGGATCTGTTG	199
<i>oppF</i> 1556	TGCTTACAACACCTAAGTCATGG	CTCTGCGTTGGACTTGTGAGTTC	114
<i>oppB</i> 1555	GCTTGGTGCCCTTCGTAACGG	CCACGGTGATTTAGGACAAAGCTTC	164
<i>oppC</i> 1554	GGAAGTGGCGATGGTTAAGGTC	CGCGCAGTGAGTATGTCATGG	128
<i>oppA</i> 1553	ACCGGCAACAATCTTGCTCATC	AGCAGATGAAGCCTTCGTTTGG	170
<i>prcR</i> 1623	CTGATTCGGCGCAACAAAGCAC	GTTGCCAGAATTAACGGCCTTGA	198

Table 3. *cont.*

16S rRNA	GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG	ACACGAGCTGACGACAACCATGCAC	247
----------	---------------------------	---------------------------	-----

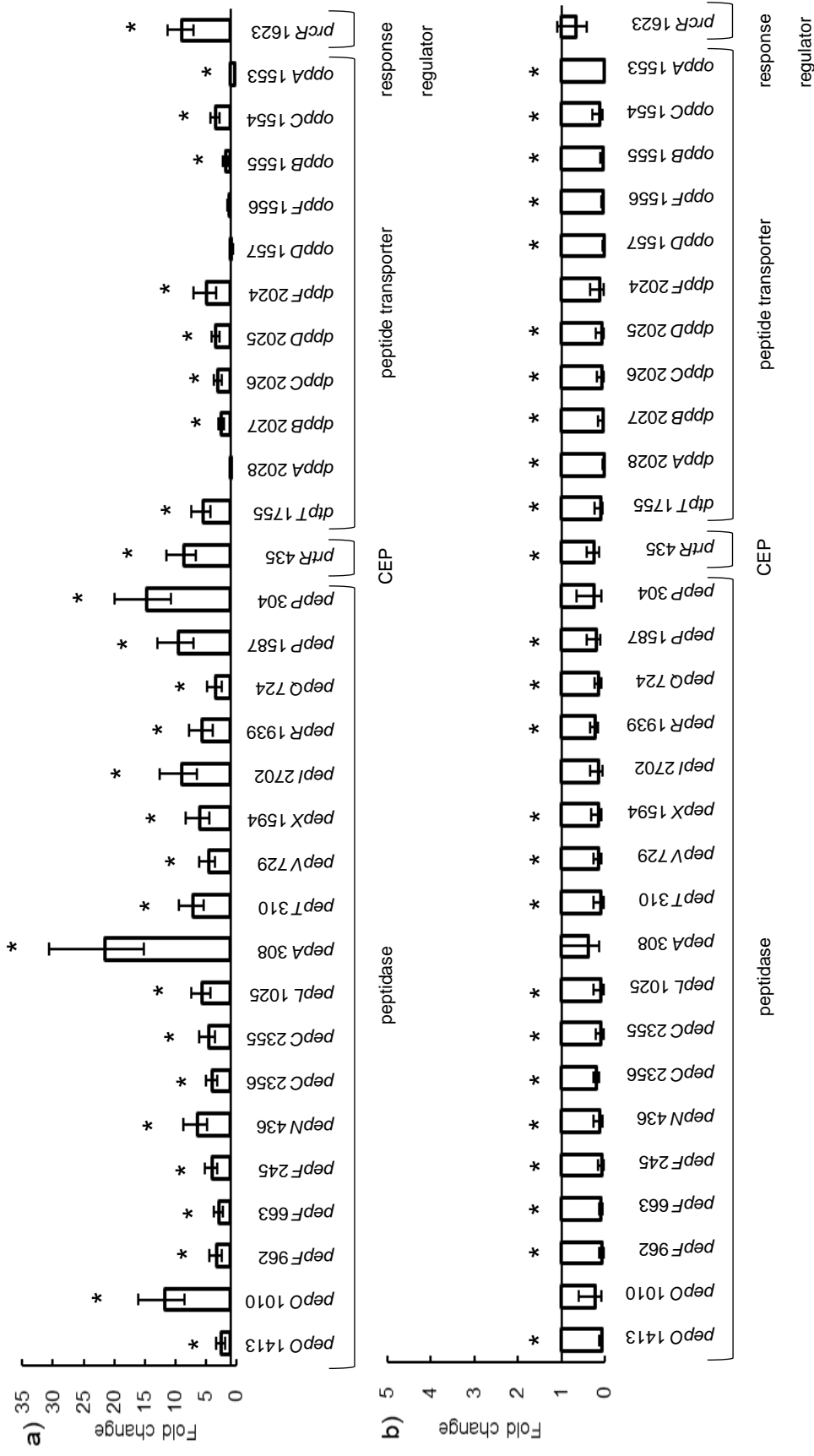


Figure 5. The mean fold change in expression of candidate genes in cheese. The cheeses were manufactured with inoculation of EG9 at 7 log cfu mL⁻¹. (a) 0 day and (b) 30 days. Asterisks indicate significant difference between the expression in the cheese and of stationary phase of skim milk culture (p<0.05).

3. 熟成チーズ中における EG9 株の代謝特性の解析

3.1. 目的

第 1 章では、EG9 株がチーズ中において生菌数を増やし、チーズの品質に影響を与えていることを明らかにした。また第 2 章では、製造後 0 日のチーズ中において EG9 株のたんぱく質分解関連遺伝子の多くが活性化していることを明らかにした。これらの結果から、EG9 株がチーズ中において生育し代謝活動を行っていることが確かめられた。乳酸菌は主要なエネルギー源としてグルコースやラクトース等の糖類を利用するが、チーズにおいてはその製造過程で水分(ホエー)と共に糖類が排除され、チーズカード中にはほぼ残存しない。本研究では、主要なエネルギー源が不足していると考えられるチーズ中において、EG9 株の代謝特性を明らかにすることを目的として、トランスクリプトーム解析による遺伝子発現プロファイルの調査を行った。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 使用菌株と培養条件

Lb. paracasei EG9 と *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 712 を使用した。培養条件は 1.2.1 に準じた。

3.2.2.RNA 抽出

新鮮サンプルからの RNA 回収のため、「1.2.3.チーズ製造」の方法に準じて処理区 A と同条件のチーズを製造した。「2.2.6.リアルタイム PCR」の方法に準じて対照区のスキムミルク培養及び試験区のチーズを調製し、total RNA を抽出した。

3.2.3.トランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析をマクロジェン・ジャパン(Tokyo, Japan)に委託した。2200 TapeStation(Agilent, Santa Clara, CA, USA)による RNA サンプルのクオリティチェックの後、ライブラリを構築した。NovaSeq 6000 システム(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)によってシーケンスを取得し、FastQC v0.11.7(Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK)によるクオリティチェック、Trimmomatic 0.38(THE USADEL LAB)によるアダプター配列と低品質配列の除去を経て Bowtie 1.1.2(Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA)によるマッピングと HTseq 0.10.0(Anders, Pyl, & Huber, 2015)によるアノテーションを行った。

3.2.4. Differentially Expressed Gene(DEG)解析

トランスクリプトーム解析によって得られたリードカウントをオリジナルデータとして、対照区のスキムミルク培地中と試験区のチーズ中における EG9 株の DEG 解析を

マクロジェン・ジャパンに委託した。低品質転写物を取り除いた後、edge R(Robinson, McCarthy, & Smyth, 2009)を用いて Trimmed Mean of M-values(TMM)正規化を行った。対照区と試験区間で比較した各遺伝子の相対的発現量の値をもとに edgeR を用いた直接確率法による解析を行い、相対的発現量に ± 2 倍以上の差がありかつ直接確率検定による p 値が 0.05 未満の遺伝子を、発現が有意に異なる遺伝子とした。

また、これらの発現が有意に変動した遺伝子のデータを用いて、サンプル間及び遺伝子間の発現レベルの類似度による階層的クラスタリング解析を行った。

3.2.5. Gene Ontology(GO)解析

トランスクリプトーム解析によって得られたアノテーションをもとに、発現の変動した遺伝子について GO 解析をマクロジェン・ジャパンに委託し行った。分類された遺伝子群を GO term 毎に相対的発現量が 5 超過、3 以上 5 以下、2 以上 3 未満、-2 以下-3 超過、-5 以上-3 以下、-5 未満の 6 段階に分類して遺伝子数を計上し、細胞機能の活性について評価した。

3.2.6. パスウェイ解析

発現が有意に変動した遺伝子について、コードするたんぱく質の酵素番号を NCBI データベースから探索し、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)データベース

の *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T の代謝経路マップをもとに、関連する代謝経路を特定した。そして代謝経路ごとに、該当した遺伝子を相対的発現量が 5 超過、3 以上 5 以下、2 以上 3 未満、-2 以下-3 超過、-5 以上-3 以下、-5 未満の 6 段階に分類して遺伝子数を計上し、各代謝経路の活性について評価した。

3.3.結果

3.3.1 トランスクリプトーム解析

シーケンスとトリミングの結果を Table 4 に示した。トリミング終了時点で各サンプルにおいて約 447 万-506 万個のリードが得られた。GC 含有量は各サンプルで 41.76%-44.76%だった。マッピングされたリード数の割合はサンプルによって 26.73%-65.60%と開きがあり、特に対照区(スキムミルク培地中)で低かった(Table 4)。これは解析に使用した RNA サンプルが EG9 株由来 RNA と 712 株由来 RNA が混合したものであり、この中から EG9 株と相同性のあるシーケンスのみがマッピングされたことに起因すると考えられた。そしてアノテーションにより 2,980 遺伝子が見出され、以降の解析に供された。

3.3.2.DEG 解析

解析された 2,980 遺伝子のうち、対照区であるスキムミルク培地中と比較して、チーズ中 EG9 株において 651 遺伝子が 2 倍以上かつ有意に発現上昇し、615 遺伝子が 2 倍以下かつ有意に発現減少した(Fig.6)。

また階層的クラスタリング解析では対照区の 3 サンプルによるクラスターと試験区の 3 サンプルによるクラスターが形成され(Fig.7)、スキムミルク培地中とチーズ中における EG9 株の遺伝子発現パターンが明確に異なることが示された。

3.3.3.GO 解析

解析された遺伝子のうち、446 遺伝子が Biological process、243 遺伝子が Cellular component、370 遺伝子が Molecular function に分類された(Table 5)。Biological process では特に biological regulation(GO:0065007)に分類された遺伝子群はチーズ中での発現上昇傾向が見られた(Table 6)。Cellular component では membrane part(GO:0044425)に分類された遺伝子群は発現上昇、protein-containing complex(GO:0032991)、cell part(GO:0044464)で発現減少の傾向が見られた。Molecular function では transcription regulator activity(GO:0140110)に分類された遺伝子群の発現が上昇する傾向が見られた。

3.3.4.パスウェイ解析

KEGG データベースから得られた 74 の代謝経路について評価を行った(Table 7)。このうち Galactose metabolism、Pentose phosphate pathway、Starch and sucrose metabolism、Lysine biosynthesis に含まれる遺伝子群の発現がチーズ中において上昇する傾向が見られた。一方で Purine metabolism、One carbon pool by folate、Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis、Histidine metabolism、Cysteine and methionine metabolism に含まれる遺伝子群の発現が減少する傾向が見られ、チーズ中においてはこれらの代謝経路の活性が低下することが推察された。

3.4.考察

本研究では、チーズ中の EG9 株における遺伝子発現を網羅的に解析することにより、主要なエネルギー源が不足する環境での代謝特性を明らかにすることを目的とした。

まず階層的クラスタリング解析によって、本研究で対照区として用いたスキムミルク培地中と試験区であるチーズ中では EG9 株の発現プロファイルが明確に異なることが示された。生菌数に着目した場合、どちらの条件においても $7 \log \text{cfu mL}^{-1}$ の接種菌数から約 1 日で 10^2 – 10^3 倍に増殖し、定常期に達していた(data not shown)。生育曲線上で定常期に達した細菌は対数増殖期と比べて活動が低下して休止に近い状態にあると考えるのが一般的だが、本研究ではスキムミルク培地中とチーズ中では異なる遺伝子発現のパターンを

示した。このことから、見かけでは定常期と思われる状態であっても実際の活動は生息環境によって異なり、EG9 株はチーズ中において特有の活動を行っていることが示唆された。

GO 解析及びパスウェイ解析からは、糖類の代謝を明確に代替するような活性を示す経路は見出されなかった。しかし、パスウェイ解析において活性が上昇していたと考えられる経路にガラクトース代謝やペントースリン酸経路、でんぷん及びスクロース代謝といった糖類の代謝に関わる経路が見られた。また発現が 5 倍以上に上昇した遺伝子に、ホスホトランスフェラーゼ系(Phosphotransferase system: PTS)トランスポーターの構成遺伝子等、糖輸送に関連すると考えられる遺伝子が複数含まれていた。チーズ中には原料乳に由来する糖類はほぼ存在しないと考えられるが、溶菌した菌体の細胞壁や核酸といった細胞成分に由来する糖類の資化について言及した報告がある(Blaya et al., 2018; Gatti et al., 2014, 1999, 2008; Gobbetti et al., 2018)。第 1 章において EG9 株が熟成期間を通して生菌数を維持したのに対し 712 株は減少していく現象が見られたことから、EG9 株が溶菌した 712 株由来の糖類を代謝した可能性が考えられる。

一方で、GO 解析では biological regulation(GO:0065007)や transcription regulator activity(GO:0140110)に分類された、他の遺伝子の発現制御に関わると考えられる遺伝子群に発現が上昇したものが多く含まれていた。パスウェイ解析においても発現が減少した

遺伝子を多く含み、活性が低下していると考えられる経路が多い傾向が見られたことから、チーズ中の EG9 株の活動は抑制される方向にあると考えられた。

本研究では製造後 0 日のチーズについて解析を行ったが、さらに熟成期間の経過したチーズをサンプルとし、菌叢やチーズの成分の変化に伴った EG9 株の動態を調査することで、チーズ中におけるエネルギー獲得機構や代謝の特性をより詳細に明らかにできると考える。

チーズという特殊な環境で生育する NSLAB の研究は、微生物学として興味深い分野であるだけでなく、より効率的あるいは高品質な食品を製造するための基礎として産業や社会に影響を与えうる課題でもある。これらの研究の成果は、他種の NSLAB における研究報告と照らし合わせ知見を蓄積することで、EG9 株に限定されない普遍的特徴を見出し、学術あるいは乳製品製造技術の進展の一助となることを確信する。

Table 4. Raw, Trimming and Mapped data statistics

Sample		Raw Data		Trimming Data		Mapped Data	
		Total reads	GC (%)	Total reads	GC (%)	Mapped reads	Trimming/Mapped (%)
Control	1	50,019,988	41.92	49,140,346	41.93	13,148,082	26.76
	2	50,012,512	41.76	49,140,006	41.76	13,137,136	26.73
	3	48,826,166	42.22	47,912,602	42.22	15,380,038	32.10
Treat	1	48,144,042	42.83	47,434,752	42.83	20,744,500	43.73
	2	51,677,828	44.75	50,691,836	44.76	32,616,696	64.34
	3	45,673,988	44.74	44,721,892	44.76	29,336,296	65.60

Table 5. Gene Ontology (GO) analysis

GO		Count	Weighted Score
Biological process	GO:0000003 reproduction	1	0.17
	GO:0001906 cell killing	1	0.03
	GO:0006510 obsolete ATP-dependent proteolysis	2	0.83
	GO:0008152 metabolic process	128	44.17
	GO:0009987 cellular process	127	16.82
	GO:0032502 developmental process	2	0.18
	GO:0050896 response to stimulus	18	4.42
	GO:0051179 localization	56	25.69
	GO:0051704 multi-organism process	6	2.30
	GO:0065007 biological regulation	47	21.48
	GO:0071840 cellular component organization or biogenesis	11	1.62
	GO:0098743 cell aggregation	1	0.01
	GO:0098754 detoxification	1	0.25
	Unclassified Unclassified	45	21.37
	Total	446	139.33
Cellular component	GO:0005576 extracellular region	2	0.18
	GO:0005623 cell	1	0.25
	GO:0009295 nucleoid	3	0.40
	GO:0016020 membrane	26	5.26
	GO:0030054 cell junction	1	0.05
	GO:0032991 protein-containing complex	28	3.42
	GO:0043226 organelle	17	3.22
	GO:0044421 extracellular region part	2	0.32
	GO:0044422 organelle part	6	0.44
	GO:0044425 membrane part	32	7.92
	GO:0044464 cell part	101	23.07
	Unclassified Unclassified	24	7.66
	Total	243	52.18
Molecular function	GO:0003824 catalytic activity	169	62.97
	GO:0004871 signal transducer activity	3	1.00

Table 5. *cont.*

GO:0005198 structural molecule activity	2	0.83
GO:0005215 transporter activity	68	27.17
GO:0005488 binding	58	28.77
GO:0008462 obsolete endopeptidase Clp activity	1	0.33
GO:0009377 obsolete HslUV protease activity	1	0.50
GO:0030401 obsolete transcription antiterminator activity	1	0.50
GO:0098772 molecular function regulator	1	0.50
GO:0140110 transcription regulator activity	18	8.25
Unclassified Unclassified	48	22.67
<hr/>		
Total	370	153.49

Table 6. GO analysis arrangement using Fold change results

GO	Fold change						Up-regulated	Down-regulated	Total of changes	
	>5	5-3	3-2	-2--3	-3--5	<-5				
Biological process	GO:0000003 reproduction	1						1	0	1
	GO:0001906 cell killing			1				1	0	1
	GO:0006510 obsolete ATP-dependent proteolysis					2		0	2	2
	GO:0008152 metabolic process	9	19	31	38	19	6	59	63	122
	GO:0009987 cellular process	11	17	32	34	20	8	60	62	122
	GO:0032502 developmental process	2						2	0	2
	GO:0050896 response to stimulus	4	1	5	5	1	2	10	8	18
	GO:0051179 localization	8	7	9	12	10	8	24	30	54
	GO:0051704 multi-organism process	2	2	1			1	5	1	6
	GO:0065007 biological regulation	8	8	14	7	7	1	30	15	45
	GO:0071840 cellular component organization or biogenesis			2	6	3		2	9	11
	GO:0098743 cell aggregation	1						1	0	1
	GO:0098754 detoxification				1			0	1	1
	Unclassified Unclassified	4	10	13	11	3	1	27	15	42
Cellular component	GO:0005576 extracellular region		1	1				2	0	2
	GO:0005623 cell						1	0	1	1
	GO:0009295 nucleoid			1	2			1	2	3
	GO:0016020 membrane	4	3	5	5	5	4	12	14	26
	GO:0030054 cell junction		1					1	0	1
	GO:0032991 protein-containing complex	1	4	3	12	5	1	8	18	26
	GO:0043226 organelle	2	5	2	3	3	1	9	7	16
	GO:0044421 extracellular region part			1		1		1	1	2
	GO:0044422 organelle part	1	2	2		1		5	1	6
	GO:0044425 membrane part	5	8	7	5	2	4	20	11	31
	GO:0044464 cell part	10	15	15	28	21	10	40	59	99
Unclassified Unclassified	2	5	7	5	3	1	14	9	23	
Molecular function	GO:0003824 catalytic activity	13	24	40	38	32	11	77	81	158
	GO:0004871 signal transducer activity			2	1			2	1	3

Table 6. *cont.*

GO:0005198 structural molecule activity			1		2		1	2	3
GO:0005215 transporter activity	13	8	11	14	9	10	32	33	65
GO:0005488 binding	4	8	10	7	9	2	22	18	40
GO:0008462 obsolete endopeptidase Clp activity					1		0	1	1
GO:0009377 obsolete HslUV protease activity				1			0	1	1
GO:0030401 obsolete transcription antiterminator activity							0	0	0
GO:0098772 molecular function regulator	1						1	0	1
GO:0140110 transcription regulator activity	3	4	7	1	3		14	4	18
Unclassified Unclassified	4	11	15	7	3		30	10	40

Table 7. Pathway analysis arrangement using Fold change results

Pathway	Fold change						Up-regulated	Down-regulated	Total of changes
	>5	5-3	3-2	-2--3	-3--5	<-5			
Glycolysis/ Gluconeogenesis	1		5	6		1	6	7	13
Pentose phosphate pathway	3	1	1	4	3		5	7	12
Pentose and glucuronate interconversions				1			0	1	1
Citrate cycle (TCA cycle)				6			0	6	6
Propanoate metabolism			1	5		1	1	6	7
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism		1					1	0	1
Methane metabolism							0	0	0
Galactose metabolism	2	1	4		2	1	7	3	10
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		1		2	1	1	1	4	5
Inositol phosphate metabolism							0	0	0
Glycerophospholipid metabolism		2					2	0	2
Glycerolipid metabolism		1	1	1			2	1	3
Fructose and mannose metabolism	1	1		1	1		2	2	4
Fatty acid biosynthesis				2			0	2	2
Fatty acid degradation			1				1	0	1
Lipoic acid metabolism							0	0	0
Terpenoid backbone biosynthesis				1			0	1	1
Butanoate metabolism			1	2			1	2	3
Chloroalkane and chloroalkene degradation							0	0	0
Synthesis and degradation of ketone bodies							0	0	0
Xylene degradation			1				1	0	1
Benzoate degradation			1	2			1	2	3
Naphthalene degradation			1				1	0	1
Aminobenzoate degradation							0	0	0
Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation				1			0	1	1
Polyketide sugar unit biosynthesis							0	0	0
Acarbose and validamycin biosynthesis							0	0	0
Streptomycin biosynthesis							0	0	0
Arachidonic acid metabolism							0	0	0
Starch and sucrose metabolism	3	2	1				6	0	6
Other glycan degradation	1				2		1	2	3

Table 7. *cont.*

Lipopolysaccharide biosynthesis						0	0	0
Peptidoglycan biosynthesis		2	2	1		2	3	5
Ascorbate and aldarate metabolism						0	0	0
Pyrimidine metabolism	3	2	4	2	1	5	7	12
Purine metabolism	1	1	9	3	12	2	24	26
Thiamine metabolism	1	2		1		3	1	4
Riboflavin metabolism		1				1	0	1
One carbon pool by folate	1		1	2	2	1	5	6
Phenylalanine metabolism		1		1		1	1	2
Tyrosine metabolism		1		1		1	1	2
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis			1	3	1	0	5	5
Folate biosynthesis				1		0	1	1
Histidine metabolism				4	3	0	7	7
Sulfur metabolism	1		1			1	1	2
Taurine and hypotaurine metabolism	1					1	0	1
Vitamin B6 metabolism			1			0	1	1
D-Alanine metabolism	1	1				2	0	2
Glycine, serine and threonine metabolism	1		2	4	2	3	6	9
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1		1		1	1	2	3
Tryptophan metabolism			1			0	1	1
Porphyrin and chlorophyll metabolism			1			0	1	1
Pantothenate and CoA biosynthesis			1		1	0	2	2
Monobactam biosynthesis		2	2			2	2	4
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis		1				1	0	1
C5-Branched dibasic acid metabolism			1			0	1	1
Valine, leucine and isoleucine degradation			4		1	0	5	5
Arginine biosynthesis				1		0	1	1
Nitrogen metabolism	1			2	1	1	3	4
Lysine biosynthesis	3	3	2	1		6	3	9
Lysine degradation			1			0	1	1
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1	2		3	2	3	5	8
Cysteine and methionine metabolism		3	3	2	2	3	7	10
Arginine and proline metabolism			1	1	1	0	3	3
Carbapenem biosynthesis				1	1	0	2	2

Table 7. *cont.*

Nicotinate and nicotinamide metabolism	1	1	1	4		3	4	7	
Cyanoamino acid metabolism						0	0	0	
Glutathione metabolism	1		1		1	1	2	2	4
Biotin metabolism				2			0	2	2
D-Glutamine and D-glutamate metabolism				1	1		0	2	2
Selenocompound metabolism				1	1		0	2	2
Styrene degradation							0	0	0
Oxidative phosphorylation		1		1			1	1	2
Pyruvate metabolism			5	8	1	2	5	11	16

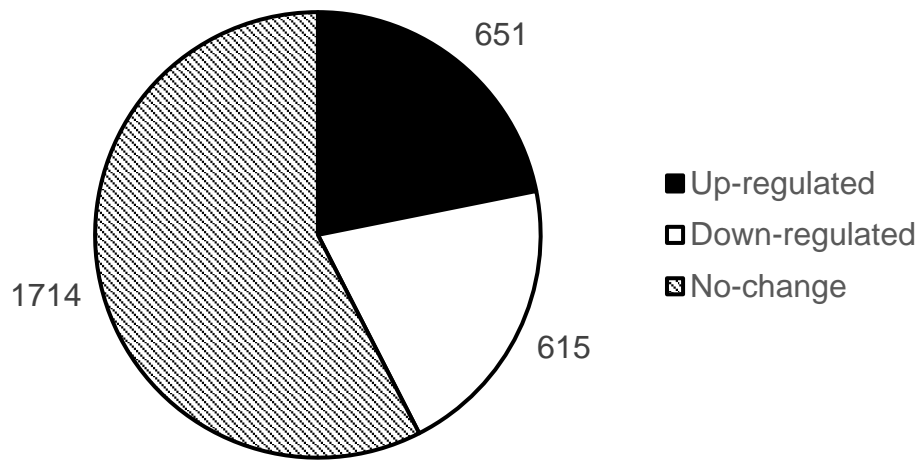


Figure 6. Up-, Down-regulated and No-change genes based on fold change of comparison pare.

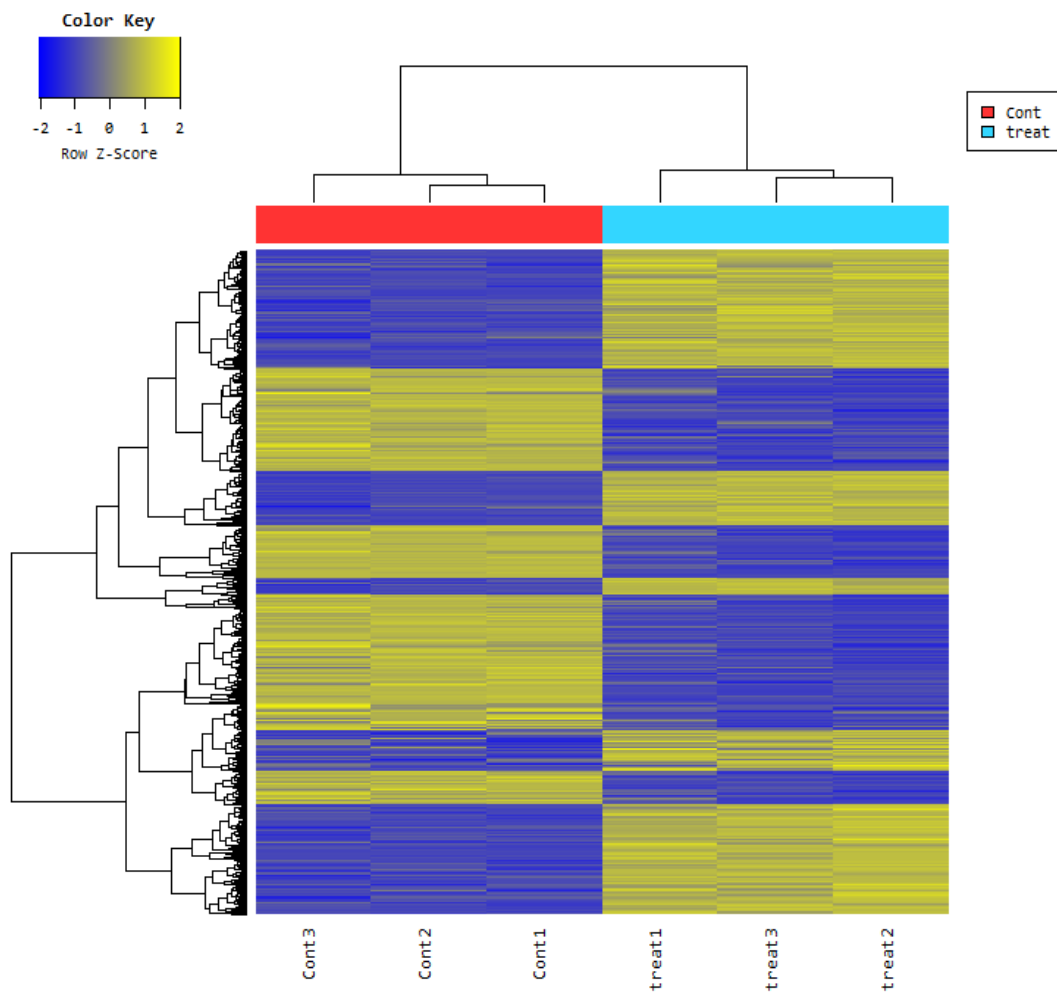


Figure 7. Heat map of the one-way Hierarchical Clustering using Z-score for normalized value (\log^2 based).

4. EG9 株のプラスミドバリエントの発生と生育特性の変化

4.1. 目的

乳酸菌は他のバクテリアと同様に、プラスミドの取り込みによって自身の形質を変化させ、またあるいは環境条件によってプラスミドを喪失することがある。これまでに、乳酸菌のプラスミドにラクトース資化、プロテアーゼ産生、バクテリオシン産生、ファージ耐性等の有用形質がコードされていることが報告されているため、プラスミドの保有状態が乳酸菌の生育や活動、ひいては乳酸菌を利用する産業に与える影響は大きい。EG9 株は pEG9A、B、C の 3 種類のプラスミドを保有している(第 2 章)。本株を MRS 液体培地を用いて継代培養したところ、生育速度や到達濁度等の生育特性が安定しなくなる現象が観察された。本研究では、この培養物中の菌株のプラスミド解析を行い EG9 株のプラスミドの安定性の検証と、得られたプラスミドバリエントの生育特性を調べた。また、EG9 株を添加したゴーダタイプのチーズ中におけるバリエントの存在比率を経時的に観察した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 使用菌株と培養

Lb. paracasei EG9 を使用した。培養条件は「1.2.1. 使用菌株と培養条件」に準じた。

4.2.2. PCR 法による EG9 株プラスミドの特異的検出

EG9 株の 3 種類のプラスミド配列からそれぞれを検出可能なプライマーを設計し、マルチプレックス PCR によるプラスミド検出法を確立した。PCR 混合液は 10 × PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 0.5 μL、2 mM dNTPs 0.5 μL、25 mM MgSO₄ 0.3 μL、各プライマー(10 μM) 0.2 μL、KOD-Plus-Neo 0.1 μL、テンプレート 0.5 μL、滅菌水 1.9 μL を含む総量 5 μL とし、その他の PCR 条件および電気泳動は「1.2.2. PCR 法による EG9 株の特異的検出」の方法に準じた。

4.2.3. EG9 株のプラスミドの安定性の検証

EG9 株培養液を MRS 寒天培地に塗布し、30°C で 3 日間嫌気培養した。生じたコロニーを特異的 PCR に供してプラスミドプロファイルを調べ、3 種類のプラスミドをすべて保有する株のコロニー 3 個を選択した。これらをそれぞれ 0.85% NaCl 1ml に懸濁して MRS 液体培地 5mL に 1% 接種し、30°C で 1 日培養した後、MRS 寒天培地にそれぞれ塗布し 30°C で 2 日間嫌気培養した。各寒天培地上に生じたコロニーをランダムに 16 個ずつ選択し、特異的 PCR によってプラスミドプロファイルを調べた。

4.2.4. プラスミドバリエントの取得

3種類のプラスミドをすべて保有する株のコロニーを MRS 液体培地に接種し、30°Cまたは37°Cでの継代培養を繰り返した。継代の度に培養液を MRS 寒天培地に塗布して30°Cで3日間嫌気培養し、生じたコロニーのプラスミドプロファイル調べた。得られたプラスミドバリエントは、コロニーを MRS 液体培地に接種して30°Cで一晩培養し、培養液と20%グリセロールを1:3で混合して-20°Cで凍結保存した。

4.2.5. プラスミドバリエントの生育特性

得られたプラスミドバリエントを30°Cで前培養後、予冷した0%または1.7% NaClを含むMRS液体培地5mLに1% (v/v)接種して10°Cで培養した。接種後168時間まで24時間ごとにOD値(620nm)を測定し、生育曲線を作成した。実験は0% NaCl区および1.7% NaCl区それぞれについて3反復で行い、同一バリエント、同一培養時間におけるNaCl添加条件によるOD値の差についてStudentのt検定を行った($p < 0.05$)。

4.2.6. チーズ中におけるバリエントの存在比率

チーズサンプルとして第1章で製造した処理区Aのチーズを用いた。またチーズ製造時のEG9株添加用菌液の再現として、3種類のプラスミドをすべて保有するバリエントをMRS培地で2回継代培養した。各サンプルをRogosa寒天培地に展開し、生じたコロニー

からランダムに 96 個を選択し、特異的 PCR によってプラスミドプロファイル調べた。そして添加用菌液を再現した MRS 培養およびチーズ中における各プラスミドバリエーションの存在比と EG9 株集団における各プラスミドの保持率を算出した。各バリエーションの存在比は、調査した 96 コロニーにおける各バリエーションのプラスミドプロファイルを持つコロニーの数から計算した。EG9 株集団における各プラスミドの保持率は、3 種類のプラスミド pEG9A、B、C それぞれについて、96 コロニーのうち各プラスミドを保有していたコロニーの数から計算した。

4.3.結果

4.3.1. PCR 法による EG9 株プラスミドの特異的検出

pEG9A、B、C それぞれを特異的に検出するプライマーを設計した(Table 8)。各プライマーセットのターゲット位置を Figure 8 に示した。EG9 株 DNA をテンプレートとした PCR により設計通りのサイズのバンドが確認され、増幅断片のシーケンスにより 3 組すべてでターゲット配列が増幅されていることを確認した (data not shown)。3 種類のプライマーセットを混合したマルチプレックス PCR においても、各プラスミドはそれぞれ特異的に検出された(Fig. 8)。

4.3.2. EG9 株のプラスミドの安定性の検証

3つの MRS 寒天培地プレートすべてで、1つまたは複数のプラスミドを欠いたコロニーが確認された(Fig. 9)。No.1 のプレートではコロニー 16 個のうち 8 個でいずれかのプラスミドを喪失していた。同様に No.2 では 7/16 個のコロニーで、No.3 では 12/16 個でプラスミド喪失が観察された。喪失は 3 種類のプラスミドすべてで独立して発生していた。また、3 種類のプラスミドすべてを喪失したコロニーも見られた。よって、EG9 株のプラスミドは不安定であり、容易に、かつランダムに喪失することが分かった。

4.3.3. プラスミドバリエントの取得

EG9 株は 3 種類のプラスミドを持つため、プラスミドプロファイルとして 8 つのパターンが想定された。そして継代培養の繰り返しにより、想定された 8 種類全てのプラスミドバリエントが得られた(Fig. 10)。以降、これら 8 種類のバリエントをそれぞれ P1(Wild type)、P2(Δ pEG9C)、P4(Δ pEG9B)、P6(Δ pEG9A)、P7(Δ pEG9A、 Δ pEG9C)、P9(Δ pEG9B、 Δ pEG9C)、P10(Δ pEG9A、 Δ pEG9B)、P11(Plasmid free)と呼称する。

4.3.4. プラスミドバリエントの生育特性

各バリエントの生育曲線を Figure 11 に示した。バリエントごとに生育速度や 168 時間時点での到達濁度に差異が見られた。また P4 を除くすべてのバリエントにおいて NaCl

の添加により生育が有意に抑制されたのに対し、P4 では OD 値は低いものの、1.7% NaCl 区において 0% NaCl 区を有意に上回る生育を示した。

4.3.5. チーズ中におけるバリエントの存在比率

MRS 培養及びチーズサンプルにおいて、8 種類すべてのプラスミドバリエントが確認された。プラスミドバリエントの存在比率は MRS 培養と熟成 30 日のチーズの間に違いが認められ、特に pEG9B と pEG9C を持つバリエント P2 の割合が 21.9%から 7.3%に減少した(Fig. 12)。しかし、チーズ熟成中には大きな変化は見られなかった。一方、各プラスミドの喪失率は、すべてのサンプルにおいて pEG9B より pEG9A と pEG9C が高かった(Fig. 13)。また、pEG9A の喪失率は MRS 培養では 45.8%であったのに対して、チーズでは MRS 培養よりも高く、75.7% (熟成 30 日)、71.2% (同 90 日)、及び 63.2% (同 180 日) と推移した。

4.4. 考察

本研究により、EG9 株が培養中に容易にプラスミドを喪失し、プラスミドバリエントを生じることが明らかになった。プラスミドのキュアリング技術に見られるように、化学物質や紫外線への暴露など、菌体に強いストレスを与えた際にプラスミドが喪失することが知られている。一方 EG9 株においては、一般的に lactobacilli の培養に用いられる MRS

培地を使い、生育至適温度である 30°C で培養を行ったにも関わらず、高頻度でプラスミドバリエントが生じた。プラスミドが不安定である原因について、複製か分配に問題が生じている可能性が高い。プラスミドの複製速度が遅く数が少ない、あるいは何らかの原因で細胞分裂時の分配が均等に行われなかった結果として、プラスミドを喪失した菌体が高頻度に発生したと考えられる。

また本研究ではバリエントの生育特性評価として、10°C、1.7% NaCl 環境での生育を観察した。10°Cは一般的なゴーダタイプチーズの熟成温度であり、また塩漬終了後のゴーダタイプチーズの NaCl 濃度は 1.7%程度となる。今回 pEG9B を喪失した P4 の OD 値が、1.7% NaCl 区において 0% NaCl 区を有意に上回るという特性を示した。しかし、同じく pEG9B を喪失している P9、P10、P11 では P4 のような特性は見られず、プラスミドプロファイルとの明確な関連は見られなかった。

一方でチーズ中 EG9 株のバリエントの存在比を調査したところ、熟成期間を通じて、pEG9B および pEG9C を持つ P6 と pEG9B のみを持つ P7 が優占になり、pEG9A を持つが pEG9B を持たないバリエントである P4、P9 の比率は大きく減少した。またチーズ中では pEG9B の保持率が最も高く、pEG9A の保持率は低下した。これらの結果から、pEG9B の存在はチーズ中での EG9 株の生存を有利にすること、また pEG9A を保持することはチーズ中での EG9 株の生存において負荷となる可能性が考えられた。

pEG9B の存在がチーズ中での EG9 株の生存を有利にする可能性について、ゲノム配列のアノテーションより、pEG9B に PTS および糖代謝関連遺伝子がコードされていることが分かっている。第 3 章の発現解析においてもこれらの一部の遺伝子で発現上昇が見られたことから、関連する可能性がある。

一方 pEG9A に関して、プラスミドの維持が遺伝子の発現制御や代謝経路に影響を与えることを示唆する報告もあり (Ow et al., 2006)、プラスミドを保持することそのものによる代謝負荷が、プラスミドプロファイルに影響を与えることも考えられる。

以上のことから、プラスミドプロファイル、コードされた遺伝子とその発現、プラスミドの保持に対する代謝負荷といった要因が、バリエーションの生育特性や存在比に複合的に影響していると考えられた。

チーズ製造への利用に際してプラスミドの不安定性とバリエーションの発生は歓迎される特徴ではないが、チーズ中において熟成期間の経過とともに特定のバリエーションが優占になる等、一定のバランスに収束するような動きが見られることから、菌体の集団として EG9 株の働きは安定するものと考えられる。

Table 8. Primers for specific detection of EG9 plasmids.

Target	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)
pEG9A	GAGATCGTGCTGCGACTGCGATTG	GTCGTGATGAAGGCACCATACGGA	1426
pEG9B	GTCCACGGATTTTCGGTTCGATGTG	TCGGCAATCATCATGATGCGTCCG	1274
pEG9C	GTGGGACTGTCACACCCTTTTCAG	CATCAGCCGCAATGCCAGCATCTT	934

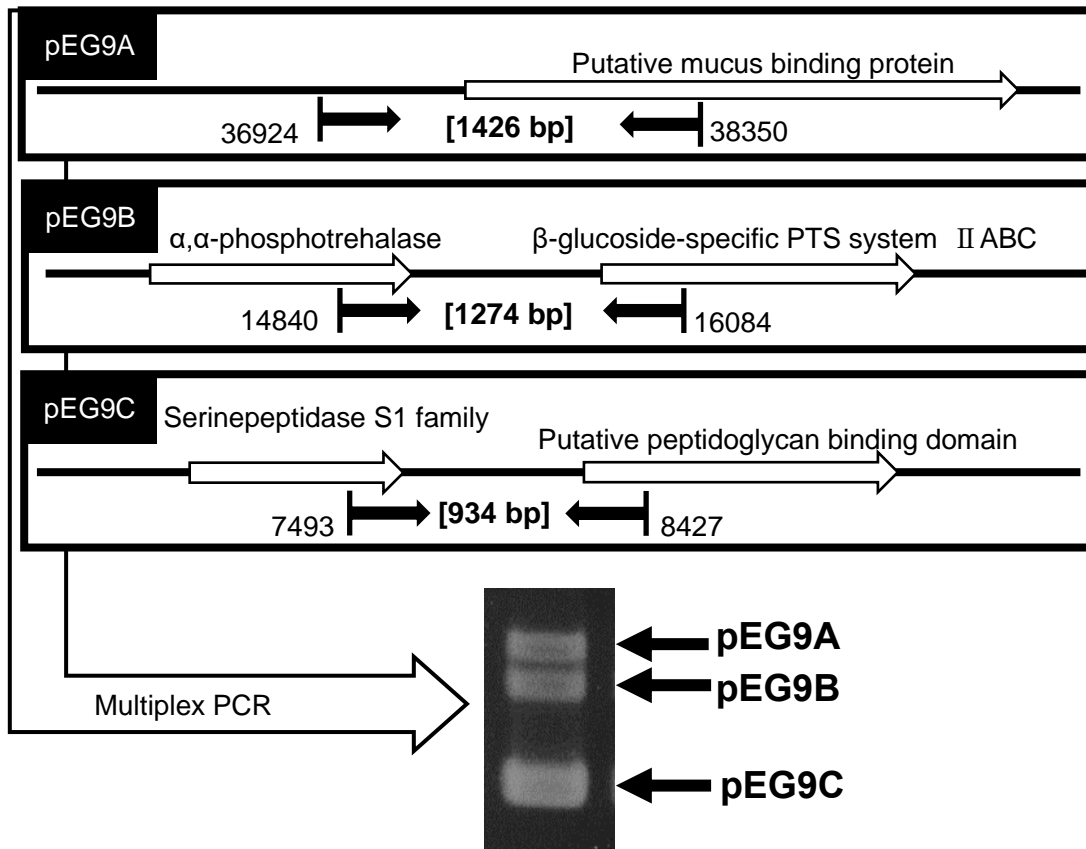


Figure 8. Schematic diagrams of specific primer design of each EG9 plasmid and electrophoresis gel of multiplex PCR using these primers.

MRS agar
plates

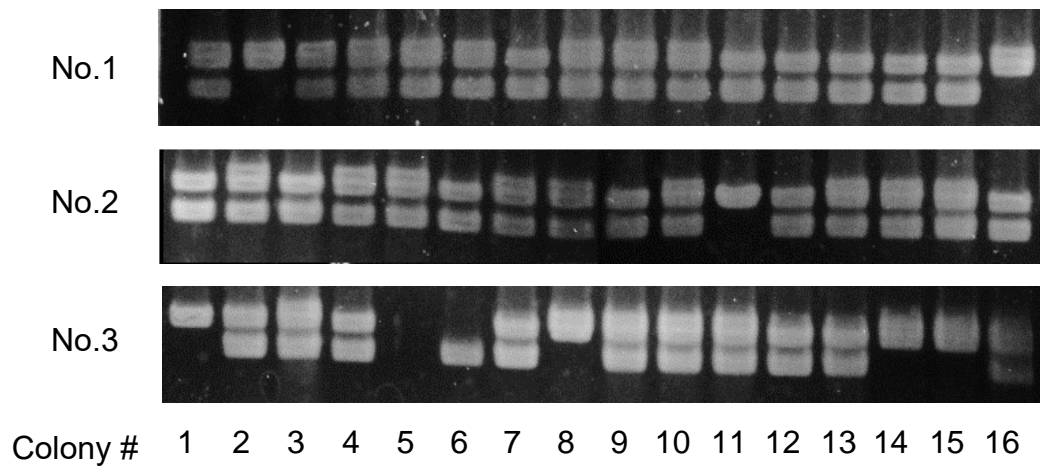


Figure 9. Electrophoresis gels of EG9 plasmid specific multiplex PCR.

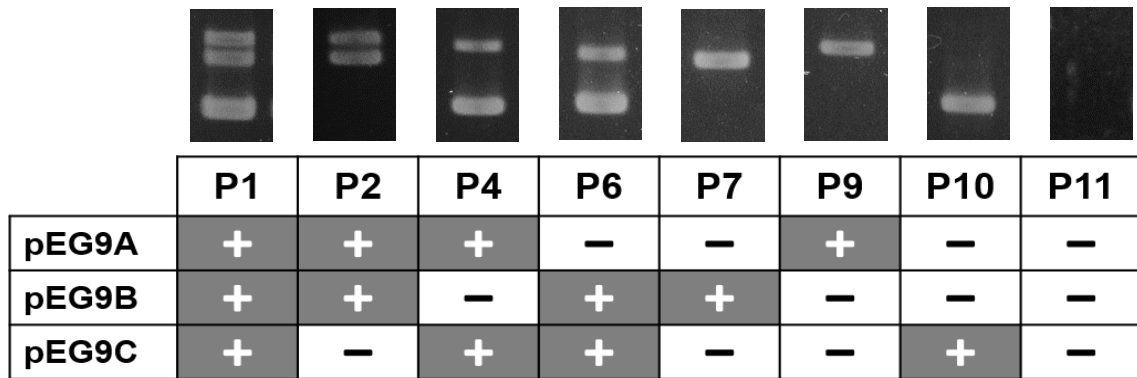


Figure 10. Plasmid profile and electrophoresis gels of each EG9 plasmid variant detected by EG9 plasmid specific multiplex PCR.

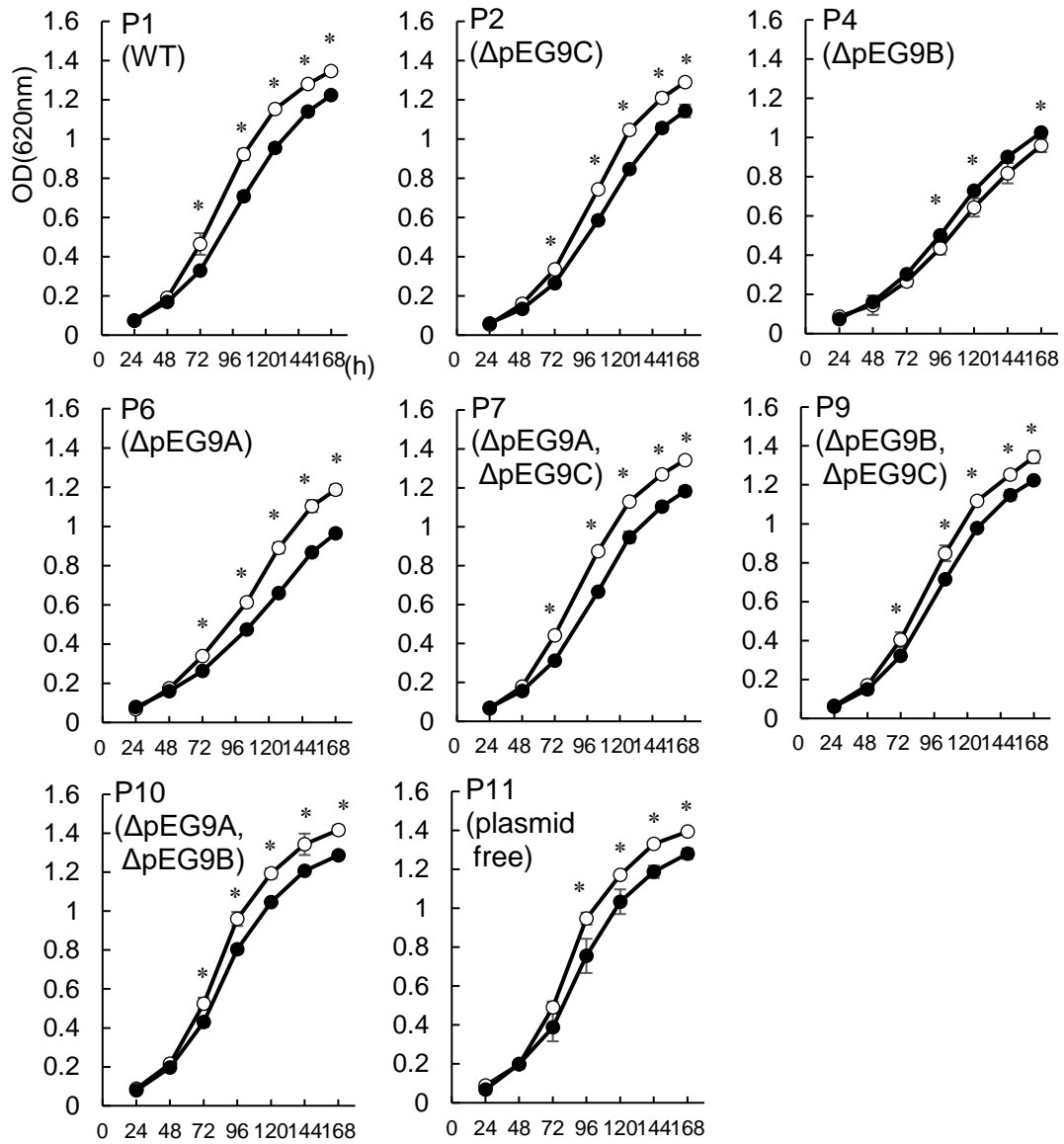


Figure 11. Growth curve of each EG9 plasmid variant cultured at 10°C in MRS broth with ○, 0% NaCl; ●, 1.7% NaCl. Values are expressed as means±SE. Asterisks with each measurement time indicate significant difference (p<0.05).

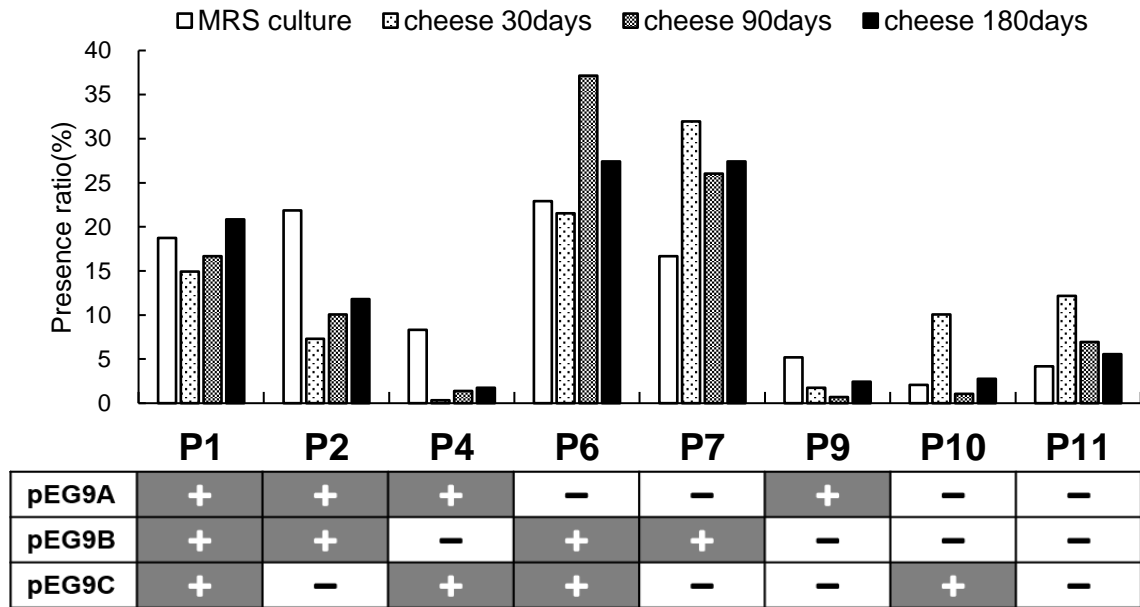


Figure 12. Ratio of each EG9 plasmid variant in MRS culture and EG9 adding Gouda-type cheeses.

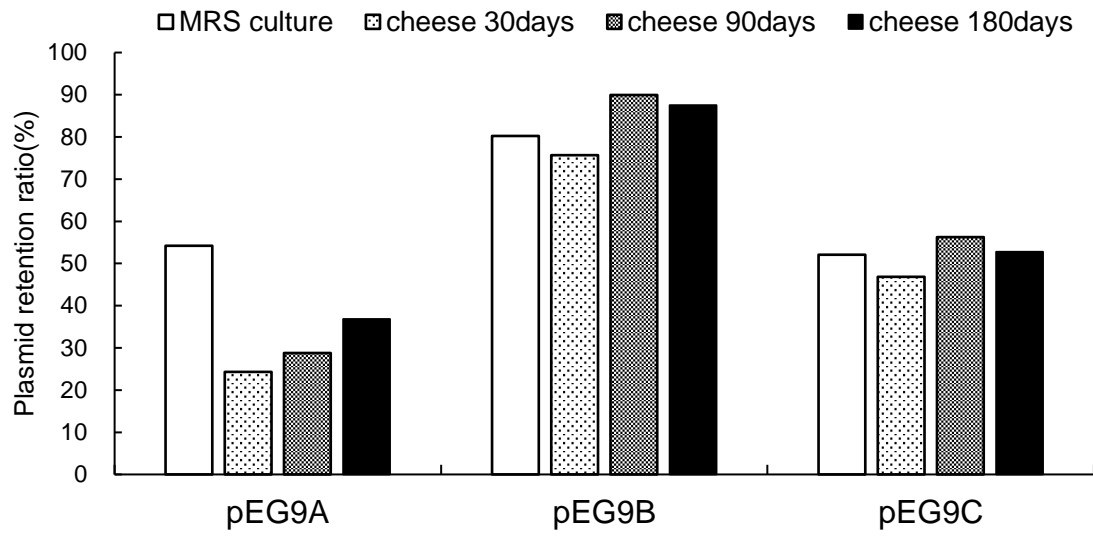


Figure 12. Ratio of each EG9 plasmid retained by EG9 cells in MRS culture and EG9 adding Gouda-type cheeses.

5.結論

本研究によって、EG9 株の補助スターター利用は、乳酸発酵スターターである 712 株の減少を促進すること、pH を有意に低下させること、総 FAA 量を有意に増加させることが明らかになった。

また本研究にて EG9 株の全ゲノム配列を明らかにした。そして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 株がカゼイン分解からペプチドの取り込みを経て FAA 生成に至るまでの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、スキムミルク培地中とチーズ中では、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、生菌数の変動から見ればスキムミルク培地中とチーズ中のどちらにおいても EG9 株は定常期にあると考えられるが、その実際の活動は異なるものであり、EG9 株はチーズ中において特有の活動を行っていることを示唆する。

6.要約

近年日本国内において、嗜好品として、また業務用製品の原料として、ナチュラルチーズが注目されている。チーズ製造、特に熟成を要するチーズの場合には、熟成環境の維持管理や関連設備が製造コストの一要因となる。熟成期間の短縮はコストダウンにつながり、より競争力の強い製品作りを可能にする。

Lactocaseibacillus paracasei EG9 株は、チーズ熟成促進用補助スターターの探索を目的として熟成チーズ中から分離された、非スターター性乳酸菌(non-starter lactic acid bacteria: NSLAB)由来新規獲得株である(Saiki *et al.* 2018)。チーズ製造時に補助スターターとして EG9 株を添加することで、非添加区と比較して製造後 180 日の総遊離アミノ酸 (free amino acid: FAA)量が有意に増加すること、つまりチーズ中のたんぱく質分解を速め熟成を促進することが分かっている。一方、本株の遺伝的特徴や生育の特性等、明らかにされていない面も多い。チーズ中のたんぱく質分解に寄与することは示されたが、その作用機序や活動の動態は不明である。

本研究では、EG9 株のチーズの熟成促進効果に関わる活動の動態を、特に遺伝的特徴とその発現に着目して明らかにすることを目的として、EG9 株の補助スターター利用がチーズに与える影響の評価、およびチーズ中における EG9 株の遺伝子発現プロファイルの調査を行った。

まず EG9 株の補助スターター利用がチーズに与える影響を評価するために、原料乳に乳酸発酵スターターとして *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 712 株、補助スターターとして EG9 株を 5 段階の接種量に調整して処理区を設定したゴーダタイプチーズを製造し、製造後 0、30、90、180 日のチーズ中の生菌数、pH、FAA 量を測定した。

生菌数について、EG9 株の接種量にかかわらず、EG9 株、712 株ともに、塩漬終了時である製造後 0 日には接種菌数より 10^2 – 10^3 倍に増加していた。その後 EG9 株は 8 – $9 \log \text{cfu g}^{-1}$ 程度まで増加した後 180 日間生菌数を維持したのに対し、712 株は時間の経過とともに減少した。また EG9 株の接種量が多いほど、712 株の減少が早い傾向が見られた。

pH について、処理と熟成期間を固定効果、各チーズを変量効果とする混合効果分散分析の結果、EG9 株接種量、熟成期間及びこれらの相互作用が有意に影響を与えることが示された。EG9 株の接種量が多いほど pH が低下し、また熟成期間の経過に伴い製造後 30 日に大きく低下した後 90 日で最低値をとり、180 日にわずかに上昇した。

FAA 量について、処理と熟成期間を固定効果、各チーズを変量効果とする混合効果分散分析の結果、EG9 株接種量、熟成期間及びこれらの相互作用が有意な効果を示した。EG9 株接種量が多いほど総 FAA 量は多くなり、また熟成期間の経過に伴って有意に増加した。

次に、チーズ中総 FAA 量の増加について EG9 株の寄与を明らかにするため、EG9 株ゲノム上から既知の乳たんぱく質分解関連遺伝子を探索し、定量 RT-PCR によりそれらの発現解析を行った。

また、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、トランスクリプトーム解析を行った。

これらの遺伝子発現解析における対照区として、10%スキムミルク培地に EG9 株と 712 株を同量接種し、30°C で 20 時間共培養した定常期の EG9 株を設定した。

試験区として、乳酸発酵スターターとして 712 株を、補助スターターとして EG9 株を同量添加したゴーダタイプチーズを製造し、乳たんぱく質分解関連遺伝子の発現解析には製造後 0、30 日のサンプル、トランスクリプトーム解析には製造後 0 日のサンプルを用いた。

EG9 株ゲノム上には 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、これらについて特異的プライマーを作成し、対照区及び試験区の各サンプルについてリアルタイム PCR を行った。

その結果、製造後 0 日のチーズ中では、31 のうち 27 遺伝子の発現が、対照の発現と比較して有意に上昇し、一部のペプチダーゼが特に大きな上昇を見せた。一方で製造後 30 日のチーズ中では、31 のうち 25 遺伝子の発現が有意に減少し、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。

トランスクリプトーム解析では、チーズ中の EG9 株の遺伝子発現について、対照区の発現と比較して、解析された 2,980 遺伝子のうち 651 遺伝子が有意に発現上昇し、615 遺伝子が有意に発現減少した。

GO 解析において、他の遺伝子の発現制御に関わるとされる遺伝子の発現が上昇する傾向が見られた。

パスウェイ解析では、チーズ中には糖がほぼ存在しないはずである一方で、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上昇が見られた。これらは溶菌した菌体に由来する糖類の資化に関連すると考えられる。しかし活性が低下したと考えられる経路も多く、チーズ中の EG9 株の活動は抑制される傾向にあると考えられた。

本研究によって、EG9 株の補助スターター利用は、乳酸発酵スターターである 712 株の減少を促進すること、pH を有意に低下させること、総 FAA 量を有意に増加させることが明らかになった。

また本研究は EG9 株の全ゲノム配列を明らかにした。そして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 株がカゼイン分解からペプチドの取り込みを経て FAA 生成に至るまでの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、スキムミルク培地中とチーズ中では、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、生菌数の変動から見ればスキムミルク培地中とチーズ中のどちらにおいても EG9 株は定常期にあると考えられるが、その実際の活動は異なるものであり、EG9 株はチーズ中において特有の活動を行っていることを示唆する。

7.謝辞

本研究の課題において、常に適切な御指導と御鞭撻を賜り、また本論文をまとめるに際しても親身に御協力下さいました、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授・田島淳史先生に深い感謝の意を表します。

本研究の実験ならびに本論分の執筆にあたり、終始御指導と御助言を下さいました、農研機構畜産研究部門畜産物研究領域乳製品開発ユニット長・野村将博士に心からの感謝と敬意を表します。

また、本研究を進めるにあたり有益な御指摘とご助言を下さいました、筑波大学大学院生命環境科学研究科助教・浅野敦之先生に厚く御礼申し上げます。

実験・分析を進めるにあたり、相談を受け、的確な御助言を下さいました、農研機構畜産研究部門畜産物研究領域乳製品開発ユニットの小林美穂博士、萩達朗博士、同領域食肉品質ユニット長・佐々木啓介博士に深く御礼申し上げます。

チーズ製造実験にあたり、多大なる御協力とご指導を下さいました、農研機構畜産研究部門畜産物研究領域乳製品開発ユニットの成田卓美氏に心より感謝致します。

研究に取り組む中で常に親身に支えて下さいました、農研機構畜産研究部門畜産物研究領域乳製品開発ユニットの林田空氏、清水明美氏、ならびに畜産物研究領域の方々に感謝申し上げます。

研究内外において支えて頂いた動物資源生産科学研究室の皆様感謝申し上げます。

最後に、私の意志を尊重し、全面的に援助し応援してくれた家族に感謝します。

8.参考文献

- Alcántara, C., Bäuerl, C., Revilla-Guarinos, A., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., & Zúñiga, M. (2016). Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR-family response regulator in *Lactobacillus casei*. *Molecular Microbiology*, **100**(1), 25–41. <https://doi.org/10.1111/mmi.13299>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **31**(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Asahina, Y., Shiroma, A., Nakano, K., Tamotsu, H., Ashimine, N., Shinzato, M., Minami, M., Shimoji, M., Nakanishi, T., Ohki, S., Teruya, K., Satou, K., Kobayashi, M., Hagi, T., Moriya, N., Suzuki, C., Tajima, A., Nomura, M., Hirano, T. (2018). Complete Genome Sequence of *Lactobacillus paracasei* EG9, a Strain Accelerating Free Amino Acid Production during Cheese Ripening. *Genome Announcements*, **6**(27). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00627-18>
- Bancalari, E., Montanari, C., Levante, A., Alinovi, M., Neviani, E., Gardini, F., & Gatti, M. (2020). *Lactobacillus paracasei* 4341 as adjunct culture to enhance flavor in short ripened Caciotta-type cheese. *Food Research International*, **135**. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109284>

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, **11**(4–7), 259–274.

[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)

Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, **101**(4), 3611–3629. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>

Borezee, E., Pellegrini, E., & Berche, P. (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infection and Immunity*, **68**(12), 7069–7077.

<https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.7069-7077.2000>

Bove, C. G., Angelis, M. De, Gatti, M., Calasso, M., Neviani, E., & Gobbetti, M. (2012).

Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *PROTEOMICS*, **12**(21), 3206–3218. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200157>

Chin, C. S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A.,

Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E., Turner, S., Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods*, **10**(6), 563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>

- Crow, V., Curry, B., & Hayes, M. (2001). The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, **11**(4–7), 275–283. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00057-7)
- Desfossés-Foucault, É., LaPointe, G., & Roy, D. (2014). Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. *International Journal of Food Microbiology*, **178**, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.004>
- Doeven, M. K., Kok, J., & Poolman, B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*, **57**(3), 640–649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04698.x>
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., DeWinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong,

- F., Korlach, J., Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, **323**(5910), 133–138. <https://doi.org/10.1126/science.1162986>
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Cheese (Fourth Edition): Chemistry, Physics and Microbiology*. ISBN: 978-0-12-417012-4
- Fuke, S., & Shimizu, T. (1993). Sensory and preference aspects of umami. *Trends in Food Science and Technology*, **4**(8), 246–251. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90139-2](https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90139-2)
- Galli, B. D., Baptista, D. P., Cavalheiro, F. G., Negrão, F., Eberlin, M. N., & Gigante, M. L. (2019). Peptide profile of Camembert-type cheese: Effect of heat treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International*, **123**, 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.009>
- Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., & Mucchetti, G. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, **97**(2), 573–591. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7187>
- Gatti, M., Fornasari, M. E., Mucchetti, G., Addeo, F., & Neviani, E. (1999). Presence of peptidase activities in different varieties of cheese. *Letters in Applied Microbiology*, **28**(5), 368–372. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00541.x>

- Gatti, M., Lindner, J. D. D., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M., Bernini, V., & Neviani, E. (2008). Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(19), 6161–6167. <https://doi.org/10.1128/AEM.00871-08>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P. F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, **45**(2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.016>
- Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P. F., & De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science and Technology*, **78**, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>
- Hagi, T., Kobayashi, M., & Nomura, M. (2014). Aerobic condition increases carotenoid production associated with oxidative stress tolerance in *Enterococcus gilvus*. *FEMS Microbiology Letters*, **350**(2), 223–230. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12341>
- Holck, A., & Naes, H. (1992). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *Journal of General Microbiology*, **138**(7), 1353–1364. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-7-1353>

Lee, B., Tachon, S., Eigenheer, R. A., Phinney, B. S., & Marco, M. L. (2015). *Lactobacillus casei* Low-Temperature, Dairy-Associated Proteome Promotes Persistence in the Mammalian Digestive Tract. *Journal of Proteome Research*, **14**(8), 3136–3147.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00387>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, **25**(4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., & Drinan, F. D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, **6**(8–9), 851–867.
[https://doi.org/10.1016/0958-6946\(96\)00019-2](https://doi.org/10.1016/0958-6946(96)00019-2)

Lynch, C. M., Muir, D. D., Banks, J. M., McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (1999). Influence of Adjunct Cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, **82**(8), 1618–1628.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75390-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75390-7)

McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, **57**(2–3), 127–144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>

- Nakano, K., Shiroma, A., Tamotsu, H., Ohki, S., Shimoji, M., Ashimine, N., Shinzato, M.,
Minami, M., Nakanishi, T., Teruya, K., Satou, K., Suzuki, C., Kimoto-Nira, H.,
Kobayashi, M., Mizumachi, K., Aoki, R., Miyata, S., Yamamoto, K., Ohtake, Y.,
Eguchi-Ogawa, T., Moriya, N., Hagi, T., Nomura, M., Hirano, T. (2016). First complete
genome sequence of the skin-improving *Lactobacillus curvatus* strain FBA2, isolated
from fermented vegetables, determined by PacBio single-molecule real-time
technology. *Genome Announcements*, **4**(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00884-16>
- Niven, G. W. (1991). Purification and characterization of aminopeptidase A from
Lactococcus lactis subsp. *lactis* NCDO 712. *Journal of General Microbiology*, **137**(5),
1207–1212. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-5-1207>
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., & Suzuki, I. (1998). Production of γ -
Aminobutyric Acid By Cheese Starters During Cheese Ripening. *Journal of Dairy
Science*, **81**(6), 1486–1491. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75714-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75714-5)
- Ow, D. S. W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K. W., & Yap, M. G. S. (2006). Global
transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in
Escherichia coli DH5 α during batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*,
39(3), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.048>

- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojić, M., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., Jovanovic, G. (2003). Identification and Genetic Characterization of a Novel Proteinase, PrtR, from the Human Isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(10), 5802–5811. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5802-5811.2003>
- Peltoniemi, K., Vesanto, E., & Palva, A. (2002). Genetic characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Archives of Microbiology*, **177**(6), 457–467. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0411-9>
- Poveda, J. M., Chicón, R., & Cabezas, L. (2015). Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. *International Dairy Journal*, **47**, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.03.004>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Saiki, R., Hagi, T., Narita, T., Kobayashi, M., Sasaki, K., Asahina, Y., Tajima, A., Nomura, M. (2018). Effects of the Addition of Non-Starter Lactic Acid Bacteria on Free Amino

Acid Production During Cheese Ripening. *Food Science and Technology Research*,
24(2), 299–309. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.299>

Saito, H., & Miura, K. I. (1963). Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, **72**(C), 619-629.
[https://doi.org/10.1016/0926-6550\(63\)90386-4](https://doi.org/10.1016/0926-6550(63)90386-4)

Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, **27**(6), 691–697.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>

Siezen, R. J. (1999). Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*,
76(1–4), 139–155. <https://doi.org/10.1023/A:1002036906922>

Sugawara, H., Ohyama, A., & Kurokawa, K. (2009). Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) for diverse users. 20th International Conference on Genome Informatics.

Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., & Haandrikman, A. (1993). Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **175**(23), 7523–7532.
<https://doi.org/10.1128/jb.175.23.7523-7532.1993>

- Ulve, V. M., Monnet, C., Valence, F., Fauquant, J., Falentin, H., & Lortal, S. (2008). RNA extraction from cheese for analysis of *in situ* gene expression of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, **105**(5), 1327–1333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03869.x>
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **82**(1–4), 187–216. <https://doi.org/10.1023/A:1020631532202>
- Van Hoorde, K., Van Leuven, I., Dirinck, P., Heyndrickx, M., Coudijzer, K., Vandamme, P., & Huys, G. (2010). Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, **144**(2), 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.007>
- Vukotić, G., Strahinić, I., Begović, J., Lukić, J., Kojić, M., & Fira, D. (2016). Survey on proteolytic activity and diversity of proteinase genes in mesophilic lactobacilli. *Microbiology*, **85**(1), 33–41. <https://doi.org/10.1134/S002626171601015X>