

<令和元年度助成>

乳酸菌由来新奇抗菌ペプチド・抗菌タンパク質の探索と 構造・機能の解析

善藤 威史

(九州大学大学院 農学研究院)

背景

食品の保存には様々な保存料が用いられているが、従来用いられてきた保存料には健康への影響が懸念されており、生物由来の天然の保存料の利用に大きな期待が寄せられている。中でも、安全な微生物である乳酸菌が生産する抗菌ペプチド・バクテリオシンは、ヒトに対する毒性がなく、体内や環境中において分解されやすく、耐性菌が出現しにくいといった特性を有している。乳酸菌バクテリオシンは、人体や環境に優しく安心して使用できる抗菌物質として注目され、食品保存料や食品と同様に高い安全性が求められる様々な用途への利用が期待されている。実際に、乳酸菌 *Lactococcus lactis* の一部の菌株が生産するナイシン A は、広い抗菌スペクトルと強力な抗菌活性を有する優れたバクテリオシンで、日本を含む世界 50 ケ国以上で食品保存料として実用されている。一方で、ある種の微生物に対してはナイシン A よりも優れた効果を発揮するバクテリオシンや、バクテリオシンよりもやや分子量の大きなバクテリオリシンと総称される抗菌タンパク質も報告されている。

これまでに、我々も抗菌スペクトルと分子量を指標とした迅速スクリーニング法を構築し、新奇乳酸菌バクテリオシン・バクテリオリシンを見出してきた¹⁾。特性の異なる様々なバクテリオシンやバクテリオリシンの中から、対象とする食品や微生物に応じて、最適な特性をもつものを選択することができれば、残留による耐性菌の出現を防ぎつつ、さらに安全かつ効果的な微生物制御の実現が期待できる。そこで本研究では、様々な分離源から得られる乳酸

菌から、特性の異なる様々な新奇バクテリオシン・バクテリオリシンの探索をさらに進め、その構造と特性を明らかにすることを目的とした。

方法

1. バクテリオシン・バクテリオリシン生産 乳酸菌の分離

発酵食品や植物をはじめとする様々な分離源から、集積培養を経て、寒天培地上で酸生成株として乳酸菌を分離した。分離した乳酸菌の抗菌活性は、Spot-on-lawn 法による抗菌活性試験で評価した。抗菌活性を示した乳酸菌については、糖類資化性試験や 16S rRNA 遺伝子配列解析等により、菌種を同定した。

2. バクテリオシン・バクテリオリシンの抗 菌スペクトル等の特性の解析

分離した乳酸菌の培養液上清を試料として、乳酸菌が生産する抗菌物質の抗菌スペクトルや pH 依存性、酵素感受性等の諸特性を解析した。また、抗菌物質の作用機構を明らかにするために、比濁法による抗菌活性試験を行った。必要に応じて、精製した抗菌物質を用いて、同様の解析を行った。

3. バクテリオシン・バクテリオリシンの精 製と構造解析

抗菌スペクトル等の諸特性の解析により、新奇性が高いと判断されたバクテリオシン・バクテリオリシンについて、その精製と構造解析を試みた。乳酸菌の培養液上清に含まれる抗菌物質を陽イオン交換

や逆相クロマトグラフィーを用いて精製した。抗菌活性を示す精製物について、質量分析やエドマン分解を行い、その構造を解析した。必要に応じて、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) で培養液上清を直接分析することで、バクテリオシンの検出と同定を試みた²⁾。

抗菌物質のアミノ酸配列情報をもとに、PCR・DNA シーケンス解析によって、バクテリオシン・バクテリオリシン前駆体遺伝子および周辺領域の塩基配列を解析した。また、乳酸菌の全ゲノムのドラフトシーケンス解析を行い、バクテリオシン・バクテリオリシン前駆体遺伝子および生合成遺伝子群を探索した。前駆体をコードする遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列およびその理論分子量と、精製物から得られた構造情報を比較し、バクテリオシン・バクテリオリシンの構造決定を試みた。

結 果

1. バクテリオシン・バクテリオリシン生産乳酸菌の分離

様々な分離源より、46 株の乳酸菌が単離され、そのうち A～D の 4 株がバクテリオシン様の抗菌活性を示した。A 株と D 株はいずれも乳酸菌である *Lactococcus lactis*、*Weissella minor* とそれぞれ同定された。B 株と C 株は、種の同定には至らなかったものの、*Enterococcus* 属乳酸菌に分類されること

が明らかとなった。

2. バクテリオシン・バクテリオリシンの抗菌スペクトル等の特性の解析

A～D の 4 株の培養液上清の抗菌スペクトルを Spot-on-lawn 法で調べた (表 1)。その結果、A 株は広い抗菌スペクトルと強い抗菌活性を示した。B 株と C 株は、A 株よりもやや弱い活性を示したものの、*Lactobacillus sakei* には比較的強い抗菌活性を示した。D 株は、狭い抗菌スペクトルを有し、*Enterococcus faecalis* には比較的強い抗菌活性を、他の 2 種の検定菌には微弱な抗菌活性を示した。

3. バクテリオシン・バクテリオリシンの精製と構造解析

A 株が生産する抗菌物質は、培養液上清の LC/MS 解析の結果、これまでに *L. lactis* から多数の報告例があるバクテリオシンで、ナイシン A の類縁体であるナイシン Z²⁾ と同定された (図 1)。B 株が生産する抗菌物質は、精製・構造解析の結果、*Enterococcus mundtii* からの生産が報告されているバクテリオシン、mundticin^{2,3)} であることが明らかとなった (図 1)。C 株が生産する抗菌物質は、他のバクテリオシンと同様の方法では精製が困難で、構造決定には至らなかった。

D 株からは、種々のクロマトグラフィーを経て、2 種の抗菌タンパク質が精製された。質量分析とア

表 1 分離株の抗菌スペクトル

検定菌	抗菌活性			
	A	B	C	D
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	+	+	+	—
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	+++	++	++	—
<i>Lactobacillus dextrinicus</i> JCM 5887 ^T	+++	+	+	—
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	++	+	+	—
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	+	+	+	++
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	+++	+	+	+
<i>Kocuria rhizophila</i> NBRC 12708	+	+	+	—
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	+	+	+	+

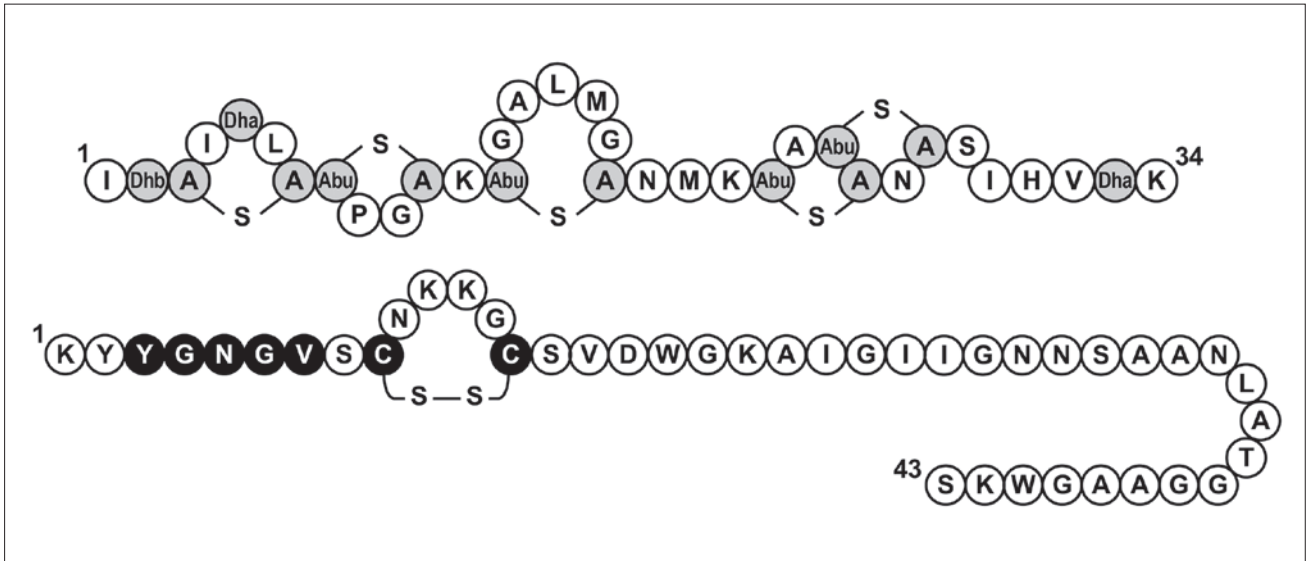


図1 ナイシンZと mundticin の構造
 ナイシンZ (上) は翻訳後修飾によって生じる異常アミノ酸 (灰色) とモノスルフィド結合 (-S-) を有している。Mundticin は抗リステリアバクテリオシンに共通して見られる保存配列 (白抜き) とジスルフィド結合 (-S-S-) を有している。

ミノ酸配列解析の結果、いずれも新奇の抗菌タンパク質、バクテリオリシンであることが明らかとなった。D株のドラフトゲノム解析の結果、2つの新奇バクテリオリシンをコードする遺伝子が見出され、いずれも約30 kDaの新奇バクテリオリシンの一次構造を決定することができた。また、隣接して存在する2つの新奇バクテリオリシンの遺伝子周辺には、これらの生合成への関与が予想される遺伝子群が見出された。

D株が生産する2つの新奇バクテリオリシンには、

溶菌酵素に類似した領域が2ヶ所ずつ見出され、そのうちの1つは両者間できわめて類似していたことから、2つの新奇バクテリオリシンは作用機構の類似した溶菌作用を示すことが予想された。そこで、D株が生産する2つの新奇バクテリオリシンの混合物について、比濁法によって作用機構を解析した。その結果、添加後に顕著な濁度の低下が認められ、2つの新奇バクテリオリシンは溶菌作用を示すことが明らかとなった (図2)。また、精製バクテリオリシンについても同様の結果が得られ、添加後速やかな

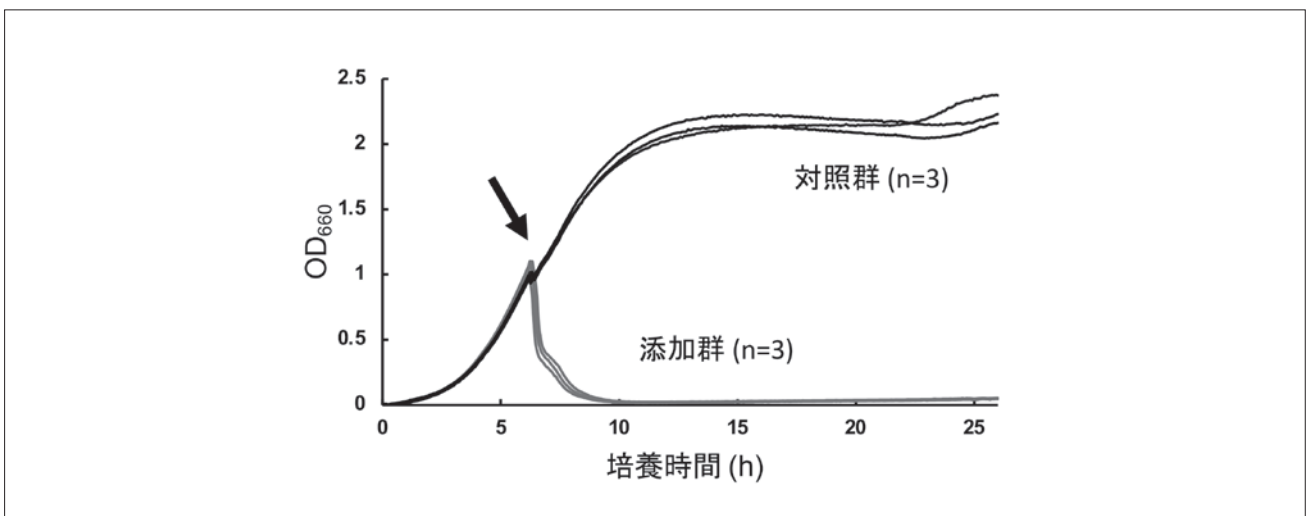


図2 D株が生産する新奇バクテリオリシンの作用機構
 検定菌 *Weissella paramesenteroides* JCM 9890¹ の培養液に粗精製バクテリオリシンを添加したところ、660 nm の濁度の速やかな低下が見られた。

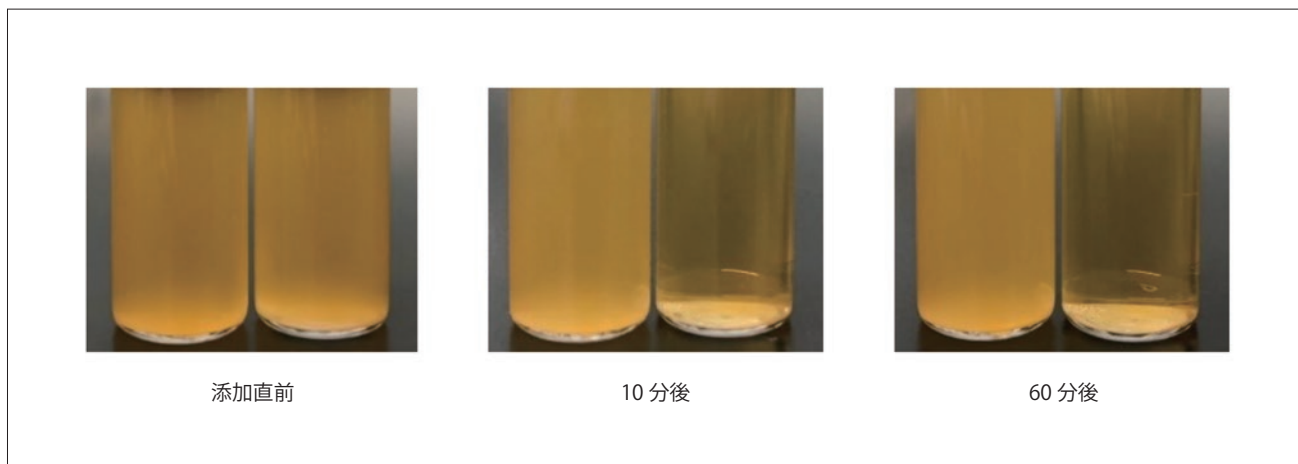


図3 精製バクテリオリシンの溶菌作用
 検定菌 *Weissella paramesenteroides* JCM 9890^T の培養液に精製バクテリオリシンを添加した。対照とした非添加の場合には変化が見られなかったが（左）、添加した場合には濁度が速やかに低下し、溶菌作用が認められた（右）。

濁度の低下が観察された（図3）。

考 察

様々な分離源より得られた乳酸菌のうち、4株にバクテリオシン様の抗菌活性が認められ、そのうちの3株が生産する抗菌物質の構造を決定することができた。A株とB株では、それぞれすでに構造が報告されているナイシンZと mundticin の生産が確認された。C株からは一般的な精製方法ではバクテリオシンが精製されなかったことから、性質の異なる新しい抗菌物質が生産されていることが予想される。一方で、D株からは抗菌タンパク質であるバクテリオリシンの生産が認められ、精製された2つのバクテリオリシンはいずれも新しい構造をもつことが明らかとなった。また、これらのバクテリオリシンは狭い抗菌スペクトルと溶菌作用を示した。この特異的な抗菌作用の解明に向けて、今後、作用機構の詳細の解析が望まれる。抗菌スペクトルの狭いバクテリオシンやバクテリオリシンは、有用な微生物には影響せずに有害菌のみを抑制する選択的な微生物制御に有効であり、将来の食品保存料などへの利用が期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団と財団関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただきました、九州大学大学院生物資源環境科学府・微生物工学研究室の野見山泰成氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 善藤威史, 石橋直樹, 園元謙二. 乳酸菌バクテリオシンの探索と利用. 日本乳酸菌学会誌, 25(1), 24-33 (2014).
- 2) Zendo, T., Nakayama, J., Fujita, K., Sonomoto, K. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 499-507 (2008).
- 3) Zendo, T., Eungruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., Kobayashi, G., Nakayama, J., Ishizaki, A., Sonomoto, K. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1181-1190 (2005).

Screening and characterization of novel antimicrobial peptides and proteins from lactic acid bacteria

Takeshi ZENDO

Faculty of Agriculture, Kyushu University

Due to their properties and safety, antimicrobial peptides and proteins produced by lactic acid bacteria (LAB) are expected to be applied as food preservatives and pharmaceutical agents. The purpose of this study was to search for LAB isolates that produce antimicrobial peptides or proteins with new properties, and to clarify the structures and properties of the produced antimicrobial substances. LAB isolates were obtained from various sources through enrichment cultures and subsequent cultivation on agar plates. The resulting isolates were then evaluated for antimicrobial activity, and four isolates, identified as LAB such as *Lactococcus* and *Weissella*, were found to exhibit bacteriocin-like inhibitory activity against some of the tested indicator bacteria. The culture supernatants of isolates A and B were analyzed to determine the structures of the produced antimicrobial substances, indicating that they produced antibacterial peptides, bacteriocins identical to previously reported nisin Z and mundticin, respectively. From the culture supernatant of isolate C, which displayed high antimicrobial activity, no bacteriocin was purified, probably due to having characteristics that differ from general bacteriocins. These three isolates showed broad-spectrum antimicrobial activity against Gram-positive indicator bacteria, whereas isolate D displayed a narrow antimicrobial spectrum. Two antimicrobial substances were purified from the culture supernatant of isolate D, and a structural analysis by mass spectrometry and Edman degradation indicated they were novel antimicrobial proteins. Subsequently, draft genome analysis on isolate D identified the genes and the whole primary structures of the two novel antimicrobial proteins. Both a crude preparation and the purified proteins showed quick lytic activity on an indicator bacterium.