

## 乳酸菌バクテリオシンの探索と利用

善藤 威史<sup>1\*</sup>、石橋 直樹<sup>1</sup>、園元 謙二<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院、<sup>2</sup>九州大学バイオアーキテクチャーセンター

乳酸菌の中には、バクテリオシンと総称される抗菌ペプチドを生産するものが存在する。乳酸菌バクテリオシンは一般に細胞膜に瞬時に作用して抗菌活性を示し、腸管内の消化酵素で容易に分解されて残留による環境負荷が少ないことから、耐性菌を生じにくく、安全性の高い抗菌物質と考えられている。とくに *Lactococcus lactis* の一部の菌株によって生産されるナイシン A は、日本を含む世界 50 ヶ国以上で食品保存料として利用されている。我々は、乳酸菌バクテリオシンの特徴を活かした安全な微生物制御の実現を目指し、ナイシン A の様々な分野への展開を図るとともに、ナイシン A に続く、優れた特性を有する新奇バクテリオシンを探索し、それらの構造と機能について研究を行ってきた。本稿では、ナイシン A をはじめとする乳酸菌バクテリオシンについて概説するとともに、ナイシン A の口腔ケア剤などの非食品用途への利用や、新奇乳酸菌バクテリオシンの探索とラクティシン Q やラクトサイクリン Q などの新奇バクテリオシンの特性について、我々の成果を中心に紹介し、今後の展望を述べたい。

**Key words** : Bacteriocin, Nisin, Lactic acid bacteria, Antimicrobial agent

### 1. はじめに

乳酸菌は様々な環境中に見出すことができ、種々の抗菌物質を生産することで自身の生存・生育を有利にしていることが知られている。発酵食品では、乳酸菌の働きによって独特の風味を付与するだけでなく、その特徴を活かし、乳酸菌が生産する種々の抗菌物質を保存性の向上に利用している。長い歴史の中で培われてきた発酵食品中の乳酸菌とその抗菌物質の働きを活用できれば、発酵食品だけでなく一般の食品においても安全な微生物制御の実現が期待できる。

乳酸菌が生産する主な抗菌物質は乳酸などの有機酸であるが、菌株によっては、バクテリオシンと総称される抗菌ペプチドを生産するものもある<sup>1)</sup>。バクテリオシンは、細菌によってリボソーム上で合成される抗菌ペプチドで、様々な細菌種で報告例がある。とくに、前述のように食品との関わりが深い乳酸菌が生産するバクテリオシンは、食品保存への利用の可能性から、広く研究が行われて

きた<sup>2, 3)</sup>。乳酸菌が生産するバクテリオシンは、高い抗菌作用のみならず、一般に酸や熱に対して安定で、腸管内の消化酵素で容易に分解されるという食品保存への利用に適した性質を有している。また、細胞膜に瞬時に作用して抗菌作用を示すこと、容易に分解されて環境中に残留しないことから、耐性菌を生じにくいと考えられている。最近では、このような優れた特徴から、乳酸菌バクテリオシンの非食品用途への利用も試みられている。本稿では、とくに最も代表的な乳酸菌バクテリオシンであるナイシンを中心に、その性質と食品への利用について述べるとともに、非食品用途への利用と新奇乳酸菌バクテリオシンの探索について、我々の取り組みを紹介したい。

### 2. 乳酸菌が生産するバクテリオシン

#### 2.1. 一般的性質と分類

乳酸菌をはじめとするグラム陽性細菌が生産するバクテリオシンは、翻訳後修飾によって生じる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<sup>3, 4)</sup>。最も一般的な分類では、クラス II は、その構造と性質によって、さらにクラス IIa から IId の 4 つのサブクラスに分類される(表 1)。クラス I バクテリオシンもその構造などによってさらに細分化できる<sup>5, 6)</sup>。しかし、各クラス内の分類には、

\*To whom correspondence should be addressed.

Phone : +81-92-642-3021

Fax : +81-92-642-3021

E-mail : zendo@agr.kyushu-u.ac.jp

研究者間に相違があり、議論の余地を残している。

クラス I バクテリオシンは、翻訳後修飾によって生じるランチオニン等の異常アミノ酸を含むことから、ランチビオティックとも総称される。ランチオニンを含むペプチドは、単にランチペプチドと呼ばれることもある。最も代表的なクラス I バクテリオシンは、乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* に属する一部の菌株によって生産されるナイシン A である (図 1)。次項で詳しく触れるが、ナイシン A はグラム陽性細菌全般に高い抗菌活性を示し、広く食品保存料として実用されている。ナイシンの他にも、乳酸菌あるいは *Bacillus*、*Staphylococcus* などのグラム陽性細菌によって生産されるクラス I バクテリオシンが多数報告されている。構造中の異常アミノ酸は、クラス I バクテリオシンの強力な抗菌活性と高い安定性に寄与している

表 1. 乳酸菌が生産するバクテリオシンの分類

| クラス<br>(サブクラス) | 特徴                                                       | 我々の生産乳酸菌の発<br>見例                 |
|----------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|
| I              | 異常アミノ酸を含む、耐酸・耐熱性、<br>分子量 5,000 以下のバクテリオシン<br>(ランチビオティック) | ナイシン Q<br>エンテロシン W               |
| II             | 異常アミノ酸を含まない、耐酸・耐<br>熱性、分子量 10,000 以下のバクテ<br>リオシン         |                                  |
| IIa            | N 末端側に YGNGVXC の保存配列を<br>有する抗リステリア活性バクテリオ<br>シン          | ベディオシン PA-1<br>ムンジチン             |
| IIb            | 相乗作用を示す 2 つのペプチドによ<br>って構成されるバクテリオシン                     | ラクトコッシン Q<br>エンテロシン X            |
| IIc            | N 末端と C 末端がペプチド結合した<br>環状バクテリオシン                         | ラクトサイクリン Q<br>ロイコサイクリン Q         |
| II d           | 上記以外のクラス II バクテリオシン                                      | ラクティシン Q<br>ラクティシン Z<br>ガルビエシン Q |

ことが明らかとなっている。

一方、クラス II バクテリオシンは、ランチオニン等の異常アミノ酸を含まず、一般のアミノ酸のみで構成されている (図 2)。クラス IIa バクテリオシンは、*Listeria* に対してとくに強い抗菌活性を示すことから、抗リステリアバクテリオシンとも呼ばれている。また、ナイシンに続く実用化が期待されるベディオシン PA-1/AcH に代表されることから、ベディオシン様バクテリオシンとも総称される。クラス IIa バクテリオシンは、N 末端側にベディオシンボックスと呼ばれる YGNGVXC の保存配列を有するという構造上の特徴も有している。クラス IIb バクテリオシンは、2 つのペプチドが相乗的に抗菌活性を示し、2-ペプチドバクテリオシンとも呼ばれる。各ペプチド単独では、抗菌活性を全く示さないか、きわめて微弱で、2 つのペプチドが 1:1 のモル比で存在するときに最も高い相乗作用を示す。このような特徴をもつバクテリオシンは、ラクティシン 3147 やエンテロシン W などのクラス I バクテリオシンにも見られる。クラス IIc には、N 末端と C 末端がペプチド結合をした環状構造をもつバクテリオシンが分類される。環状バクテリオシンとも呼ばれ、この環状構造が高い抗菌活性と安定性に寄与していると考えられる。この環状構造は、翻訳後修飾によって生じるため、環状バクテリオシンをクラス I・II とは独立したクラスとして分類することを提唱する研究者もいる。クラス II d は、クラス IIa ~ c には属さないクラス II バクテリオシンが分類される。したがって、クラス II d には構造や性質にあまり共通性のない種々雑多なバクテリオシンが分類されており、今後類似したものが発見されてくれば、分類を再考する必要があるだろう。

2.2. ナイシンの特徴

先に述べたように、ナイシンは *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* に属する一部の菌株によって生産され、強力な抗菌活性を有することから食品保存料として応用され、その構造、生合成機構、作用機構などについて、広く研究が行われている<sup>7)</sup>。食品保存料として認められているのは

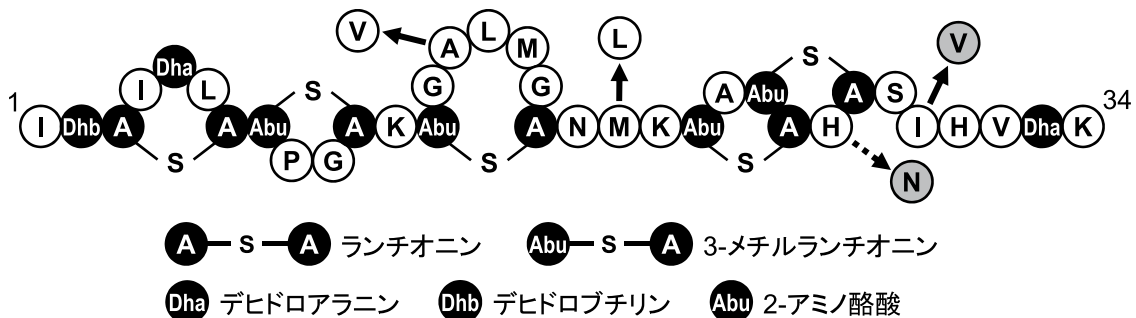


図 1. ナイシン A の構造  
黒色のアミノ酸残基は、翻訳後修飾で生じる異常アミノ酸を示す。破線矢印はナイシン Z、灰色はナイシン F で異なるアミノ酸残基を示す。ナイシン Q では矢印で示した 4 つ全てのアミノ酸残基が異なる。

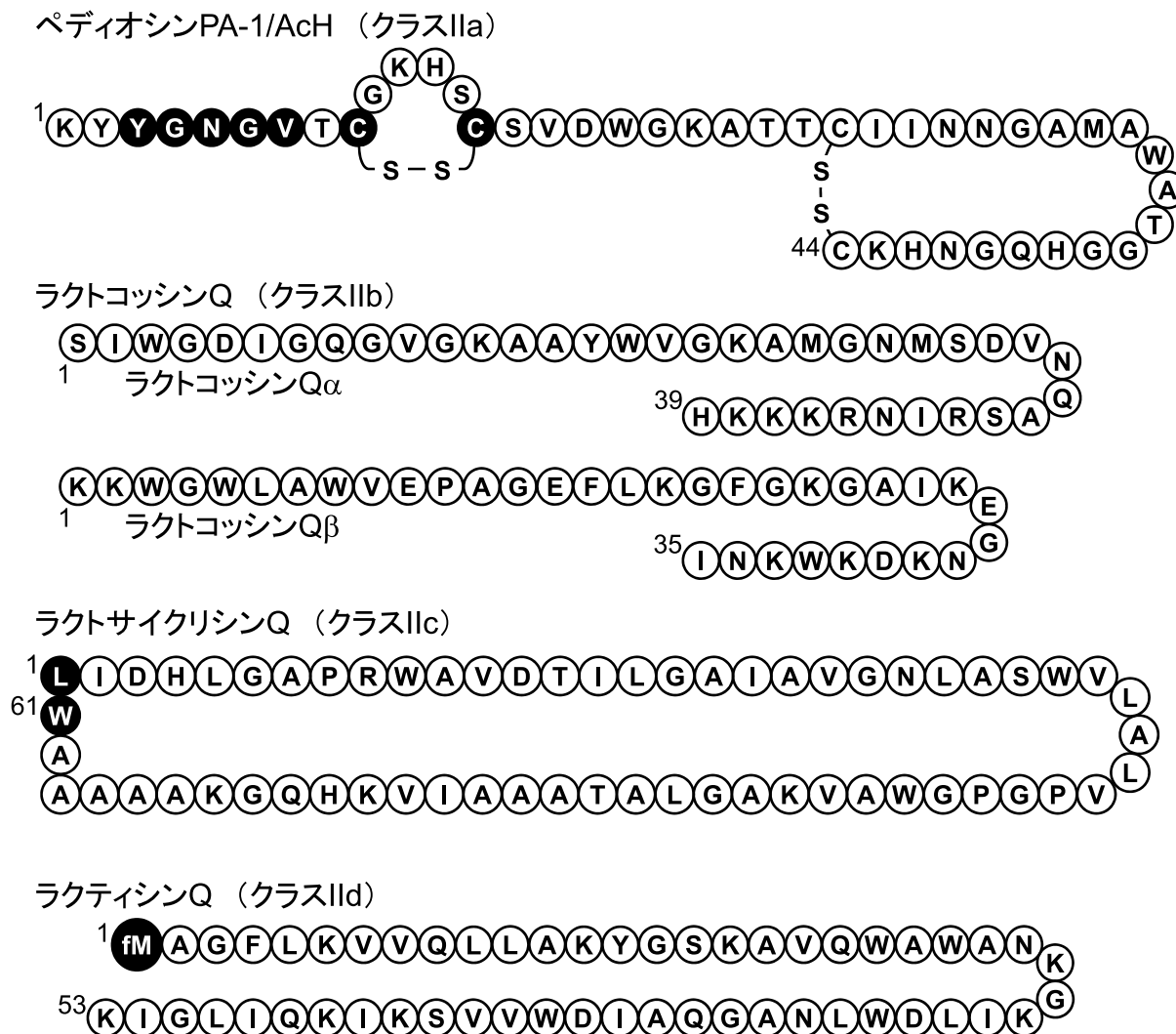


図2. クラスIIバクテリオシンの構造

ペディオシン PA-1/AcH は、黒色で示したクラス IIa バクテリオシンに特有の保存配列を有する。ラクトコッシン Q は、2つのペプチドによって構成される。ラクトサイクリシン Q は、黒色で示した N 末端と C 末端のアミノ酸残基がペプチド結合した環状構造を有する。ラクティシン Q は、黒色で示した N 末端のメチオニン残基がホルミル化されている。

最初に発見されたナイシン A のみであるが、ナイシン Z、Q、F など、アミノ酸が 1～4 残基異なる類縁体も報告されている (図 1)。いずれも 34 残基のアミノ酸で構成され、1つのランチオニンと 4つの 3-メチルランチオニンによる計 5つのモノスルフィド結合の架橋構造と、脱水アミノ酸であるデヒドロアラニンを 1つ、デヒドロプロチリン 2つを有している。

各ナイシン類縁体は同様の生合成機構によって生産され、ナイシンに含まれるランチオニンなどの異常アミノ酸は、ナイシン生合成遺伝子群に存在する修飾酵素による翻訳後修飾によって生じる (図 3)。ナイシン A を例にすると、最初にナイシン A 構造遺伝子 *nisA* が転写・翻訳され、23 アミノ酸残基のリーダーペプチドを伴う計 57 アミノ酸残基のナイシン A 前駆体が合成される。この前駆体が、NisB による脱水、NisC による架橋 (環化) を経て、ABC

トランスポーターである NisT によって、菌体外に分泌される。最後に、NisP によってリーダーペプチドが切断されて、成熟型のナイシン A となる。ナイシン生合成遺伝子群には、他に自己耐性や生産制御に関する遺伝子もある。ナイシン生産菌は、生産したナイシンから自身を守るために 2種類の自己耐性機構を有している。一つは NisI によるナイシンの吸着、もう一つは NisFEG によって構成される ABC トランスポーターによるナイシンの排出である。また、ナイシンの生産は、ナイシン自身を誘導因子とする二成分制御系によって制御されている。細胞膜上に存在する NisK が菌体外のナイシンを感知し、NisR へのリン酸基のリレーによって、ナイシン生合成遺伝子群中のプロモーターを活性化し、ナイシンの生産が誘導される。

ナイシンは、細菌細胞の表面に存在するペプチドグリカン前駆体であるリピド II を標的として作用する<sup>5, 8)</sup>。リ

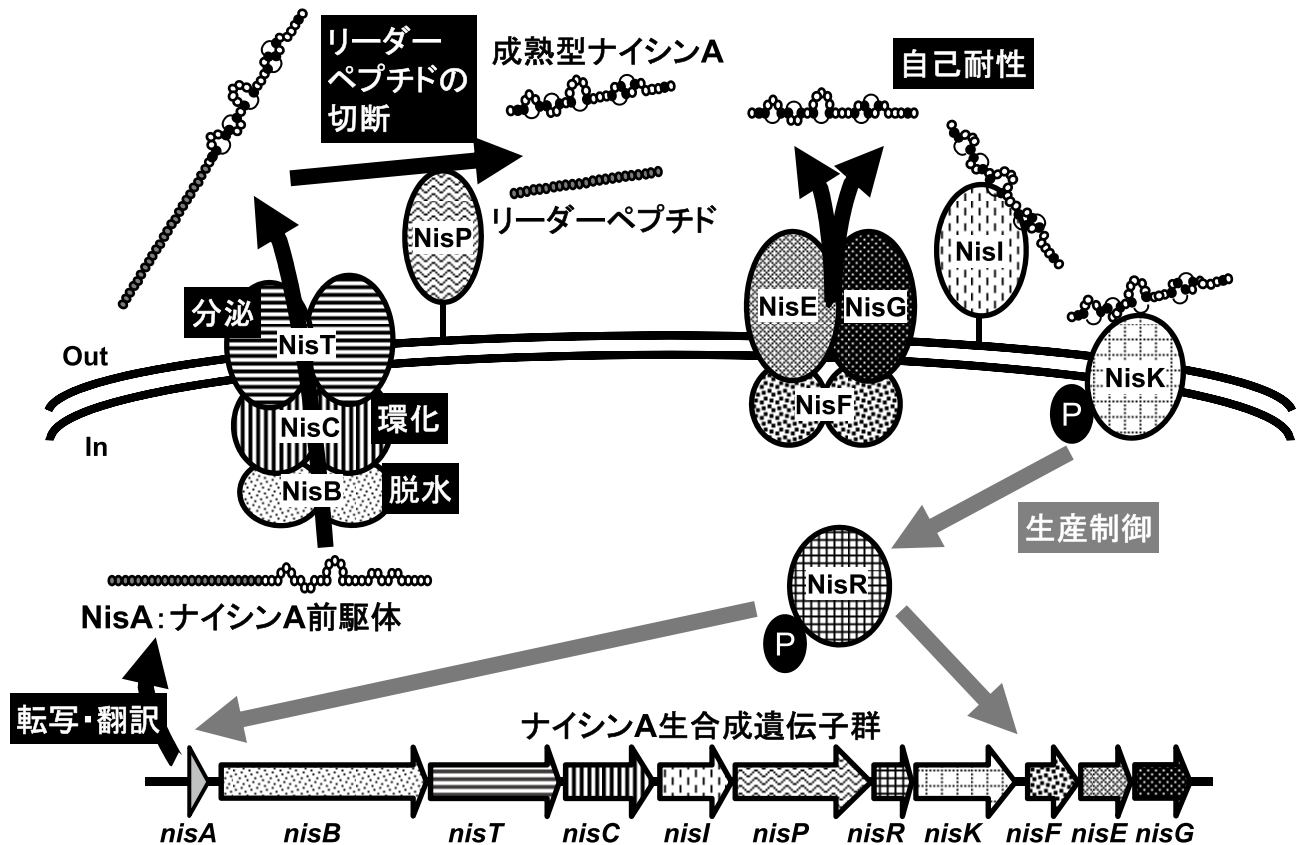


図3. ナイシンAの生合成機構

前駆体 NisA が、脱水・環化（翻訳後修飾）されて菌体外に排出され、最後にリーダーペプチドが切断されて成熟型のナイシンとなる。自己耐性や生産制御に関わるタンパク質も同じ生合成遺伝子群に存在する。ナイシンZやQも同様の機構で生合成される。

ピドIIを足掛かりとして、細胞膜に孔を形成し、ATPやイオンなどの細胞内容物を溶出させることで、殺菌的な抗菌作用を示す。この一連の過程は瞬時に起こり、リポドIIがグラム陽性細菌の表面に普遍的に存在することから、ナイシンに対する耐性は生じにくいと考えられている。さらに、最近では、ナイシンが低濃度の場合には、リポドIIへの結合による細胞壁合成阻害によって抗菌作用を示すことが明らかとなった。また、多くのクラスIバクテリオシンがナイシンと同様に、リポドIIを標的分子として作用することが明らかとなっている<sup>5, 9)</sup>。

一方、細胞の最も外側に外膜をもつグラム陰性細菌に対しては、ナイシンは細胞膜上のリポドIIに到達することができず、抗菌作用を及ぼすことができない。グラム陰性細菌の外膜はナイシンを使用する上で文字通りの障壁となっている。しかし、外膜を突破しさえすれば、ナイシンもグラム陰性細菌に対して、抗菌活性を示す。例えば、外膜の構造を変化させるキレート剤を併用することで、ナイシンは外膜を透過することができ、グラム陰性細菌にも抗菌活性を示すことが知られている。ナイシンとは異なりリポドIIを標的分子にしない場合にも、ある種のクラスIIバクテリオシンが細胞膜上の糖取り込みのトランスポー

ターを標的とするように、多くのバクテリオシンは細胞膜上の分子を標的に作用すると予想され、キレート剤との併用はグラム陰性細菌への抗菌スペクトルの拡大への有効な手段と考えられる。

### 3. ナイシン利用の展開

#### 3.1. 食品への利用

ナイシンの食品保存料としての歴史は60年以上を遡ることができる<sup>10)</sup>。ペニシリンと時をほぼ同じくして1920年代に発見されたナイシンは、1950年代にはチーズへの利用が検討され始め、ナイシン製剤である「Nisaplin（ニサプリン）」が商品化された。その後、WHOとFAOによって認可され、米国FDAでは一般に安全と認められ（GRAS）、現在では50ヶ国以上で食品保存料として利用されている。日本においては、2009年3月2日に食品添加物（保存料）として指定され、食品保存料としての使用が可能となった<sup>7)</sup>。

食品保存料としてのナイシンは、ナイシンAを2.5%含有し、乳培地の成分や塩化ナトリウムを含むナイシン製剤（Nisaplin）である。ナイシンはグラム陽性細菌に

強い抗菌活性を示すため、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属、*Staphylococcus* 属、*Listeria* 属などの食品汚染菌や食中毒菌が問題となる、チーズ、乳製品、缶詰、液卵などが主な使用対象で、各国で対象食品や使用許容量が定められている<sup>11)</sup>。とくに、低温での保存ができない食品や、低温で増殖する微生物が問題となる食品、加熱処理ができない食品が使用対象となる。日本においても、食品添加物への指定に際し、乳培地由来のナイシン製剤の規格と各国での使用基準に準じて、食品添加物「ナイシン」の成分規格、使用基準等が定められた。詳細は厚生労働省の発表を確認されたいが、成分規格には、乳アレルギーを低減でき、かつ高純度のナイシンが得られる糖培地が加えられ、使用用途には味増が加わっているのが特徴である<sup>7)</sup>。

### 3.2. 非食品用途への利用

ナイシンは優れた特性を有することから、非食品用途への利用も検討されている。とくに、容易に分解されて残留せず、食べても安全であることから、種々の問題を抱えている従来の抗菌剤との代替が多方面で検討されている。しかしその一方では、グラム陰性細菌などへの微弱な抗菌活性や、低純度、高価格など、克服すべき課題がある。我々も非食品用途への利用と課題の解消を試みてきたので、簡単に紹介したい<sup>3, 7)</sup>。

①ナイシンを主剤とした手指用殺菌洗浄剤を開発した。中性からアルカリ性域では不安定で、酸性域では安定なナイシンと配合可能な界面活性剤のスクリーニングを行い、洗浄成分および殺菌主剤として使用可能な界面活性剤を選定することができた。洗浄成分として使用可能な非イオンあるいは両性界面活性剤の一部には、ナイシンとの併用による相乗的な抗菌作用の増強が認められた。既存殺菌成分である陽イオン界面活性剤とナイシンを併用した開発品は、広範な抗菌スペクトルと高い殺菌力を示し、グラム陰性細菌に対しても十分な殺菌作用を示した。

②ナイシンを利用した牛乳房炎の予防剤・治療剤を開発した<sup>12)</sup>。乳房炎の予防には、搾乳前後にヨード剤が広く使用されているが、乳房炎起因菌の残存や出荷乳中のヨード剤残留が問題視される場合があり、より効果的で安全な乳頭消毒剤が求められている。一方、抗生物質による治療は耐性菌の出現を助長する場合があり、耐性菌を誘導しにくく、かつ安全性が高い乳房内注入用の抗菌剤も求められている。このような理想的な乳房炎予防剤・治療剤に求められる条件は、まさにナイシンの特性に合致している。ナイシンとクエン酸などを含有する乳房炎予防剤（乳頭消毒剤）は、既存の市販品と同等の抗菌効果を実現し、規定時間内（60秒）で99.9%以上の強力な殺菌効果をグラム陽性・陰性両方の乳房炎原因菌に示した。また、ナイシンと油性軟膏から成る乳房炎治療剤（乳頭注入剤）は潜在性乳房炎および軽度の臨床型乳房炎に対してとくに優れた治療効果を示した。食品添加物グレードの高い安全性を有するナイ

シンを利用した乳房炎予防剤・治療剤は、優れた抗菌効果のみならず、残留薬剤に対する懸念の解消、さらには休薬期間の短縮による廃棄乳量の低減も実現でき、従来のヨード剤や抗生物質に代わるものとして大いに期待される。

③上記のような洗浄剤や治療剤への利用には、高純度かつ低価格のナイシンが求められる。そこで我々は、乳酸菌用の培地として、とくに九州地方で廃棄処理方法が問題となっている焼酎蒸留粕に着目し、ナイシンの低コスト大量生産を試みている。また、従来の高濃度の食塩を使用する塩析法ではなく、新規無塩分離法を採用することでナイシンの高純度化を可能とした。また、分離工程で発生する発酵残渣は機能性発酵調味液として有効に活用することができた。このように、ものづくりと廃棄物の有効利用を両立し、かつ残渣を出さない環境調和型生産プロセスを構築することができ、低価格化にはさらに検討が必要ではあるが、高純度のナイシンを得ることが可能となった。

④ナイシンと梅エキスを組み合わせた口腔用抗菌剤（ネオナイシン）を開発した<sup>13)</sup>。ナイシンは、梅エキスに含まれ、キレート作用をもつクエン酸との相乗作用によって、グラム陽性の虫歯菌（*Streptococcus mutans*）のみならず、グラム陰性の菌周病菌（*Porphyromonas gingivalis*）にも高い抗菌活性を示す。さらに、このネオナイシンを配合した口腔ケア剤を開発した（[図4](#)）<sup>14)</sup>。ナイシンと梅エキス以外も可食天然成分のみを使用し、飲み込んでも安心な歯磨きジェルを実現できた。誤飲しやすく口腔ケアが困難な要介護高齢者や重度心身障がい者、乳幼児などによる利用が見込まれる。

### 3.3. 顕在化しうる問題点とその対応

前述のように、ナイシンのグラム陰性細菌への抗菌スペクトルの拡大や高純度化にはある程度目途が立っているものの、低コスト化をさらに図る必要がある。ほかにも、ナイシンを使用していく上で考慮すべき点が大まかに三つある。一つは安定性である。ナイシンは酸性領域では安定であるものの、中性からアルカリ性領域では、安定性が低い。酸化による抗菌活性の低下が問題となる可能性もある。二つめは、抗菌スペクトルである。ナイシンはグラム陽性細菌全般に広い抗菌スペクトルを有するものの、抗菌活性の低い菌種もある。三つめは、耐性菌である。実用におけるナイシン耐性菌出現の報告例は未だ無く、上述のようにナイシン耐性菌はきわめて生じにくいと考えられるものの、実験室レベルではナイシン耐性菌が得られることが知られている。いかなる抗菌物質にも付きまとう懸念ではあるが、今後、継続使用によるナイシン耐性菌の出現の可能性もゼロではない。これまでに抗生物質耐性菌が蔓延した経緯から学び、対策を講じておくことが必要である。

これらの問題点を解決する手段の一つとして、多様なバクテリオシンの利用が考えられる。前述したように、乳酸菌バクテリオシンには、ナイシン以外にも多種多様なもの



図4. ナイシンの非食品用途への利用例

口腔ケア製品「オーラルピース・歯磨き & 口腔ケアジェル」(左)と「オーラルピース・マウスプレー & ウォッシュ」(右)。どちらも可食成分のみから成り、飲み込んでも害がない。

が見出されている。例えば、*Listeria* 属細菌に対しては、ペディオシン様バクテリオシンの方がナイシンよりも高い活性を有し、より効果的な制御が可能と考えられる。このように、それぞれの用途に合った性質をもつバクテリオシンを適材適所に用いることで、有害菌のみを少量で効果的に抑制し、無用の耐性菌を生じない、より高度な微生物制御の実現が期待される。そのためには、優れた性質をもつ多様な新奇乳酸菌バクテリオシンを得る必要がある。

#### 4. 新奇乳酸菌バクテリオシンの探索

##### 4.1. 迅速スクリーニング法の構築

多様な新奇バクテリオシンを得るには、多数の乳酸菌を迅速に評価することが重要となる。そこで、スクリーニングの初期段階でバクテリオシンの新奇性の判定を行い、迅速化を図ることとした。様々な分離源から得られた乳酸菌分離株の培養液上清を試料とし、抗菌スペクトルと分子量を新奇性の指標とした。バクテリオシン高感受性株として設定した6～12株の検定菌に対する、培養液上清の抗菌スペクトルを抗菌活性の強度として数値化し、主成分分析等で解析することで、抗菌スペクトルをグループ化し、新奇性を判定することができる。また、LC/MSによってナイシンを含む数種のバクテリオシンを培養液上清から検出することができる<sup>15)</sup>。抗菌スペクトルの解析とLC/MSによる分子量の解析を組み合わせることで、スクリーニングの初期段階において、ナイシンなどの既知のバクテリオシンを除外し、新奇性の高いバクテリオシンを効率的に選抜することが可能となった<sup>16)</sup>。

##### 4.2. 新奇乳酸菌バクテリオシンの構造と特徴

構築した迅速スクリーニング法によって、様々なクラス・サブクラスに属する、多種多様な新奇乳酸菌バクテリオシ

ンを見出すことができた(表1)<sup>16)</sup>。その中から、代表的なものを数例紹介する。

福岡県の河川水から分離された*L. lactis* 61-14が新しいナイシン類縁体を生産することが明らかとなり、これをナイシンQと命名した<sup>17)</sup>。ナイシンQは、ナイシンAとは4残基が異なるものの同様の抗菌スペクトルと架橋パターンを有しており、ナイシンAとほぼ同様の生合成機構によって生産されることが明らかとなった(図1、3)<sup>18, 19)</sup>。ナイシンAは抗菌活性に重要な中央部分のヒンジ領域に酸化されやすいメチオニン残基を有しており、このメチオニン残基の酸化による抗菌活性の低下が実用時の問題となる。一方、このメチオニンがロイシンに置換したナイシンQは酸化の影響を受けにくいことが明らかとなり<sup>19)</sup>、食品保存料等への利用に有利と考えられる。

トウモロコシから分離された*L. lactis* QU 5が、新奇バクテリオシン、ラクティシンQを生産することが明らかとなった(図2)<sup>20)</sup>。ラクティシンQは、ナイシンと同様に広い抗菌スペクトルと高い抗菌力を有し、ナイシンに続くバクテリオシンとして期待される。とくに、ナイシンの安定性が低下する中性～弱アルカリ性領域において高い安定性を有するため、ナイシンには不利な条件での利用が期待できる。ラクティシンQは特定の標的分子を必要とせずにきわめて迅速に細菌細胞膜に作用し、小さなタンパク質をも流出させる大きな孔を形成することが明らかとなり、この作用機構を「Huge Toroidal Pore Model」と命名した<sup>21, 22)</sup>。さらに、馬の腸管より分離された*L. lactis* QU 14が、ラクティシンQの3つのアミノ酸残基が置換されたラクティシンZを生産することを見出した<sup>23)</sup>。いずれも、N末端のアミノ酸残基は開始コドンに対応するホルミルメチオニンで、さらに生合成遺伝子群を解析した結果、ラクティシンQ・Zは、一般的なバクテリオシンとは異なり、リーダーペプチドなしで合成・分泌されることが明らかと

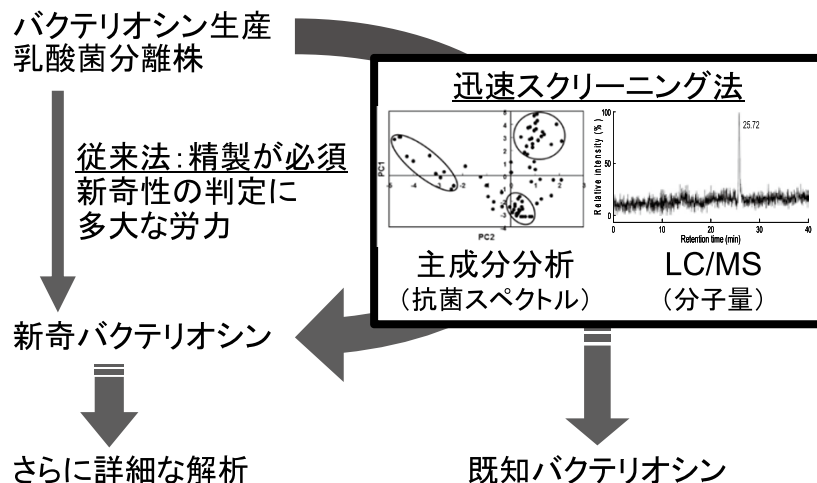


図5. 新奇乳酸菌バクテリオシンの迅速スクリーニング法  
乳酸菌分離株の培養液上清を用いて、抗菌スペクトルと分子量の解析を行う  
ことで、バクテリオシンの新奇性をスクリーニングの初期段階で判定できる。

なった<sup>24, 25)</sup>。このようなリーダーレスバクテリオシンは、菌体内で翻訳後すぐに活性を有するため、他の一般的なバクテリオシンとは異なる生合成機構を有していることが予想される<sup>26)</sup>。

チーズの製造工程より分離された *Lactococcus* sp. QU 12 が、N 末端と C 末端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を生産することが明らかとなり、これをラクトサイクリン Q と命名した (図2)<sup>27)</sup>。また、赤カブ漬けから分離された *Leuconostoc mesenteroides* TK41401 がラクトサイクリン Q に類似の構造をもつ新奇環状バクテリオシン、ロイコサイクリン Q を生産することを明らかとなった<sup>28, 29)</sup>。これらの環状バクテリオイシンは各属由来として、初めての環状バクテリオシンの報告例となった。これらの環状バクテリオイシンはいずれも高い構造安定性を有しており、バクテリオシン自体の利用のみならず、環化・分泌機構および作用機構にも興味を持たれ、その機構を利用した新奇ペプチドの創出への展開も期待される<sup>26)</sup>。

構造の異なる複数のバクテリオシンを同時に生産する乳酸菌が多数見出された<sup>30, 31, 32)</sup>。これらの多成分バクテリオシン生産乳酸菌は、様々な環境に適応して、あるいはストレスなどに応答して、各バクテリオシンの生産を制御していることが明らかとなりつつある。例えば、発酵魚から分離された *Enterococcus faecium* NKR-5-3 は 5 種のバクテリオシンを生産し、そのうちの 1 つであるエンテロシン NKR-5-3D が 5 種のうち自身を含む 4 種の生産を誘導することが明らかとなった<sup>33, 34)</sup>。このような多成分バクテリオシン生産乳酸菌は、抗菌スペクトルの異なる複数のバクテリオシンを生産することで、発酵食品中や環境中で自身の生存を競合細菌よりも有利にしていると考えられる。このような機構を模倣することができれば、より効果的な微生物制御を実現できる可能性がある。

## 5. 今後の展望

最近では、バクテリオシンおよびその生産乳酸菌と作用機構について、いくつか興味深い知見が得られつつある。ラクトコッシン Q (図2) は、*L. lactis* のみに特異的に抗菌活性を示す<sup>35)</sup>。作用機構の詳細は未だ不明だが、このような菌種特異的な抗菌作用を示すバクテリオシンが他にもあることが明らかとなりつつある。特異的な抗菌作用をもたらす要因や機構を突き止めることができれば、有用菌に影響を与えずに狙った有害菌のみをピンポイントかつ確実に攻撃できる、まさに「魔法の弾丸」をデザインすることが可能となるかもしれない。ランチビオティックや環状バクテリオシン、リーダーレスバクテリオシンの生合成機構を活用し、新しい抗菌ペプチドの様々なデザインが可能となることも期待できる<sup>26, 36)</sup>。また、ある種の病原菌が二成分制御系によって、ナイシンなどのバクテリオシンを感知することが明らかになってきた<sup>37, 38)</sup>。対象菌の応答機構が明らかとなれば、バクテリオシンをより効果的に利用することが可能となろう。さらに、2 株のバクテリオシン生産乳酸菌の全ゲノム配列を得ることができた<sup>39, 40, 41)</sup>。両株ともキシロースなどからの乳酸発酵能に優れており、バクテリオシンの高生産にもゲノム情報の活用が望まれる。近年、ゲノム解析にかかる費用は劇的に低下しており、新奇バクテリオシン探索の方法も大きく変化することが考えられる。

一方、乳酸菌バクテリオシンの拡大する用途に合わせた、より効果的な使用方法の開発も重要である。食品保存料としてバクテリオシンを用いる場合、バクテリオシンが食品成分に吸着してしまい、効果が持続しにくいという問題が生じる場合がある。その解決法の一つとして、バクテリオシンを食品包装用のフィルム剤に添加する方法がある<sup>42)</sup>。バクテリオシン生産乳酸菌をスターターあるいは非スター

ターとして添加し、食品中でバクテリオシンを直接生産させるという方法もある<sup>43, 44)</sup>。減塩した発酵食品における汚染菌の制御にはとくに有効であろう(善藤: 化学工学、生物工学)<sup>45, 46)</sup>。この場合は複数のバクテリオシンや乳酸などの他の抗菌成分の相乗作用も期待できる。このような相乗効果を有効に利用したい場合には、種々の抗菌物質の混合物として乳酸菌培養液上清を利用することも考えられる。ある種のバイオフィルムに対してナイシンなどのバクテリオシンが有効で、ナイシンをリポソームに封入することで抗菌効果が持続することなども明らかになってきている<sup>47, 48)</sup>。

このように、ナイシンは食品のみならず、様々な分野への展開が試みられ、ナイシンとは性質の異なる乳酸菌バクテリオシンも多数見出されてきている。乳酸菌バクテリオシンの用途は、食品保存料に始まり、上述した医薬品関連のほか、畜水産飼料における抗生物質や化粧品における保

存料の代替など、安全な抗菌物質が求められる多くの分野に拡大すると考えられる。将来的には、得られた多様なバクテリオシンの中から、用途に応じた最適なバクテリオシンの選択が望まれる。対象に最適なバクテリオシンを選択できれば、より効果的に対象菌を制御できるのはもちろんのこと、耐性菌を生じるリスクが大きく低減される。そのため、安全性も含め、各バクテリオシンの特性や作用機構に関する情報を充実させる必要がある。

## 謝 辞

本稿での研究成果は、経済産業省、農林水産省、文部科学省等による多くの研究支援によるものです。関係の皆様、共同研究者の皆様にご感謝申し上げます。また、口腔用抗菌剤・歯磨きジェルにつきまして、株式会社優しい研究所・永利浩平氏をはじめとする関係の皆様にご厚く御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) 善藤威史, 米山史紀, 澤 稔彦, 園元謙二: 乳酸菌が生産する抗菌物質. 防菌防黴, 37, 903-911 (2009).
- 2) 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二: 乳酸菌バクテリオシンとその応用研究. 防菌防黴, 34, 277-283 (2006).
- 3) 石橋直樹, 善藤威史, 園元謙二: 乳酸菌バクテリオシン—戦略的な探索・発見・活用とゼロエミッションPJまで—. 日本乳酸菌学会誌, 22, 38-48 (2011).
- 4) Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P.: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777-788 (2005).
- 5) Islam, M. R., Nagao, J., Zendo, T., and Sonomoto, K.: Antimicrobial mechanism of lantibiotics. *Biochem. Soc. Trans.*, 40, 1528-1533 (2012).
- 6) Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C.: Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 95-105 (2013).
- 7) 善藤威史, 澤 稔彦, 米山史紀, 園元謙二: 乳酸菌由来抗菌性ペプチド, ナイシン—その基礎と利用. 乳業技術, 59, 77-86 (2009).
- 8) Zendo, T., Yoneyama, F., and Sonomoto, K.: Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 88, 1-9 (2010).
- 9) Islam, M. R., Nishie, M., Nagao, J., Zendo, T., Keller, S., Nakayama, J., Kohda, D., Sahl, H.-G., and Sonomoto, K.: Ring A of nukacin ISK-1: a lipid II-binding motif for type-A(II) lantibiotic. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 3687-3690 (2012).
- 10) Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., and Hugenholtz, J.: Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 193-202 (1996).
- 11) Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L.: Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 1-20 (2001).
- 12) 北崎宏平, 馬場武志, 古賀康弘, 桑野剛一, 福田浩章, 河田恵美, 高巢祐介, 竹花稔彦, 古賀祥子, 永利浩平, 島田信也, 農 新介, 林 龍鶴, 前田幸子, 川崎貞道, 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二: ナイシン A を利用した酪農分野における牛感染症防除. *FFI ジャーナル*, 215, 449-456 (2010).
- 13) ネオナイシン: <http://neonisin.com/>
- 14) オーラルピース: <http://oralpeace.com/>
- 15) Zendo, T., Nakayama, J., Fujita, K., and Sonomoto, K.: Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 499-507 (2008).
- 16) Zendo, T.: Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 893-899 (2013).
- 17) Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 1616-1619 (2003).
- 18) Fukao, M., Obita, T., Yoneyama, F., Kohda, D., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Complete covalent structure of nisin Q, the new natural nisin variant, containing post-translationally modified amino acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1750-1755 (2008).
- 19) Yoneyama, F., Fukao, M., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Biosynthetic characterization and biochemical features of the third natural nisin variant, nisin Q, produced by *Lactococcus lactis* 61-14. *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1982-1990 (2008).



- 20) Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: 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 (2007).
- 21) Yoneyama, F., Imura, Y., Ichimasa, S., Fujita, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., and Sonomoto, K.: Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 538-541 (2009).
- 22) Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., and Sonomoto, K.: Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 3211-3217 (2009).
- 23) Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1984-1992 (2007).
- 24) Iwatani, S., Yoneyama, F., Miyashita, S., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Identification of the genes involved in the secretion and self-immunity of lacticin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. *Microbiology*, **158**, 2927-2935 (2012).
- 25) Iwatani, S., Horikiri, Y., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Bifunctional gene cluster *InqBCDEF* mediates bacteriocin production and immunity with differential genetic requirements. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 2446-9 (2013).
- 26) Masuda, Y., Zendo, T., and Sonomoto, K.: New type non-lantibiotic bacteriocins: circular and leaderless bacteriocins. *Benef. Microbes*, **3**, 3-12 (2012).
- 27) Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Identification and characterization of lactocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 1552-1558 (2009).
- 28) Masuda, Y., Ono, H., Kitagawa, H., Ito, H., Mu, F., Sawa, N., Zendo, T., and Sonomoto, K.: Identification and characterization of leucocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 8164-8170 (2011).
- 29) Mu, F., Masuda, Y., Zendo, T., Ono, H., Kitagawa, H., Ito, H., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Biological function of a DUF95 superfamily protein involved in the biosynthesis of a circular bacteriocin, leucocyclicin Q. *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 158-164 (2014).
- 30) Hu, C.-B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4542-4545 (2010).
- 31) Sawa, N., Okamura, K., Zendo, T., Himeno, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15. *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 282-291 (2010).
- 32) Sawa, N., Koga, S., Okamura, K., Ishibashi, N., Zendo, T., and Sonomoto, K.: Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. *J. Appl. Microbiol.*, **115**, 61-69 (2013).
- 33) Ishibashi, N., Himeno, K., Fujita, K., Masuda, Y., Perez, R. H., Zendo, T., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Purification and characterization of multiple bacteriocins and an inducing peptide produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai fermented fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 947-953 (2012).
- 34) Perez, R. H., Himeno, K., Ishibashi, N., Masuda, Y., Zendo, T., Fujita, K., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Monitoring of the multiple bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 through a developed liquid chromatography and mass spectrometry-based quantification system. *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 490-496 (2012).
- 35) Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3383-3389 (2006).
- 36) 奥田賢一, 永尾潤一, 園元謙二: ランチビオティック: その特性と次世代ペプチドデザイン技術の開発. *化学と生物*, **47**, 91-97 (2009).
- 37) Kawada-Matsuo, M., Yoshida, Y., Zendo, T., Nagao, J., Oogai, Y., Nakamura, Y., Sonomoto, K., Nakamura, N., and Komatsuzawa, H.: Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, nukacin ISK-1 and nisin A, in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, **8**, e69455 (2013).
- 38) Kawada-Matsuo, M., Oogai, Y., Zendo, T., Nagao, J., Shibata, Y., Yamashita, Y., Ogura, Y., Hayashi, T., Sonomoto, K., and Komatsuzawa, H.: Involvement of the novel two-component NsrRS and LcrRS systems in distinct resistance pathways against nisin A and nukacin ISK-1 in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 4751-4755 (2013).
- 39) Kato, H., Shiwa, Y., Oshima, K., Machii, M., Araya-Kojima, T., Zendo, T., Shimizu-Kadota, M., Hattori, M., Sonomoto, K., and Yoshikawa, H.: Complete genome

- sequence of *Lactococcus lactis* IO-1, a lactic acid bacterium that utilizes xylose and produces high levels of L-lactic acid. *J. Bacteriol.*, **194**, 2102-2103 (2012).
- 40) Shimizu-Kadota, M., Kato, H., Shiwa, Y., Oshima, K., Machii, M., Araya-Kojima, T., Zendo, T., Hattori, M., Sonomoto, K., and Yoshikawa, H.: Genomic features of *Lactococcus lactis* IO-1, a lactic acid bacterium that utilizes xylose and produces high levels of L-lactic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1804-1808 (2013).
- 41) Shiwa, Y., Yanase, H., Hirose, Y., Satomi, S., Araya-Kojima, T., Watanabe, S., Zendo, T., Chibazakura, T., Shimizu-Kadota, M., Yoshikawa, H., and Sonomoto, K.: Complete genome sequence of *Enterococcus mundtii* QU 25, an efficient L-(+)-lactic acid-producing bacterium. *DNA Res.*, in press (2014).
- 42) Woraprayote, W., Kingcha, Y., Amonphanpokin, P., Krueenate, J., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S., and Visessanguan, W.: Anti-listeria activity of poly(lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork. *Int. J. Food Microbiol.*, **167**, 229-235 (2013).
- 43) Swetwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Maturation of Nham - a Thai fermented meat product, Effect of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella anatum* during Nham fermentation. *Fleishwirtschaft International*, **22**, 46-49 (2007).
- 44) Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Chareonpornsook, K., Valyasevi, R., Sonomoto, K., and Visessanguan, W.: Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. *Food Control*, **25**, 190-196 (2012).
- 45) 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二: バイオプリザベーション-乳酸菌バクテリオシンの利用-。化学工学, **53**, 94-100 (2002)。
- 46) 善藤威史, 島田信也, 谷本保英, 相馬さやか, 中山二郎, 園元謙二: 乳酸菌のバクテリオシンを利用するバイオプリザベーション。生物工学, **80**, 569-573 (2002)。
- 47) Yamakami, K., Tsumori, H., Sakurai, Y., Shimizu, Y., Nagatoshi, K., and Sonomoto, K.: Sustainable inhibition efficacy of liposome-encapsulated nisin on insoluble glucan-biofilm synthesis by *Streptococcus mutans*. *Pharm. Biol.*, **51**, 267-270 (2013).
- 48) Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., and Mizunoe, Y.: Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 5572-5579 (2013).

## Screening and applications of bacteriocins from lactic acid bacteria

Takeshi Zendo<sup>1\*</sup>, Naoki Ishibashi<sup>1</sup>, Kenji Sonomoto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University*

<sup>2</sup>*Bio-Architecture Center, Kyushu University*

### Abstract

Some strains of lactic acid bacteria (LAB) can produce antimicrobial peptides, bacteriocins. LAB bacteriocins generally exert antibacterial activity through quick action on bacterial cell membrane and can be degraded easily by intestinal digestive enzymes without leaving residues to the environment, which lets them considered as safe antimicrobial agents. In particular, nisin A produced by some strains of *Lactococcus lactis* has been being utilized as a food preservative in more than 50 countries including Japan. To realize safe microbial control using LAB bacteriocins, we have developed various applications of nisin A as well as discovered and characterized novel LAB bacteriocins with good properties for applications. In this review, we outline nisin A and other LAB bacteriocins and introduce our recent studies on applications of nisin A such as oral care agents, and screening and characterization of novel LAB bacteriocin such as lacticin Q and lactocyclin Q.