

乳酸菌 *Carnobacterium maltaromaticum* Sur 602の

産生する抗リステリア物質に関する研究

学位論文内容の要旨

低温食品流通システムは、非加熱または過度の加熱を行っていない調理済み食品を、微生物の増殖を抑えつつ流通させるのには有効な方法である。しかし、このような食品では一旦微生物に汚染された場合、食品流通・保蔵時に細菌が増殖または長期生残し、食中毒を引き起こす可能性が考えられる。実際に平成 10 年には、イクラ醤油漬けを原因食材とする、大腸菌 O157 による集団食中毒事例も報告されており、加工後の低温流通のみでは食品の安全性を確保できないのが現状である。

Listeria monocytogenes は、低温増殖能を有し、発症率は低いが重篤な症状を引き起こす食中毒原因菌である。*L. monocytogenes* は、様々な環境ストレスに対して耐性を持つため、自然環境中で長く生残でき、工場での製造工程や従事者の手指を介して、食品を汚染する可能性がある。我が国における食中毒事例はこれまでに 1 事例のみであるが、食品汚染率は欧米と大差ないことが報告されており、非加熱状態で水産食品を喫食する習慣を有する我が国では、本菌による食中毒事件が今後増加するものと考えられる。そこで本研究では、水産食品中での *L. monocytogenes* の挙動について調べるとともに、水産食品から分離した抗リステリア物質産生菌の微生物学的特徴、産生される抗菌物質の特性および食品への利用について検討した。

第一章では、市販の水産発酵食品に *L. monocytogenes* を接種後、種々の温度で貯蔵し、その挙動を観察した。ニシン切り込みでは、貯蔵中 *L. monocytogenes* は変動せず、静菌状態を保っており、イカ塩辛では、低温での貯蔵中 *L. monocytogenes* の著しい減少が確認された。また乳酸菌が多数検出されたいずしでは、試験開始から急激な *Listeria* 菌数の減少が観察された。しかし、*L. monocytogenes* は pH 3.4 でも生残可能なことから、この減少が乳酸菌による有機酸産生のみの影響と考えられないため、新たに 3 種類の異なる市販いずしにおいて乳酸菌との拮抗作用を調べた。いずれのいずしにおいても pH に差はなかった

が、*L. monocytogenes* 菌数の減少程度は製品によって異なっていた。すなわち、サケいずしでは *L. monocytogenes* 菌数の減少が顕著であり、その分離株には、*L. monocytogenes* の発育抑制能の高いものが多かった。

第二章では、市販水産食品からの抗リステリア性物質産生乳酸菌の分離を試み、魚肉すり身から分離できたので、既知の微生物と比較検討し同定を行った。この分離株 (Sur 602 株) は生態学的・生化学的性状から *Carnobacterium* 属であると判断され、さらに類縁菌との 16S rDNA 塩基配列の相同性および系統学的位置から *Car. maltaromaticum* Sur 602 と同定された。

第三章では、*Car. maltaromaticum* Sur 602 によって産生される抗菌物質の精製を試み、その特性について検討した。本抗菌物質の産生は、培地組成、初発 pH および培養温度によって大きく影響を受け、酵母エキス加 TSB, 30°C, pH 7.0 での培養が抗菌物質産生の至適条件であると判断した。この条件で培養した培養液から抗菌物質を硫酸アンモニウム沈殿、疎水性相互作用クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGE に供したところ、銀染色法によってもバンドは検出されなかったが、寒天重層法を用いた抗菌活性直接検出法で活性の認められる部分がゲル上に一カ所見られた。本抗菌ペプチドは、23 アミノ酸残基からなり、ウシ β -カゼイン N 末端の 69~91 残基の一次配列と完全に一致するものであった。このような抗菌ペプチドはこれまでになく、本研究で初めて報告するものである。そこでカゼインを培地に添加し、その産生能の変化を調べたところ、濃度依存的に最大抗菌活性値も大きくなった。本抗菌ペプチドはタンパク質分解酵素、熱および pH に対して、バクテリオシンと同様の感受性を示したが、脂質分解酵素によって部分的に失活した。また、本抗菌ペプチドの抗菌性は *Listeria* 属菌に対して非常に高い特異性を有しており、*Cl. botulinum* に対してもわずかに抗菌力を有していた。さらに本ペプチドの抗菌活性は低温、長期保存においても安定であった。したがって、低温増殖能を有する細菌に対しても、非常に有効な抗菌剤となり得る可能性があると言える。

また、Sur 602 株の産生する抗菌ペプチドは、感受性菌である *Listeria* 属菌に対してのみ吸着された。そこで膜表面を各種酵素および界面活性剤で処理したところ、リパーゼやトリトン X-100 の処理で吸着率の大幅な低下が認められた。このことは、本抗菌ペプチドの吸着に関与するタンパク質性レセプターの存在を否定するものであった。また、感受性菌に対する作用メカニズムは、短時間での殺菌作用、 K^+ 漏洩および細胞内部 ATP の消費・枯渇を引き起こすなど、クラス IIa バクテリオシンと類似したものであった。

第四章では、Sur 602 株を用いてカゼインを発酵させ、その発酵粉末による食品の安全性向上への応用可能性について検討した。カゼインのみでは菌が増殖せず、抗菌物質の産

生も全く認められなかったが、グルコースや酵母エキスの添加によって、菌の増殖および抗菌ペプチド産生は大幅に向上し、0.5 %酵母エキス添加で高力価の抗菌活性を有する発酵粉末を得ることができた。カゼイン発酵粉末溶液中では *L. monocytogenes* は急激に減少し、4 および 12°C の両温度において貯蔵 1 日目および 7 日目までに検出限界未満 (<300 CFU/ml) となった。また、発酵粉末を添加したひき肉でも、*Listeria* 菌数は急激に検出限界以下まで減少した。畜肉製品中における pH 低下や変敗の原因菌として乳酸菌の関与が報告されており、本実験においても乳酸菌の増殖による pH 低下とカゼイン発酵粉末との相乗効果によって、*L. monocytogenes* が死滅すると推察される。よってカゼイン発酵物は、非加熱食品中の *L. monocytogenes* の増殖を抑制し、より安全性の高い食品の流通に寄与できるものと考えられる。

以上、本研究では、水産発酵食品中での *L. monocytogenes* の挙動を調べ、そこに存在する乳酸菌が大きく影響することを見いだした。さらに、我が国で市販されている水産食品からも多数の抗菌物質産生菌が分離できることを明らかとした。その中から、*L. monocytogenes* に対して高い抗菌活性を有する物質を産生する株として *Car. maltaromaticum* Sur 602 株が得られ、本菌株によって培地中に産生される抗菌物質が、これまでに報告のない非常に新奇性の高いペプチドであることを示した。また、Sur 602 株は酵母エキス添加カゼイン溶液中で抗菌ペプチドを産生し、Sur 602 株によるカゼイン発酵粉末が新しい天然の抗菌物質として応用できる可能性を示した。このことは、今後バクテリオシンやその他抗菌物質産生菌をスターターカルチャーとして用いる場合の知見となりうると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 猪 上 徳 雄
副 査 教 授 吉 水 守
副 査 教 授 川 合 祐 史
副 査 助 教 授 山 崎 浩 司

学 位 論 文 題 名

乳酸菌 *Carnobacterium maltaromaticum* Sur 602の 産生する抗リステリア物質に関する研究

低温流通システムは、非加熱または穏和な加熱調理済み食品の微生物増殖を抑制させながら流通させる有効な方法であるが、このような環境では低温増殖能を有する細菌が増殖または長期生残する機会を与え、食中毒を引き起こす可能性が考えられる。実際、大腸菌 O157 による低温流通食品での集団食中毒事例も報告されており、加工後の低温処理だけでは食品の安全性を確保できないのが現状である。

Listeria monocytogenes (リステリア菌) は、低温増殖能を有する食中毒原因菌であり、様々な環境中に分布するため食品を汚染する機会も多い。我が国における食中毒事例はこれまでに 1 事例のみであるが、食品汚染率は欧米と大差ないことから、非加熱状態で水産食品を喫食する習慣を有する我が国では、本菌による食中毒事件の発生が懸念されている。

そこで本論文では、水産食品中でのリステリア菌の挙動について調べるとともに、水産食品から分離した抗リステリア物質産生菌の微生物学的特徴、産生される抗菌物質の特性および食品への利用について検討している。

第一章では、市販の水産発酵食品にリステリア菌を接種し、その挙動を観察し、リステリア菌の挙動に乳酸菌の存在が大きく関与しており、乳酸菌が検出されなかったものよりも多数検出されたものでリステリア菌の死滅の著しいことを見出している。しかし、リステリア菌は低 pH 下でも生残可能なことから、この減少が乳酸菌による産生される有機酸のみの影響と考えられないため、乳酸菌を含む 3 種類の市販いずしでのリステリア菌の動態を詳細に調べ、リステリア菌の減少程度が製品中に存在する乳酸菌相の相違によって異なることを明らかにしている。

第二章では、水産食品から抗リステリア性物質産生菌の分離を試み、魚肉すり身から強い活性を持つ Sur 602 株の分離に成功し、形態学および生理・生化学的性状検査結果ならびに 16SrDNA 塩基配列の相同性から Sur 602 株が *Car. maltaromaticum* と同定している。

第三章では、*Car. maltaromaticum* Sur 602 株によって産生される抗菌性物質の精製とその特性について検討している。至適培養条件で培養した培養液から抗菌性物質を硫酸アンモニウム沈殿、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによって精製し、プロテインシークエンサーで本抗菌性物質が 23 アミノ酸残基からなるペプチドであることを明らかにしている。またこの抗菌ペプチドが、ウシβ-カゼインの N 末端 69~91 残基の一次配列と完全に一致することを見出し、この配列を有するペプチドに抗菌性のあることを世界で初めて証明している。さらに、本抗菌ペプチドが脂質分解酵素の作用によって部分失活すること、また、その抗菌スペクトルが非常に狭くリステリア属菌に対して特異的に効果を発揮すること、さらに耐熱性、耐 pH 性を保有するとともに低温・長期保存にも耐えることを示し、食品の加工・製造および低温流通システム下でも有効に利用できる可能性を示唆する結果を得ている。

次に、Sur 602 株の産生する抗菌ペプチドの抗菌メカニズムについて検討し、感受性菌であるリステリア菌に対してのみ吸着し、その吸着がリパーゼやトリトン X-100 の処理によって大幅に低下することを認め、抗菌ペプチドの吸着にタンパク質性レセプターが関与のないことを推察している。また、本抗菌ペプチド物質が感受性菌の細胞表層に微少な孔を開けることで K^+ 漏洩と細胞内 ATP の消費・枯渇を誘引し、短時間で殺菌的に死滅させることを明らかにし、このメカニズムが乳酸菌の産生するクラス IIa バクテリオシンと類似したものであることを示す結果を得ている。

第四章では、Sur 602 株を用いてカゼインを基質とした発酵粉末を調製し、これによる食品の安全性向上技術の開発を検討している。すなわち、カゼインに食品用酵母エキスを微量添加することで高力価の抗菌活性を有するカゼイン発酵粉末を得られること明らかにしている。また、この発酵粉末をひき肉に添加することで、食品中のリステリア菌の発育を抑制するだけでなく検出限界未満まで急速に死滅させられ、さらにその抗菌性が長期間にわたって保持されることを示している。

以上本論文では、我が国で発生が懸念されているリステリア菌による食中毒の発生を未然に防止するための新しい制御法構築に有益な知見を明示している。よって、審査員一同は、本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。