

論文の内容の要旨

氏名：春日元気

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：*Lactobacillus gasseri*が生産する新規二成分性バクテリオシン
“ガセリシン S”の特性に関する研究

第1章 序論

近年、保存料の代わりに長年の食経験を有した天然の抗菌性物質（バイオプリザバティブ）を用いる食品保蔵技術（バイオプリザベーション）が注目されており、この技術を提唱した Ray はバイオプリザバティブとして乳酸菌とその産生物質の利用を推奨している。乳酸菌が生産する抗菌物質としては乳酸、過酸化水素、アセトアルデヒド、ジアセチルやバクテリオシンなどが知られている。バクテリオシンとは細菌がリボソームを介して生産する抗菌性のペプチドおよびタンパク質の総称で、構造遺伝子がゲノム上にコードされるという点で抗生物質とは大きく異なっている。また、熱に比較的安定で、主にペプチド性であることから無味無臭かつ消化管内で容易に分解されることが予想されるため、安全性の高い食品保存剤として注目されている。

当研究室では Generally Recognized As Safe (GRAS) の有力な候補である *Lactobacillus gasseri* により生産されるバクテリオシン（ガセリシン）について研究し、これまでに *Lb. gasseri* LA39 が生産する N/C 末端結合型の環状バクテリオシン「ガセリシン A (GA)」と、*Lb. gasseri* LA158 により生産される二成分性バクテリオシンである「ガセリシン T (GT: GatA と GatX)」の 2 種を見出してきた。両ガセリシンは、優れた pH (2-10) 安定性と耐熱性 (121°C, 15 min で活性残存) を有し、乳酸菌に加えてグラム陽性の食中毒・病原性細菌にも高い活性を示すことから、主に食品への応用が期待されている。しかしながら、現時点では完全食品グレード培地を用いたガセリシン生産系については確立されていない。

2004 年に Majhenič らは第三のガセリシンとして、*Lb. gasseri* LF221 が生産する推定の二成分性バクテリオシン「アシドシン LF221A (Acd LF221A: Acd 221a と Acd 221A)」を報告したが、一方のペプチド (Acd 221A) が単離・精製されたに過ぎず、Acd LF221A が実際に二成分性バクテリオシンであるかは不明であった。最近、当研究室の保有株である *Lb. gasseri* LA327 に Acd LF221A の構造遺伝子と推定される配列が見出され、周辺を含む全塩基配列を解析した結果、少なくとも 1 アミノ酸残基が異なる新規のバクテリオシンである可能性が明らかとなり、ガセリシン S (GS: GasA と GasX) と命名した。また、本遺伝子クラスターは 3 つの遺伝子 (*gasAX*: 推定構造遺伝子、および *gasI*: 推定自己耐性遺伝子) のみで構成され、周辺領域に生産制御や菌体外輸送に関与する遺伝子群は認められず、二成分性を含めて、実際に発現しているか否かも不明である。

本研究では、GS を含む上記ガセリシンの将来的な食品への利用を目的として、*Lb. gasseri* 用の食品グレード培地の開発から、GS の発現と二成分性に関する証明、および諸性質の検討を行った。

第2章 GS を含むガセリシンの生産に向けた食品グレード培地の開発

バクテリオシンを食品へ応用するには、食品添加が可能な成分のみで構成された培地（食品グレード培地）を用いて生産株を培養する必要がある。乳酸菌向けの代表的な食品グレード培地としては脱脂乳培地

などが挙げられるが、*Lb. gasseri*は乳中での生育が緩慢であるために不向きとされている。また、同培地に酵母エキスなどの窒素源を添加することでこの緩慢な生育は改善できるが、乳成分は乳アレルギーのリスクに加え、バクテリオシンの回収・精製を阻害し、特に GT の場合には豊富に含まれる二価金属イオンによりその生産も阻害されることが明らかになっている。本章では、乳成分を含まない *Lb. gasseri* 向けの食品グレード培地の創製と食品グレードとなるガセリシンの生産を試みた。

乳酸桿菌の培養に広く利用されている人工合成培地である MRS 培地の組成より、窒素源を食品添加用酵母エキス FR のみに置換し、人体に有害な硫酸マンガンを除去することで食品グレード培地 FR (FGM-FR) を作製した。LA39 (GA 生産株) と LA158 (GT 生産株) の FGM-FR を用いた最適培養条件 (FR と Tween 80 の添加濃度、および培養時間) を決定した結果、MRS 培地培養時の半量および等量に当たる活性が得られ、食品グレードとなる GA および GT の生産に成功した。また、GS 生産株として LA327 Δ *gatAX* 株 (GT 構造遺伝子ノックアウト株) を培養した場合も高い活性が認められ、食品グレードの GS を得ることが可能になった。

第3章 新規バクテリオシン (ガセリシン S) における二成分性の証明

二成分性バクテリオシンは 2 種のペプチドによって構成されるバクテリオシンで、各ペプチド単独では活性が微弱、もしくは全く示さないが、主に 1:1 の組み合わせ時に相乗効果によって最大活性を示すことが知られている。通常、この二成分性に関する証明には各ペプチドの単離精製が必要となるが、*Lb. gasseri* が生産する二成分性バクテリオシンにおいては完全精製の成功例はなく、既存の精製技術を用いた GS の解析は困難である可能性が考えられた。

そこで、本実験では GS 遺伝子の発現株構築による解析を試みた。また、先行研究において LA327 株より GT の ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター遺伝子 (*gatT*) を除去した場合、活性が完全に消失したことから、GS の生産には *gatT* をはじめとする GT 遺伝子群が関与していると考えられる。この理由から、GT 生産株 (LA158 株) より GT 構造遺伝子をノックアウトした株 (LA158 Δ *gatAX*) を宿主として各 *gas* 遺伝子発現株を構築し、同種発現解析を行った。GasA および GasX を単独で生産する改変株の培養上清はいずれもバクテリオシン活性を示さなかったが、両培養上清の混合時には活性が得られ、GS は二成分性バクテリオシンであることが初めて証明された。また、GS 含有培養上清を SDS-PAGE に供試後、指標菌混釈寒天培地を重層して培養した (*in situ* activity assay) 結果、GS の理論分子量 (GasA: 6,061、および GasX: 5,481) に近似する位置に生育阻止帯が得られ、GS の発現が確認された。

次いで、GasA と GasX の最適な作用比率を試験するため、各ペプチド含有培養上清を段階的に希釈して活性を測定した結果、どちらの上清を希釈した場合も希釈倍数依存的に活性が低下し、GasA と GasX の最適な作用比率は 1:1 であると考えられた。また、GasA、GasX、GatA、および GatX の 4 成分を混合して活性を試験した結果、GasA+GasX および GatA+GatX の組み合わせ以外では活性の上昇が認められず、GS と GT の間に相乗効果は存在しないことが明らかとなった。

第4章 GS の食品に向けた諸性質の検討

バクテリオシンを食品などへ応用する際には製造・加工時の各処理から保存性、およびヒト腸管内への影響までを考慮する必要がある。本実験では GS を含む各ガセリシンの食品応用に向けた諸性質の検討を試みた。GS を含む MRS 培地培養上清は pH 2、4、7、および 10 で (常温) 1 h 静置後も活性値が一定であったことから、他のガセリシンと同様に GS は pH 2-10 において安定である可能性が示唆された。また、熱安定性試験では、121°C、15 min の加熱処理後も GS は約 25% 量の活性を残存し、高い耐熱性が示された。

一方、保存性試験においては4℃で1か月間保持後も活性は低下しなかったが、37℃で1か月間保持した場合には活性が1/4まで低下した。さらに各種プロテアーゼ（ペプシン、トリプシン、 α -キモトリプシン、およびプロテイナーゼK：終濃度10 mg/mL）に対するGA、GT、およびGSの耐性を試験した結果、GAのみがプロテイナーゼKを除く全てのプロテアーゼへ耐性を示したが、GTはペプシンのみへ僅かに耐性を示し（活性を約1.6%残存）、GSはすべてのプロテアーゼによって完全に失活した。

次いで、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)の生菌数を指標とするGSの抗菌性について試験した結果、高濃度GS（濃縮上清）をMRS培地と混合した場合は菌数が大幅に低下し、殺菌的作用が示されたが、MRS培地非添加時ではGSの濃度に関わらず静菌的作用が認められた。また、静菌的条件下（4℃保持、またはエリスロマイシンの添加）にある指標菌へMRS培地を添加した高濃度GSを感作した場合、殺菌的作用が阻害されたことから、GSは増殖する菌体のみを殺菌する可能性が示唆された。

第5章 総括

食品添加用酵母エキスFRをベースに開発したFGM-FRによって各ガセリシン生産株(LA39株、LA158株、およびLA327/*gatAX*株)を培養した結果、全ての培養上清中にバクテリオシン活性が検出され、食品グレードのガセリシン生産が可能になった。

次いで、*gas*の同種発現解析の結果、GSの構成ペプチドであるGasAとGasXの含有培養上清は単独で活性を示さなかったが、混合時には活性（相乗効果）を示したことから、GSは二成分性バクテリオシンであることが初めて明らかになった。

GSの食品利用に向けた諸性質の検討では、高いpH安定性と耐熱性、およびプロテアーゼ感受性が明らかになり、GSの安全性に優れた食品保蔵剤としての利用性が示唆された。また、低濃度時に静菌的作用を示し、高濃度の場合には増殖する菌体のみを特異的に殺菌するという作用特性は、これまでにバクテリオシンでは報告例が無く、GSの選択的殺菌剤としての応用が期待される。