



1997年 トピックス委員

(投稿歓迎 各委員まで)

幹 事	金子 嘉信 (阪大・工・応生)		
微生物・生態	森川 正章 (阪大・工・物質・生命)	発酵生産・培養工学	田中 孝明 (新潟大・工・機能材料)
遺 伝	竹川 薫 (香 川 大・農)	酵 素	川本 卓男 (京大・工・合成・生化)
微生物代謝・生化学	神崎 浩 (岡 山 大・農)	環境工学	加藤 純一 (広大・工・発酵)
醸 造	浜地 正昭 (大 関・総 研)	単位操作・培養制御	朴 龍洙 (静岡大・農・応生化)
食 品	木村 幸敬 (京大・農・食工)	細胞工学	岡本 稔 (住 友 製 薬)

## チーズ大作戦「なお、この乳酸菌は自動的に消滅する」

### —乳製品製造における酵素利用の最前線—

明治乳業(株)中央研究所 佐藤英一

チーズは世界中で食されている代表的な発酵乳製品であり、その数は1000種類を越すといわれる。チーズの製造には細菌、カビ、酵母など多くの微生物が関与するが、特にスターターとして添加する乳酸菌の働きが主要である。というのは、乳酸生成により凝乳酵素の作用を促進したり、汚染菌の増殖を抑制することに加え、乳酸菌が乳成分を代謝する過程で生じるペプチドや遊離アミノ酸がチーズ特有の風味を形成しているからである。原料となる牛乳中には乳酸菌が生育するうえで必要とする遊離アミノ酸が少ないため、乳酸菌は自らのプロテイナーゼ、ペプチダーゼで乳中のカゼインを低分子量のペプチドやアミノ酸にまで分解し、代謝に利用する。したがって、これらのプロテイナーゼやペプチダーゼは、乳酸菌が牛乳中で生育するために必要であるだけでなく、同時にチーズ製造においても重要な役割を果たしているのである。もう少し詳しく乳酸菌のタンパク質分解システムを説明しよう。チーズ乳酸菌の *Lactococcus lactis* ではプロテイナーゼがプラスミド支配であることから、これまで多くの研究がなされた。このプロテイナーゼの活性発現には成熟型への変換が必要で、そのためには細胞膜の外側に存在するマチュラーゼと呼ばれるリポタンパク質の作用が必須である。マチュラーゼを欠いた乳酸菌では、たとえプロテイナーゼが合成されても牛乳中で生育することはできない。この酵素のもう1つの特徴は、カルシウム存在下では細胞壁に局在し、非存在下では自己消化により遊離する性質をもつことであるが、牛乳中はカルシウムが豊富なため細胞壁に安定に存在することができる。また、プロテイナーゼが細胞壁に存在するということは、乳酸菌が牛乳中のカゼインを効率よく分解するのに好都合である。細胞壁に局在するプロテイナーゼの作用でカゼインから生じたペプチドは、ペプチド輸送システムを介して細胞内に取り込まれる。細胞内にはいくつかのペプチダーゼが存在しており、取り込んだペプチドをさらに分子量の小さいペプチド、アミノ酸へと分解する。現在までにタイプの異なる種々のペプチダーゼが単離精製されており、さらに乳酸菌内での各ペプチダーゼの役割や他のペプチダーゼとの関係も明らかにされてきた。実際のチーズの熟成には通常3~6ヵ月要するとされ、その間にこのような乳酸菌のタンパク質分解システムが働いて、時間をかけて風味成分が形成されていくのである。一方で、熟成期間の短縮はコストの軽減にもつながる重要な課題であり、これまで多くの試みがなされている。

そこで、おもしろい一例を紹介しよう。そのためには、もう1つの話題を取り上げなければならないので、ここからは乳酸菌の自己溶菌システム<sup>2)</sup>について述べることにする。細菌にファージが感染すると、ファージの溶菌酵素により細菌細胞壁が分解されてしまう。乳酸菌の場合も同様で、ファージが作り出す溶菌酵素ライシンによって溶菌する。したがって、乳製品製造においてファージ汚染は深刻な問題であり、通常は汚染防止に注意が払われる。ところが、逆にこの現象を積極的に利用しようとする研究が進められている。ファージから単離した溶菌酵素遺伝子をチーズ乳酸菌に組み込み、人為的に溶菌を誘発させようというのである。チーズの熟成に関与するペプチダーゼは細胞内に存在しているので、乳酸菌が溶菌すれば蓄積されているペプチダーゼが放出され、チーズの熟成が促進されるという寸法である。ただし溶菌させる時期が重要で、勝手に溶菌されては都合が悪い。そのためには、溶菌をコントロールできなければならないのだが、最近になり特殊なプロモーターを利用して溶菌させる方法が開発された。特定の濃度のNaCl存在下でのみ誘導されるプロモーター<sup>3)</sup>が *L. lactis* から単離されたのである。このプロモーターを利用して溶菌酵素遺伝子をチーズ乳酸菌で発現させれば、食塩の添加により自

在に乳酸菌を溶かしてしまいうことができるわけである。実際のチーズ製造行程では加塩後に熟成させて製品にするため、実にエレガントな発想である。さらに、苦味成分を生じる不都合なペプチダーゼ遺伝子を破壊しておくとか、酵素活性を増強するなどの工夫をしておけば、優良な製品を早く安定に供給することも可能であろう。乳酸菌の能力を十分に利用し、後になって溶かしてしまうとは、さながらスパイ大作戦（最近の人にはミッションインポシブルの方が分かりやすいかも）の自動消滅するテープのような話だが、ヨーロッパではこのような研究が精力的に進められているのである。

- 1) Konings, W. N.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 187 (1996).
- 2) Gasson, M. J.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 147 (1996).
- 3) Sanders, J. W.: *5th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Abstract* (1996).

## 植物体生産プロセスにおける溶存酸素濃度の重要性

東京工業大学生命理工学部生物工学科 邢 新会

脱分化植物細胞の維持は、細菌や動物細胞のような簡単な冷凍保存法が確立されていないため、現在のところ主に好気的な継代培養に頼っている。一方、植物細胞の継代培養を繰り返していくとその再分化能が次第に失われてしまうことが経験的に知られている。したがって、植物細胞からの植物体の生産プロセスにおいて誘導された脱分化細胞の再分化能の維持が不可欠である。このため、クローン植物体の生産を目指す培養操作を確立するためには脱分化植物細胞の再分化能を保持できる簡便な細胞保存方法が求められている。

ニンジンカルスやイネカルスの培養においては、溶存酸素 (DO) 濃度が低いと細胞増殖速度は低下するが、嫌気代謝によりその生存が可能であり、脱分化細胞の再分化能を保持している。<sup>1,2)</sup> この事実は、低酸素あるいは無酸素条件にすることにより再分化能を保持できる簡便な脱分化植物細胞の保存の可能性を示唆している。

好気性細胞とされている脱分化植物細胞の再分化過程では、DO 濃度の影響が大きい。<sup>1,3)</sup> イネカルスの再分化を行うバイオリクターにおいて、再分化個体数の向上やその成長促進には高い DO 濃度が必要である。<sup>3)</sup> また、Jay らはニンジンカルスの不定胚形成における DO 濃度の影響を調べたところ、100%飽和酸素濃度下での不定胚数は、10%酸素濃度下でのものに比べ3倍以上となった。脱分化植物細胞の再分化過程における DO 濃度の作用機作は明らかでないが、ニンジン細胞の不定胚形成の初期では低酸素分圧下での細胞内 alcohol dehydrogenase (ADH) 活性は高分圧のものと同様であったものの、後期では高くなるという現象が認められている。<sup>4)</sup>

一方、低酸素濃度や無酸素状態での幼植物体の細胞内の嫌気的代謝活性とその無酸素への耐性との関係について多く報告されている。Bertani らの研究<sup>4)</sup>によると、好気的に発芽したイネ幼植物体は48時間の無酸素処理により細胞内の ADH 活性が増加し、これに伴って生産されたエタノールの大部分が培地中に放出され、その幼植物体あたりの最大量が 57.8  $\mu\text{mol}$  にも達した。これは、エタノール発酵によってイネ幼植物体は生存のためのエネルギーを獲得したことを示唆している。しかし、イネとは異なるトウモロコシ幼植物体においては、無酸素下で細胞内で乳酸が蓄積して細胞が死滅するが、低酸素条件下で前処理すると無酸素耐性を誘導できる。<sup>5-7)</sup> これは、低酸素条件下での前処理により植物細胞内の乳酸の生産量が低下したうえ、その大部分が培地中に放出されたためか、また多くの代謝産物がエタノール発酵によって細胞にとって毒性の小さいエタノールになったためである。また、これらの結果は、低酸素条件下での前処理により植物細胞内で lactate dehydrogenase (LDH), pyruvate decarboxylase (PDC) や ADH に関わる遺伝子の発現量が増大したためと推定されている。<sup>6,7)</sup> さらに、嫌気代謝遺伝子のプロモーター領域に Anaerobic Response Element が存在し、これが低酸素処理の効果に関わっている可能性も指摘されている。<sup>7)</sup> これらの結果は、DO 濃度によって植物細胞の多様な代謝経路を制御しうることを示唆している。今後、植物細胞の持っている嫌気代謝遺伝子とその機能を解明することにより、植物細胞を利用するバイオプロセスへの新たな応用が期待できる。

- 1) Jay, V. et al.: *Plant Cell Reports*, **11**, 605 (1992).
- 2) Xing, X.-H. et al.: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 168 (1996).
- 3) Okamoto, A. et al.: *Plant Cell Reports*, **15**, 731 (1996).
- 4) Bertani, A. et al.: *J. Experim. Botany*, **31**, 325 (1980).
- 5) Xia, J.-H. and Saglio, P. H.: *Plant Physiol.*, **100**, 40 (1992).
- 6) Hoffeman, N. E. et al.: *Plant Physiol.*, **82**, 658 (1986).
- 7) Andrews, D. L. et al.: *Plant Physiol.*, **106**, 1575 (1994).