

乳酸菌バクテリオシン —探索から応用まで—



石橋 直樹¹



善藤 威史¹



園元 謙二^{1,2}

¹九州大学大学院農学研究院、²九州大学バイオアーキテクチャーセンター

1. はじめに

乳酸菌は、様々な抗菌物質を生産して競合する微生物の生育抑制をすることで自身の増殖を有利に行っている。乳酸菌が生産する抗菌物質としては、乳酸をはじめとする種々の低分子有機酸が挙げられるが、それ以外にもバクテリオシンと称される抗菌性ペプチドが知られている。これら生物由来の天然抗菌物質(バイオプリザバティブ)を食品保存に応用する方法はバイオプリザベーションと呼ばれており¹⁾、優れた性質と機能を有する乳酸菌バクテリオシンは有望なバイオプリザバティブとして近年注目を集めている²⁾。本稿では、乳酸菌バクテリオシンの構造および特性について紹介するとともに、新奇乳酸菌バクテリオシンの探索から近年の応用例について述べる。

2. 乳酸菌バクテリオシンの基礎および分類

バクテリオシンは細菌が生産する抗菌性ペプチドあるいはタンパク質の総称であり、様々な細

菌種が生産することが知られている。これまでに、乳酸菌からも多種多様なバクテリオシンが確認されているが、乳酸菌バクテリオシンは一般に真菌類やグラム陰性菌には抗菌活性がなく、主に生産菌と近縁なグラム陽性菌に抗菌活性を示す。これらバクテリオシンは他の抗生物質とは異なり、通常のタンパク質と同様の機構で生産され、ヒトや動物の腸管内の消化酵素によって容易に分解される。したがって、環境中に残存する可能性が極めて低く、耐性菌が出現する可能性も低いと考えられている。特に、乳酸菌バクテリオシンは無味無臭であり、乳酸菌自体が安全性の高い微生物であることから、主に食品保存料として期待され、今日まで多くの研究が進められてきた³⁾。

1920年代に初めて乳酸菌によるバクテリオシン生産が発見されて以降、これまでに様々なバクテリオシンが見出されており、その構造は多岐に渡る。現在、その構造に基づいた分類がなされており、乳酸菌をはじめとするグラム陽性菌が生産するバクテリオシンは、異常アミノ酸を含むクラスⅠと含まないクラスⅡに大別される(表1)⁴⁾。クラスⅠバクテリオシンは、別名ランチビオティッ

表1. 乳酸菌によって生産されるバクテリオシンの分類と代表例

クラス (サブクラス)	特徴	代表例
クラス I	異常アミノ酸を含む, ランチビオティックと総称される5 kDa以下の低分子ペプチド, 耐酸性・耐熱性	ナイシンA, Z, Q ラクティシン481
クラス II	異常アミノ酸を含まない10 kDa以下の低分子ペプチド, 耐酸性・耐熱性	
(IIa)	抗リステリア活性, N末端にYGNGVXCの保存配列を持つ	ベディオシンPA-1 ムンジチシン
(IIb)	2成分による相互作用によって抗菌活性を示す	ラクトコッシンQ, ABP-118
(IIc)	N末端とC末端がペプチド結合で連結した環状構造を有する	ラクトサイクリシンQ ロイコサイクリシンQ
(IId)	その他のクラスIIバクテリオシン	ラクティシンQ, Z エンテロシンB

クとも呼ばれるペプチドで、その構造中に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)が存在している⁵⁾。最も代表的な乳酸菌バクテリオシンであるナイシンAはこのクラス I に属している。一方、クラス II バクテリオシンは、異常アミノ酸を含まないペプチドで、さらに4つのサブクラスに細分されている⁴⁾。クラス II aバクテリオシンは、抗リステリア活性が高くN末端にYGNGVXCの保存配列を有するもの、クラス II bは2つのペプチドで相乗効果を示すもの、クラス II cはN末端とC末端がペプチド結合した環状構造を有するもの、とそれぞれが定義されている。また、クラス II dバクテリオシンには、クラス II でII aからII cにあてはまらないものが分類される。

ペクトルを持ち、一般に耐性を示す酸や熱に対しても、その度合いは個々で異なっている。例えば、ナイシンAはグラム陽性菌に対して非常に広い抗菌スペクトルを有するが、一方では狭い抗菌スペクトルを持つバクテリオシンや限られた菌種のみの特異的に抗菌活性を示すものも見出されている。したがって、様々なタイプのバクテリオシンを選抜し、適材適所に利用することで、有用菌を生かしたまま有害菌のみを狙い撃ちにする、より高度な微生物制御の実現も期待されている。以上のようなことから、乳酸菌バクテリオシンを利用するにあたっては、様々な目的・対象・要求にかなう多種多様なバクテリオシンを得ることが重要となる。そこで、著者らは長年に渡り様々な分離源から新奇なバクテリオシンを生産する乳酸菌の探索を行ってきた。特に、試験管レベルの培養液上清の段階でバクテリオシンの新奇性を判定できるシステムの構築を試みてきた。その結果、培養液上清を試料として、最も差別化を図りやすい抗菌スペクトルと分子量を分析し、それらを指標として新奇性を判定するシステムの確立に成功した^{6, 7)}。このようにして得られた結果を比較・照

3. 新奇乳酸菌バクテリオシンの戦略的探索

乳酸菌バクテリオシンは前述のように構造によって大まかな分類がなされているが、実際の個々の性質は多様である。それぞれ異なる抗菌ス

合することにより、新奇性が高いと判断されるものについてのみ以降の詳細な解析を行っている。

4. 新奇バクテリオシンの構造・特性

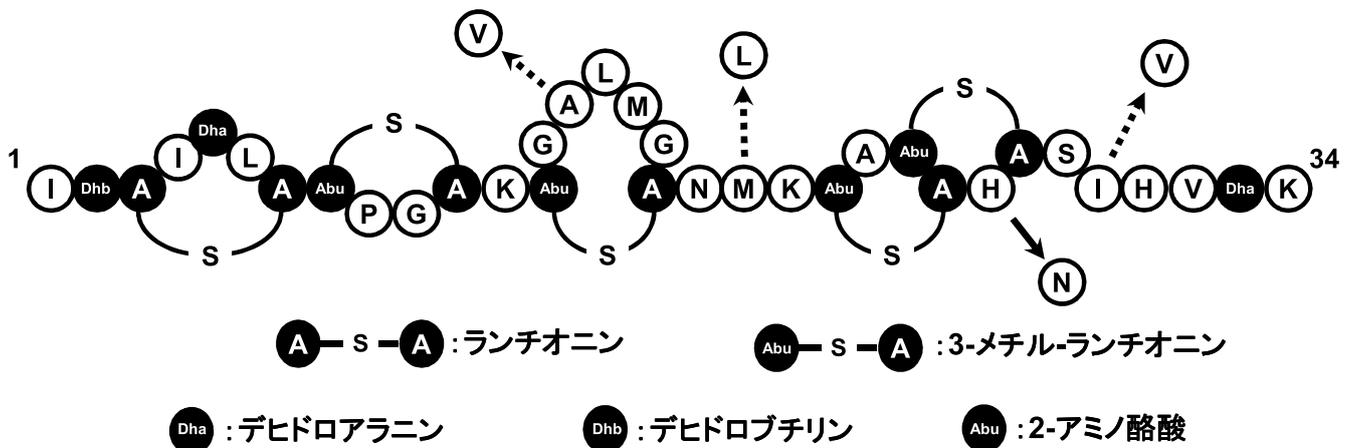
これまで乳酸菌バクテリオシンの研究は欧米を中心にわれ、バクテリオシン生産乳酸菌の分離源は、主として動物性食品であった。一方、日本では漬物をはじめとした植物を利用した発酵食品が多く食されており、その中では植物に由来した乳酸菌が活躍している。そこで、前述のような新しい方法を取り入れながら、著者らは特に植物を利用した発酵食品や植物体そのものなどの様々な分離源を用いて新奇バクテリオシン生産乳酸菌の探索を行ってきた⁷⁾。

最も代表的な乳酸菌バクテリオシンであるナイシンA(クラスIバクテリオシン)は、米国ではGRAS(Generally Recognized As Safe)物質として認められており、世界50カ国以上で広く食品保存料として利用されている。また、日本において

も2009年3月2日に食品添加物として指定され、今後広く利用されることが予想される⁸⁾。ナイシン(図1)は*Lactococcus lactis*の一部の菌株により生産されるバクテリオシンであり、その生合成機構や作用機構について詳細な研究が行われてきた⁹⁾。著者らの研究室においても、ナイシンAとアミノ酸配列が1残基異なる類縁体ナイシンZを生産する乳酸菌を多く見出してきたほか、近年ではナイシンAとアミノ酸配列が4残基異なる類縁体ナイシンQを発見した¹⁰⁾。従来の2つのナイシン(A、Z)は、ヒンジ部位のメチオニンの酸化によって活性が低下するが、このメチオニンがロイシンに置換されたナイシンQは同等の抗菌スペクトルを示しながら、より高い安定性を有している¹¹⁾。

クラスIIaバクテリオシンは、欧米で多くの食中毒を引き起こしているリステリア菌に対して特に強い活性を示す。中でもペディオシンPA-1はナイシンに続く実用化が期待されているバクテリオシンである。著者らもこのペディオシンPA-1(図2(a))を生産する*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536¹²⁾のほか、ムンジチシン生産菌であ

図1 ナイシンの構造



黒色のアミノ酸残基は、それぞれ翻訳後修飾で導入される異常アミノ酸を示す。実線の矢印は、ナイシンZとナイシンQで置換されているアミノ酸、破線の矢印はナイシンQのみで置換されているアミノ酸を示す。

る *Enterococcus mundtii* QU 2 などを見出した¹³⁾。

ラクトコッシンQ(クラスIIbバクテリオシン)は、2つのペプチド、 α (39アミノ酸)と β (35アミノ酸)から成るバクテリオシンで、*L. lactis* QU 4が生産することを見出した(図2(b))¹⁴⁾。このラクトコッシンQは、生産株と同菌種の*L. lactis*のみにしか抗菌活性を示さず、抗菌スペクトルは極めて限定的である。また、2つのペプチドを化学合成した結果、単独では活性を示さず、2つが共存したときのみ相乗的に作用して抗菌活性を示す、クラスIIbバクテリオシンに特徴的な性質を有することが明らかとなった。

Lactococcus sp. QU 12が生産する新奇バクテリオシン、ラクトサイクリシンQ(クラスIIcバクテリオシン)は、N末端とC末端のアミノ酸がペプチド結合した環状構造を有する新奇バクテリオシンである(図2(c))¹⁵⁾。この環状構造は抗菌活性に必須であり、高い熱安定性にも寄与していると考えられている。しかし、環状バクテリオシンの作用機構や環状化機構については不明な点が多く、現在、検討を進めている。

ナイシンは非常に優れたバクテリオシンであるが、中性からアルカリ性領域での低い安定性や広いながらも特徴的な抗菌スペクトルなどの欠点があり、これらはバクテリオシンの応用範囲を拡大する上で克服すべき課題となっている。著者らが発見した*L. lactis* QU 5が生産する新奇バクテリオシン、ラクティシンQ(クラスIIdbakテリオシン、図2(d))は、ナイシンに匹敵する強い抗菌活性とナイシンとややパターン異なる広い抗菌スペクトルを示す¹⁶⁾。また、ナイシンや他のバクテリオシンとは異なり、弱アルカリ領域で特に高い抗菌活性を示し、かつpH 2-10領域で安定という利点から、従来型の乳酸菌バクテリオシンの弱点を補う存在として大いに期待されている。ラクティシンQは他のバクテリオシンに見られるN末端側のリーダー配列がなく、直接、活性型として合成される。さらに、細胞壁前駆体であるlipid IIを必要とするナイシンとは異なり、特定のレセプターを用いずに細菌の細胞膜に巨大な孔を形成し、細胞からイオンやATPだけでなくタンパク質をも流出させることで、強力な抗菌活性を示す

図2 クラスIIバクテリオシンの構造

(a) ペディオシン PA-1 (クラスIIa)



(b) ラクトコッシン Q (クラスIIb)

α -ペプチド



β -ペプチド



(c) ラクトサイクリシン Q (クラスIIc)



(d) ラクティシン Q (クラスIIdbak)



(a)ペディオシンPA-1 は、クラスIIaバクテリオシンに特有の保存配列(YGNGVXC)およびN末端領域のジスルフィド結合を有する(白抜き)。(b)ラクトコッシンQは、2成分のペプチドにより相乗的に抗菌活性を示す。(c)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する。(d)ラクティシンQは、ホルミル化されたメチオニンをN末端に有する。

ことが明らかとなった^{17, 18)}。一方、このラクティシンQと類似した構造を持つラクティシンZを生産する*L. lactis* QU 14も発見された¹⁹⁾。

見出した新奇バクテリオシン生産株の多くはバクテリオシンを1種類のみ生産するが、中には、2種類以上を生産するものも存在する。例えば、*Enterococcus faecium* NKR-5-3は、5種類のバクテリオシンを生産する²⁰⁾。また、*Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15も、新奇のロイコシンQ、N(クラスⅡd)を含む3種類のバクテリオシンを生産することが明らかとなっている²¹⁾。このように複数のバクテリオシンを生産する乳酸菌の報告例はまだ少なく、その生物学的意義や将来的な応用の両面において大変興味深い。

5. 乳酸菌バクテリオシンの新たな用途

乳酸菌が食品との関わりが深い微生物であること、古来、発酵食品の保存性向上に寄与していることなどから、ナイシンをはじめとする乳酸菌バクテリオシンは食品保存料としての利用が広く検討され、実用化されてきた^{2, 6, 8, 9)}。我々も乳酸菌バクテリオシンの優れた特性、特に乳酸菌由来という安全性を基盤として、食品保存料だけでなく、医薬やそれに準じる消毒剤や洗浄剤、その他微生物制御が必要な様々な分野への応用を試みてきた。

一般に、ナイシンは酸性域では安定であるものの、中性からアルカリ性域では不安定である。一方、洗浄剤の洗浄成分として不可欠な界面活性剤は、逆に酸性域での安定性が確保できないものが多い。そこで、活性と安定性について最適な配合剤を検討し、ナイシンAを主剤とした手指用殺菌洗浄剤の開発を行った。結果として、開発品は広範な抗菌スペクトルおよび高い殺菌力を示し、市販品との比較では概ね優位性が認められる洗浄剤を調製することに成功した^{6, 22)}。また、酪農経

営の収益性を左右する重大な疾病である牛の乳房炎に対して、ナイシンを利用した予防剤・治療剤の開発を検討してきた。乳房炎予防剤・治療剤は、乳房炎原因菌(*Staphylococcus aureus*や*Streptococcus agalactiae*)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すことが認められた^{23, 24, 25)}。この開発品は、従来のヨード剤や抗菌物質の牛乳への残留による悪影響を低減でき、安全性と経済面から代替品として今後大いに期待される。

最近では、ナイシンAと梅エキスを組み合わせた口腔用抗菌剤(ネオナイシン)を開発し、その抗菌剤が配合された口腔ケア剤の製品化に成功している²⁶⁾。このネオナイシンは、虫歯菌(*Streptococcus mutans*)だけでなく、ナイシンA単独だけでは効果が低い歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*)に対しても高い抗菌活性を有する。同時に、ナイシンAと梅エキス以外も可食性成分のみを使用し、高い安全性を有している。誤飲しやすく口腔ケアの困難な要介護高齢者や重度心身障害者、乳幼児などへの利用が期待されている。

6. おわりに

現在、世界で広く使用されているナイシンAは優れたバクテリオシンであるが、その抗菌活性の持続性、アルカリ条件下での低い安定性、有用菌への影響などいくつかの問題が指摘されている。また、幸いなことにナイシンでは未だ報告例はないが、バクテリオシンの継続的な利用においても耐性菌の出現には細心の注意を払わねばならない。そこで、ナイシンとは異なる特徴を持ち、ナイシンの弱点を克服できるバクテリオシンの実用化が望まれている。このような背景から、著者らは新奇バクテリオシンの探索を広く行い、優れた特性を持つラクティシンQやラクトサイクリンQなどを見出すに至った。今後、様々なバクテリオシンをさらに発見し、それらを組み合わせるこ

とで、状況に応じた抗菌スペクトルをテーラーメイドで作り出すことも可能となるであろう。そして、バクテリオシンを利用した効果的な微生物制御を食品分野のみならず医療、畜水産など他分野でも実現していきたい。

<参考文献>

- 1) 森地敏樹、松田敏生(編著) : バイオプリザベーション, 幸書房, 1-7 (1999) .
- 2) 善藤威史ら: 化学工学, 53, 94-100 (2002) .
- 3) 善藤威史ら: 防菌防黴, 37, 903-911 (2009) .
- 4) Cotter, P. D. et al.: Nat Rev Microbiol, 3, 777-788 (2005) .
- 5) 奥田賢一ら: 化学と生物, 47, 91-97 (2009) .
- 6) 善藤威史ら: 防菌防黴, 34, 277-283 (2006) .
- 7) Zendo, T. : Biosci Biotechnol Biochem, 77, 893-899 (2013) .
- 8) 善藤威史ら: 乳業技術, 59, 77-86 (2009) .
- 9) 益田時光ら: ミルクサイエンス, 59, 59-65 (2010) .
- 10) Fukao, M. et al.: Biosci Biotechnol Biochem, 72, 1750-1755 (2008) , 特許WO2004029082
- 11) Yoneyama, F. et al.: J Appl Microbiol, 105, 1982-1990 (2008) .
- 12) Swetwivathana, A. et al.: Fleischwirtschaft International, 22, 46-49 (200) .
- 13) Zendo, T. et al.: J Appl Microbiol, 99, 1181-1190 (2005) .
- 14) Zendo, T. et al.: Appl Environ Microbiol, 72, 3383-3389 (2006) .
- 15) Sawa, N. et al.: Appl Environ Microbiol, 75, 1552-1558 (2009) .
- 16) Fujita, K. et al.: Appl Environ Microbiol, 73, 2871-2877 (2007) .
- 17) Yoneyama, F. et al.: Appl Environ Microbiol, 75, 538-541 (2009) .
- 18) Yoneyama, F. et al.: Antimicrob Agents Chemother, 53, 3211-3217 (2009) .
- 19) Iwatani, S. et al.: Biosci Biotechnol Biochem, 71, 1984-1992 (2007) .
- 20) Ishibashi, N. et al.: Biosci Biotechnol Biochem, 76, 947-953 (2012) .
- 21) Sawa, N. et al.: J Appl Microbiol, 109, 282-291 (2010) .
- 22) 特開2007-99809 : ナイシン含有洗浄剤組成物
- 23) 北崎宏平ら: FFIジャーナル, 215, 449-456 (2010) .
- 24) 特願2009-121295 : 乳房炎予防剤.
- 25) 特願2009-121318 : 乳房炎治療剤.
- 26) ネオナイシン (<http://www.neonisin.com/>) , 口腔ケア製品 (<http://oralpeace.com/>)