

## 食品保存料への応用を目指した海洋細菌由来抗菌物質の探索

小谷 真也

静岡大学大学院農学領域

**概要** 高塩濃度の発酵食品の漬物などにおいて、塩の腐敗菌の抑制効果に加えて、乳酸菌などの抗菌活性により、腐敗が抑えられることはよく知られている。一方で、食品の保存料において、味や風味などに影響を与えない抗菌物質の開発が求められている。特に乳酸菌由来のペプチド性抗菌物質 Nisin は優れた食品保存料として用いられている。また、放線菌の生産するポリリジンもまた食品保存料として利用されている。このように細菌由来の抗菌物質は食品保存料としての利用の可能性を有している。しかしながら、現在使用されている食品保存料は、長期の使用において耐性菌の出現が予測され、新しい食品保存料の開発が急務である。特に海洋細菌は、耐塩性の細菌が多く、漬物などの発酵産業において用いるのに適した細菌が期待できる。そこで、本研究課題においては、静岡市の海洋環境から海洋細菌の単離および抗菌活性試験を行う。さらに活性の見られた菌に関して、抗菌活性物質の単離を行い、さらに生産される抗菌物質の化学的性状を明らかにすることを目的として研究を行った。静岡県静岡市の大谷海岸の海底土をから菌の分離および抗菌活性スクリーニングを行った。その結果、抗菌活性物質を生産する OHYA-14 および OHYA-26 株と命名した 2 株の放線菌を分離することに成功した。各菌株のゲノムを抽出後、PCR 法によって部分 16S rDNA の配列の増幅を行い、DNA シーケンサーを用いて DNA 配列の決定を行った。得られた DNA 配列から Blastn 検索による相同性検索によって OHYA-14 株は *Streptomyces* 属、OHYA-26 株は *Microbacterium* 属に属する放線菌である可能性が示唆された。さらに OHYA-26 株から抗菌物質を単離後、ESI-TOF-MS を用いた化学分析により、フラグメンテーション解析による部分構造の決定を行った。また、DNA シーケンサーを用いたゲノム配列の解析を行い、推定生合成遺伝子クラスターを見出した。この抗菌物質は、ランチペプチドである可能性が高く、顕著な抗菌活性を示した。

## 1. 緒言

人類の歴史は、細菌感染症との戦いと言っても過言ではない。これまで、抗菌物質は、細菌感染症治療薬、食品添加料など、生活にとって重要な化合物として、重要な役割を果たしてきた。抗生物質を生産する微生物は分類学的に多岐にわたり種類が多く、その多くは土壌中に存在することが明らかになった。特に土壌に生息する放線菌は重要な抗菌物質探索源となった。当時まだ発見されていない抗生物質を求めて土壌からのスクリーニングが試みられ多くの抗生物質が発見された。抗生物質はカビやその他の細菌によって生産されるが多くは放線菌によって生産される。中でも放線菌の多数を占める *Streptomyces* 属から作用機構の異なる多くの抗生物質の生産が確認されて

いる。また、抗菌物質でも Nisin<sup>1,2)</sup> やポリリジン<sup>3)</sup> のように食品添加料として利用されているものもある。また、近年海洋微生物は新規生物活性の豊富な供給源として注目されている。海水中や海洋資源に多数の微生物が存在しているがそれらのうち培養できるものは 0.1~0.01% 程度であると言われている。よって海洋資源中には未だ研究されていない微生物も多く存在すると考えられる。最近注目されている微生物の探索源の海洋生物として海綿が挙げられ、海綿から多数の放線菌が単離されている。2019 年には中国三亜市の海岸のカイメンから分離された放線菌 *Streptomyces spongiicola* HNM0071 株の培養抽出物から 2 つの抗がん化合物スタウロスポリンとエキノマイシンが分離され、強力な抗癌活性を示したことが報告されている<sup>4)</sup>。

また、沖縄の海底土からも放線菌 *S. spongiicola* が単離されている<sup>5)</sup>。また、沖縄の海底土から単離した放線菌から spongiicolazolicins A および B が単離されている<sup>6)</sup>。静岡には駿河湾があり、海洋土壌を採集するのに適した場所である。そこで、本研究では静岡県静岡市の大谷海岸から放線菌など多様な微生物の探索を行った。そして、新規の低分子抗菌活性物質の探索を目的としてそれらが産生する二次代謝産物の抗菌活性試験、HPLC 分析や ESI-TOF-MS 測定などを行い、抗菌成分の化学分析を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 大谷海岸土壌サンプルの採取、純粋培養

静岡県静岡市駿河区の大谷海岸の砂の採取を行った。そしてそれを ISP3 培地に塗布して 30°C で培養した。約 7 日間培養後、ISP3 培地内に様々な微生物が混在していることが確認できた。これらのうち、色や孢子の有無から特徴的な菌を選び平板塗抹培養法で合計 30 株の純粋分離を行った。純粋分離は ISP2 培地にて 30°C で培養を行った。

### 2.2 ISP2 寒天培地

Yeast extract 4 g, Malt extract 10 g, Glucose 4 g を蒸留水に溶解し、NaOH を用いて pH7.3 に調整した後、1 L にメスアップした。これに寒天 15 g を加え、オートクレーブ (121°C, 20 分) にかけて滅菌した。培地をシャーレに分注し、固定した。

### 2.3 ISP3 寒天培地

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, MnCl<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g を蒸留水 100 mL に溶解させ、Trace Salts Solution を作製した。Oatmeal 20 g を 1 L の蒸留水に溶解し、煮沸後、それをざるおよび布で濾した。そして pH7.2 に調整した後、寒天 15 g を加えオートクレーブ (121°C, 20 分) で滅菌を行った。その後クリーンベンチ内で Trace Salts Solution 1 mL, 抗生物質として Nulidixic acid を 20 mg/L となるように、また Cycloheximide を 50 mg/L となるように加えた。培地をシャーレに分注し、固定した。

### 2.4 LB 寒天培地

NaCl 10 g, Bactotryptone 10 g, Yeast extract 5 g を蒸留水に溶解し、1 L にメスアップした。これに寒天 15 g を加え、オートクレーブ (121°C, 20 分) にかけて滅菌した。培地をシャーレに分注し、固定した。

### 2.5 抗菌活性試験

腐敗性細菌 *Micrococcus luteus* NBRC3333 株を含ませた LB 寒天培地を作製し、培地上に大谷海岸土壌サンプルから純粋分離した 30 株の菌体を少量ずつのせ、30°C で 2 日間培養し、試験菌体の周りに阻止円ができるかどうかで、抗菌活性試験を行った。

### 2.6 OHYA-26 株の抽出液の HPLC 分析

HPLC 分析によるサンプルの選出において特徴的なピークが確認された OHYA-26 株の詳しい化学分析を行った。OHYA-26 株を LB 寒天培地で培養し、プレート 5 枚分の菌体をミクロスパーテルでかきとり菌体量に対して二倍量の MeOH で抽出を行った。その抽出液を HPLC で分析を行った。HPLC 分析は、水/アセトニトリル (0.05%TFA 含有) の溶媒系を用いて、グラジエントモードで分析を行った。グラジエントは、20%-50%アセトニトリル、20 分間の条件で行った。使用したカラムは、Handy-ODS (4.6 X 250 mm, 和光フジフィルム) を用いて、検出波長 220 nm で検出を行った。

### 2.7 ESI-TOF-MS 測定

大気圧イオン化飛行時間型質量分析計 JMS-T100 AccuTOF を用いて、ポジティブイオンモードで質量分析を行った。

### 2.8 ゲノム抽出および部分 16SrDNA 配列の解析

DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit を用いて、OHYA-26 および OHYA-14 株の菌体からのゲノム DNA の抽出を行った。抽出した OHYA-26 ゲノム DNA を鋳型に、16S rDNA に特異的なプライマーセット 16S-27F (AGAGT TTGATCCTGGCTCAG), 16S-826R (GACTACCAGGGTATCTAATCC) を用いて 16S rDNA 配列の PCR 法を用いた部分増幅を行った。PCR 後、1% アガロースゲルに 50 μl の PCR 産物をアブライシ、135 V で 15 分間電気泳動を行い、目的遺伝子が増幅できているかを確認した。NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いて PCR 産物のゲルからの精製を行った。得られた DNA を用いてシーケンス解析を行い、シーケンス解析の結果から Blastn 検索を行い、菌の簡易同定を行った。

### 2.9 全ゲノム配列の決定

抗菌物質が得られたため、全ゲノムの配列の決定を行った。精製したゲノム抽出物を断片化後、DNA シーケンサー MiSeq (イルミナ株式会社) を用いて、全ゲノム配列の決定を行った。

### 3. 結果

#### 3.1 抗菌活性試験結果

純粋分離を行った 30 株のうち、7 株において抗菌活性が見られ、特に OHYA-26 株および OHYA-14 株について腐敗性細菌 *Micrococcus luteus* に対し強い活性が確認された。そこで、生産する抗菌物質に関して化学分析を行うこととした。

#### 3.2 OHYA-26 株および OHYA-14 株の部分 16S rDNA 配列の解析

顕著な抗菌活性がみられたため、OHYA-26 株の同定のため、ゲノム抽出後、PCR 法を用いて、部分 16S rDNA 配列の決定を行った。その結果、下記のように、640bp の DNA 配列が得られた。

その DNA 配列を用いて Blastn で検索をかけたところ、*Microbacterium testaceum* 16S ribosomal RNA gene (accession number: KT935065.1) と 99.84% の相同性を示し、*Microbacterium chocolatum* strain 16S ribosomal RNA gene (accession number: MF526790.1) と 99.53% とほぼ *Microbacterium* 属のバクテリアが 99% 以上の相同性を示したことから、OHYA-26 株は *Microbacterium* 属に属する放線菌であることが示唆された。また、同様に、OHYA-14 株に関しても 16S rDNA の部分配列の増幅及び、DNA 配列の解析を行った。その結果、*Streptomyces* 属の細菌に相同性がみられ、*Streptomyces* 属の放線菌であることが示唆された。

#### 3.3 OHYA-26 株のメタノール抽出物の HPLC

OHYA-26 株は、LB 寒天培地、ISP2 寒天培地等の栄養培地で良好な生育を示した。ISP2 培地で培養を行った場合、細胞外に分泌される細胞外多糖と思われる分泌物が多くみられ、メタノール抽出がうまく行えなかった。そのため、メタノール抽出は、LB 寒天培地で培養を行った。OHYA-26 株に関して、LB 寒天培地で培養後、菌体をメタノールによる溶媒抽出を行い、抽出液に関して HPLC 分析を行った(図 1)。HPLC のクロマトグラムにおいて、ピーク 1-4 までの 4 つのピークが観察された。特に、保持時間 15 分のピークが抗菌活性を示したことから、ESI-TOF-MS 分析を行うこととした。

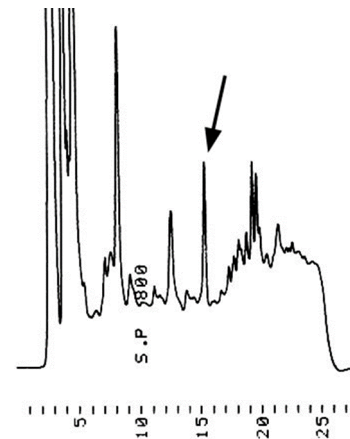


図 1. OHYA-26 株のメタノール抽出物の HPLC クロマトグラム  
(矢印は抗菌物質)

#### 3.4 OHYA-26 株の生産する抗菌物質の ESI-TOF-MS 分析による部分構造の推定

ポジティブイオンモードの ESI-TOF-MS を測定したところ、質量電荷比で  $m/z$   $[M + 2H]^{+2}$  1187.6 の二価のイオンのピークが観察された(図 2)。そのことから、分子量は約 2373 Da であることが示唆された。さらに collision-induced dissociation (衝突誘起解離)を用いて MS の測定を行ったところ、N 末端のアミノ酸の配列が示唆された(図 3)。その結果、N 末端から Gly-(Leu/Ile)-Dhb-(leu/Ile)-Ala の 5 つのアミノ酸の存在が示された。また Dehydrobutyrine (Dhb) は、ランチペプチドに見られる異常アミノ酸であることから、抗菌物質はランチペプチド様の化合物であることが示唆された。

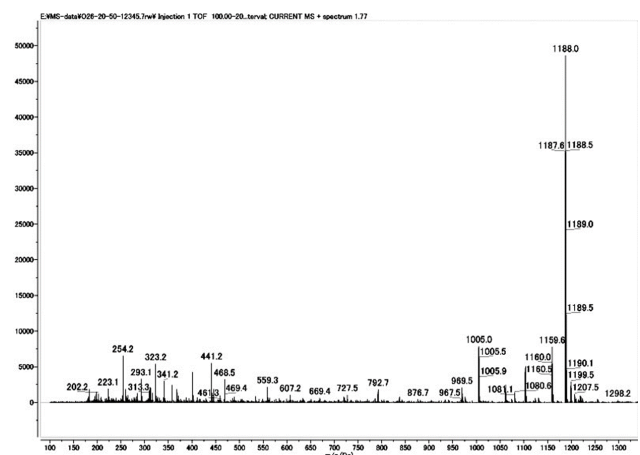


図 2. OHYA-26 株の生産する抗菌物質の ESI-MS

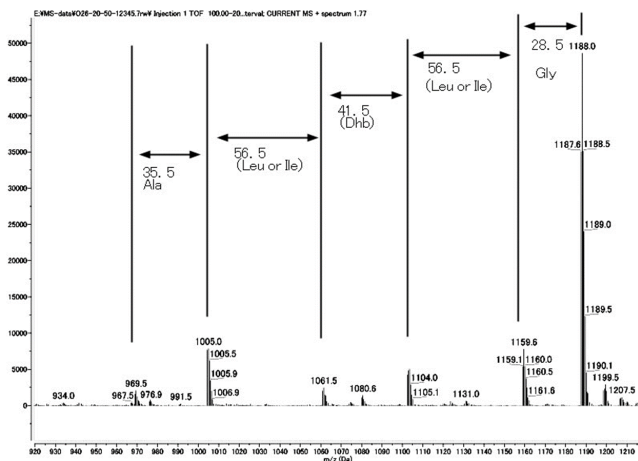


図 3. 抗菌物質の collision-induced dissociation によるアミノ酸配列の決定

### 3. 5 OHYA-26 のゲノム配列の決定及び抗菌物質の生合成遺伝子の推定

抗菌物質のアミノ酸配列が得られとことにより、生合成遺伝子の推定を行うため、OHYA-26 株のゲノム配列の決定を行った。AntiSmash<sup>7,8)</sup>で検索をかけたところ、ランチペプチドの生合成遺伝子クラスターを見出した(図 4)。クラス II のランチペプチドで Lichenicidin<sup>9)</sup>に類似した遺伝子クラスターであった。ランチペプチド Lichenicidin は二つのランチビオティックが生産され、相乗的に抗菌活性を示すランチペプチドである。今回 Oyha-26 株に見出された生合成遺伝子クラスターにも下記のように前駆体ペプチド遺伝子の配列が二つ見出された。

> OHYA26\_04410  
 MTERNVSLLEEIAEQDQALTSAGQGWTITITSLTCY  
 GVSWWAGNNGQICTATVEQCNNCN

> OHYA26\_04430  
 MTSNTHNRTGFIAEDDLVLLSENAQDVSAGTTTAPC  
 AVAGLTIAATAALPGFCPTGACTTRCTKG



図 4. AntiSmash によって見出された OHYA-26 株のゲノムに存在するランチペプチド生合成遺伝子クラスター

今回得られた抗菌物質の N 末端の配列は, Gly-(Leu/Ile)-Dhb-(leu/Ile)-Ala であり, OHYA26\_04430 の中に, GLTIA という配列があることから, 抗菌物質は, OHYA26\_04430 から, 生合成され, 生産されるランチペプチドであることが示唆された。構造部分となると予想されるアミノ酸配列 (GLTIAATAALPGFCPTGACTTRCTKG) の分子量は, 2481 であり, ESI-MS で得られた分子量を考慮すると, この配列の中から, 6 個脱水が起きて, ランチペプチドが生成すると考えられる。また, 分子の中に, 3 つの Cys があることから, ランチオン/メチルランチオン環は 3 つ存在すると考えられる。もう片方の前駆体ペプチドの遺伝子 OHYA26\_04410 に由来するランチペプチドは今回検出されなかった。

### 3. 6 OHYA-14 株のメタノール抽出物の HPLC

OHYA-14 株も OHYA-26 株と同様に, 培養した菌体に関して, メタノールを用いて, 菌体の溶媒抽出を行った。得られたメタノール抽出物を OHYA-26 株の分析と同様に HPLC を用いて分析を行った。その結果, 抗菌物質のピークを検出した。

### 4. 考察

これまで, *Microbacterium* 属の放線菌から, ランチペプチドが得られたという報告に関して *microvionin*<sup>10)</sup> が知られている。*Microvionin* はスタフィロコッカス属の細菌に強力な抗菌活性を有することから応用が期待されている。しかしながら, *Microbacterium* 属の放線菌からは二成分からなるランチペプチドの報告はなく, OHYA-26 株の生産する抗菌物質は新規抗菌物質である可能性が高い。また OHYA-26 株の生産する抗菌物質に関して腐敗性細菌 *Micrococcus luteus* に対して, 強力な活性を有することから, 応用が期待できる。

## 5. 文献

1. C. Anumudu, A. Hart, T. Miri & H. Onyeaka, *Molecules* 26, 5552 (2021)
2. U. Jancic & S. Gorgieva, *Pharmaceutics* 14, 76 (2021)
3. Z. Xu, Z. Xu, X. Feng, D. Xu, J. Liang & H. Xu, *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 6619 (2016)
4. X. Huang, S. Zhou, D. Huang, J. Chen & W. Zhu, *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 738 (2016)
5. H. Dohra, I. Kaweewan, B. E. Casareto, Y. Suzuki & S. Kodani, *Microbiol Resour Announc* 8, e01198-18 (2019)
6. M. Suzuki, H. Komaki, I. Kaweewan, H. Dohra, H. Hemmi, H. Nakagawa, H. Yamamura, M. Hayakawa & S. Kodani, *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 93 (2021)
7. K. Blin, S. Shaw, S. A. Kautsar, M. H. Medema & T. Weber, *Nucleic Acids Res* 49, (2021)
8. K. Blin, S. Shaw, A. M. Kloosterman, Z. Charlop-Powers, G. P. van Wezel, M. H. Medema & T. Weber, *Nucleic Acids Res* 49, (2021)
9. M. Begley, P. D. Cotter, C. Hill & R. P. Ross, *Appl Environ Microbiol* 75, 5451 (2009)
10. V. Wiebach, A. Mainz, M. J. Siegert, N. A. Jungmann, G. Lesquame, S. Tirat, A. Dreux-Zigha, J. Aszodi, D. Le Beller & R. D. Sussmuth, *Nat Chem Biol* 14, 652 (2018)

## Search for Antibacterial Substances Derived from Marine Bacteria for Application to Food Preservatives

Shinya Kodani

Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University

### Summary

It is well known that in pickles of fermented foods having a high salt concentration, spoilage is suppressed by the antibacterial activity of lactic acid bacteria in addition to the effect of salt. On the other hand, in food preservatives, the development of antibacterial substances that do not affect the taste and flavor is required. In particular, the peptide antibacterial substance Nisin derived from lactic acid bacteria is used as an excellent food preservative. An antibacterial compound,  $\epsilon$ -Poly-L-Lysine, produced by an actinomycete is also used as a food preservative. As described above, the antibacterial substance derived from bacteria has a possibility as a food preservative. However, the food preservatives currently used are expected to have resistant bacteria in long-term use, and there is an urgent need to develop new food preservatives. Many marine bacteria are salt-tolerant bacteria, and bacteria suitable for use in the fermentation industry such as pickles can be expected. We isolated marine bacteria and performed antibacterial activity tests on the obtained bacterial strains. As a result, we succeeded in isolating seven bacterial strains. Among them, we performed identification of one bacterial strains OHYA-14 and OHYA-26 by analysis of 16S rDNA sequence. As a result of 16S rDNA analysis, OHYA-14 and OHYA-26 were identified to be an actinobacteria belonging to *Streptomyces* and *Microbacterium*, respectively. The cultured bacterial cells were extracted with methanol. The methanol extract was analyzed by HPLC using ODS column. The peptide antibacterial compound was isolated from the methanol extract. The compound was subjected to ESI-TOF-MS analysis to obtain partial structure. The antibacterial compound was suggested to be a lanthipeptide by the partial structure. The compound exhibited the potent antibacterial activity against a gram-positive bacterium *Micrococcus luteus*.