

食品保存料開発を目的とした放線菌ランチビオティックの探索

静岡大学創造科学技術大学院

小谷 真也

1. 研究の目的と背景

現在利用されている食品保存料の中には、熱や酸に不安定で、食品に影響を与えるものがあるなど実際の利用において制約があり、安定かつ安全な食品保存料が必要とされて来た。新しい食品保存料として注目されているのが、乳酸菌などのグラム陽性菌の生産するペプチド性抗菌物質ランチビオティックである。なかでも、乳酸菌の生産する nisin は最も研究の進んだランチビオティックで、既に世界 50 ヶ国以上でチーズ、乳製品、缶詰等の食品保存料として利用されている。一方、ランチビオティックの長期的な使用によって耐性菌が出現することが予期されており、対策が望まれている。このような背景から新しいランチビオティックの開発は食品衛生学において重要な課題の一つとなっている。そこで、本研究において食品保存料の開発を目的とし新しい放線菌ランチビオティックの探索を行う。

2. 研究の方法

ランチビオティック産生能のスクリーニングを行い、さらに活性の見られた株を大量培養する。培養した菌体もしくは培地から各種クロマトグラフィーを用いて新しいランチビオティックを精製する。精製したランチビオティックは化学分析によってその化学構造を決定する。最終的に抗菌活性試験や食品防腐効果試験を行い、応用への可能性を検討する。

3. 研究内容

本研究において、スクリーニングを行ったところ、2 株の放線菌に顕著な活性が見られたため、それぞれを培養後、抽出を行い、活性物質の単離を行った。それぞれの経過に関して、4 項で説明する。

4. 研究の実施経過

4.1. *Streptomyces sp.* TM-59 株からのランチビオティックの単離と部分構造の決定

新規抗菌物質の探索を目的として放線菌抽出物のスクリーニングを行った結果、*Streptomyces sp.* TM-59 株の抽出物に抗菌活性が見られたので、抗菌物質の単離と構造決定を行った。TM-59 株寒天培養菌体をアセトン抽出し、

抽出液を減圧濃縮後、逆相オープンカラムを用い含水メタノールによって溶媒分画した。活性の見られた 100% メタノール溶出画分から ODS カラムを用いた HPLC 分取によって活性物質を単離した。本物質はポジティブイオンモードの ESI-MS 測定で m/z 2185 にイオンピークを与えた。加水分解後のアミノ酸分析の結果、Ser, Cys, Ile, Leu, Tyr が 1 mol, Ala, Val, Phe が 2 mol, Asp が 3 mol, Gly が 4 mol 検出された。さらに各種 NMR スペクトルを用いて構造解析を進めたところ糖が 2 mol, インドール環が含まれていることが明らかとなった。しかしながら、重 DMSO 中において溶解性が低くピークがブロードであるため、NMR スペクトルの解析が困難であった。現在、化学的分解を行い、さらに短いペプチド断片を得ることで構造の解析を行っている。

4.2. *Streptomyces sp.* MK-30 株からの抗酵母活性物質の単離および構造決定

新たに茶園土壌から放線菌の単離を行い、アセトン抽出物を用いた抗微生物活性のスクリーニングを行った。その結果、*Streptomyces sp.* MK-30 株において抽出物から抗酵母活性が見られたので、抗酵母物質の単離と構造決定を行った。牧の原市の茶園土壌から、ISP2 寒天培地を用いて放線菌の単離を行った。合計 34 株の放線菌を単離し、アセトン抽出物に関して、*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* の 4 種類の微生物に対するペーパーディスク法を用いた抗菌作用試験を行ったところ MK-30 株に酵母 *S. cerevisiae* に対する活性が見られた。そこで、MK-30 株の 16S rDNA の配列を用いた同定を行い、*Streptomyces* 属の放線菌であることを明らかにした。寒天培養菌体をアセトン抽出し、抽出液を減圧濃縮後、逆相オープンカラムを用い含水メタノールによって溶媒分画した。活性の見られた 100% メタノール溶出画分から ODS カラムを用いた HPLC 分取によって新規抗酵母物質を単離した。この成分はポジティブイオンモードの ESI-MS 測定で m/z 822 にイオンピークを与えた。さらに化学構造を決定するために、重アセトン中での各種 NMR スペクトラムの測定を行い、構造決定を試みた。COSY, TOCSY, HMBC, HMQC の二次元 NMR スペクトラムの測定の結果、16 員環ラクトン構造を有する新規 bafilomycin 類縁体であることが明らかとなった。

5. 研究から得た結論・考察

MK-30 株から得られた物質はランチビオティックではなかった。しかしながら、TM59 株の産生する物質は新規性の高いランチビオティックであり、活性も非常に強く有望である。

6. 残された問題、今後の課題

残念ながら TM59 株から得られたランチビオティックの全構造を決定することが出来なかった。アミノ酸組成および、部分構造を明らかにしたことから、今後、化学分解などを行い構造を決定する予定である。