

論文内容の要旨

氏名	安藤 ひとし 仁
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農第183号
学位授与の日付	平成24年9月13日
学位授与の要件	学位規程第5条
学位論文題目	発酵食品由来の微生物が生産する抗菌抗真菌物質に関する研究
論文審査委員(主査)	教授 岸 本 憲 明
(副主査)	教授 河 村 幸 雄
(副主査)	教授 田 中 裕 美

バイオプリザベーションとは、ヒトが食品とともに長期間食べてきた食品微生物やそれらが生産する抗菌物質を利用して食品を保存する方法で、安全性の高い食品の保存技術として期待されている。

本研究では、発酵食品から食品汚染糸状菌 *Aspergillus brasiliensis* の胞子発芽阻害物質を生産する微生物を探索し、抗菌抗真菌物質の特性を評価した。次に、この抗菌物質に高い感受性を示した *Escherichia coli* に対する生育阻害機構と *E. coli* の抗菌物質に対する耐性機構について解析した。

第1章では、*A. brasiliensis* 胞子の発芽を阻害する微生物を発酵食品から探索した。そして、イラン産市販チーズから NP9 株を分離し、26S rDNA D1/D2 遺伝子の塩基配列と生理・生化学的性状試験の結果から、NP9 株を *Candida maltosa* と同定した。*C. maltosa* NP9 が生育した平板培地と *A. brasiliensis* 胞子を混釈した平板培地を重ね合わせて培養すると、*A. brasiliensis* の生育が阻害された。また、NP9 株の生育した平板の一部を活性炭に置換すると、*A. brasiliensis* は生育した。これらの結果から、*C. maltosa* NP9 は揮発性抗真菌物質を生産していることを見出した。

第2章では *C. maltosa* NP9 が生産する揮発性抗真菌物質を同定した。YPD 平板培地に生育した NP9 株の気相成分を SPME-GC/MS 分析した結果、7 本のピークを検出し、このうち 3 本のピークを酢酸イソアミルとイソアミルアルコール、フェネチルアルコールと同定した。これら 3 成分の胞子発芽阻害活性を vapor-agar contact 法で試験した。その結果、酢酸イソアミルとイソアミルアルコールは 20  $\mu$ l/dish で胞子発芽を完全に阻害したが、フェネチルアルコールは 160  $\mu$ l/dish でも阻害しなかったことから、NP9 株が生産する揮発性抗真菌物質は、酢酸イソアミルとイソアミルアルコールであることを見出した。

次に、vapor-agar contact 法で試験した気相中の酢酸イソアミルとイソアミルアルコール濃度を測定した。酢酸イソアミル量の最大値はイソアミルアルコールより約 2.5 倍高く、添加 2 h 後から急速に減少し、20  $\mu$ l/dish 添加した容器では 48 h 後には約 15% に減少した。一方、イソアミルアルコールの気相中量は添加 48 h 後でも一定の値を保っていた。この違いは、水素結合によって会合しているアルコール類は、エステル類に比べて揮発性が低いことに由来すると考えられる。

揮発性酢酸イソアミルに曝露した *A. brasiliensis* 胞子は、大きさや形態ともに変化していなかったことから、揮発性酢酸イソアミルは胞子発芽の吸水段階を阻害していることが示唆された。一方、揮発性イソアミルアルコールに曝露した胞子では、胞子外殻の突起状構造が消失していたことから、イソアミルアルコールは膨潤段階を阻害していることが示唆された。両者の阻害段階の違いは、イソアミルアルコールの揮発性が酢酸イソアミルより低いことに起因すると考えられる。

揮発性イソアミルアルコールは供試系状菌 15 種すべてと、酵母 4 種、細菌 8 種の生育を 160  $\mu$ l/dish で殺菌的に阻害した。一方、揮発性酢酸イソアミルは糸状菌 3 種と酵母 2 種、細菌 2 種しか殺菌しなかったことから、イソアミルアルコールは酢酸イソアミルより幅広い抗菌抗真菌活性を示すことを明らかにした。しかし、グラム陰性細菌では、イソアミルアルコールより酢酸イソアミルが高い抗菌活性を示した。特に *E. coli* の生育は 20  $\mu$ l/dish の酢酸イソアミルで殺菌的に阻害された。

第3章では揮発性酢酸イソアミルが *E. coli* の生育阻害に与える効果を調べた。*E. coli* NBRC 3301 は揮発性酢酸イソアミルに高い感受性を示した。揮発性酢酸イソアミル (20  $\mu$ l/dish) に 3 h 曝露した *E. coli* は生育が抑制され、5 h で完全に阻害された。しかし、5 h 曝露した *E. coli* を電子顕微鏡で観察しても、菌の形態や細胞内部の構造に変化は認められなかった。

一方、揮発性酢酸イソアミルに 5 h 曝露した *E. coli* は CTC 蛍光試薬で発色しなかったことから呼吸活性が消失していることを、また、PI 蛍光試薬で染色されたことから膜が損傷を受けていることを見出した。揮発性酢酸イソアミルに 5 h 曝露した *E. coli* は、形態学的には大きな損傷を受けていないものの、細胞膜に損傷を受け、呼吸活性も消失して死滅していることを明らかにした。

第4章では揮発性酢酸イソアミルに曝露した *E. coli* タンパク質の発現変動を解析した。揮発性酢酸イソアミルに 5 h 曝露した *E. coli* と未曝露の *E. coli* からタンパク質を抽出し、IC-Dye を用いた蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動で比較した。また、MALDI-TOF/MS を用いたペプチドマスマフィンガープリンティング法により、発現が変動したタンパク質を同定した。

揮発性酢酸イソアミルに曝露した *E. coli* の可溶性タンパク質と膜タンパク質画分では、発現量が変動した多数のタンパク質スポットが検出された。可溶性タンパク質画分

から発現量が減少した 4 種類のタンパク質を選出し、糖輸送に関わるタンパク質 MalE、MglB、Crr と酸化還元酵素 AhpC と同定した。

一方、膜タンパク質画分では、発現量が増加したタンパク質が多く検出され、11 種類のタンパク質を選出して、解糖系に関わる Pfl、PtsI や TCA 回路に関わる AceA、AcnB、タンパク質合成に関わる EF-Tu、EF-G、GlyS と同定した。同定したタンパク質には、*E. coli* において酸やアルコールストレスに応答して発現が変動するタンパク質が含まれていた。

また、*E. coli* 菌体のエステラーゼ活性を測定したところ、*p*-ニトロフェニル酢酸を基質としたエステラーゼ活性を見出した。揮発性酢酸イソアミルアルコールや酢酸イソアミルより高い抗菌活性を示したことから、揮発性酢酸イソアミルはエステラーゼによって加水分解され、生成した酢酸とイソアミルアルコールが *E. coli* の生育を阻害したことが強く示唆された。

第5章では、揮発性酢酸イソアミルに対して感受性が異なる *E. coli* の耐性機構を検討した。*E. coli* IFO 3806 は 20  $\mu$ l/dish でも殺菌されず、他の 4 株より高い耐性を示した。そこで、感受性株 NBRC 3301 株と耐性株 IFO 3806 株の膜タンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、NBRC 3301 株とは異なり、IFO 3806 株で構成的に発現している 35 kDa のタンパク質を見出し、外膜タンパク質 OmpA と同定した。OmpA は、外膜の構造維持や酸ストレス耐性に関与していると言われていた。*E. coli* の揮発性酢酸イソアミルに対する耐性機構には OmpA が関与していることが示唆された。

酢酸イソアミルは清酒酵母が吟醸過程で生産する吟醸香の主成分で、バナナ様の香料として利用されている。本研究によって、酢酸イソアミルは香料としての利用だけでなく、安全な保存料として応用できることを示した。

## 論文審査結果の要旨

食品微生物が生産する有機酸とバクテリオシンが、安全性の高い食品保存料として利用されている。バクテリオシンは耐熱性が高く無味無臭で、nM単位で細胞膜に作用する抗菌ペプチドで、消化酵素で分解されるなどの利点が多いが、抗菌スペクトルが狭いという課題がある。

本研究では、発酵食品から抗菌スペクトルの広い抗菌物質を生産する微生物を単離し、抗菌物質の同定と、その作用機構を明らかにすることを目的とした。そして、イラン産市販チーズから食品汚染糸状菌 *Aspergillus brasiliensis* の孢子発芽を阻害する物質を生産する酵母 *Candida maltosa* NP9株を単離した。この酵母は揮発性抗真菌物質を生産して、孢子発芽を阻害していることを明らかにしている。

既存の抗菌物質の多くは、溶液中で微生物と接触あるいは細胞内に取り込まれて抗菌活性を発現しているが、揮発性抗菌物質を生産する食品微生物の報告はほとんどない。植物の生産する精油が揮発性抗真菌物質としてよく知られているが、天然の精油には多くの成分が混在し、単一成分の抗菌活性を明らかにした研究は少ない。発酵食品から単離した酵母が揮発性抗菌物質を生産した報告は、本研究が初めてである。

*C. maltosa* NP9 の生産する揮発性抗菌物質は、酢酸イソアミルエステルとイソアミルアルコールと同定した。酢酸イソアミルは清酒酵母がもろみ発酵中に生産する吟醸香としてよく知られており、酢酸イソアミルを高生産する吟醸酒酵母が育種されている。また、イソアミルアルコールは、ラム酒やウイスキー様の香気を有し、果実、野菜、乳製品等の食品に天然に含まれている成分である。いずれも食品添加物(香料)として認可されているが、酢酸イソアミルの抗菌活性はまだ明らかにされていない。

そこで本研究では、気相中の酢酸イソアミルとイソアミルアルコール量と抗菌活性を検討した。酢酸イソアミルはイソアミルアルコールより揮発量が高く、これは酢酸イソアミルがアルコールのように水素結合で会合していないことに起因していると推察している。また、揮発性イソアミルアルコールの抗菌スペクトルは広く、糸状菌、酵母、細菌の生育を殺菌的に阻害した。揮発性酢酸イソアミルはイソアミルアルコールに比べると抗菌スペクトルは狭かったが、*E. coli* の生育を強く阻害した。そして、揮発性酢酸イソアミルは *E. coli* の細胞膜に損傷を与え、呼吸活性とコロニー形成能を消失させて、完全に死滅させていることを明らかにした。

また、揮発性酢酸イソアミルに曝露した *E. coli* では、多数の可溶性タンパク質と膜タンパク質の発現量が変動していたことから、揮発性酢酸イソアミルは広範囲な個所に

作用していると考察している。また、変動したタンパク質を同定したところ、*E. coli* において酸やアルコールストレスに応答して発現が変動するタンパク質が含まれていた。さらに、*E. coli* 菌体から *p*-ニトロフェニル酢酸を基質としたエステラーゼ活性を検出している。揮発性酢酸イソアミルはイソアミルアルコールより高い抗菌活性を示したことから、揮発性酢酸イソアミルはエステラーゼによって加水分解され、生成した酢酸とイソアミルアルコールが *E. coli* の細胞膜に蓄積して、物理的損傷を与え、膜タンパク質の機能を消失させることにより、様々なタンパク質の発現を変動させていると推察している。

さらに、揮発性酢酸イソアミルに耐性を示した *E. coli* 株の外膜では、OmpA が発現していることを見出し、OmpAが外膜の構造維持や酸ストレス耐性に関与している可能性を示唆している。

これらの研究成果は、日本農芸化学会、日本生化学会、日本微生物生態学会などで計5回口頭発表を行うとともに、オリジナリティの高い国際学術誌に筆頭著者として公表しており、研究業績は高く評価されている。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成24年7月17日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。