

論文要旨

論文題目 「*Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の特性と
その多成分バクテリオシンに関する研究」

氏 名 河原 あい

バクテリオシンはタンパク質性の抗菌ペプチドであり、その安全性の高さから化学合成の食品保存料に代わる天然の食品保存料として期待されている。現在実用化されている代表的なバクテリオシンに nisin A があるが、酸性領域でのみ安定、単独使用ではグラム陰性菌には抗菌活性を示さない、などの特性から使用用途が乳製品や缶詰など一部の食品に限定される。乳酸菌が生産するバクテリオシンに関する研究報告は多いが、それらの生産機序は不明な点が多い。そのため、高い応用可能性を持ちながらもほとんどのバクテリオシンは実用化には至っておらず、依然として化学合成保存料が多用されている。一方で、近年の消費者の健康・自然志向から、化学合成された食品添加物は避けられる傾向にある。しかし、食品添加物を使用しない微生物制御技術では微生物汚染を完全に防ぐことができず、食中毒や食品汚染などの懸念が拭えず、長期保存の難しさから食品の大量廃棄に繋がる可能性もある。そのため、安全性の高い食品保存技術の発展が求められており、乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンに着目した。これまでに、熊本県球磨地方で 800 年以上食されてきた味噌漬け豆腐からバクテリオシン生産乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 を分離した。味噌漬け豆腐の保存性の高さの要因の一つに、バクテリオシン生産乳酸菌が寄与し、有害菌を排除していることが考えられる。

L. plantarum の多くは、発酵食品のスターター菌として使用されるとともに、ヒトに有益な効果をもたらすプロバイオティクスであることが知られている。これらを踏まえ、本研究では、PUK6 株の特性を調べ、乳酸菌の発酵食品における応用可能性を評価し、PUK6 株が生産するバクテリオシンの精製、同定、バクテリオシン生合成関連遺伝子群の同定および解析、そして新規バクテリオシン様遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。

(1) *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の特性

PUK6 株の特性として、耐塩性、乳酸生産性、胃酸耐性、胆汁酸耐性、コレステロール吸収・吸着効果について調べた。その結果、PUK6 株は 7.5% NaCl に耐性を示し、培養 12 時間後の乳酸生産量は、D-乳酸が 4.8 g/L、L-乳酸が 3.4 g/L、総乳酸生産量が 8.2 g/L、D/L 乳酸比は 1.42 であり、L-乳酸よりも D-乳酸を多く生産することがわかった。次に、PUK6 株を pH 2.5 および 3.0 の 5 mL の人工胃液 (0.32% ペプシン含有 MRS 液体培地) を用いて 37 °C で 4 h 振とう培養し (50 strokes/min)、生残率を調べた (胃酸耐性試験)。その結果、PUK6 株は人工胃液に対して強い耐性を示し、pH 2.5 下でも生残率は 100% だった。次に、コレステロール (最終濃度 70 µg/mL)、0.2% タウロコール酸ナトリウムおよび 0.2% チオグリコール酸ナトリウムを含む MRS 液体培地 (5 mL) にて、PUK6 株を 37 °C で 20 h 振とう培養した (50 strokes/min) (胆汁酸耐性試験)。培養液上清をけん化・濃縮後、残存するコレステロールを定量し、菌体へのコレステロール吸収・吸着作用を評価した。PUK6 株は、タウロコール酸含有培地にて

増殖が良好であることから、胆汁酸耐性を示し、菌体へのコレステロールの吸収・吸着率は 28.7 % であった。以上より、PUK6 株は D-乳酸を多く生産する DL-乳酸生産株であり、耐塩性、胃酸耐性・胆汁酸耐性を示し、コレステロールを吸収・吸着することから、PUK6 株を摂取した場合、胃酸や胆汁酸に耐えて腸に届き、コレステロール低下作用が期待されるプロバイオティクス候補株といえた。

(2) *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産するバクテリオシンの精製とその生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の同定

PUK6 株の培養液上清から、硫酸沈殿、透析、逆相系前処理カラム Sep-Pak Plus tC18 および逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を行い、バクテリオシンを精製した。RP-HPLC により Fraction 1~7 に分画し、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌としたバイオアッセイを行った結果、Fraction 1 および 4 に抗菌活性が検出された。Fraction 1 については複数のピークが重なっていたため、アセトニトリルの濃度勾配を緩やかに変更し、精製を進めた結果、Fraction 1 はさらに A~H の 8 つのピークに分かれ、全てのピークが抗菌活性を示した。特に抗菌活性の高かったピーク D、G および H についてアミノ酸配列分析を行った結果、既知バクテリオシンの *plantaricins* A、F および NC8 β と相同性を示した。また、Fraction 4 については、既知バクテリオシンと相同性を示さず、機能不明タンパク質の分解物が抗菌活性を示したと考えられた。次に、相同性を示したバクテリオシン構造遺伝子に特異的なプライマーを用いて、PUK6 株ゲノム DNA の PCR を行った。続いて、primer walking を行って、PUK6 株のバクテリオシン生合成関連遺伝子群 (*pln* locus) の全塩基配列 (21,847 bp) を明らかにした。そして、web データベースの BLAST による相同性検索および InterPro によるドメイン解析により、PUK6 株の *pln* locus 上に存在する 29 遺伝子の機能を決定あるいは推測した。

(3) 新規バクテリオシン様遺伝子の機能解析

L. plantarum PUK6 の *pln* locus 上の 2 つの機能不明遺伝子 (*orf1* および *orf2*) の推定翻訳産物に、バクテリオシン前駆体に特徴的なダブルグリシン (Gly-Gly) 配列を見出した。また PUK6 株と同様の *pln* locus を有する *L. plantarum* J51 の *pln* locus 上にも、PUK6 株の *orf1* および *orf2* と相同性を有し、2 分子ペプチドバクテリオシン遺伝子と推測されている *orf3* および *orf4* が存在する。RT-PCR により PUK6 株の *orf1* および *orf2* の転写を確認したことから、Orf1 および Orf2 は発現していると考えられた。続いて、Orf1 および Orf2 の推定成熟ペプチド (mOrf1 および mOrf2) を化学合成し、15 種の細菌に対する抗菌活性試験を行った。その結果、*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T および *Weizmannia coagulans* JCM 2257^T に対して抗菌活性を示した。次に、感受性が高かった *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を指標菌として、mOrf1 および mOrf2 の作用機序を調べた。1.5 mL の 10 倍希釈 MRS 培地で指標菌を培養し、10 μ M の mOrf1、mOrf2、または mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物 (各 5 μ M) を培養開始時または培養 4 時間目に 150 μ L ずつ添加して、600 nm における菌体濁度を経時的に測定した。指標菌の培養開始時に合成ペプチドを添加した結果、mOrf2 のみを添加した場合はコントロールと同様に指標菌は増殖したが、mOrf1 のみ、あるいは mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物を添加した場合は指標菌の増殖が阻害された。指標菌の対数増殖期にあたる培養 4 時間目に合成ペプチドを添加した場合、mOrf2 のみでは指標

菌の増殖に影響せず、mOrf1のみでは増殖を抑制し静菌作用を示した。さらに mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物は指標菌に対して殺菌作用を示し、2つの mOrfs の相乗作用が見られた。

また、培養 4 時間目に合成ペプチドを添加した際の培養において、*-Bacstain- Bacterial Viability Detection Kit -DAPI/PI (DOJINDO)* を用いて指標菌を蛍光顕微鏡で観察した。この染色では、初めに DAPI によって全ての指標菌が青く染まり、PI によって膜損傷した細胞が赤く染まり、2つ合わせて紫色となる。mOrf2 単独ではコントロールとの違いはみられなかったが、mOrf1 単独では、経時的に指標菌の紫色の割合が増加し、細胞膜の損傷が見られた。さらに、mOrf1 と mOrf2 の等モル混合物を添加した場合、指標菌に対する膜損傷を示す紫色の割合が最も高くなった。以上より、指標菌に対する作用機序および蛍光顕微鏡観察の結果から、*orf1* および *orf2* をそれぞれ *plnPUK6α* および *plnPUK6β* 遺伝子とし、それらが発現した活性型の 2 分子ペプチドバクテリオシンを *plantaricin PUK6* と命名した。そして、(2) および (3) の結果をもとに、PUK6 株の多成分バクテリオシン生合成メカニズムを提唱した。

(4) *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンの抗菌スペクトル

PUK6 株は 4 種類のバクテリオシン (*plantaricins* A、EF、NC8 および PUK6) を生産することがわかった。そこで、これらのバクテリオシンを化学合成し、10 種類の指標菌に対して抗菌活性試験を行い、PUK6 株の抗菌スペクトルを決定した。その結果、4 種類のバクテリオシンはいずれも *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T および *W. coagulans* JCM 2257^T に対して抗菌活性を示したが、各バクテリオシンの抗菌スペクトルはそれぞれ異なることが明らかとなった。

以上より、博士論文研究において、*L. plantarum* PUK6 は耐塩性、DL-乳酸生産性、胃酸・胆汁酸耐性、コレステロール吸収・吸着作用を有することがわかった。また、PUK6 株は新たに見出した *plantaricin PUK6* を含めて、抗菌スペクトルが異なる少なくとも 4 種類のバクテリオシンを生産することを明らかにし、多成分バクテリオシン生合成メカニズムを提唱した。