

<平成 16 年度助成>

## 乳酸菌バクテリオシン探索のハイスループット化と 発酵生産の総合システム化

園 元 謙 二

(九州大学大学院農学研究院)

### 1. はじめに

近年、食品の品質に対する消費者の関心は急速に高まっており、なかでも食品に対する安全志向、自然志向は大きな広がりを見せている。食品の品質を維持しながら、かつ安全性の高い食品を供給するための殺菌・保存法の確立が望まれている。食品保存料の利用は、こうした要求を満たす方法のひとつであるが、化学的に合成された保存料や抗菌剤の添加は、消費者に避けられる傾向がある。そのような状況の中、我々が安全に食してきた生物に由来する保存料(バイオプリザバティブ)を用いた食品保存には大きな期待が寄せられている<sup>1)</sup>。

我々に最も馴染み深い微生物の一つである乳酸菌は、さまざまな発酵食品の製造に関わり、乳酸などの有機酸をはじめとする様々な抗菌物質、すなわちバイオプリザバティブを生産する。そのなかでも最も有力なバイオプリザバティブとして期待されるのが、タンパク質性の抗菌物質、バクテリオシンである。乳酸菌が生産するバクテリオシンは、一般に熱や酸に対する安定性に優れ、味や臭いが無く、食品の風味に影響を与えない。また、乳酸菌が古くから人類の食生活に関わってきた安全な微生物であることや、バクテリオシンがヒトの消化酵素によって容易に分解されることから、その安全性は非常に高いと考えられている。乳酸菌バクテリオシンは、一般のタンパク質と同様にリボソーム上で合成され、主に生産菌に近縁のグラム陽性菌に対して抗菌活性を示す。食中毒菌であるリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) やボ

ツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、黄色ブドウ球菌 (*Streptococcus aureus*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) などに対しても抗菌活性をもつものが多く、ボツリヌス菌やセレウス菌の芽胞の発芽を抑制するものも報告されている<sup>2,3)</sup>。

乳酸菌バクテリオシンは、このような優れた特性から、食品保蔵や機能性食品への応用が期待されている。さらに、その用途は食品分野のみにとどまらず、感染防御などの医療分野にも及んでいる。また、乳酸菌バクテリオシンには、さまざまなタイプのものが存在しており、その抗菌スペクトルも多様である。このような抗菌スペクトルの多様性は、バクテリオシンを利用する上での重要な指針となる。すなわち、異なる抗菌スペクトルを示すバクテリオシンを適材適所に用いることで、有用菌を生かしつつ有害菌のみを選択的に殺菌・静菌することが可能となる。このような高度な微生物制御を実現するためには、各対象に応じた多種多様なバクテリオシンを持ち合わせる必要がある。

そこで、本研究では、未開拓な分離源からのバクテリオシン生産乳酸菌ライブラリー作成、バクテリオシンデータベースの構築、新奇バクテリオシンのハイスループットスクリーニングを行った。また、乳酸菌の培養工学的手法に基づく独創的な生産システムの開発、培養規模の拡大、実用規模を指向した設計指針や生産性評価の基礎データの取得を試みた。

## 2. 乳酸菌バクテリオシン探索のハイスループット化

新奇乳酸菌バクテリオシンの獲得にあたり、スクリーニングの初期段階である培養液上清レベルでの新奇性の判定方法を確立し、新奇バクテリオシンの獲得に要する時間の大幅な短縮、すなわち新奇バクテリオシン探索のハイスループット化を試みた。バクテリオシンの評価にはいくつかの指標が考えられるが、培養液上清での新奇性の判定にあたり、最も差別化しやすい抗菌スペクトルと分子量に着目した。これまでの研究成果から選抜した十数種類のバクテリオシン感受性株を指標菌として、培養液上清の抗菌スペクトルを測定した。培養液上清が各指標菌に対して示す抗菌活性を数値化し、多変量解析の一つである主成分分析によって解析した。分子量は高速液体クロマトグラフィ質量分析計(LC/MS)を用いて培養液上清から直接測定した。

結果として、抗菌スペクトルの主成分分析により、新規分離株と既存株を合わせた計82の試験菌株は大きく3つのグループに分類された(図1)。この方法では類似した抗菌スペクトルのものほど近くに位置するため、既知バクテリオシンとの位置関係により新奇性を判定することが可能である。また、LC/MSによる解析では3つのナイシン類縁体(A、Z、Q)をはじめとする数種類のバクテリオシンの検出・同定が可能となった(図2)<sup>4)</sup>。さらに、検出されるイオンの範囲を限定することで未知のバクテリオシンの分子量を決定することも可能となった。

また、得られた抗菌スペクトルと分子量等のデータを蓄積し、データベースを構築した(図3)。本データベースは、新奇バクテリオシン探索の際のデータの照合に利用され、ハイスループット化に寄与するだけでなく、バクテリオシンを使用する際の重要な指針ともなる。本データベースに基づいて、状況に応じたバクテリオシンの選択とそ

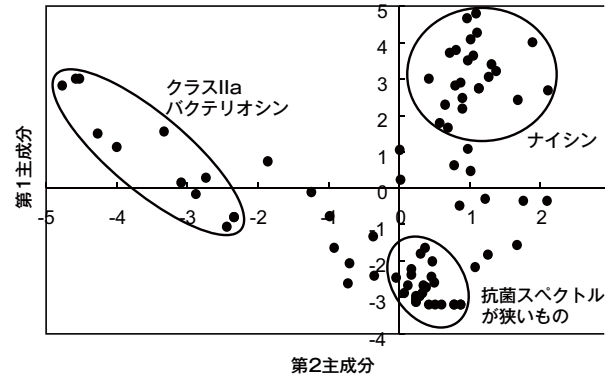


図1 抗菌スペクトルの主成分分析

各点がそれぞれのバクテリオシンを示しており、位置が近いほど抗菌スペクトルが類似している。既知バクテリオシンの位置と比較することで、新たに見出したバクテリオシンの新奇性を判定する。

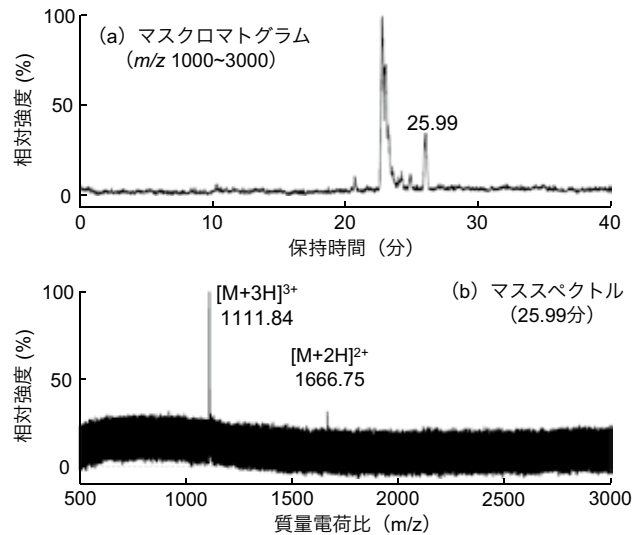


図2 LC/MSによる分析例

LC/MSによって、培養液上清から直接、バクテリオシンを検出・同定することができる。本例では、25.99分にナイシンZに由来するシグナルが検出された。

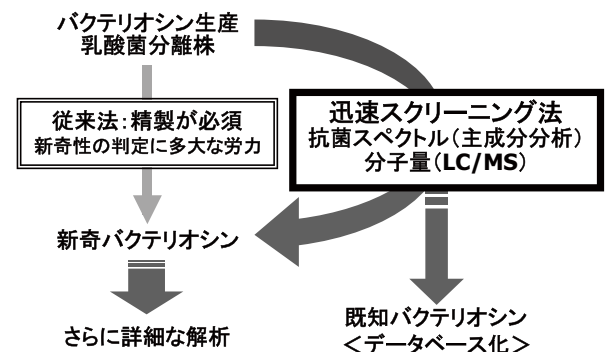


図3 新奇乳酸菌バクテリオシン探索のハイスループット化とデータベースの構築

抗菌スペクトルを指標とした主成分分析とLC/MSによる分子量測定によって、培養液上清レベルでバクテリオシンの新奇性を迅速に判定できる。得られた結果はデータベース化され、以降の解析やバクテリオシン使用時の選択指標として利用される。

の使用量、あるいは組み合わせを予測することも可能となることが期待される。

### 3. 新奇乳酸菌バクテリオシンの構造および特性の解析

バクテリオシン生産乳酸菌は、ヒトを含めた動物の腸管や発酵乳等からの分離例が極めて多い。これまでに例のない分離源からは新しい菌株の分離が期待できることから、栄養条件が制限された環境である植物表面に付着し生息する乳酸菌に着目し、新奇バクテリオシン生産乳酸菌の分離を試みた。その結果、様々な分離源から多数のバクテリオシン生産菌を分離することができ、上記のハイスクリーン法によって、多くの新奇性の高いバクテリオシンが見いだされた。とくに、トウモロコシから分離された乳酸菌、*Lactococcus lactis* QU 4 と *Lc. lactis* QU 5 が生産するバクテリオシンには高い新奇性が認められたため、さらに詳細な精製・構造解析を行った。

両株の生産するバクテリオシンは、培養液上清から、アセトン沈殿、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC によって精製された。*Lc. lactis* QU 4 からは 2 種、*Lc. lactis* QU 5 からは 1 種のバクテリオシンが精製された。各精製物を用いて、ESI-MS による質量分析、およびエドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析を行った。

*Lc. lactis* QU 4 の 2 つのペプチドは、分子量がそれぞれ 4260.43、4018.36 で、39、35 アミノ酸残基からなる一次構造が明らかとなった。得られたアミノ酸配列は、両ペプチドをコードする遺伝子の塩基配列解析結果と一致し、分子量の計算値は測定値とも一致した。また、相同性検索の結果、本配列は新奇のものであることが明らかとなった。さらに、後述するように、両ペプチドは抗菌活性において高い相乗作用を示した。以上より、*Lc. lactis* QU 4 が生産するバクテリオシンを新奇 2 成分バクテリオシンとして、ラクトコッシン Q

(Q  $\alpha$ 、Q  $\beta$ ) と命名した (図 4)<sup>5)</sup>。

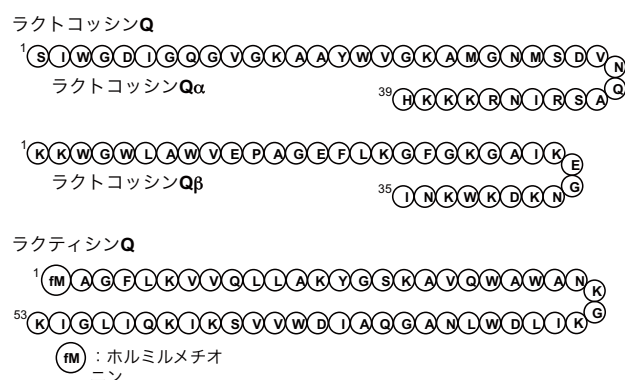


図 4 新奇バクテリオシン、ラクトコッシン Q とラクティシン Q の構造

ラクトコッシン Q は、Q  $\alpha$  と Q  $\beta$  の 2 つのペプチドによって構成される。ラクティシン Q の N 末端のメチオニンはホルミル化されている。

*Lc. lactis* QU 5 が生産するバクテリオシンは、精製物の質量分析の結果、分子量が 5926.50 であることが明らかとなった。しかし、N 末端アミノ酸配列解析では反応が進行せず、N 末端アミノ酸が修飾されていることが予想された。そこで、メチオニンの C 末端を切断する臭化シアン処理を行うとエドマン分解が進行したが、得られた配列の分子量の計算値は測定値よりも小さかった。次に、得られたアミノ酸配列を元に、本バクテリオシンをコードする遺伝子の塩基配列解析を行ったところ、本バクテリオシンは N 末端がメチオニンで、53 アミノ酸残基から構成されることが明らかとなった。この配列の分子量の計算値と実測値との間に 28 の差が存在すること、また N 末端がブロックされていたことから、本バクテリオシンの N 末端メチオニンはホルミル化されていると考えられた。相同性検索の結果、本バクテリオシンは新奇のものであった。以上より、*Lc. lactis* QU 5 が生産する新奇バクテリオシンをラクティシン Q と命名した (図 4)<sup>6)</sup>。

ラクトコッシン Q は、2 つのペプチド Q  $\alpha$  と Q  $\beta$  から構成されるが、精製時に互いが混入する恐れがあり、培養液上清からの精製物では両ペプチド単体の正確な解析が行えない可能性がある。そこで、

化学合成したペプチドを用いて解析を行った。Q $\alpha$ とQ $\beta$ は、ともに単体ではほとんど抗菌活性を示さなかったが、両者を混合した場合には相乗的に抗菌活性を示し、その最適混合比率は、モル比で1:1であった。また、その抗菌スペクトルは非常に狭く、*Lc. lactis* 以外には抗菌活性を示さなかった。

一方、ラクティシン Q は非常に広い抗菌スペクトルを有していた。ラクティシン Q の抗菌スペクトルを最も代表的なバクテリオシンであるナイシン A と比較したところ、両バクテリオシンの抗菌スペクトルは明らかに異なっており、いくつかの検定菌においてラクティシン Q の活性はナイシン A を凌駕していた(表 1)。とくに *Bacillus* 属細菌に対して、ラクティシン Q は強い活性を示した。このように、ラクティシン Q はナイシン A とは異なるが、優れた抗菌力を有するバクテリオシンであった。また、ナイシン A をはじめとする一般的なバクテリオシンは酸性領域で高い安定性を示し、中性からアルカリ性では活性を失うものが多いが、ラクティシン Q はアルカリ性条件下でも高い熱安定性を有していた。さらに、ラクティシン Q およびナイシン A 作用時に、標的細胞膜の孔形成によって起こる細胞内物質の漏出を ATP を指標として測定したところ、

ラクティシン Q はナイシン A よりも低濃度で、短時間にかつ大量の ATP を漏出させることが明らかとなった(図 5)<sup>6)</sup>。以上より、ラクティシン Q は、食品保存料として、また様々な用途への抗菌剤として、非常に優れた性質を有していると考えられた。また、その後の研究の発展により、ラクティシン Q はナイシン A とは異なる作用機構をもつことを明らかにした<sup>7-9)</sup>。

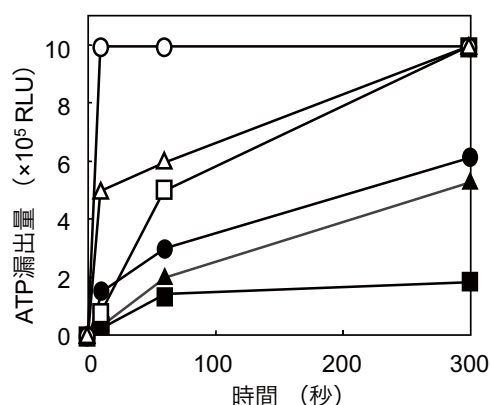


図 5 ラクティシン Q とナイシン A による ATP の漏出  
15  $\mu$ M (○、●)、1.5  $\mu$ M (△、▲)、0.75  $\mu$ M (□、■) のラクティシン Q あるいはナイシン A 添加による、検定菌 *Listeria innocua* ATCC 33090<sup>T</sup> からの細胞内 ATP の漏出量を示す。オープンシンボルはラクティシン Q、クロースドシンボルはナイシン A を示す。

#### 4. 乳酸菌バクテリオシンの発酵生産

得られた新奇バクテリオシンのうち、とくに今後の利用が期待されるラクティシン Q について、

表 1 ラクティシン Q とナイシン A の抗菌スペクトル

検定菌	JCM 番号	最小生育阻止濃度 (nM)	
		ラクティシン Q	ナイシン A
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 2152 <sup>T</sup>	5.3	25
<i>Bacillus coagulans</i>	JCM 2257 <sup>T</sup>	2.7	9.0
<i>Bacillus subtilis</i>	JCM 1465 <sup>T</sup>	140	37
<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 5803 <sup>T</sup>	54	88
<i>Enterococcus faecium</i>	JCM 5804 <sup>T</sup>	56	47
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	230	47
<i>Lactococcus lactis</i>	ATCC 19435 <sup>T</sup>	3.5	79
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	JCM 1095 <sup>T</sup>	33	45
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM 1059 <sup>T</sup>	230	180
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	JCM 1164 <sup>T</sup>	110	450
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	JCM 6124 <sup>T</sup>	56	19
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090 <sup>T</sup>	70	69
<i>Micrococcus luteus</i>	IFO 12708	790	88
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM 5885	310	110

発酵生産の最適化を試みた。まず、ラクティシン Q 生産の最適温度を検討したところ、*Lc. lactis* QU 5 は、37℃では生育するものの、ラクティシン Q を全く生産せず、30℃あるいは 25℃で良好な結果が得られた。ところで、乳酸菌は生育に伴って乳酸を生産するため、培地の pH を低下させ、自身の生育および生理活性を低下させ、いわゆる生産物阻害を生じてしまう。そこで、乳酸菌の生育に伴ってアルカリを培地中に添加し、生成した乳酸を中和して pH を一定に保つことで、乳酸による生育阻害を回避できる可能性がある。*Lc. lactis* QU 5 についても同様に、培地の pH を 6.0 に保持する pH 制御培養システムを構築し、ラクティシン Q 生産を試みたところ、良好な結果が得られた(図 6)。今後、ラクティシン Q 生産をさらに高効率化するには、連続培養やラクティシン Q の選択的分離回収システムの構築が必要と考えられた。

## 5. おわりに

培養液の段階で抗菌スペクトルと分子量を指標に解析を行うことで、新奇乳酸菌バクテリオシン検出のハイスループット化を実現することができた。今後、さらに、集積されるデータを参照することで、構造解析に要する時間は加速度的に短縮され、結果として多種多様なバクテリオシンを獲

得することが可能となるだろう。実際に、本研究で得られたラクトコッシン Q やラクティシン Q に続く、環状のバクテリオシン、ラクトサイクリン Q<sup>10</sup>、などの新奇なバクテリオシンが多数得られつつある。また、乳酸などによる最終生産物阻害の解除やバクテリオシンの選択的分離を伴った発酵生産に必要なデータを蓄積することで、バクテリオシンの発酵生産の総合システム化が期待できる。本研究の成果により蓄積されるデータは、バクテリオシンを使用する際の重要な指針ともなる。最終的に、最適なバクテリオシンの選択や、多種のバクテリオシンの併用による抗菌スペクトルのデザインにより、対象となる微生物群をより効率的に制御できる。さらには、バクテリオシン使用量を低減し、耐性菌出現のリスクを限りなくゼロに近づけることも可能となるだろう。最近、最も代表的なバクテリオシンであるナイシン A が食品保存料として利用され始めたが、本研究を通じて見いだされたラクティシン Q などの利用により、さらに効果的な微生物制御の実現が期待される。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、多大なご援助を賜りました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

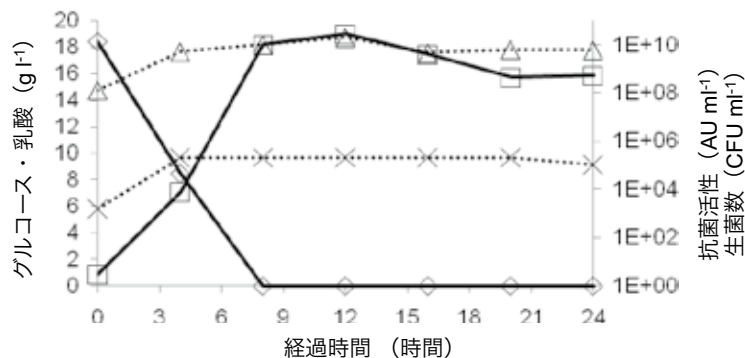


図 6 *Lactococcus lactis* QU 5 の回分培養によるラクティシン Q の生産の例

温度を 30℃、pH を 6.0 に制御して培養を行った場合を示す。◇はグルコース濃度、□は乳酸濃度、△は生菌数、×は抗菌活性(ラクティシン Q 生産量)を示す。

## 文献

- 1) 森地敏樹、松田敏生 (1999) バイオプリザベーション — 乳酸菌による食品微生物制御 —、幸書房
- 2) Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 1-20.
- 3) Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, **3**, 777-788.
- 4) Zendo, T., Nakayama, J., Fujita, K., and Sonomoto, K. (2008) Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 499-507.
- 5) Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006) Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3383-3389.
- 6) Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2007) Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2871-2877.
- 7) Yoneyama, F., Imura, Y., Ichimasa, S., Fujita, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., and Sonomoto, K. (2009) Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 538-541.
- 8) Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., and Sonomoto, K. (2009) Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 3211-3217.
- 9) Yoneyama, F., Shioya, K., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2010) Effect of negatively charged lipid on membrane-lacticin Q interaction and resulting pore formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 218-221.
- 10) Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2009) Identification and characterization of lactocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 1552-1558.

## Developments of high-throughput screening system and fermentative production system for bacteriocins from lactic acid bacteria

Kenji Sonomoto

*Faculty of Agriculture, Kyushu University*

A wide variety of bacteria including lactic acid bacteria (LAB) are found to produce bacteriocins. LAB are industrially important bacteria, especially in food industry. LAB are generally regarded as safe microorganisms, and their bacteriocins are also safe. LAB bacteriocins have attracted significant interests for their potentials in using as safe natural food preservatives, namely 'biopreservatives'. Suitable bacteriocins should be selected to achieve more effective microbial control and to prevent the emerging bacteriocin-resistant strains. Therefore, novel LAB bacteriocins with proper features for target foods are required. In this study, we attempted to develop bacteriocin-producing LAB library, bacteriocin database, high-throughput screening system, and bacteriocin production system.

A new high-throughput screening system was designed to find out novel bacteriocins at the early stage of screening. Crude culture supernatants of new LAB isolates were served as samples for this system, which comprised antimicrobial spectrum analysis by the principal component analysis (PCA) and molecular mass determination by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Combination of PCA and LC/MS could save the time and provide a high probability for discovering novel bacteriocins. Obtained data of bacteriocins were accumulated in a database, which can be utilized for further applications to select appropriate bacteriocins to each purpose.

By the new screening system, some novel LAB bacteriocins were discovered. For instance, lactococcin Q and lacticin Q were discovered from new corn isolates, *Lactococcus lactis* QU 4 and *Lc. lactis* QU 5, respectively. These novel bacteriocins were purified through some chromatographic steps, and their structures were determined by amino acid sequence and molecular mass analyses. Lactococcin Q is a novel two-peptide bacteriocin and active only against *Lc. lactis* strains by the synergistic action of the two peptides. On the other hand, lacticin Q is an N-terminal formylated peptide and active against a wide range of bacteria. In addition, the action of lacticin Q was characterized by its high activity and quick bactericidal action through efflux of cell components.

Lacticin Q production by *Lc. lactis* QU 5 was also characterized for further optimization and developments of mass production system. *Lc. lactis* QU 5 produced lacticin Q with high yields at 30°C and pH 6.0 controlled by the fermentation system. The results indicated that continuous fermentation system and lacticin Q-selective recovery system will improve the production.