

氏名	石川 潤一
学位の種類	博士（食産業学）
学位記番号	第19号
学位授与年月日	平成29年3月19日
学位授与の条件	学位規程第3条第3項該当
学位論文題目	乳酸菌バクテリオシンを用いた多剤耐性菌の低減と食産業への応用
論文審査委員	主査 石田 光晴 副査 須田 義人, 齋藤 忠夫

論文の要旨

近年、多量の抗生物質の使用により多剤耐性菌が数多く出現しており、ヒトへの感染拡大が危惧されている。そこで抗生物質に代わり、安全性が高い乳酸菌のバクテリオシンを使用して、多剤耐性菌の感染リスクを低減できないかと考えた。

宮城県産業技術総合センターが保有する908菌株の乳酸菌から *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002 と *Bacillus* sp. C107 に対して強い抗菌活性を示す27菌株をバクテリオシン高産生株として選抜した。また、食品や豚糞便から薬剤耐性スクリーニング培地を用いて分離した菌株や、抗菌ディスク感受性試験を行い薬剤耐性が認められた菌株など、合わせて11菌株を薬剤耐性細菌として分離した。バクテリオシン高産生株の上清について、JCM1002株を指標菌として、pH中性化処理および熱処理を行った後、抗菌活性を試験したところ、各上清の抗菌活性は熱耐性およびpH依存性によってグループ化できた。また、アクチナーゼE（プロテアーゼ）による消化試験に供したところ、*Lactococcus lactis* MBR916の培養上清は、ナイシンやガセリシンAと比較して高いプロテアーゼ耐性を示した。MBR916株の培養上清は、*Bacillus* sp. R11を除き試験した全ての薬剤耐性菌に対して抗菌活性を示し、抗菌スペクトルが広いバクテリオシンであると考えられた。本バクテリオシン(Bac916と命名)は、抗菌活性スペクトルを比較すると、ナイシン様バクテリオシンであることが推察されたが、高いプロテアーゼ耐性を有すること、SDS-PAGEから推定した分子量が4200でありナイシンと異なること、生育阻止円の特徴が異なることなどから、新奇バクテリオシンである可能性が示唆された。MBR916株について、*Lc. lactis*種が産生する既知のバクテリオシンの構造遺伝子を検出するプライマーペア12種類を用いて構造遺伝子の検出を試みたところ、いずれのプライマーペアでも増幅は認められなかった。

Bac916の性状についてまとめると、MBR916株によって産生され、大きな抗菌活性値(> 2¹⁰ A.U./100mL)を有し、耐熱性に優れ、酸性から中性領域で抗菌活性を示し、プロテアーゼの消化作用に対して高い耐性を有するバクテリオシンであることが明らかとなった。特に、プロテアーゼに対して高い耐性を示す特性は、プロテアーゼが豊富な環境下においても抗菌活性を保持することが期待されるため、食品加工における日持ち向上や土壌環境の改善などへの応用が考えられた。Bac916について、透析及びカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、MALDI-TOF/MS解析に供した結果、バクテリオシン本体由来と推察されるフラグメントが5593.0 m/zに出現した。

食品および食品環境におけるBac916の多剤耐性菌への抗菌を検証するため、簡易的に精製したBac916粉末を原料に添加してかまぼこを作製し、かまぼこの汚染菌として検出

される *Carnobacterium maltaromaticum* C29 や多剤耐性菌になりうる *Enterococcus faecalis* MYU572A 株等の汚染菌を付着させ、菌数の経時変化を観察した。Bac916 は、汚染菌が増殖する初期の段階で抗菌的に働き、ナイシンやその他の抗菌物質と併用することでかまぼこの汚染を防止できる可能性が示唆された。また、多剤耐性菌が発生しやすい豚の糞便に Bac916 や抗生物質のバシトラシンを添加して静置し、耐性菌数を比較したところ、増殖する多剤耐性菌の菌数を有意に減少させることができた。

本研究において、乳酸菌のバクテリオシンを用いた多剤耐性菌の殺菌の可能性が示された。今後の展望として、Bac916 の構造遺伝子を中心とした遺伝子クラスターの特定、解析を経て、1 次構造の完全解明、合成経路の解明、作用機構の解明へとつなげていきたい。また、応用研究として、Bac916 を産生する MBR916 の家畜用餌としての可能性を探り、プロバイオティクス性やその他の機能性、また、糞便として排出された際の多剤耐性菌抑制効果など、家畜用機能性乳酸菌として応用を検討していきたい。

審査結果の要旨

本論文の内容は、近年、多量の抗生物質の使用により畜産現場に多剤耐性菌が数多く出現しており、ヒトへの感染拡大が危惧されている。そこで、抗生物質に代わり、安全性が高い乳酸菌のバクテリオシンを使用して、抗生物質多剤耐性菌の感染リスクを低減し、食産業への応用を検討したものである。

審査会は、スライドを用いた詳細な説明を課し、主査、副査 2 名が試問した。さらに学会投稿論文の共同研究者である 3 名がオブザーバーとして同席した。審査結果の要約は以下のとおりである。

本論文の構成は、第 1 章の序論から第 7 章の総括まで、論文を構成する核となる部分は、ミルクサイエンス（日本酪農科学会の学会誌）の掲載された和文原著論文に基づいており、審査基準を満たしている。

第 1 章の序論では、本研究の社会的背景および目的について概説している。抗生物質耐性菌（薬剤耐性菌）の人や家畜への影響について述べ、乳酸菌が生産する抗菌性ペプチド（バクテリオシン）の開発の歴史や食品への応用例を挙げている。目的は、新たなバクテリオシンの発見の可能性とその応用についてである。審査会では、目的達成への経験や手法について試問し明確な回答を得た。

第 2 章では、食品における多剤耐性菌の分布調査を行い、食品の潜在的なリスク評価について検証した。加熱調理せずに喫食する 11 品目から、抗生物質スクリーニング培地を用いて分離した菌株や、抗菌ディスク感受性試験を行い薬剤耐性が認められた菌株など、1~10 種類の薬剤に耐性を持つ菌株が選抜された。審査会では、選抜手法について試問し、適切な方法を用いていることを確認した。

第 3 章では、ブタ糞便を試料とし薬剤耐性菌調査を行い、抗生物質耐性菌の菌数調査と分離を行った。食品からのと合わせて 11 菌株を薬剤耐性細菌として分離した。審査会では、選抜方法が適切であることを確認し、これらの耐性菌がヒトや家畜に及ぼす影響について試問し明確な回答を得た。

第 4 章では、乳酸菌からバクテリオシン産生株をスクリーニングし、第 2 章の調査で分離した薬剤耐性菌に対しての殺菌効果を検証した。908 菌株の乳酸菌から *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002 と *Bacillus* sp. C107 に対して強い抗菌活性を示す 27 菌株をバクテリオシン高産生株として選抜した。最も抗菌活性が高い株 *Lactococcus lactis* MBR916 株を選抜した。審査会では、バクテリオシン高産生株の選抜方法について試問し、明確な回答を得た。

第 5 章では、第 4 章で分離したバクテリオシン産生株 *Lc. lactis* MBR916 株の性状を明らかにし、BR916 株が産生するバクテリオシン（抗菌性ペプチド）を単離した。同バク

博士論文要旨・審査結果要旨
学外公表用様式

テリオシンは、ナイシンやガセリシン A と比較して高いプロテアーゼ耐性を示した。さらに、*Bacillus* sp. R11 を除き試験した全ての薬剤耐性菌に対して抗菌活性を示し、抗菌スペクトルが広いバクテリオシンであると考えられた。本バクテリオシン (Bac916) を精製し N-末端アミノ酸配列解析により同定したところラクティシンである可能性が示された。審査会では、得られたバクテリオシンの性状が従来のもとのどのように異なるのか、また同定のための手法やその結果について、多くの試問が出されたが、いずれも明快な回答を得た。

第 6 章では、分離したバクテリオシン Bac916 の食産業への応用として、食品への添加による日持ち向上効果、および豚糞便中の薬剤耐性菌に対する抗菌効果を検証した。Bac916 粉末が多剤耐性菌増殖する初期の段階で抗菌的に働き、ナイシンやその他の抗菌物質と併用することでかまぼこの汚染を防止できる可能性が示唆された。また、豚糞便の多剤耐性菌の菌数を有意に減少させることができた。審査会では、その有用性を認め、さらなる検証を求めた。

第 7 章総括では、これまでの結果をまとめ、今後の展望について述べている。

本研究において、乳酸菌バクテリオシンを用いた多剤耐性菌の殺菌の可能性が示された。今後は、Bac916 の全一次構造の決定、ランチオニンなどの異常アミノ酸・D-アミノ酸の有無、生合成経路、作用機構等の解明が望まれる。また、MBR916 の家畜用餌としての可能性を探り、さらなる応用性を検討する予定である。

本論文では、食品衛生および畜産衛生の視点から、乳酸菌が産生するバクテリオシンを解析し、複数の抗生物質に抗菌性を持つ多剤耐性菌への影響を明らかにしたものであり、さらに食品添加物としての利用や家畜への投与薬剤の開発の可能性も述べている。よって、本論文は博士論文に値するものと認められる。