

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06382

研究課題名(和文) 抗菌ペプチド「ナイシン」とエタノールを組み合わせた抗菌剤の開発とその作用機構解析

研究課題名(英文) Development of antimicrobial agent for antimicrobial peptide "nisin" in ethanol and its action mechanism

研究代表者

川井 泰 (KAWAI, Yasushi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00261496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： チーズ製造用乳酸菌により生産される抗菌ペプチド(バクテリオシン)のナイシンと低～高濃度(5～80%)エタノールを組み合わせた高い殺菌効果を有する実用化可能な抗菌剤の開発を試みた。その結果、30 および37℃にて、ナイシン添加濃度2.5mg/L以上、pH4、および遮光有りでナイシン活性が半年間以上で維持されることを見出した。

また、各ナイシン自己耐性因子(NisI、NisK)の発現株の取得に成功し、NisK発現株がNisIに匹敵するナイシン耐性機構を有することを見出すと共に、同耐性遺伝子導入株に対して低濃度(5%)エタノール・ナイシン溶液が高い抗菌効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有用な抗菌ペプチドであるナイシンは、中性pH域においては溶解性の低下により抗菌効果が大幅に低減することが知られている。本研究では、中性pH域の溶媒としてエタノールに着目し、ナイシンと組み合わせて抗菌活性を測定したところ、大腸菌を含むグラム陰性菌に対して抗菌効果を示すと共に、低濃度のエタノール添加でナイシン単独では殺菌出来ないナイシン生産株・耐性株の殺菌に成功した。また本製剤の長期保存条件を見出し、安価で安全かつ広く利用可能な抗菌剤の提供が可能になった。本エタノール・ナイシン溶液はスプレーや浸漬剤として、食品をはじめ、厨房等の周辺環境の安全で効果的な殺菌剤として利用性が期待される。

研究成果の概要(英文)： A practical antimicrobial agent with high bactericidal effect by combining nisin, an antimicrobial peptide (bacteriocin) produced by lactic acid bacteria for cheese production, with low to high concentration (5-80%) of ethanol was developed. As a result, we found that nisin activity was maintained at 30 and 37℃ for more than half a year at a nisin concentration of 2.5 mg/L, pH 4, and with light shielding.

We also succeeded in obtaining strains expressing each nisin self-tolerance factor (NisI and NisK) and found that NisK-expressing strains have a nisin resistance mechanism comparable to that of NisI, and that a low concentration of 5% ethanol/nisin solution showed high antibacterial activity against the transgenic strains.

研究分野：食品微生物学

キーワード：抗菌ペプチド ナイシン エタノール 保存性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ナイシンは、チーズ製造用乳酸菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) により生産される抗菌ペプチド (バクテリオシン) で、日本 (2009 年に認定) を含む世界 50 ヶ国以上で食品添加物として使用されている唯一のバクテリオシンである。最近、我が国でも業務用食品から大手食品メーカーの製品に使用されるなど、各種の食品や口腔ケア剤などへの利用性が拡大している。

1920 年代にイギリスで発見されたナイシンは、1971 年にランチオニン等の修飾アミノ酸を含む 34 アミノ酸残基からなる構造が明らかにされ、1988 年にはアメリカで GRAS (Generally recognized as safe) 認定を受けている。また、グラム陽性細菌に対して幅広い抗菌効果を有し、細菌に普遍的なペプチドグリカン前駆体 (Lipid II) をレセプターとして孔を形成するために、食品への利用から半世紀以上経過した現在でも深刻な耐性菌の出現は無く、腸管内で速やかに分解されることから、理想的な食品保存剤として大きな期待が寄せられている。

しかしながら、ナイシンは大腸菌等のグラム陰性菌には無効であり、また中性 pH 域での溶解性低下により抗菌効果が大幅に低減することが知られている。多数の食品は弱酸性から中性 pH 域であるため、ナイシンの添加量を増やす必要があり、コスト上昇と添加基準値の遵守からも克服すべき世界的な課題となっていた。

### 2. 研究の目的

当研究室では、ナイシンの溶解度を上昇させ、抗菌活性を最大限に引き出す溶媒について検討を行った結果、低濃度 (20%、v/v) エタノールとの併用により本来はナイシン単独では効果の無い大腸菌に対しても強力な殺菌相乗効果が得られ (文献) ナイシンの利用拡大に繋がる可能性を見出した。ナイシンとエタノールの併用については、相乗抗菌効果を有することは以前から知られていたが、その利用性と効能について言及した論文は僅かであり、それも低濃度エタノールを用いた試験結果に限られていた。

また、当研究室にて高濃度 (70、80%、v/v) エタノールのみでは短時間での除菌が不十分であるデータを取得してきたが、ナイシンとの組合せによる抗菌効果と市販化に向けた製剤としての安定性・保存性についての情報は不明であった。

さらに、ナイシン生産株はナイシン耐性因子 (タンパク質、ペプチド) を有することからナイシンの抗菌効果は認められないが、これまでにナイシン生産株やナイシン耐性因子保有株のエタノールとナイシンの組合せによる耐性能とその変化については調べられていない。

そこで本申請研究では、これまで検討されていなかった高濃度エタノールとナイシンを組み合わせたナイシン耐性株への抗菌効果と抗菌剤としての安定性・保存性を調べ、市販・実用化可能な抗菌剤の開発を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 方法(1) エタノール・ナイシン溶液の常温下における活性低下要因の解明と保存性向上

これまでの検討により、エタノール・ナイシン溶液の抗菌活性は 4 保存下で比較的安定であるものの、常温・37 下では (特にナイシン低濃度時に) 大幅な活性の低減が認められている。本抗菌剤の市販化には長期間での活性安定化が望ましいことから、常温保存を可能とする条件 (ナイシン添加濃度、pH、遮光容器素材の選定等) について検討を試みた。なお、各抗菌活性の測定は寒天拡散法を用いて実施した。

#### 方法(2) ナイシン生産菌に対するエタノール・ナイシン溶液の効果

抗菌ペプチドであるナイシンを生産する乳酸球菌 (*Lc. lactis*) は、ナイシン生産と共にナイシンから自身を保護する耐性機構 (自己耐性タンパク質およびペプチド:後述) を有している。ナイシン生産菌やナイシン耐性菌はナイシンに対して高い抵抗性を有しており、エタノール・ナイシン溶液の効果は低減する可能性が考えられている。そこでエタノール濃度別にエタノール・ナイシン溶液のナイシン生産菌 (*Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC12007) に対する殺菌効果とその耐性能について測定した。

#### 方法(3) ナイシン耐性菌に対するエタノール・ナイシン溶液の効果と耐性因子の解明

ナイシン耐性因子 (NisI: 自己耐性タンパク質、NisEFG: ナイシン排出トランスポーター、および NisK: 菌体外のナイシンを付着・認識するヒスチジンキナーゼ) を乳酸球菌由来の発現ベクターに組み込み、各発現株を構築した。次いで、取得した各発現株に対して、各濃度のエタノール単独、ナイシン単独、およびエタノール・ナイシン溶液を感作させ、各ナイシン耐性因子の関与とその耐性能、およびナイシンの各菌体付着性について解析した。

#### 4. 研究成果

##### 結果(1) エタノール・ナイシン溶液の常温下における活性低下要因の解明と保存性向上

これまでエタノール・ナイシン溶液は 37℃ 下にて 2 ヶ月程度で大幅な活性低下が認められていた。そこで各検討を行ったところ、現実的に即した 30℃ にて、80%エタノール、ナイシン添加濃度 2.5mg/mL 以上、pH4 (乳酸により調整)、および遮光有りの条件で有効なナイシン活性が 9 ヶ月間で維持されることを見出した。本結果より、エタノール・ナイシン溶液の常温保存に問題はなく、エタノール・ナイシン溶液の市販化は実現可能と考えられた。

##### 結果(2) ナイシン生産菌に対するエタノール・ナイシン溶液の効果

ナイシン生産乳酸菌株 (*Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC12007) に対して、ナイシン単独、低濃度 (20%) エタノール単独ではいずれも効果は認められなかったが、20%エタノール・ナイシン溶液にて有効な相乗効果が提示されることを見出した。本結果より、エタノール・ナイシン溶液により、ナイシン存在下で生残するナイシン生産株の制御が可能であることが明らかとなり、食品および各環境で生残するナイシン生産株に有効な対策となり得ると考えられた。

##### 結果(3) ナイシン耐性菌に対するエタノール・ナイシン溶液の効果と耐性因子の解明

ナイシン自己耐性因子の一つである NisI は指標菌細胞膜に接近するナイシンを捕捉 (付着) し、NisF、NisE、および NisG による複合体がトランスポーターとしてナイシンを菌体外へ排出する機構が知られている。また、ナイシンの生産は NisK を含む三成分制御系により制御されており、NisK は菌体外のナイシンを認識 (付着) し、レスポンスレギュレーターである NisR にリン酸を受け渡す機能を担っている (その後、リン酸化された NisR は、*nis* オペロンの転写活性を促進し、結果としてナイシン生産が向上する)。これまでナイシン自己耐性因子とその保有株に対するエタノールの影響については一切不明であった。そこで本研究では、自己耐性機構を担う、もしくは担うと推定される各因子の単独発現株を構築し、エタノール・ナイシン溶液に対する抗菌効果について検証を試みることにした。その結果、NisI、NisFEG、および NisK の各単独発現株の取得に成功し、NisK 発現株が NisI に匹敵するナイシン耐性機構を有することを初めて見出した。

続いて、NisK を含む各ナイシン耐性遺伝子導入株に対するエタノール・ナイシン溶液の抗菌効果と菌体付着性を検討した結果、20%エタノール・ナイシン溶液は、ナイシン耐性を有する全ての遺伝子導入株に対して、高い抗菌効果 (Fig.1) と菌体付着性を示した。また、低濃度のエタノール単独では殺菌的に作用しないことから、20%エタノールにより各自己耐性タンパク質の機能が停止すると共に、エタノール存在下でナイシンは強固に菌体に付着することで 20%エタノール・ナイシン溶液が抗菌効果を提示していると考えられた。

以上の結果から、エタノール・ナイシン溶液は、ナイシン単独では効果の無い大腸菌をはじめナイシン耐性を有するナイシン生産菌等、グラム陽性・陰性を問わず細菌全般に抗菌効果を有する極めて有効な抗菌剤であることが明らかになった。また、長期保存性を保有した、低濃度のエタノール

存在下でも抗菌効果を提示可能な製剤として、食品から台所・厨房施設、畜産現場まで幅広く使用可能と考えられる。なお、エタノール・ナイシン溶液の食品 (食肉) における活用では特許取得には至らなかったが、特許とは無関係に本技術が広く利用されることを期待している。

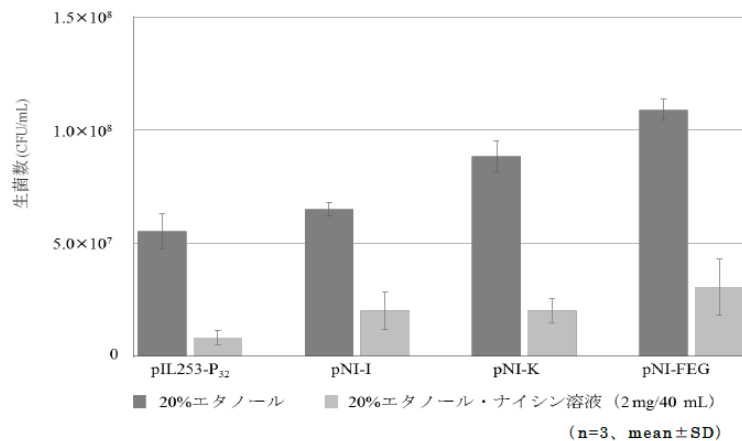


Fig. 1. 各遺伝子導入株における各溶液感作時の経時的生菌数

(感作条件: 室温、5 秒間)

#### 引用文献

川井 泰、総説「エタノール中におけるナイシンの抗菌効果とその感作菌体内物質の網羅解析」、*FFI ジャーナル*、第 218 巻 (No.2)、142-148、2013。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高 升、納谷遥南、今西一果、田邊智也、中山詠文、増田哲也、川井 泰
2. 発表標題 二成分性バクテリオシン “ガセリシンS” とその類縁体 “アシドシンLF221A” の抗菌活性比較
3. 学会等名 日本畜産学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本食品免疫学会編（分担：川井 泰）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 496
3. 書名 食品免疫学事典（分担：5-28 プロバイオティクス）	

1. 著者名 監修：木下英樹、井越敬司（分担：春日元気、川井 泰）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 205
3. 書名 乳酸菌の機能と産業利用（分担：乳酸菌が生産するバクテリオシンと食品保存への応用）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------