

研究テーマ

「日本古来の寿司「なれずし」由来細菌の新規抗菌化合物同定とその化学構造決定」

研究責任者	所属機関名	三重大学	
	官職又は役職	准教授	
	氏名	市川 俊輔	メールアドレス ichikawa@edu.mie-u.ac.jp
共同研究者	所属機関名	三重大学	
	官職又は役職	准教授	
	氏名	増田裕一	

(令和5年度募集) 第36回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

本研究では、三重県発酵食品であるサンマなれずしから、防腐効果をもつ細菌・化合物を探索することを目的とした。塩漬けサンマと米を発酵させた試料から抗菌活性を示す細菌をスクリーニングし、枯草菌に対して増殖抑制を示す3株を単離することができた。最も活性の高かった単離株のゲノムを解析し、*Pseudomonas rhodesiae* と同定することができた。加えて、本単離株のゲノムから、非リボソームペプチド (NRPs)、リボソーム翻訳後修飾ペプチド (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides: RiPPs)、Lankacidin C、Fengycin、Pyoverdine SMX-1、Pf-5 pyoverdine、Pyochelin など二次代謝産物の合成遺伝子クラスターとの類似領域を検出することができた。加えて RNA-seq 解析によって、抗菌活性発現条件下で鉄獲得系遺伝子の転写量が顕著に上昇していることを確認し、上記二次代謝産物の合成、鉄イオンキレートを介した栄養競合型の抗菌メカニズムを支持できた。

P. rhodesiae は、さまざまな抗菌性二次代謝産物を産生し、特定の菌株は植物病害防除に寄与することが実証されており、この面ですでに産業利用されている。NRPs/RiPPs など本単離株由来抗菌化合物の熱安定性と消化分解性が確認されれば、ナイシンに続く国産クリーンラベル保存料としての応用が現実味を帯びる。以上の通り本研究成果は、地方発酵文化に眠る微生物資源を高付加価値化し、合成保存料の削減・フードロス低減・地域産業振興を同時に達成する新しいサーキュラー・バイオエコノミーの核技術となり得る。

2. 実施内容および成果の説明

本研究の背景と目的

なれずしは現代の寿司の原型とされている日本の伝統的な食品であり、三重県の郷土料理にも位置づけられている¹⁾。なれずしは、塩漬けした魚と炊いた米を桶に詰め、発酵させることによって作られる。この発酵プロセスにより、独特の風味を与えられ、また長期間保存が可能になる。発酵前は pH 6.1 程度であるが発酵後には pH 4.4 程度まで変化する²⁾。歴史的に、なれずしは特に冷蔵技術や酢の醸造技術がなかった江戸時代以前に、魚を長期保存できる手法として重宝された。東紀州地域のサンマなれずしは、30 年間にもおよび腐敗せずに保存できることがわかっている。

なれずしは抗菌性をもつことが確認されており³⁾、新たな天然由来の抗菌化合物の発見において期待されている。なれずし製品の微生物叢は、主に乳酸菌の集団で構成されている⁴⁾。乳酸菌の中には、バクテリオシンと総称される抗菌ペプチドを産生するものが存在する。乳酸菌バクテリオシンは、腸管内の消化酵素で容易に分解されて残留による負荷が少ないことから、安全性の高い抗菌物質と考えられている⁵⁾。

バクテリオシンのうち、ナイシンは社会実装できている貴重な天然物由来化合物として挙げられる。抗菌性ペプチドの一種であり、細胞膜攻撃性の耐熱性低分子（< 5kDa）である。また、ナイシン A の抗菌スペクトルは、他のバクテリオシンと比較して広く、多種乳酸菌やグラム陽性の食中毒細菌の多くに抗菌活性を示す。具体的には、レンサ球菌、ブドウ球菌、リステリア菌などの病原性菌に対して抗菌効果がある。しかし、単独ではグラム陰性菌に対しては効果を示さない。グラム陰性菌の細胞外膜を破壊、除去する効果のあるキレート剤と併用することで、グラム陰性菌に対しても抗菌作用を示すことが明らかとなっている⁶⁾。

なれずしは新たな天然由来の抗菌化合物を生産する細菌の探索において意義のある食材である。また、天然由来の化合物を加熱処理を適用することのできない食材の保存料として使用することは、消費者の安全性志向の高まりに伴い、需要の大きな研究であるといえる。本研究では、三重県発酵食品であるなれずしから防腐効果をもつ細菌・化合物を探索することを目的とした。

東紀州サンマなれずしからの細菌単離

サンマを塩に漬け 10-15 日程度重石をした。多めの水で 3 時間程度サンマの塩抜きをした。多めの水で炊いた米を、塩抜きをしたサンマにのせた。清潔な袋にサンマと米を入れて、塩水を入れて、空気が入らないように閉めた。これを 5℃環境に置き、3 週間発酵させた。発酵物の pH は 6.60 から 5.84 まで低下した。発酵物中の乳酸菌数を

3 M™ ペトリフィルム™ 乳酸菌数測定用プレート (3 M Company, MN, USA) で評価した。2 週間時点までは乳酸菌を検出できなかったが、3 週間時点で 7,000 CFU/g の乳酸菌の存在を確認できた。本発酵物を、発酵初期段階のサンマなれずしとした。あらためて、サンマなれずし中の細菌をペトリフィルム上で培養し、形成されたコロニーを無作為に単離した。

単離細菌のモデル細菌増殖抑制効果

単離した細菌を LB 培地に接種し、37°C、220rpm で 3 日間、振とう培養した。各単離細菌培養液を 0.22µm 滅菌フィルターをかけ、無菌ろ液を得た。得られた溶液の大腸菌 (*Escherichia coli* K-12) および枯草菌 (*Bacillus subtilis* 168) に対する増殖抑制効果を評価した。LB 培地にて、37°C、220rpm で 1 日間、大腸菌および枯草菌を振とう培養した。各培養液を LB 培地でそれぞれ 1000 倍希釈した後、96 well plate に 200 µL 添加し、サンプル溶液を 4 µL ずつ添加した。35°C のインキュベーター内で 1 日間静置培養し、その後の培養液の波長 630nm 吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定することで、細菌増殖を評価した。すべての細菌培養液において、大腸菌に対する増殖抑制効果は認められなかった。3 つの単離細菌の培養液は、枯草菌に対する有意な増殖抑制効果を示した ($p < 0.05$)。このなかで活性の強かった菌株の培養液について、枯草菌増殖過程を Stratus Kinetic マイクロプレートリーダー (Cerillo, VA, USA) を用いてモニターして、その抑制効果を再確認した (図 1)。

枯草菌増殖抑制効果を示す単離細菌の種同定

枯草菌に対して有意な増殖抑制効果を示した単離細菌のゲノム配列を解読した。ANI (Average Nucleotide Identity) 解析によって、本単離細菌は *Pseudomonas rhodesiae* だと同定することができた。なれずし中の *P. rhodesiae* の存在はこれまで報告されていない。*P. rhodesiae* は、*Pseudomonas fluorescens* グループに分類されているグラム陰性細菌で⁷⁾、土壌、水圏、動植物表面などさまざまな環境で生息している⁸⁾。

Pseudomonas 属細菌の抗菌活性に関して、複数報告されている。植物から単離された *Pseudomonas* 属細菌の中には、抗菌物質である 2,4-ジアセチルフロログルシノール (DAPG) を生産するものが存在する。DAPG は植物病原性真菌に対して増殖阻害効果を示すことが報告されている。また、特に蛍光性 *Pseudomonas* 属はシアン化水素、ピオルテオリン、ピロールニトリン、トキソフラビン、リゾキシシン、オルファミドなどの抗菌物質を産生することが報告されている⁷⁾。*Pseudomonas chlororaphis* は、*Pseudomonas protegens* と同様にシアン化水素およびピロールニトリンを産生するほか、フェナジンカルボン酸やフェナジンカルボキサミドを含む様々なフェナジン化合物を

産生する⁸⁾。また、大分県宇佐市近郊で採取された *Pseudomonas yoshitomiensis* Y-12278 の産生する菌体外成分から、新抗腫瘍性抗生物質 Bacrobolin が発見されている。

P. rhodesiae の抗菌活性については、たとえば植物病原菌に対する防除効果として、トマト萎凋病やトマト根腐萎凋病に対する防除効果が報告されている。また、キュウリ苗立枯病の防除にも効果があることが示されている⁹⁾。*P. rhodesiae* は、PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) として機能することも報告されている。*P. rhodesiae* を含む蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌は、さまざまな抗菌性二次代謝産物を産生しており、これらの物質が植物病害防除効果に関与していることが実証されている⁸⁾。これらの特徴と抗菌活性により、*P. rhodesiae* HAI-0804 株を有効成分とする微生物殺菌剤「マスタピース水和剤」が開発され、2013 年に日本で農薬登録が取得されている。

単離細菌が合成する化合物の推定

antiSMASH 解析により、本細菌ゲノム中から二次代謝産物合成遺伝子クラスターを 11 領域検出することができた (図 2)。たとえば、抗菌化合物として知られる非リボソームペプチド (Nonribosomal peptides : NRPs) 合成遺伝子クラスターを 4 つ検出することができた。これらから合成されると予想される NRPs コア化学構造を推定することができた (図 3)。

リボソーム翻訳後修飾ペプチド (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides: RiPPs) の合成遺伝子クラスターと類似性のある遺伝子領域を複数検出できた (図 2)。RiPPs は、リボソーム翻訳系のペプチドを基にした天然物の総称である。これらは、リボソームによって合成され、翻訳後、修飾を受けたペプチドと定義されている。RiPPs は真核生物、真正細菌、古細菌などさまざまな生物によって生合成され、広範囲な生化学的特徴を有することで知られている。RiPPs にはさまざまな有名な化合物が含まれており、たとえば、ナイシン、チオストレプトン、ファロイジン、アナンチンなどがあげられる¹⁰⁾。これらの化合物は、さまざまな生物活性をもち、医薬品や研究用途などの分野で利用されている。特定の細菌によって産生される抗菌ペプチドであるバクテリオシンは RiPPs の一種として分類され、主に類縁菌に対して抗菌活性を示す¹¹⁾。

加えて、Lankacidin C、Fengycin、Pyoverdine SMX-1、Pf-5 pyoverdine、Pyochelin の合成遺伝子クラスターと類似性を示すゲノム領域が見つかることができた (図 2)。Lankacidin C は、*Streptomyces* 属細菌から単離された天然物抗生物質である。17 員環マクロラクトン構造を持つ複雑な分子構造を有し β -ケト- δ -ラクトン核を含む特徴的な構造を持つ。タンパク質合成阻害作用を示し、その活性はエリスロマイシンと同程度である。また、抗菌活性を有し、マクロライド耐性菌に対しても効果を示す¹²⁾。Fengycin

は、枯草菌の複数の株が生産する生物活性のあるリポペプチドである¹³⁾。その構造は、10 個のアミノ酸からなるペプチド部分に結合した β -ヒドロキシ脂肪酸で構成されており、8 個のアミノ酸が環状構造を形成している。Fengycin は、糸状菌に対して抗真菌作用を持つことが知られている。また、サーファクチンと比較して 40 倍近い溶血活性を持つ。

Pseudomonas sp. SXM-1 は、海水から分離された細菌で、Pyoverdine SMX-1 を生産することができることで知られている¹⁴⁾。Pyoverdine SMX-1 は鉄イオンと強く結合する能力を持ち、細菌の鉄獲得に重要な役割を果たしている。また、病原性因子の一つとして機能し、栄養素の供給や病原性因子の制御、バイオフィルムの形成の援助、毒性の強化などの役割を持っている。Pf-5 pyoverdine は、土壌細菌 *Pseudomonas protegens* Pf-5 が生産するシデロフォアの一つである¹⁵⁾。特に、鉄濃度が低い環境下において生産が誘発される。また、競合するほかの細菌の成長を抑制する効果がある¹⁶⁾。Pyochelin は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) が産生する主要なシデロフォアの一つである¹⁷⁾。主に、 Fe^{3+} と結合するが、他の金属イオンとも結合可能な物質である。細胞外で鉄と結合し、特異的な外膜トランスポーター (FptA) を介して細胞内に鉄を輸送する。Pyochelin は緑膿菌の病原性と関連を持っている。本研究では、培養条件によって単離細菌の抗菌活性発現を制御できた。抗菌活性発現がある条件とない条件で単離細菌を培養してその対数増殖期細胞を回収し、各条件ではたらく遺伝子を網羅的に解析した (RNA-seq 解析)。抗菌活性発現がある条件では、鉄の取り込みに関する遺伝子のはたらきが大きくなっており、鉄の奪い合いが抗菌活性に関わっていることを支持する結果を得ることができた。

参考文献

- 1) Matsui et al. Journal of Home Economics of Japan. 2011 62(10):633-637.
- 2) Chang et al. Fisheries Science. 1992 58(10):1961-1969.
- 3) Horikoshi. Journal of the Brewing Society of Japan. 2012 107(6):389-394.
- 4) Koyanagi. Japanese Journal of Food Microbiology. 2021 38(1):1-8.
- 5) Zendo et al. Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria. 2014 25(1):24-33.
- 6) Masuda et al. Milk Science. 2010 59(1):59-65.
- 7) Anzai et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2000 50 Pt 4:1563-1589.
- 8) Someya et al. Kagakutoseibutsu. 2019. 57(9):541-548.
- 9) Takeuchi et al. Front Microbiol. 2024 15:1485167.
- 10) Wyss et al. J Antibiot (Tokyo). 1991 44(2):172-80.
- 11) Cotter et al. Nat Rev Microbiol. 2013 11(2):95-105.
- 12) Cai et al. J Am Chem Soc. 2020 142(35):15116-15126.
- 13) Deleu et al. Biophys J. 2008 94(7):2667-79.
- 14) Guo et al. Mar Genomics. 2021 55:100802.
- 15) Hartney et al. J Bacteriol. 2013 195(4):765-76.
- 16) Sexton et al. Environ Microbiol. 2017 19(9):3514-3525.
- 17) Braud et al. J Bacteriol. 2009 191(11):3517-25.

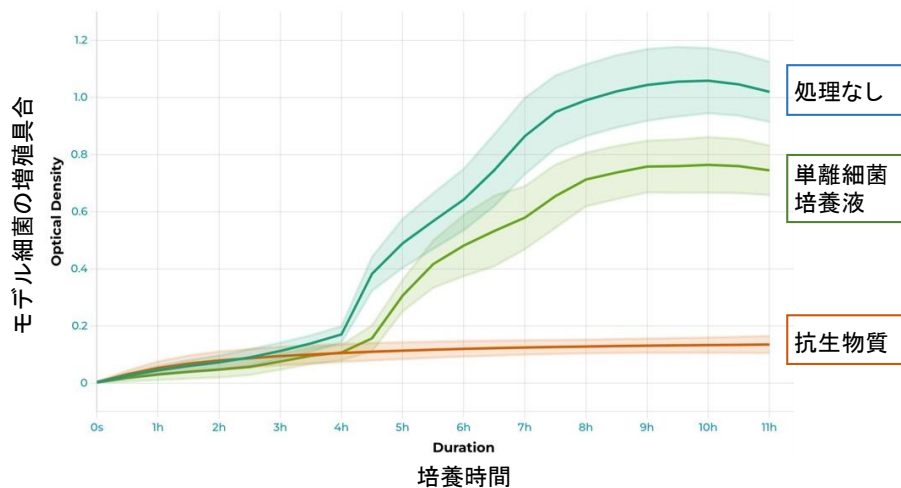


図 1：単離細菌培養液の枯草菌増殖抑制

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	NRPS  , hydrogen-cyanide  , NRP-metallophore 	71,574	160,583	pyoverdine SMX-1  NRP	35%
Region 1.2	NRP-metallophore  , NRPS 	653,619	707,204	pyochelin  NRP	85%
Region 1.3	RiPP-like 	911,711	923,939		
Region 2.1	NAGGN 	85,768	100,580		
Region 2.2	NRPS 	132,572	185,468	Pf-5 pyoverdine  NRP	10%
Region 4.1	RiPP-like 	33,379	44,224		
Region 4.2	redox-cofactor 	543,613	565,760	lankacidin C  NRP+Polyketide	13%
Region 5.1	betalactone 	427,808	456,156	fengycin  NRP	13%
Region 6.1	arylpolyene 	166,373	209,948	APE Vf  Other	40%
Region 8.1	RiPP-like 	30,480	41,355		
Region 16.1	NRPS-like 	64,981	91,602	fragin  NRP	25%

図 2：単離細菌ゲノム中の二次代謝産物合成遺伝子クラスターの推定

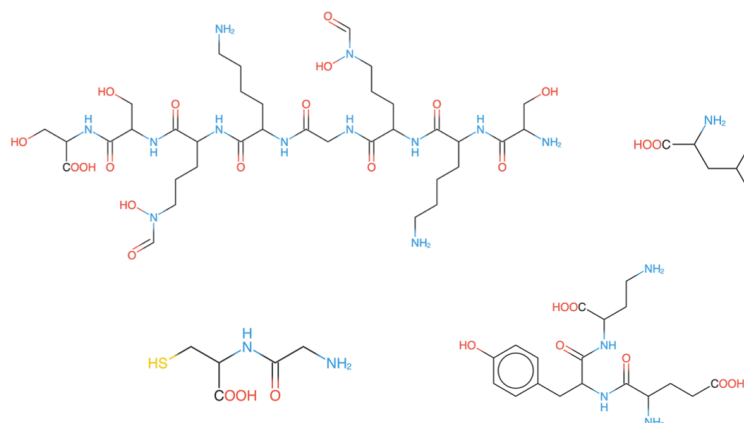


図 3：単離細菌が合成すると予想される NRPs のコア化学構造