

乳酸菌バクテリオシンの探索と展望

九州大学大学院農学研究院¹、九州大学バイオアーキテクチャーセンター²
 須志田 浩稔¹、石橋 直樹¹、善藤 威史¹、園元 謙二^{1,2}

はじめに

乳酸菌を利用した食文化の歴史は古く、乳製品をはじめ、発酵肉製品や醸造製品、漬物製品など、食品分野での乳酸菌利用は多岐に渡る。乳酸菌が生産する有機酸などの物質は、食品に風味を与えるだけでなく雑菌の増殖抑制にも効果を示すことから、乳酸菌自体やその代謝産物を利用したバイオプリザベーション技術に期待が寄せられている^{1,2)}。

乳酸菌が生産する抗菌物質の中でも、近年注目されているのがバクテリオシンである。バクテリオシンは細菌が生産する抗菌性ペプチドもしくはタンパク質の総称で、特に、乳酸菌が生産するバクテリオシンは、近縁のグラム陽性細菌に抗菌活性を示し、耐熱・耐酸性、無味無臭という特性を有している。また、ヒトの消化酵素などにより容易に分解されるため環境中への残存がなく、細菌細胞膜に瞬時に孔形成するその作用機構からも、バクテリオシン耐性菌の出現リスクは非常に低いと考えられている。このように、乳酸菌バクテリオシンは、その優れた

性質から、天然の安全な食品保存料として大いに期待されている。

本稿では、自然界に存在する様々な分離源からの新奇乳酸菌バクテリオシンの探索および特性解析を行った研究の一端を紹介するとともに、ナイシン利用に関する近年の我々の取り組みについて説明する。

1. 新奇乳酸菌バクテリオシンの探索とその特性

乳酸菌バクテリオシンは構造に基づく分類がなされ、一般に2つのクラスに大別される(表1)³⁾。クラスIはランチビオティックとも呼ばれ、翻訳後修飾によって生じる異常アミノ酸(デヒドロアラニンやランチオニンなど)を含むペプチドである。代表的なランチビオティックとしてはナイシンA(図1)とその類縁体が挙げられる。一方、クラスIIは、異常アミノ酸を含まないバクテリオシンであり、さらに4つのサブグループに分けられている。IIaはN末端側にYNGGVXCという保存配列を有する抗リステリア性のバクテリオシン、IIbは2つのペプチドの相乗作用により抗菌活性を示すバクテリオシン、IIcは

そして、IIdはそれ以外のクラスIIバクテリオシンとされている。

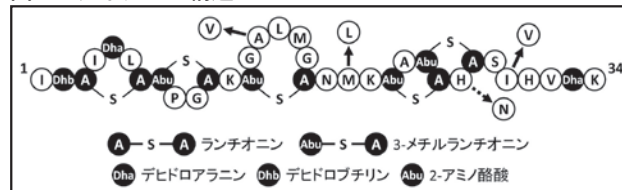
このように乳酸菌バクテリオシンの構造は多種多様であることから、その性質も多岐に渡る。例えば、非常に広範な細菌種に対して抗菌活性を示すものもあれば、ごく限られた菌株に対してのみ活性を示す特異性の高いバクテリオシンも存在する。したがって、構造や特性の異なるバクテリオシンを選抜、あるいは組み合わせることで、標的となる病原細菌や食中毒細菌のみ制御し、有用菌を生かす、高度な微生物制御も可能になると考えられる。この高度な微生物制御の実現には、有益なバクテリオシンを迅速に探索し、特性の異なるバクテリオシンの種類を増やしていくことが必要となる。そこで、我々は長年に渡り、自然界の様々な分離源からバクテリオシン生産乳酸菌を分離し、抗菌スペクトルや分子量を指標として確立した迅速スクリーニング法により、数多くの新奇乳酸菌バクテリオシンを発見してきた(表2)⁴⁾。以降、我々が発見した新奇乳酸菌バクテリオシンを中心にその特性を紹介したい。

*Lactococcus lactis*の特定の菌株により生産されるランチビオティックであるナイシンAは食品保存料として使用されている唯一のバクテリオシン

表1 乳酸菌バクテリオシンの分類と代表例

分類(サブクラス)	特徴	代表例
クラスI	ランチビオティック：異常アミノ酸を含み、耐熱・耐酸性を有する。	ナイシンA、Q、Z
クラスII	異常アミノ酸を含まない。耐熱・耐酸性を有する。	
IIa	N末端に保存配列であるYNGGVXCを含み、抗リステリア活性を示す。	ムンジチシンペディオシンPA-1
IIb	2つのペプチドの相乗作用により抗菌活性を発揮する。	ラクトコッシンQ エンテロシンX
IIc	N末端とC末端がペプチド結合した環状構造を有する。	ラクトサイクリンQ ロイコサイクリンQ
IIId	その他のクラスIIバクテリオシン。	ラクティンQ、Z

図1 ナイシンの構造



黒色のアミノ酸残基は、翻訳後修飾により導入される異常アミノ酸であることを示す。破線の矢印はナイシンZとナイシンQで置換されているアミノ酸、実線の矢印はナイシンQでのみ置換されているアミノ酸を示す。

表2 当研究室で発見した新奇乳酸菌バクテリオシンの一例

バクテリオシン	クラス	抗菌スペクトル	生産菌種	菌株	分離源
ナイシンQ	I	広い	<i>Lactococcus lactis</i>	61-41	河川水
ラクトコッシンQ	IIb	特異的	<i>Lactococcus lactis</i>	QU 4	トウモロコシ
ラクトサイクリシンQ	IIc	広い	<i>Lactococcus</i> sp.	QU 12	チーズ
ロイコサイクリシンQ	IIc	広い	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	TK41401	漬物
ラクティンQ	IIId	広い	<i>Lactococcus lactis</i>	QU 5	トウモロコシ

で、現在日本を含む60ヶ国以上で利用されている⁵⁾。河川から単離された *L. lactis* 61-14によって生産される第3のナイシン類縁体であるナイシンQは、ナイシンAと同様にグラム陽性細菌に対して非常に広範な抗菌スペクトルを有する⁶⁾。ナイシンQの構造は、ナイシンAのそれと4残基が異なる(図1)。ナイシンAや第2の類縁体であるナイシンZの中央部のヒンジ部位にあるメチオニンは酸化されやすく、酸化されると抗菌活性が低下するが、このメチオニンがロイシンに置換されたナイシンQの活性は酸化の影響を受けにくく、食品保存料としてより優れた性質を有している⁷⁾。

トウモロコシから単離された *L. lactis* QU 4が生産する新奇クラスIIbバクテリオシン、ラクトコッシンQは、非常に特異的な抗菌スペクトルを有し、生産菌と同属種の *L. lactis* のみにしか抗菌活性を示さない⁸⁾。2つのペプチド、ラクトコッシンQ α (39残基)とQ β (35残基)から構成され、それぞれ単独では抗菌活性がないが、2つのペプチドが相乗的に作用することで抗菌活性を発揮することが明らかとなっている。

ラクトサイクリシンQは、チーズから単離された *Lactococcus* sp. QU 12が生産する61残基からなる環状バクテリオシンで、熱・pHに対して安定性が高いことが明らかになっている⁹⁾。ラクトサイクリシンQは、*Bacillus* 属、*Enterococcus* 属、*Lactococcus* 属などに対して幅広い抗菌スペクトルを有する。また、同じく61残基から構成される、*Leuconostoc mesenteroides* TK41401由来の環状バクテリオシン、ロイコサイクリシンQは、ラクトサイクリシンQと相同性を有し、同様の幅広い抗菌スペクトルを有する¹⁰⁾。特に、微生物由来のプロテイナーゼKやカルボキシペプチダーゼYに安定であるのに対して、ヒトの消化酵素であるペプ

シンと α -キモトリプシンでは分解されることから、安全性の高い実用的なバクテリオシンであると考えられている。

トウモロコシから単離された *L. lactis* QU 5が生産するラクティンQは、一般的なバクテリオシンとは異なり、前駆体中にリーダーペプチドと呼ばれる配列を持たない¹¹⁾。このようなバクテリオシンはリーダーレスバクテリオシンと呼ばれ、発見例が少ないことから、合成・自己耐性機構の解明に興味を持たれるところである。ラクティンQは、ナイシンに匹敵するほどの強い抗菌活性と広範な抗菌スペクトルを有し、ナイシンの安定性が低下する中性からアルカリ性領域でも抗菌活性が安定に維持される。また、熱に対する安定性も高い。ナイシンは細菌の細胞壁合成の前駆体であるlipid IIを標的として攻撃することが知られているが、ラクティンQは特定のレセプターを必要とせずにタンパク質が流出するほどの大きな孔を細胞膜に形成することが明らかとなっている^{12,13)}。このようにラクティンQは、ナイシンとは異なる特性や作用機構を有することから、ナイシンとの使い分けや組み合わせによる効率的な利用が期待される。

2. ナイシンの利用と展開

近年、食品の安全・安心に対する関心が高まる一方で、消費者の天然志向を背景として添加物や保存料の使用が忌避されるようになった。その中で、古来発酵食品に利用されてきた乳酸菌に由来する高い安全性という観点から、乳酸菌バクテリオシンの利用が検討されてきた。特にナイシンAは、乳培地由来成分や食塩を含むナイシン製剤(ニサプリン)として、世界中で食品保存料に利用されている。我が国でも2009年3月に食品添加物として認可されて以降、いくつかの実用例がある⁵⁾。我々も乳酸菌バクテリ

オシンの食品添加物レベルの高い安全性を基盤とし、特にナイシンAを先行例として、食品保存料だけでなく、医薬品や消毒剤としての応用に向けた取り組みを行ってきた^{1,2)}。

ウシの疾病である乳房炎は、*Staphylococcus aureus* や *Streptococcus agalactiae* により引き起こされ、牛乳の生産性に直結するため、経済的損失が非常に大きい。酪農においては乳牛の乳房炎を予防するため、主にヨード剤による乳房と飼育環境の消毒が行われ、罹患時には抗生物質による治療が行われる。しかし、薬剤の残留による環境・生乳の汚染や、抗生物質の多用による耐性菌の出現が懸念されている。そこで残留による影響が少ないナイシンAを用いた乳房炎予防剤と治療剤が開発された¹⁴⁾。この予防剤(乳頭消毒剤)はナイシンとクエン酸などの有機酸を含み、乳房炎原因菌に対して規定時間以内(60秒)で99.9%以上の強力な殺菌効果を示した。ナイシンAと油性軟膏からなる治療剤(乳房注入剤)は、潜在型及び臨床型の乳房炎において60%以上の高い治癒率を示した。同時にこれらは、既存の薬剤で問題とされている環境や生乳中への残留を抑えることができ、安全性と経済面の両方から今後の利用に期待が寄せられている。

一方、ナイシンAと梅エキスを組み合わせた口腔用天然抗菌剤(ネオナイシン)が開発された¹⁵⁾。ネオナイシンは、虫歯菌(*Streptococcus mutans*)だけでなく、歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*)に対しても高い抗菌活性を示す。さらに、このネオナイシンを配合した口腔ケア製品であるオーラルピースが開発された(図2)¹⁶⁾。オーラルピースは、石油由来成分や合成

図2 口腔ケア剤へのナイシン利用例



ナイシンを含む口腔ケア製品「オーラルピース・歯磨き&口腔ケアジェル」(左)と「オーラルピース・マウススプレー&ウォッシュ」(右)。どちらも可食成分のみを含むため、飲み込んだ場合でも身体に害がない。

抗菌剤、エタノール等を含まず、天然由来の可食成分のみを使用しており、飲み込んだ場合でも容易に分解されるため無害である。口腔医療の重要性が叫ばれる中、要介護高齢者、重度障がい者、乳幼児といった、誤飲の危険性があり通常の歯磨き剤では身体への影響が懸念される場合においても、オーラルピースは安心して利用することができ、ナイシンの特性と安全性を最大限に活かすことができた。

現在では、ナイシンをリード化合物としてその構造中に任意の変異を加える研究も盛んに行われており、抗菌活性の向上や安定性の改善といった展開に注目が集まっている。しかし、いかに優れた性質を有する変異体であっても、現状では食品への遺伝子組換え製品の使用は困難である。また、優れた特性を有するナイシンだが、実用レベルでは現在までに耐性菌の出現が報告されていないとはいえ、使用頻度が増えることでそのリスクが増大する可能性は否定できない。*Listeria monocytogenes*に対して強力な抗菌活性を示すペディオシンPA-1をはじめとするクラスIIaバクテリオシンなど¹⁷⁾、対象菌種によってはナイシンよりも有効な例もあり、乳酸菌バクテリオシンの利用をさらに展開するためには、天然由来で、特性の異なる様々な新奇乳酸菌バクテリオシンの探索と応用を進めることも不可欠であろう。

おわりに

このように、ナイシンをはじめとする乳酸菌バクテリオシンは優れた特性を有するため、食品に限らず様々な分

野での応用が期待されている。現状で実用されているのはナイシンAのみであるが、ナイシンAとは異なる特性を有するラクティンQやラクトサイクリンQなどの新奇乳酸菌バクテリオシンを適材適所で活用することにより、高度な微生物制御技術の確立が可能となるであろう。また、生産乳酸菌が有する特異的な生成機構やバクテリオシンの作用機構の解明を通して、バクテリオシンのより効果的な使用方法を確立するとともに、将来的には高活性・高選択性ペプチドの設計・創出などへの発展が期待される。

〈参考文献〉

- 1) 石橋直樹ら：乳酸菌ニュース, 481, 5-10 (2013).
- 2) 石橋直樹ら：日本乳酸菌学会誌, 22, 38-48 (2011).
- 3) Cotter, P. D. *et al.* : Nat Rev Microbiol, 3, 777-788 (2005).
- 4) Zendo, T. : Biosci Biotechnol Biochem, 77, 893-899 (2013).
- 5) 善藤威史ら：乳業技術, 59, 77-86 (2009).
- 6) Fukao, M. *et al.* : Biosci Biotechnol Biochem, 72, 1750-1755 (2008).
- 7) Yoneyama, F. *et al.* : J Appl Microbiol, 105, 1982-1990 (2008).
- 8) Zendo, T. *et al.* : Appl Environ Microbiol, 72, 3383-3389 (2006).
- 9) Sawa, N. *et al.* : Appl Environ Microbiol, 75, 1552-1558 (2009).
- 10) Masuda, Y. *et al.* : Appl Environ Microbiol, 77, 8164-8170 (2011).
- 11) Fujita, K. *et al.* : Appl Environ Microbiol, 73, 2871-2877 (2007).
- 12) Yoneyama, F. *et al.* : Antimicrob Agents Chemother, 53, 3211-3217 (2009).
- 13) Yoneyama, F. *et al.* : Appl Environ Microbiol, 75, 538-541 (2009).
- 14) 北崎宏平ら：FFIジャーナル, 215, 449-456 (2010).
- 15) ネオナイシン (<http://neonisin.com/>).
- 16) オーラルピース (<http://oralpeace.com/>).
- 17) Woraprayote, W. *et al.* : Int J Food Microbiol, 167, 229-235 (2013).

〈著者略歴〉

須志田 浩稔(すしだ ひろとし)

13年 広島大学理学部卒業
同年 九州大学大学院生物資源環境科学府修士課程 現在に至る。

石橋 直樹(いしばし なおき)

13年 九州大学大学院生物資源環境科学府博士課程修了
同年 日本学術振興会特別研究員 現在に至る。

善藤 威史(ぜんどう たけし)

04年 九州大学大学院生物資源環境科学府博士課程修了
07年 九州大学大学院農学研究院助教 現在に至る。

園元 謙二(そのもと けんじ)

82年 京都大学大学院工学研究科博士課程修了
01年 九州大学大学院農学研究院教授 現在に至る。