

# 新しい食品添加料の開発を目指したランチビオティックの探索

小谷 真也

静岡大学大学院農学研究科 助教

## 緒言

本研究の目的は、食品保存料としての利用を目指した放線菌の新しいタイプのランチビオティックの探索である。現在利用されている食品保存料の中には、熱や酸に不安定で、食品に影響を与えるものがあるなど実際の利用において制約がある。従来の食品保存料の代替として注目されているのが、乳酸菌などのグラム陽性菌の生産するペプチド性抗菌物質“ランチビオティック”である。ランチビオティックの中でも Nisin<sup>1,2)</sup> は世界50カ国以上で実際に食品添加料として用いられている。一方で長期的な Nisin の使用によって耐性菌が出現することが予期されており、対策が望まれている。このような背景から新しい化学構造を有したランチビオティックの開発は食品衛生学において重要な課題である。これまで、主に乳酸菌から数々のランチビオティックが発見されたが、放線菌からは数種のランチビオティックしか発見されていない。筆者は、これまで放線菌から2つの新しいランチビオティックを単離し、その構造が多様性に富むことを発見した。そこで本研究において、新しい食品保存料の開発を目指し、各種微生物を用いたスクリーニングを行い、ランチビオティックの探索を行った。さらに得られたランチビオティックに関し食品防腐効果試験などの応用に向けた抗菌活性試験を行った。

## 実験方法

### 1. ランチビオティックのスクリーニングおよび培養と単離

研究室において保持している微生物に関して、抗菌活性および、HPLC、ESI-MSを用いた分析から *Bacillus sonorensis* NBRC 101234株が新規ランチビオティックを生産していることを見出した。そこで、*B. sonorensis* の培養をJCM302寒天培地で行い、菌体を回収した。菌体量に対して2倍量の acetone を加え 30 min 室温にて静置した後、遠心分離 (4000 rpm, 5 min) を行い上清である粗抽出液を得た。その後、菌体量に対して等量の

acetone を加えて前述と同様に操作を行い、再度抽出を行った。得られた上清を減圧濃縮にて濃縮を行い、得られた抽出物を H<sub>2</sub>O に溶解した。この後、疎水性樹脂 CHP-20P を用いて逆相オープンカラムに供し 10% MeOH、60% MeOH、100% MeOH で溶媒分画を行った。HPLC および ESI-MS 分析の結果、100% MeOH 画分に新規ランチビオティックを得た。

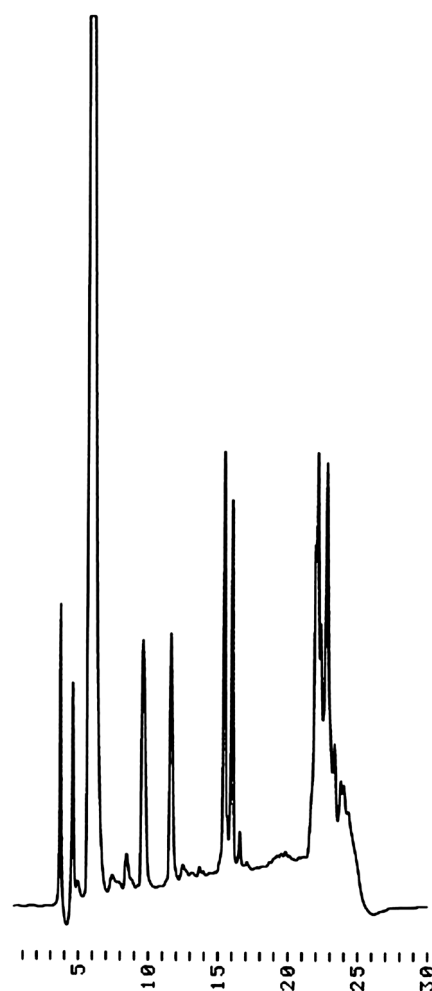


図1 100% MeOH 画分の HPLC クロマトグラム

## 2. 抗菌活性試験

抗菌活性試験は、ペーパーディスク法を用いて行った。ペーパーディスクは、直径6 mmの薄手タイプ (Merck) を用いて、ペーパーディスク周辺に現れる阻止円の直径を測定することにより評価した。

用いた試験菌を以下に示した。

細菌

*Escherichia coli* (NBRC 1002203)

*Pseudomonas aeruginosa* (NBRC 12689)

*Serratia marcescens* (NBRC 1002204)

*Bacillus subtilis* (NBRC 13719)

*Staphylococcus aureus* (NBRC 100910)

*Micrococcus luteus* (NBRC 3333)

*Streptomyces antibioticus* (NBRC 3117)

酵母

*Saccharomyces cerevisiae* (NBRC 2376)

*Schizosaccharomyces pombe* (NBRC 0340)

*Kloeckera apiculata* (NBRC 0154)

カビ

*Aspergillus niger* (NBRC 33023)

*Aspergillus oryzae* (NBRC 4290)

*Mucor hiemalis* (NBRC 9405)

## 3. NMRおよびESI-MSスペクトラム

ESI-MSは日本電子・Accu-TOF T100LCを用いて測定を行った。またNMRスペクトルは、日本電子ECA-

600を用いて測定した。

## 結 果

HPLC分析によって得たピークを分取後、抗菌活性試験および、ESI-MS分析を行った。その結果、図1の保持時間15分のピークに抗菌活性が見られ、またESI-MSにおいて $m/z$  1179.6に二価のモノアイソトピックイオンピークが見られた。それにより、分子量は約2357 Daであることが示唆された (図2)。*Bacillus sonorensis* NBRC 101234に関してはすでにゲノムのDNA配列の解析が終了しており<sup>3)</sup>、その配列情報を参照することができる。そこで、検索を行ったところ、lantibioticである streptin<sup>4)</sup>に類縁の遺伝子である WP\_006639978.1がヒットした。図3のように6残基存在するセリンもしくはスレオニンがランチビオティック脱水酵素により脱水されると仮定すると、分子量が一致する。そこで、化学構造を同定するために、NMRを用いた構造解析を行った。重DMSO中において<sup>1</sup>H-NMR (図4)、<sup>13</sup>C-NMR (図5)、COSY、NOESY、HSQC、HMBCスペクトラムを含む各種二次元NMRの測定を行った。その結果、Dhbが3モル含まれていることが明らかとなった。さらに現在詳細な化学構造の解析を行っている。また、単離したランチビオティックに関して、ペーパーディスク法を用いた抗菌活性試験を行った。試験菌は、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Micrococcus luteus*等の細菌を用いた結果、食品腐敗性細菌 *Micrococcus luteus* への

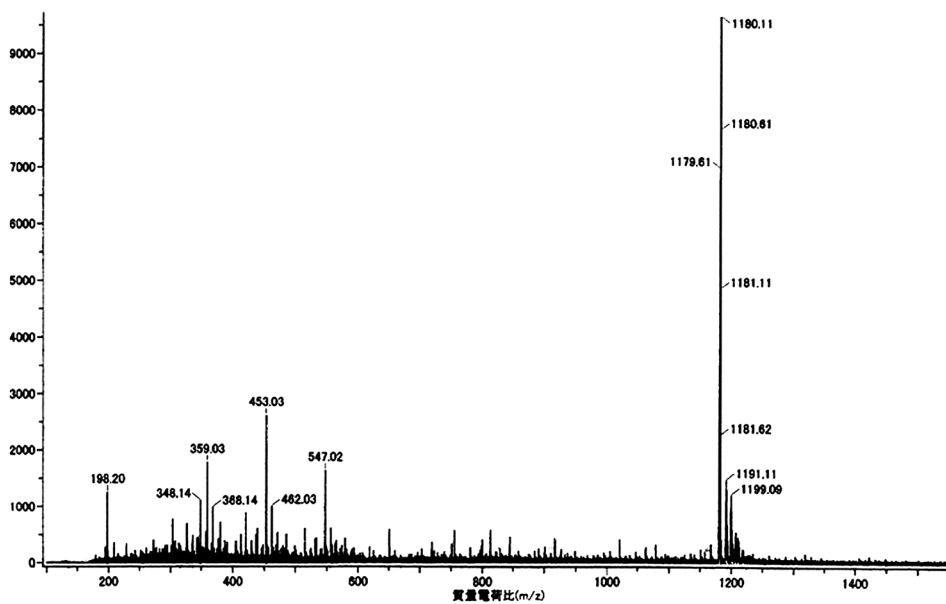


図2 *Bacillus sonorensis*の生産するランチビオティックのESI-MSスペクトラム

Leader peptide: VGSRYLCIPGSCWKWVCFITTA (構造ペプチド部の分子量 2466.8)



VGDhaRYLCDhbPGDhaCWKWWCFDhbDhbDhbA

Ser と Thr が脱水されるため  
 $2466.8 - (18 \times 6) = 2358.8$   
 ESI<sup>+</sup>-MS 測定において 2 価のイオンピークを与えるとする  
 $2358.8 \div 2 = 1179.4$  と測定値と合致する。

図3 *Bacillus sonorensis*において生産が予測されるランチビオティックの分子量推定

み顕著な抗菌活性が見られた。

### 考察

今回の研究で、*Bacillus sonorensis* NBRC 101234の生産するランチビオティックの部分構造を明らかにすることができた。ランチビオティックの構造的な特徴としてランチオニン環構造を有することが挙げられる。構造ペプチドの6つのセリンもしくはスレオニンが脱水され

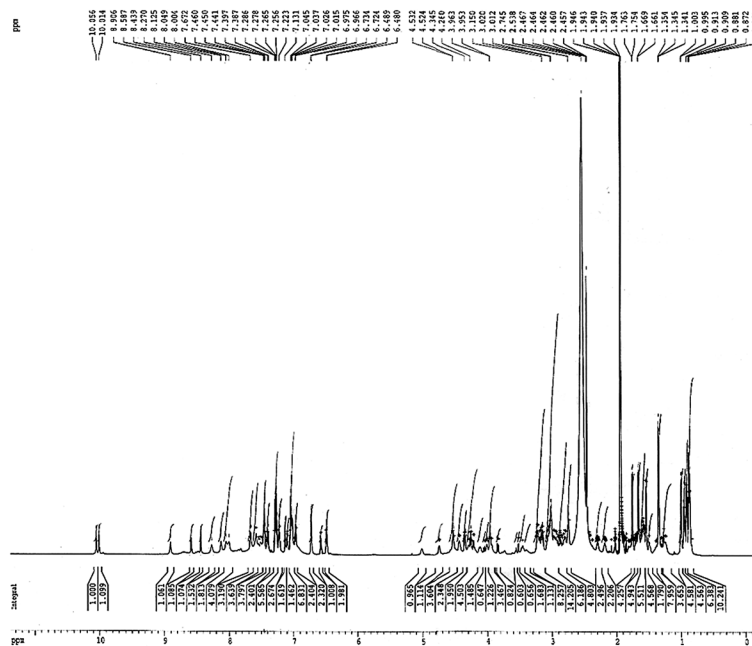


図4 *Bacillus sonorensis*のランチビオティックの<sup>1</sup>H-NMRスペクトラム

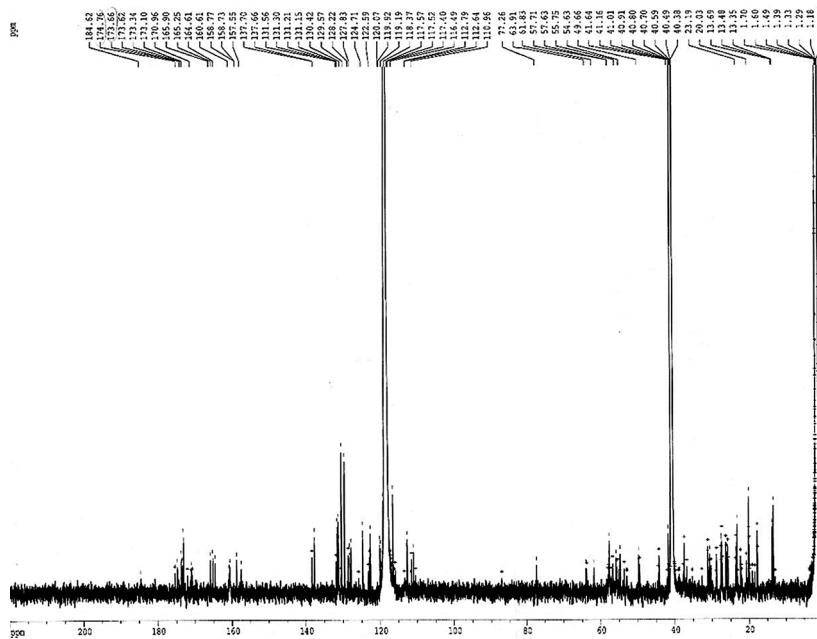


図5 *Bacillus sonorensis*のランチビオティックの<sup>13</sup>C-NMRスペクトラム

ていることは推定できたが、そのうち3つがシステインと結合しチオエーテルを形成していることが推定された。重DMSO中において非常にブロードなシグナルを与えたために、NMRによる構造解析が困難であった。今後、NMR測定の重溶媒の変更を行い、良いシグナルを与える条件を探したい。また、X線結晶解析を試み、構造を明らかにしたい。

*Micrococcus*属細菌の多くはグラム陽性を示す真正細菌であり形状は球状で単体あるいは集塊を成し芽胞を作らないことが知られている。この属の細菌は比較的高い塩濃度での生育が確認されており、乾燥に耐え中には耐塩性、耐乾燥性、耐熱性、耐低温性を示す菌種も存在する。浮遊菌として一般的な種類の菌であり栄養要求が比較的簡単であり好气的環境化において著しい増殖を示す。食品および食品製造工場にて分布することの多い菌であり*Micrococcus*属が原因による変敗の原因菌となる場合もあるが、他の微生物や酵素と共存して変敗の原因菌となる場合が多いと報告がなされている。つまり*Micrococcus*属細菌に対する抗菌活性を有することは食品の変敗を防ぐまたは遅延させる食品添加物となる可能性がある。多くのランチビオティックに特徴的な耐熱性、低pH域での安定性、プロテアーゼによる分解への耐性また低濃度での効果を示すことから耐性菌の発生を低下させる可能性もあり従来の抗菌物質に比べての優位性に期待がなされている。しかしながら抗菌活性を示す標的菌への幅が狭く単体では多くの食品変敗の原因菌に対応できない。このことから様々な標的菌に活性を持つランチビオティックをはじめバクテリオシンを複数用いて幅広い菌種に対応しようという構想がなされている。

今回の研究で得られた*Bacillus sonorensis* NBRC 101234由来ランチビオティックも*Micrococcus luteus*に抗菌活性を有することから応用の可能性も十分考えられる。

## 要 約

ランチビオティック生産のスクリーニングを行い、*Bacillus sonorensis* NBRC 101234がランチビオティックを生産することを見出した。また、ゲノムマイニングとESI-MSの情報から構造ペプチド部がVGSRYLCTPGSCWKWVCFTTTAであり、下線部のセリンまたはスレオニンが脱水され、そのうち3つがシステインと結合し、ランチオニン形成していることが示唆された。また、活性試験では、食品腐敗性細菌*Micrococcus luteus*に顕著な抗菌活性が見られたことから有望な化合物であると考えられる。今後、全化学構造の決定を行う予定である。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり、助成金を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) K. Fukase, et al.: *Tetrahedron Lett.*, **29**, 795–798, 1988.
- 2) G. W. Buchman, et al.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 16260–16266, 1988.
- 3) D. B. Adimponga, et al.: *Genome Announcements*, **1**, e00097-13, 2013.
- 4) P. A. Wescombe, J. R. Tagg: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2737–2747, 2003.