

研究紹介

Lactobacillus gasseri の生産する バクテリオシンの食品利用へ 向けた検討

荒川 健 佑

(応用動物科学コース)

Research into food preservation using a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri*

Kensuke Arakawa

(Course of Applied Animal Science)

Bacteriocins are natural antibacterial peptides ribosomally biosynthesized by bacteria. Gassericin T which is a bacteriocin produced by many strains of *Lactobacillus gasseri* has a broad antibacterial spectrum against food spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria; therefore, the bacteriocin and its producers are predicted for use as safe food preservatives. However, probiotic *Lb. gasseri* strains show poor growth and minimally produce gassericin T in food-grade natural media such as reconstituted cheese whey, unlike in MRS broth. The growth of *Lb. gasseri* in reconstituted cheese whey was improved by adding proteose peptone as a nutrient factor. The production of gassericin T in MRS broth was specifically inhibited by adding divalent metal cations, and then the inhibition was removed using a chelator of divalent cations, trisodium citrate dihydrate. The production of gassericin T in reconstituted cheese whey was also restored by adding trisodium citrate dihydrate, and the activity was enhanced by a surfactant, Tween 80. In addition, trisodium citrate dihydrate led to over-production of and synergistic antibacterial effect with gassericin T. In this study, we developed a cheese whey-based medium containing proteose peptone, trisodium citrate dihydrate and Tween 80 for gassericin T production. The developed food-grade medium may contribute to the effective use of some bacteriocins from probiotic lactic acid bacteria for biopreservation of foods.

Key words : Bacteriocin, *Lactobacillus gasseri*, Gassericin T, Biopreservation

緒 言

食品がその機能を十分に発揮するためには、食品の安全性を確保することが最低限必要である。食品に対するナチュラル志向が高まる現代において、過度の加熱処理

や化学合成された保存料の不適切な添加は、消費者に強く敬遠される傾向にある。そこで近年、長く人類に親しまれてきた天然由来の抗菌物質「バイオプリザバティブ」を利用した保存法「バイオプリザベーション」が人々の関心を集めている。中でも、食経験豊かな乳酸菌の生産する抗菌ペプチド「バクテリオシン」は有効なバイオプリザバティブの1つとして考えられており、その食品利用が期待されている¹⁾。その代表例として、世界50ヶ国以上で使用されている *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の生産するバクテリオシン「ナイシンA」が2009年に我が国でも食品添加物として新規指定されたことは記憶に新しい。

バクテリオシンは、細菌の遺伝情報に基づいてリボソーム上で生合成される分泌型抗菌ペプチドの総称で、一般的に pH や熱に対する安定性に優れ、微量で高い抗菌活性を示すことが知られている¹⁾。これらの特徴は、過酷な加工処理を要する多様な食品において、風味への影響を小さく抑えたままで、乳酸菌バクテリオシンの有効利用が可能であることを表している。また、摂取後に消化管内で容易に分解されるペプチド性であることは、乳酸菌バクテリオシンの優位性を高めている1つの要因となっている。さらに、比較的高分子で構造の多様性に富み、耐性菌の出現頻度が極めて低い¹⁾ことは、乳酸菌バクテリオシンの安全性を語る上で重要なポイントとなっている。

ヒトや家畜の腸内優占菌種である *Lactobacillus gasseri* は、経口摂取により宿主の健康に有益な効果をもたらす安全なプロバイオティクスとして広く認知されている。多くの *Lb. gasseri* 菌株は、二成分性のバクテリオシン「ガセリシンT (gassericin T, GT ; GatA, GatX)」を生産し、その遺伝情報は染色体上にコードされていることが明らかになっている^{2,3)}。GT は、熱や pH に非常に安定で、乳酸菌だけでなく、*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* および *Staphylococcus aureus* などのグラム陽性病原細菌に対しても高い抗菌効果を有する^{4,5)}ことから、食品への有効利用が期待されている。しかし、*Lb. gasseri* は、還元チーズホエー (reconstituted cheese whey, RCW) などの安価で食品利用可能な培地中で生育が緩慢で、GT 生産性に乏しいことが知られる⁶⁾。そこで本研究では、*Lb. gasseri* の生育性を改善した RCW 基礎培地を用いて、食品利用可能な GT 生産法を構築することとした。

材料および方法

使用菌株、培地、および培養条件

GT 生産菌株には、ヒト (6ヶ月齢♀) 糞便より単離した *Lb. gasseri* JCM 11064を用いた。バクテリオシン

活性測定に用いる指標菌には, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T を用いた. 両菌株は, 乳酸桿菌用の MRS 培地 (Difco) にて 37°C, 18 h の経代培養を 3 回行った後に各試験に供した. RCW (よつ葉乳業) における培養も同様に行い, 生育促進成分には 0.5% (w/v) プロテオースペプトン (proteose peptone, PP; Difco) を用いた. 両菌株の生育性は, 培養液の pH もしくは OD₆₀₀ における濁度を測定することにより観察した.

バクテリオシン活性測定

バクテリオシン活性測定は, JCM 1002^T 株を指標菌とした寒天拡散法 (agar-well diffusion method)²⁾ にて行った. 試験液となる培養上清は, 培養液を遠心分離 (5,000 g, 10 min, 4°C) した後に, ディスクフィルター (孔径 0.20 もしくは 0.45 μm, アドバンテック東洋) を用いた膜ろ過により回収した. 試験液の段階希釈には, 滅菌済み 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いた. バクテリオシンの活性値は, 生育阻止円の認められた最も低い希釈度の逆数と定義し, その単位を Arbitrary Unit (AU) で表した.

ガセリシン T 生産に及ぼす二価金属イオンの影響

GT 生産に及ぼす二価金属イオンの影響は, 各種二価金属塩 [CaCl₂, CaCO₃, Ca(CH₃COO)₂, MgCl₂, MgSO₄, MnSO₄ および FeSO₄; 1 mM] をそれぞれ添加した培地中で JCM 11064 株を培養し, 得られた培養上清の抗菌活性を測定することにより試験した. また, 二価金属イオン濃度による影響は, 1, 2, 3, 5 および 10 mM MgSO₄ を添加した MRS 培地を用いることで試験した.

ガセリシン T 活性に及ぼす二価金属イオンの影響

GT 活性に及ぼす二価金属イオンの影響は, JCM 11064 株の MRS 培地培養上清 (GT 溶液) を 10 mM MgSO₄ を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.7) を希釈液とした活性測定に供することで試験した. 対照の希釈液には, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いた.

クエン酸三ナトリウムによるガセリシン T 生産の回復

GT 生産の回復は, 10 mM MgSO₄ を含む MRS 培地に食品添加物規格の二価金属イオンキレート剤であるクエン酸三ナトリウム二水和物 (trisodium citrate dihydrate; TSC) を添加することにより試験した. 10, 20, 30, 50 および 100 mM TSC を添加した培地にて JCM 11064 株を培養した後, 培養液 (無添加を含む) の TSC 終濃度を 100 mM に調整し, 培養上清の抗菌活性を測定した.

GT と TSC の相乗的な抗菌効果は, JCM 11064 株の MRS 培地培養上清 (GT 溶液) に終濃度 10, 20, 30, 50 および 100 mM TSC を添加することにより検証した.

TSC を用いた PP-RCW からの GT 生産の回復は, PP-RCW に 10, 50 および 100 mM TSC を添加することで行った. さらに, GT 活性を高める目的で, 100 mM TSC を含む PP-RCW に食品添加物規格の各種界面活性剤 (Tween 80, モノオレイン酸グリセリル, モノオレイン

酸ソルビタン, 卵黄レシチン) を 0.1% (w/v) 濃度で添加し, JCM 11064 株を培養した.

in situ 抗菌活性測定によるガセリシン T の検出

培養上清中の抗菌活性本体が GT であることは, 培養上清を SDS-PAGE に供した後の *in situ* 抗菌活性測定²⁾ により確認した. *in situ* 抗菌活性測定では, まず, 泳動後の SDS-PAGE ゲルを固定・洗浄した. 固定には 20% (v/v) メタノールおよび 10% (v/v) 酢酸を含む混合液を用い, 洗浄には蒸留水を用いた. 次に, 洗浄後のゲル上に指標菌 JCM 1002^T 株を含んだ MRS 軟寒天培地を重層し, 37°C, 18 h 培養した. 培養後, 指標菌の生育阻止帯の位置によって GT の存否を確認した.

結果および考察

改良チーズホエーにおける *Lb. gasseri* JCM 11064 の生育性とガセリシン T 生産性

RCW において *Lb. gasseri* JCM 11064 は良好に生育しなかったが, PP を添加することにより MRS 培地と同等の生育性を獲得した (データは示していない). 各種アミノ酸, 核酸, 糖, ビタミンおよびミネラルを RCW に添加しても生育性の改善は見られなかったが, PP と同様にペプチド成分の混合物である酵母エキスを添加した場合のみ生育性の回復が見られた (データは示していない). これらの結果は, *Lb. gasseri* JCM 11064 の生育に, 遊離アミノ酸ではなく, ペプチド態が必須であることを示唆していた. 同様の傾向は, *Lb. gasseri* の異なる株や異種のいくつかの腸管由来乳酸桿菌においても見られた (データは示していない).

一方で, 良好な生育性は確認されたものの, PP-RCW 培養上清には GT 活性がほとんど検出されなかった. この要因には, GT 生産もしくは作用における何らかの成分が不足している, または何らかの成分がそれらを阻害している可能性が考えられた. そこで, GT 活性を十分に提示する MRS 培地成分を PP-RCW に添加することで GT 生産もしくは作用の回復を試みた. しかし, 培養上清に GT 活性の回復は検出されなかった (データは示していない). この結果は, GT 生産もしくは作用が PP-RCW 中の何らかの成分によって阻害されていることを示唆していた.

二価金属イオンによるガセリシン T 生産の阻害

MRS 培地と比較して PP-RCW 中に多量に含まれる二価金属イオンの GT 生産への影響を調べるために, MRS 培地に二価金属塩を添加し, *Lb. gasseri* JCM 11064 を培養した (いずれの二価金属塩の添加の場合も菌の生育に有意な差は認められなかった). その結果, CaCO₃ を除く二価金属塩 [CaCl₂, Ca(CH₃COO)₂, MgCl₂, MgSO₄, MnSO₄ および FeSO₄; 1 mM] の添加によって, 培養上清中の GT 活性は 19-37% に減少することが明らかとなった (Fig. 1). しかし, 水への溶解性が極端に低く, 二価

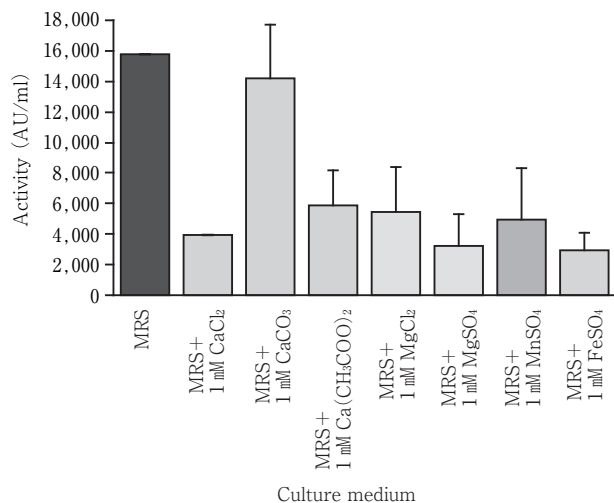


Fig. 1 Effect of divalent metal salts on GT production.

Lb. gasseri JCM 11064 was cultivated in MRS broth alone or MRS broth containing 1 mM of the metal salts indicated.

金属イオンを遊離しにくい CaCO₃ の添加では、GT 活性が90%維持された (Fig. 1)。このことから、GT 生産もしくは作用の阻害は、不溶性の二価金属塩ではなく、可溶性の二価金属イオンによって起こることが見出された。また、添加した二価金属イオン (MgCl₂) 濃度の上昇に従って培養上清の GT 活性が低下したことから、二価金属イオンによる GT 阻害は濃度依存的であることが明らかとなった (Fig. 2)。一価金属イオン (Na⁺ および K⁺) による有意な GT 阻害は確認されなかった (データは示していない)。

次に、二価金属イオンの阻害が GT 生産に対するものか、GT 作用に対するものか調べるために、MRS 培地培養上清 (GT 溶液) に二価金属イオン (10 mM MgSO₄) を添加し、活性測定を行った。その結果、GT 活性に増減はなく (データは示していない)、GT 作用は二価金属イオンに影響されない、つまり、GT 生産が二価金属イオンにより阻害されることが明らかとなった。

クエン酸三ナトリウムによるガセリシンT生産の回復

二価金属イオンによる GT 生産阻害を再確認するために、キレート剤 TSC を10, 20, 30, 50および100 mM の濃度で10 mM MgSO₄ を含む MRS 培地に添加した。その結果、30 mM TSC の添加により、MgSO₄ を添加していない MRS 培地と同等まで生産性が回復した (Fig. 3)。このことより、GT 生産が、二価金属イオンにより阻害され、キレート剤 TSC の添加により回復することが確認された。また、50 mM TSC を添加した培地において、添加していない場合の2倍の GT 活性が検出された (Fig. 3) ことから、一定量以上の TSC 添加で GT の過剰生産が起こることが示唆された。これは、添加した Mg²⁺ だけでなく、MRS 培地中に元々存在していた余分な二価金属イ

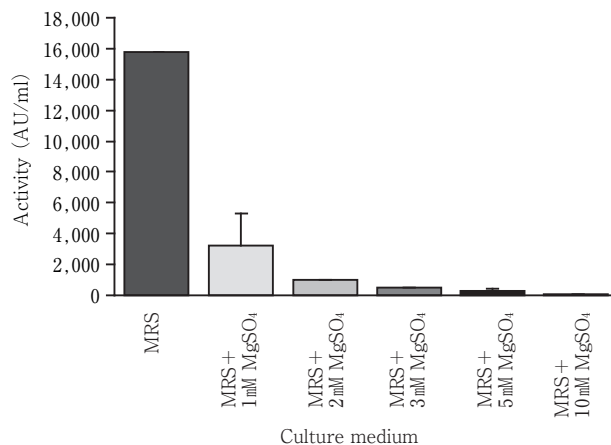


Fig. 2 Effect of divalent metal cation (Mg²⁺) concentration on GT production.

Lb. gasseri JCM 11064 was cultivated in MRS broth alone or MRS broth containing 1, 2, 3, 5, or 10 mM MgSO₄.

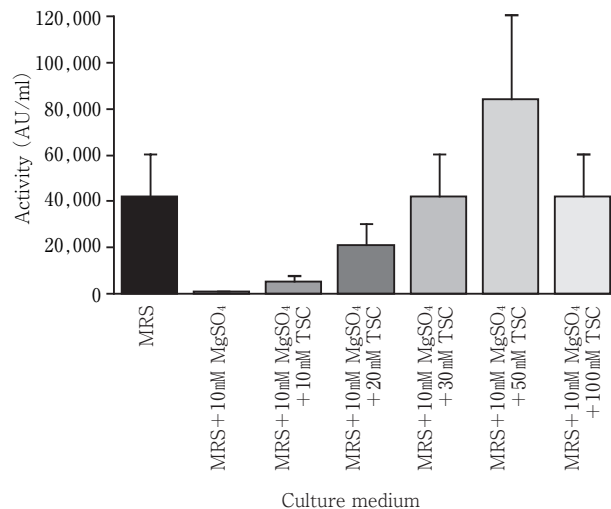


Fig. 3 Effect of TSC on restoration of GT production.

Lb. gasseri JCM 11064 was cultivated in MRS broth alone, MRS broth containing 10 mM MgSO₄, or MRS broth containing 10 mM MgSO₄ and 10, 20, 30, 50, or 100 mM TSC. Before assays, each culture supernatant was adjusted to a final TSC concentration of 100 mM.

オンを TSC がキレートしたために、GT 生産の促進が起きたものと考えられる。また、TSC により生産菌 JCM 11064 の細胞膜の透過性が上昇し、多量に GT が分泌した可能性も考えられた。ただし、100 mM TSC を添加した培地では、TSC 自体の抗菌作用⁷⁾により JCM 11064 の生育が不十分になり (データは示していない)、結果的に GT の生産量の低下が見られた (Fig. 3)。二価金属イオンと TSC による GT 生産の阻害と回復は、SDS-PAGE 後の *in situ* 抗菌活性測定においても確認された (Fig. 4a)。二価金属イオンによる生産阻害は他のいくつかのバクテ

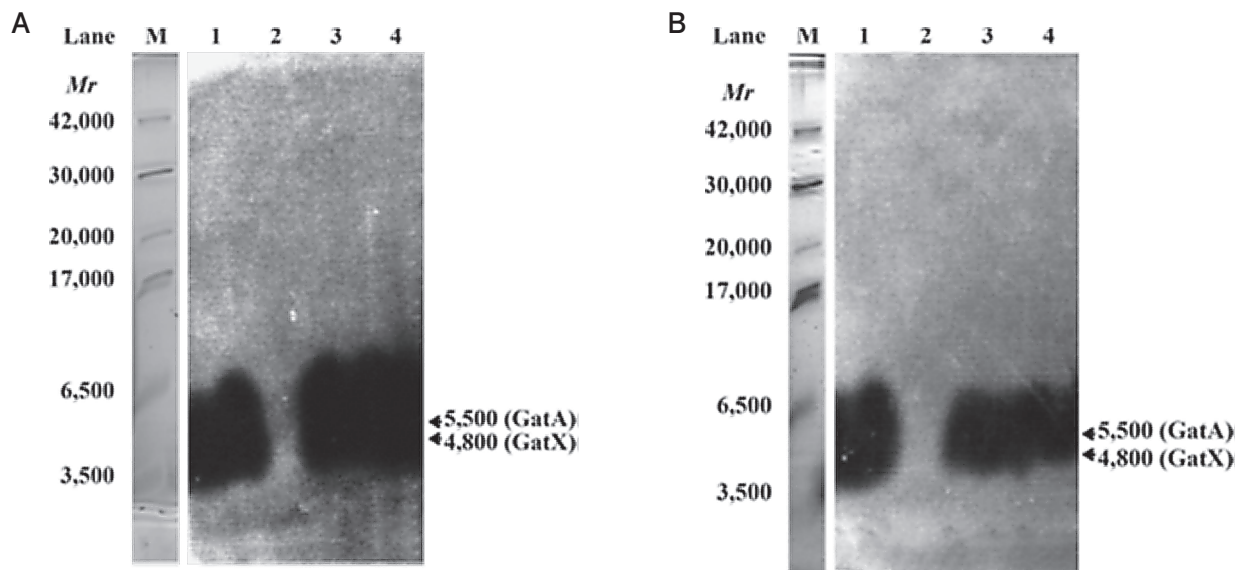


Fig. 4 *In situ* bacteriocin activity assay after SDS-PAGE of the culture supernatants of *Lb. gasseri* JCM 11064 cultivated in modified MRS broth (A) and PP-RCW (B).

Lanes: M, molecular weight markers; 1, MRS culture supernatant (GT control); A2, MRS+10 mM MgSO₄ culture supernatant; A3, MRS+10 mM MgSO₄+30 mM TSC culture supernatant; A4, MRS+10 mM MgSO₄+50 mM TSC culture supernatant; B2, PP-RCW culture supernatant; B3, PP-RCW+100 mM TSC culture supernatant; and B4, PP-RCW+100 mM TSC+0.1% (w/v) Tween 80 culture supernatant. Clear zones at approximately 5,500 Da show that GT inhibits the growth of indicator strain. GatA and GatX are gassericin T components.

リオシンで既に報告されている^{8,9)}が、それらはいずれも特定のイオン (Mg²⁺, Ca²⁺ もしくは Mn²⁺) に限定されており、試験した全ての二価金属イオン (Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ および Fe²⁺) に生産阻害を受けた例は GT が初めてである。二価金属イオンによるバクテリオシン生産阻害のメカニズムに関しては不明であるが、*Salmonella* sp. に見られるような二価金属イオンによる二成分制御系を介した転写制御¹⁰⁾の可能性が考えられる。*Salmonella* sp. では、細胞外の二価金属イオンが低下すると、センサーの役割を担うヒスチジンキナーゼ PhoQ がそれを感じし、レスポンスレギュレーター PhoP をリン酸化し、下流遺伝子の転写活性化を促す。逆に、細胞外の二価金属イオン濃度が上昇すると、PhoQ が PhoP のリン酸化を停止することによって、下流の遺伝子転写が抑制される。現在、この PhoP-PhoQ 系を参考に、GT における生産制御メカニズムを明らかにしようと試みている。

TSC は弱いながらも抗菌活性を示すことが知られている⁷⁾。そこで、GT と TSC の相乗効果を検証するために、JCM 11064 株の MRS 培地培養上清 (GT 溶液) に TSC を添加し、抗菌活性測定を行った。その結果、50 および 100 mM TSC を GT 溶液に加えた場合において、両者の相乗効果が確認された (Fig. 5 ; 100 mM TSC のみの抗菌活性は寒天拡散法では検出されなかった)。この相乗効果は、TSC により脆弱化した標的細菌の細胞膜に、孔形

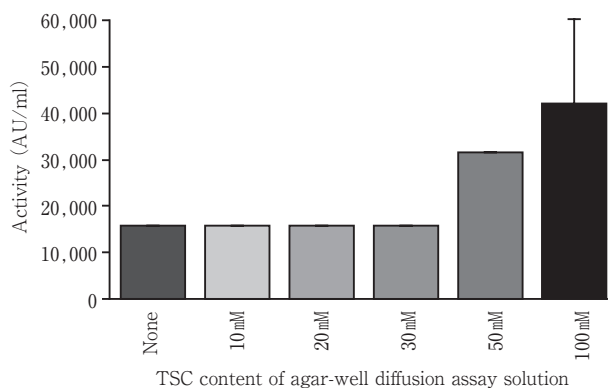


Fig. 5 Synergistic antibacterial activity of GT and TSC.

The tested solutions on the agar-well diffusion assay were prepared by adding TSC to GT solution (the culture supernatants of *Lb. gasseri* JCM 11064 cultivated in MRS broth) to final concentrations of 10, 20, 30, 50, or 100 mM. No antibacterial activity was detected for TSC by itself at concentrations up to 100 mM.

成作用のある GT が作用したためと考えられる。

最後に、食品利用可能な PP-RCW における GT 生産を実現するために、10, 50 および 100 mM TSC を PP-RCW に添加し、JCM 11064 株を培養した。すると、100 mM TSC を添加したときに MRS 培地培養時の半分の活性が培養

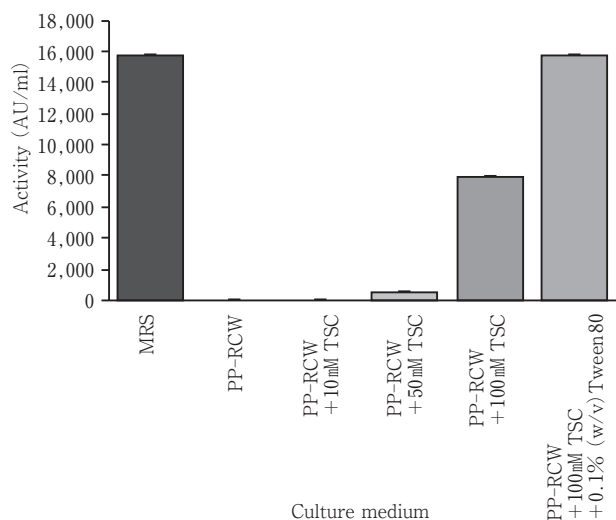


Fig. 6 Restoration of GT production in PP-RCW.

Lb. gasseri JCM 11064 was cultivated in MRS broth, PP-RCW alone, PP-RCW containing 10, 50 or 100 mM TSC, or PP-RCW containing 100 mM TSC and 0.1% (w/v) Tween 80.

上清から検出され、さらに、界面活性剤0.1% (w/v) Tween 80を追加添加したときにMRS培地培養時と同等の活性が検出された (Fig. 6; 試験に用いた他の界面活性剤は効果を有していなかった)。PP-RCW培養時におけるGTの非生産とTSC添加によるGT生産の回復は、SDS-PAGE後の*in situ*抗菌活性測定においても確認された (Fig. 4 b)。以上より、PP-RCWにおける主要なGT生産阻害因子が二価金属イオンであることが示され、TSC (さらに Tween 80) の添加によってPP-RCWが食品利用可能なGT生産用培地となることが見出された。本培地は、GTの食品利用だけでなく、チーズ製造の際の副産物である余剰のRCWを有効活用できるという副次的な利点も有している。また、PP-RCW中の二価金属イオンがGT生産を調節することを見出した点は、GTのバイオプリザバティブとしての利用を可能にしただけでなく、GT生産菌*Lb. gasseri*のプロバイオティクスとしての利用性を高めることに繋がると考えられる。なぜなら、GT生産のコントロールが、発酵乳製品中でのスターター乳酸菌とGT生産菌(プロバイオティクス)の共培養を可能にするからである。実際に、GT生産菌*Lb. gasseri* SBT 2055が、*Streptococcus thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* および *Bifidobacterium longum* との共培養の後に、経口摂取でヒト腸管に到達したという報告がある¹¹⁾一方で、SBT 2055株が腸内細菌叢の構成と代謝を変化させ、糞便の性質に影響を与えたという報告がある¹²⁾。このSBT 2055株の*in vivo*効果は、共培養中にGTが生産されなかったことと、腸内で生産されたGTによる腸内細菌叢への影響が関与し

ている可能性が考えられる。

本研究では、プロバイオティック乳酸菌*Lb. gasseri*のバクテリオシン (GT) 生産が二価金属イオンによって制御されていることを明らかにした。また、乳関連培地中で生産されなかったGTを、*Lb. gasseri*生育促進因子プロテオースペプトンと二価金属イオンキレート剤TSCの添加によって、RCW中で十分に生産させることに成功した。本研究で開発した食品添加物規格の培地を用いることによって、GTおよびその生産菌をバイオプリザバティブとして食品利用することが可能となった。本研究で明らかにした知見および開発培地が、今後のプロバイオティック乳酸菌とそのバクテリオシンの利用拡大に貢献するものと期待している。

謝 辞

本研究は、東北大学大学院農学研究科教授・齋藤忠夫博士および同助教・川井泰博士のご指導の下で行われたものである。両氏にはここに深謝申し上げます。

引用文献

- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López and N. Ben Omar : Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **120**, 51-70 (2007)
- Kawai, Y., B. Saitoh, O. Takahashi, H. Kitazawa, T. Saito, H. Nakajima and T. Itoh : Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 2201-2208 (2000)
- 川井 泰・高橋涼子・荒川健佑・齋藤忠夫 : ヒト腸管系乳酸菌が生産するガセリシンA/Tの構造と機能特性. *日本乳酸菌学会誌*, **17**, 32-39 (2006)
- Kawai, Y., T. Saito, J. Uemura and T. Itoh : Rapid detection method for bacteriocin and distribution of bacteriocin-producing strains in *Lactobacillus gasseri* group lactic acid bacteria isolated from human feces. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 179-182 (1997)
- Arakawa, K., Y. Kawai, H. Iioka, M. Tanioka, J. Nishimura, H. Kitazawa, K. Tsurumi and T. Saito : Effects of gassericins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. *J. Dairy Sci.*, **92**, 2365-2372 (2009)
- Arakawa, K., Y. Kawai, K. Fujitani, J. Nishimura, H. Kitazawa, K. Komine, K. Kai and T. Saito : Bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from human feces in milk-based media. *Anim. Sci. J.*, **79**, 634-640 (2008)
- Brul, S. and P. Coote : Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.*, **50**, 1-17 (1999)
- Matsusaki, H., N. Endo, K. Sonomoto and A. Ishizaki : Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1 : relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 36-40 (1996)
- Zendo, T., N. Eunggruttanagorn, S. Fujioka, Y. Tashiro,

- K. Nomura, Y. Sera, G. Kobayashi, J. Nakayama, A. Ishizaki and K. Sonomoto : Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 1181-1190 (2005)
- 10) Prost, L. R. and S. I. Miller : The Salmonellae PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cell. Microbiol.*, **10**, 576-582 (2006)
- 11) Takahashi, H., T. Fujita, Y. Suzuki and Y. Benno : Monitoring and survival of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in the human intestinal tract. *Microbiol. Immunol.*, **50**, 867-870 (2006)
- 12) Fujiwara, S., Y. Seto, A. Kimura and H. Hashiba : Establishment of orally-administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 343-352 (2001)