

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成10年度博士課程 入学

氏名 朴 相熙

指導教官名 伊藤喜久治

論文題目 Characteristics of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi and *Enterococcus faecium* JCM 5804[†]

(和訳 キムチから分離された *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* と *Enterococcus faecium* JCM 5804[†] が産生するバクテリオシンの特性)

バクテリオシンは細菌が産生する抗菌性タンパク質である。古典的な抗生物質と異なり、広範囲のスペクトルを持つものもあれば狭いスペクトルを持つものもある。nisinは最も広く研究されているバクテリオシンであり、現在50以上の国で食品の保存料として用いられている。また、nisinは獣医および医療分野において治療薬の候補として考えられている。例えば、牛の乳腺炎治療やヒトの消化性潰瘍の治療薬として可能性を持っている。nisinは抗生物質耐性菌に対しても効果があると期待されている。

バクテリオシンに対するより詳細な研究は、効果的な食品保存料や抗菌性物質としての利用につながると考えられる。種々の分離源からのバクテリオシンの検索は有望な方法であるが、食品由来のバクテリオシンを産生する菌として乳製品由来の乳酸菌に関する報告多い。しかし、伝統

的な発酵食品に含まれている乳酸菌や基準株ではバクテリオシンに対する研究は進んでいない。

本研究の目的は、伝統的な発酵食品および種々の材料から病原菌を抑えるバクテリオシンを産生する細菌を検索し、そのバクテリオシンの特性を明らかにすることである。本研究は3つの章からなる。：(1)バクテリオシンを産生する菌株の検索、(2)キムチから分離された *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が産生する nisin Z の特性と抗菌スペクトル、(3) *Enterococcus faecium* JCM 5804[†] が産生する enterocin の特性と抗菌スペクトルである。

第1章では種々の材料から病原菌や抗生物質耐性菌を抑制するバクテリオシンを産生する細菌を検索した。バクテリオシン感受性菌株 *Lactobacillus plantarum* NCD0 955 および *Listeria monocytogenes*、*Clostridium*、vancomycin 耐性 *Enterococcus* (VRE)、methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA)、*Salmonella* Enteritidis、*E. coli* O157:H7、*Campylobacter jejuni* を標的菌として patch test と agar spot test を用いて検索した。漬物、キムチ、味噌、飼料添加物、ヒトおよび鶏の糞便から分離された 1602 菌株の中 18 の分離菌がいずれも1つの標的菌に対して抗菌効果を持つことが判明した。12 株が *Lactobacillus*、5 株が *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、1 株が *Pseudomonas fluorescens* であった。バクテリオシンを産生する菌が分離されたのはキムチと漬物だけであった。このうち *Lactobacillus* は *Clostridium* や食品由来病原菌や抗生物質耐性菌に対して抗菌活性がなかったが、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* は *Listeria monocytogenes*、*Clostridium* や VRE に抑制効果を示した。漬物から隔離された *Pseudomonas fluorescens* は patch test と agar spot test で MRSA と *Salmonella* Enteritidis に抑制効果を示したが、broth 培養では抑制効果が確認できなかった。

また、バクテリオシン産生に関して検討されていなかった基準株や参照株について検討した。*Weissella* 6 株、*Lactococcus* 4 株、*Lactobacillus* 28 株、*Enterococcus* 13 株、*Leuconostoc* 3 株について抗菌性物質の産生の有無について調べた。その結果 *Enterococcus faecium* JCM 5804[†] でバクテリオシンの産生が確認された。

第2章では第1章でキムチから分離された、バクテリオシン感受性菌株*Lactobacillus plantarum* NCD0 955に効果的な抗菌作用を示す5株の *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*が産生するバクテリオシンの特性を検討した。そのバクテリオシンは*Clostridium*や *L. monocytogenes*、VRE、MRSAを抑制し、*Lactococcus* や *Weisella*、*Enterococcus*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus* といった近縁の乳酸菌に対してもこの抗菌効果を示した。しかしながら、グラム陰性の病原菌には効果が見られなかった。このバクテリオシンは幅広いpHの条件と高温にも比較的安定であったが、100℃1時間または115℃で15分の熱処理をすると活性を失った。また、プロテアーゼ処理により活性を失って、ライソザイムやリパーゼやカタラーゼやβ-グルコシダーゼ処理に対しては活性が残った。Tricine-SDS-PAGEでこのバクテリオシンは3.5kDaの nisin Zと同じ位置にバンドが検出された。さらにnisin 遺伝子特異的プライマーを用いてPCRとdirect sequence methodでこの bacteriocin に関与する遺伝子配列を調べたところ、分離菌株はnisin Zを生産する遺伝子を持っていることが確認された。しかしながら、分離菌株のnisin 分泌に関与する *nis B*の塩基配列はnisin Zを生産する *Lactococcus lactis* JCM 7638と比較して2つの塩基が異なっていた。その塩基差による分離菌株のnisin Zと*Lactococcus lactis* JCM 7638のnisin Z間の特性の差は認められなかったが、キムチからの分離菌株の中でnisin Zを生産する*Lactococcus lactis* が見つかったのは本研究が最初である。キムチから分離された *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*が産生するnisin Zは今まで報告された他のnisin Zと比べてプロテアーゼや熱に対して異なる特性を示した。そのプロテアーゼ感受性はヒトや動物の腸内フローラに影響を与えない安全な食品保存料として利用される可能性を示している。

また、本研究で見出されたnisin 耐性菌の*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Enterococcus*、MRSAの耐性機構は最近のnisin耐性菌研究によると菌細胞膜の脂質あるいはテイコン酸の変化であると考えられる。nisinを実際に治療に用いるためには nisin耐性機構に関するいっそうの研究が必要と考えられる。

第3章では第1章で確認された*E. faecium* JCM 5804[†]の産生するバクテリオシンの特性を検討した。そのバクテリオシンは *Lactobacillus*、*Enterococcus*、*Clostridium*、*Listeria*

monocytogenes、VREを抑制したが、グラム陰性菌、*Weisella*、*Leuconostoc*、*Lactococcus*、MRSAに対して効果は認めなかった。このバクテリオシンは幅広いpHの条件と高温にも比較的安定であったが、100℃1時間または115℃15分で活性を失った。また、プロテアーゼ処理に対して感受性、ライソザイム、リパーゼ、カタラーゼ、 β -グルコシダーゼ処理に対して抵抗性があった。Tricine-SDS-PAGEによるとバクテリオシンの分子量は4kDaであった。既知の enterocin 遺伝子特異的なプライマーを用いてPCRおよびdirect sequence methodでこの bacteriocin に関する遺伝子配列を調べたところ、enterocin A、enterocin B、enterocin P類似遺伝子を保有することが明らかになった。近年、enterocin Aとenterocin Bを生産する*E. faecium*に対する報告はあり、enterocin Aとenterocin Bは相乗作用によって乳酸菌、病原菌を抑制することも知られている。また、enterocin Pは別の*E. faecium* がenterocin 50とともに産生すると報告されている。しかし、3種のenterocinを生産する菌株として*E. faecium* JCM 5804¹は初めての報告である。この株は3種のenterocinを生産し、これらの相乗作用によって乳酸菌、病原菌を抑制する可能性があると考えられた。

以上の成績は、バクテリオシンを食品保存料と抗菌性物質として応用するための研究に重要な知見を与えられられる。