



## 新奇乳酸菌バクテリオシンの探索とその構造と機能に関する研究

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門 助教 善藤 威史

はじめに

バクテリオシンは、細菌によってリボソーム上で合成される抗菌ペプチドもしくはタンパク質で、食中毒菌や病原菌に対して抗菌作用を示すものもある。乳酸菌由来のバクテリオシンは、一般に耐熱・耐酸性で、近縁のグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を示す。また、安全性の高い微生物である乳酸菌によって生産され、腸管内のタンパク質分解酵素で分解されることから、高い安全性を有すると考えられ、天然の安全な食品保存料としての利用が期待されている。これまでに、最も代表的なバクテリオシンで、乳酸菌 *Lactococcus lactis* の一部の株によって生産されるナイシン A は世界 50 カ国以上で食品保存料として広く実用されている。日本においても、ナイシン A は 2009 年に食品添加物として指定され、今後、広く利用されていくことが予想される。

乳酸菌バクテリオシンは、一般的な抗生物質とは異なり、きわめて低濃度で抗菌活性を示すことや、瞬時に細胞膜に孔を形成して抗菌活性を示すこと、環境中で容易に分解されることから、耐性菌を生じにくいと考えられている。このような特徴から、乳酸菌バクテリオシンは食品保存料だけでなく、医療や畜水産分野における、抗生物質の代替品、消毒洗浄剤としての利用も検討されている。腸管内および環境中で容易に分解される乳酸菌バクテリオシンの利用によって、残留のない安全な微生物制御の実現が期待される。そこで、筆者らは、乳酸菌バクテリオシンの特徴を活かした微生物制御の実現を目指し、ナイシン A に続く、優れた特性を有する新奇バクテリオシンの探索を行い、それらの構造と機能について研究を行った。

### 1. 新奇乳酸菌バクテリオシンの探索と迅速スクリーニング法の構築

まず、多様な新奇乳酸菌バクテリオシンの獲得を目指し、迅速スクリーニング法の構築を試みた。従来は、乳酸菌の分離とバクテリオシンの精製・構造解析に多大な労力を費やしたにも

かかわらず、決定した構造が既知のものと同じで、徒労に終わることが多々あった。そこで、スクリーニングの初期段階、とくに乳酸菌の培養液上清のレベルでのバクテリオシンの新奇性の判定方法の構築を試みた。新奇性の判定は、培養液上清の抗菌スペクトルの解析と LC/MS を用いた分子量決定によって行うこととした。培養液上清の抗菌スペクトルをバクテリオシン高感受性株として設定した 6~12 株の検定菌に対する抗菌活性の強度として数値化し、主成分分析等で解析することで、抗菌スペクトルのグループ化と新奇性の判定が可能となった。また、LC/MS によってナイシンを含む数種のバクテリオシンを培養液上清から検出することが可能になった。以上により、スクリーニングの初期において、既知のバクテリオシンの除外と新奇性の高いバクテリオシンの絞り込みが可能となり、結果的に新奇性の高いバクテリオシンの解析により多くの時間を割くことができ、多くの新奇乳酸菌バクテリオシンを見いだすことができた。さらに、この過程を通じて、バクテリオシン生産乳酸菌は発酵食品中のみならず環境中に広く存在しており、それらが生産するバクテリオシンの構造と特性は多様性に富んでいることが明らかとなった。

### 2. 新奇乳酸菌バクテリオシンの構造と機能の解析

迅速スクリーニング法の構築によって、多くの新奇乳酸菌バクテリオシンを得ることができ、それらの構造と機能を明らかにすることができた。乳酸菌バクテリオシンは、構造などから、翻訳後修飾によって生じるランチオニンなどの異常アミノ酸を有するクラス I (ランチビオティック) と異常アミノ酸をもたないクラス II に大別され、クラス II はさらに IIa から IId の四つのサブクラスに分類されるが、さまざまなクラス・サブクラスに属する新奇バクテリオシンを見いだすことができた。その中から、代表的なものについて以下に示す。

#### 2.1 新奇ナイシン類縁体、ナイシン Q

福岡県の河川から分離された乳酸菌 *L. lactis* 61-14 がナイシン Q と命名した第 3 のナイシン類縁体を生産することを明らかにした (図 2)。ナイシン Q はナイシン A・Z と同様に異常アミノ酸を有し、A とは 4 残基、Z とは 3 残基のアミノ酸が置換していた。さらに、その架橋構造および生合成遺伝子群の詳細を明らかにした。ナイシン A・Z とは異なり、活性に重要なヒンジ領域にメチオニン残基をもたないナイシン Q は、酸化の影響を受けにくく、食品保存料等への利用に有利と考えられる。

#### 2.2 新奇 2 成分バクテリオシン、ラクトコッシン Q

トウモロコシより分離された乳酸菌 *L. lactis* QU 4 が、新奇の 2 成分バクテリオシン、ラクトコッシン Q を生産することを明らかにした (図 2)。ラクトコッシン Q は  $\alpha$  と  $\beta$  の二つのペプチドから構成され、両ペプチドの相乗的な作用によって、*Lactococcus* 属のみに特異的な抗菌活性を示した。この成果

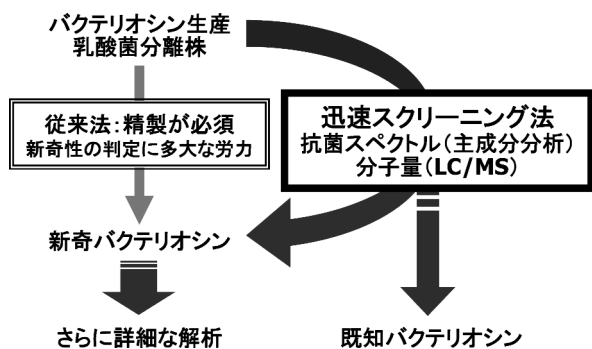


図 1 新奇乳酸菌バクテリオシンの迅速スクリーニング法  
培養液上清レベルで新奇性の評価を行うことで、新奇性の高いものを重点的に解析でき、スクリーニングの迅速化が図られた。

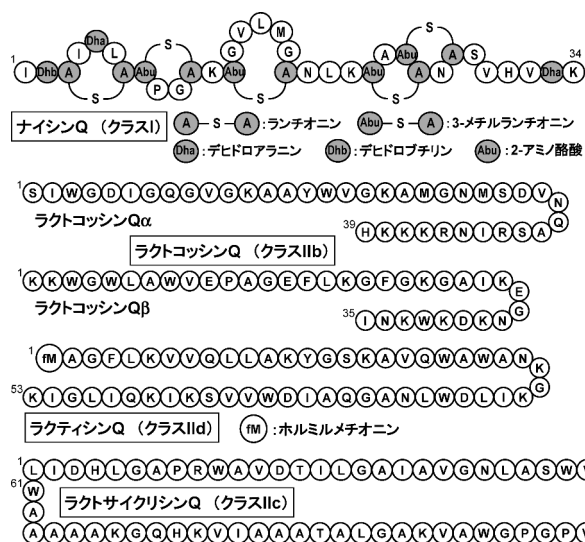


図2 構造を決定した新奇乳酸菌バクテリオシンの例

ナイシン A はランチビオテックに分類され、翻訳後修飾によって形成される異常アミノ酸を含む。ラクトコッシン Q は二つのペプチドによって構成される。ラクティシン Q はリーダーペプチドをもたずに翻訳され、N 末端のメチオニン残基はホルミル化されている。ラクトサイクリシン Q は N 末端と C 末端がペプチド結合した環状構造を有している。

は、ある特定の菌種のみ、例えばある種の病原菌のみをピンポイントで制御できる抗菌ペプチドの創出への道を拓くものと考えられる。

### 2.3 新奇リーダーレスバクテリオシン、ラクティシン Q・Z

上記の *L. lactis* QU 4 と同じトウモロコシから分離された乳酸菌 *L. lactis* QU 5 が、新奇バクテリオシン、ラクティシン Q を生産することを明らかにした (図 2)。ラクティシン Q は、ナイシンと同様に広い抗菌スペクトルと高い抗菌力を有し、かつナイシンよりも迅速に抗菌作用を示した。また、ラクティシン Q はナイシンの安定性が低下する中性～弱アルカリ性領域において高い安定性を有し、とくにナイシンが不利な条件において、ナイシンに代わる食品保存料としての利用が期待できる。つづいて、作用機構を解析した結果、ラクティシン Q は特定の標的分子を必要とせずに細菌細胞膜に作用し、小さなタンパク質をも流出させる大きな孔を形成することが明らかとなり、この作用機構を「Huge Toroidal Pore Model」と命名した。さらに、馬の腸管より分離された *L. lactis* QU 14 が、ラクティシン Q から 3 残基のアミノ酸が置換されたラクティシン Z を生産するを見いだした。生合成遺伝子群の解析の結果、ラクティシン Q・Z は、他の一般的なバクテリオシンとは異なり、リーダーペプチドをもたずに合成・分泌される、リーダーレスバクテリオシンであることが明らかとなった。リーダーレスバクテリオシンは、他の一般的なバクテリオシンとは異なり、活性型として合成されるため、単純な機構で生産・分泌されると考えられ、他の微生物種による大量生産や、新奇ペプチドの分泌生産などへの生産機構の応用が期待される。

### 2.4 新奇環状バクテリオシン、ラクトサイクリシン Q、ロイコサイクリシン Q

チーズの製造工程より分離された乳酸菌 *Lactococcus* sp. QU

12 が、N 末端と C 末端のアミノ酸がペプチド結合した新奇の環状構造を有するバクテリオシンを生産することを明らかにし、これをラクトサイクリシン Q と命名した (図 2)。ラクトサイクリシン Q は、*Lactococcus* 属由来としては初めての環状バクテリオシンの発見例となった。また、赤カブ漬けから分離された乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* TK41401 がラクトサイクリシン Q に類似の構造をもつ新奇環状バクテリオシン、ロイコサイクリシン Q を生産することを明らかにした。ロイコサイクリシン Q は *Leuconostoc* 属由来として初めての環状バクテリオシンの報告例となった。さらに、タイの発酵魚より分離された乳酸菌 *Enterococcus faecium* NKR-5-3 が新奇環状バクテリオシンを生産することを明らかとし、エンテロシン NKR-5-3B と命名した。これらの環状バクテリオシンはいずれも高い構造安定性を有しており、バクテリオシン自体の利用のみならず、環化・分泌機構および作用機構の解明とその機構を利用した新奇ペプチドの創出への展開も期待される。

### 2.5 多成分バクテリオシン生産乳酸菌

複数のバクテリオシンを同時に生産する乳酸菌が多数見いだされた。*E. faecium* NKR-5-3 は 5 種、*E. faecium* KU-B5、*E. durans* QU 49 と *Leu. pseudomesenteroides* QU 15 はそれぞれ 3 種、*Weissella hellenica* QU 13 と *E. faecium* WHE81 は 2 種のバクテリオシンを同時に生産していることが明らかとなった。これらの多成分バクテリオシン生産乳酸菌は、さまざまな環境に応答して、性質の異なる各バクテリオシンの生産を制御していることが明らかとなってきている。

### おわりに

以上のように、さまざまな分離源から得られた乳酸菌から、多様な新奇バクテリオシンが見いだされた。また、新奇のバクテリオシンは新しい生合成機構と作用機構を有すると考えられ、それらについても精力的に研究を進めている。乳酸菌バクテリオシンをはじめとする抗菌ペプチドは、抗生物質に代わる次世代の抗菌物質としても期待される。本研究によって見いだされた多数の新奇バクテリオシンとそれらの生合成・作用機構は、さまざまな分野への乳酸菌バクテリオシンの利用の進展に寄与するものと考えられ、今後とも本研究の発展のために努力していきたい。

本研究は、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門微生物工学研究室にて行われたものです。本研究を行う機会を与えていただき、学生時代から終始ご指導ご鞭撻を賜りました九州大学教授・園元謙二先生に心より御礼申し上げます。同名誉教授・石崎文彬先生、同准教授・中山二郎先生には、多くの有意義なご助言、ご指導をいただきましたことを深く感謝申し上げます。また、本研究成果は、国内外の大学・企業の多くの共同研究者のご指導とご協力、および共に研究を行った多数の卒業生・在学生の多大なる努力によって成し遂げられました。本研究に携わったすべての皆様に深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会西日本支部長の山田耕路先生、ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。