

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月13日現在

機関番号：37119

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22590567

研究課題名（和文） パネットーネ乳酸菌が分泌する未知の食品用抗カビ性因子に関する研究

研究課題名（英文） Study on the unknown anti-mold factor for food use which is excreted by a panettone lactobacilli

研究代表者 甲斐達男 (KAI TATSUO)

西南女学院大学保健福祉学部・栄養学科・教授

研究者番号：60331899

研究成果の概要（和文）：

パネットーネ乳酸菌が分泌する抗カビ性因子の作用点として DNA 合成阻害活性が確認された。本因子の高活性画分と低活性画分を LCMS で差異分析を試みた結果、目的の物質と思われる成分の分子量と組成式を割り出すことに成功した。本成分は、グラム陰性・陽性の双方の細菌と、カビに対して抗菌活性があり、その作用点と分子量から推察すると、新しいタイプのニューキノロン系抗菌剤であることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

DNA synthesis was inhibited by the anti-mold factor excreted by panettone lactobacilli. As the result of LCMS differential analysis between high activity fraction and low activity fraction, the molecular weight and the chemical composition of the possible targeted factor was successfully obtained. Considering that this factor is inhibitory to the growth of both the gram negative- and positive-bacteria and mold, and also considering its action point of inhibiting the growth of bacteria and its molecular weight, it is expected that this factor might be a novel type antibiotic of new-quinolon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：食品衛生

1. 研究開始当初の背景

当初、われわれは、人体に安全で効果の強い抗カビ剤の実用化が強く世界中で望まれていることを背景にして、食用抗カビ剤の発見を目指して研究に着手した。抗カビ剤については抗菌剤に匹敵するような、安全で効力の強いものがないため、バナナや柑橘類の皮に使用されるもの以外では、一般の食品に食用として使用が認可されているものがないのである。

われわれが研究材料として着目したのは北部イタリアで伝統的に食されている天然酵母パンの「パネットーネ」であった。ふつうのパンが1週間程度の放置期間でカビが発生するのに対して、この「パネットーネ」は防腐剤を使わないのに数カ月～半年の間、カビもネトも発生せずに長持ちすることで知られる。この理由としては、糖の使用量が多い菓子パンであり水分活性が低いことが言われているが、われわれは、パン種に生

育するマイクロフローラの中に何らかの抗カビ性因子を分泌している微生物がいるのではのではないかと考えたのである。

さらに、「パネットーネ」が食品であるゆえに、もし抗カビ性因子が微生物によって分泌されているとしたら、その因子は次のような特性を持つことが予測された。

- (1) 人体に対して無害であること。
- (2) 加工の際に加熱操作が入るので、耐熱性であること。

そこでわれわれは、ミラノ大学農学部応用微生物学研究室の協力を得て、イタリアで入手した家伝のパン種から分離した酵母菌と乳酸菌を得、抗カビ性因子が分泌されていないかどうかのスクリーニングを行った。その結果、強い抗カビ活性を示す酵母菌と乳酸菌の分離に成功した。なかでも、パネットーネ乳酸菌 *Lactobacillus sanfranciscensis* #2 は、強い抗カビ活性を示したことから、この菌が分泌する抗カビ性因子に関する解析を行ってきた。

2. 研究の目的

われわれは、これまでの研究から、北部イタリアの天然酵母パン「パネットーネ」の母生地から分離した乳酸菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*) の培養上清に、グラム陰性・陽性の双方の細菌およびカビの生育抑制能があることを発見した。この因子の作用点を調べたところ DNA 合成阻害活性があることが見出された。これまで細菌類全般と真菌類に対して生育抑制能があり DNA 合成阻害を作用点とする抗生物質はニューキノロン系の薬剤のみであったが、今回発見した因子の分子量は 500 以下と小さいことから、ニューキノロン系以外の新規な抗生物質であることが期待される。本研究は、この DNA 合成阻害因子の分離精製および化学構造の決定を目指すとともに、本因子の医薬品としての諸性状を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

列挙すると以下のような事柄である。

- (1) 抗カビ性因子を分泌している乳酸菌の同定を行った。
- (2) 抗カビ性因子を分泌する乳酸菌株から得た抗カビ性因子の精製標品について、作用点を明らかにすることによって、既存の抗菌剤と同じ薬効を示すのか、それとも新規な作用機作を有する物質であるのかを調べた。
- (3) 抗カビ性因子の高活性画分と低活性画分をさまざまな条件下で、LCMS による差異分析を行うことに、抗カビ性因子の同定とその化学構造解析を試みた。

4. 研究成果

(1) リボソーム RNA の解析

イタリアで採取したパネットーネ母種から分離した乳酸菌 8 株の rRNA スペーサー配列の塩基配列を分析し、同定解析を行った。比較株として *Lactobacillus casei* Shirota 株を用いた。PCR 増幅の結果は図 1 の通りである。

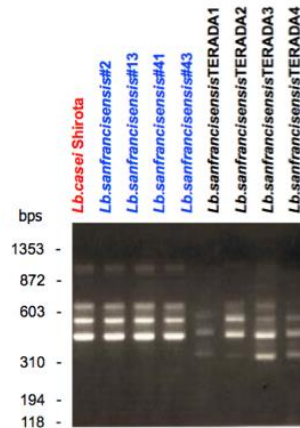


図 1. PCR 増幅の結果

増幅産物について、rRNA スペーサー配列の塩基配列を分析した結果、今回分析したすべての株の DNA 配列が 100% 一致した。このことより、分離した乳酸菌株の全てが、パネットーネ乳酸菌として最もよく分離されている *Lactobacillus safrancisensis* であることが判った。

(2) 抗カビ活性因子の作用点の解析

これまで得た抗カビ活性因子の特性から、いくつかの作用点を推察し検討を重ねてきた結果、DNA 合成阻害活性が見いだされたので、その実験経過の概要をここに報告する。DNA 合成阻害活性の解析には、Inspiralis 社の検査キットを用いて、DNA Gyrase Super Coiling Assay、TOPOISOMERASE IV Relaxation Assay、TOPOISOMERASE IV Decatenation Assay の 3 つの解析を行なって、DNA 合成のどのステップを阻害しているのかを調べた。コントロールには、ニューキノロン系の norfloxacin を用いた。参考までに、この Assay の原理図 (図 2) を次に示す。

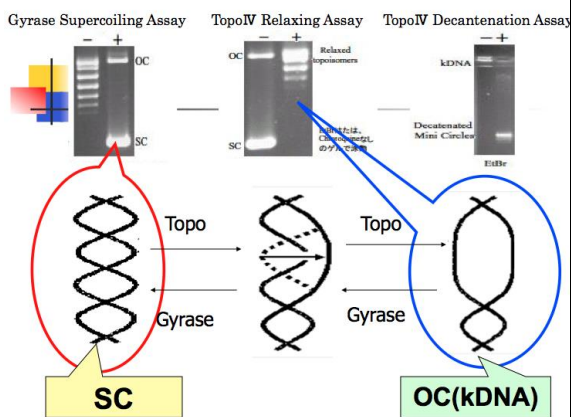


図2. DNA合成阻害活性解析の原理

Gyrase Assay の電気泳動の結果は、次の図3の通りである。通常 DNA は Gyrase の働きによりねじれを形成し、超らせん構造をとるため、移動距離が大きい。しかし、抗カビ性因子を含むレーンではバンドの移動距離が小さいことが確認できた。これは、Gyrase の働きが阻害されていることを示す。従って、抗カビ性因子は Gyrase による超らせん構造の形成を阻害している。

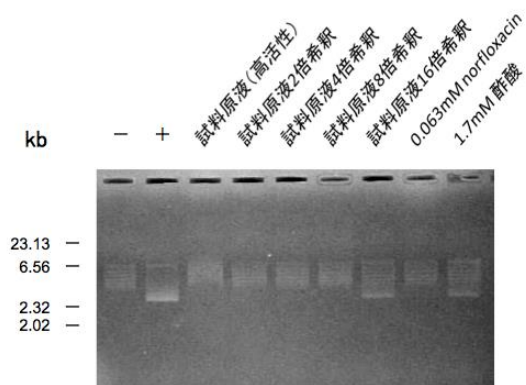


図3. 抗カビ活性画分のGyrase Supercoiling Assayの結果

TOPOISOMERASE IV Relaxation Assay の電気泳動の結果は、図4の通りである。通常 DNA は TOPOISOMERASE IV の働きにより超らせん構造を緩和させ、弛緩構造をとるため移動距離が小さい。しかし、抗カビ性因子を含むレーンでは、バンドの移動距離が大きいことが確認された。これは、TOPOISOMERASE IV の Relaxation の働きが阻害されていることを示す。従って、抗カビ性因子は TOPOISOMERASE IV の Relaxation の働きを阻害し、DNA の複製を阻害しているということが言える。

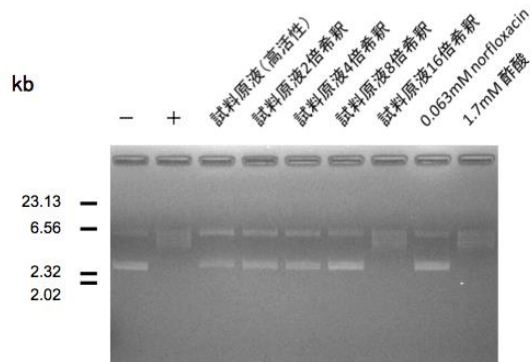


図4. 抗カビ活性画分のTOPOIV Relaxation Assayの結果

TOPOISOMERASE IV Decatenation Assay の電気泳動の結果は、次のページの図5の通りである。kDNA は、小型環状 DNA が連環状の高分子ネットワークを形成している高分子であるため、アガロース電気泳動ではゲルに侵入できない。kDNA は TOPOISOMERASE IV との特異的な反応で、これを遊離し容易にゲル中を移動することにより移動距離は大きくなると考えられる。しかし、抗カビ性因子を含むレーンではバンドの移動距離が小さいことが確認された。これは、TOPOISOMERASE IV が連結した小型環状を遊離させる働きを阻害していることを示す。従って、抗カビ性因子は TOPOISOMERASE IV の連結した小型環状二本鎖の DNA 分子を遊離する働きを阻害し、DNA の複製を阻害しているということが言える。

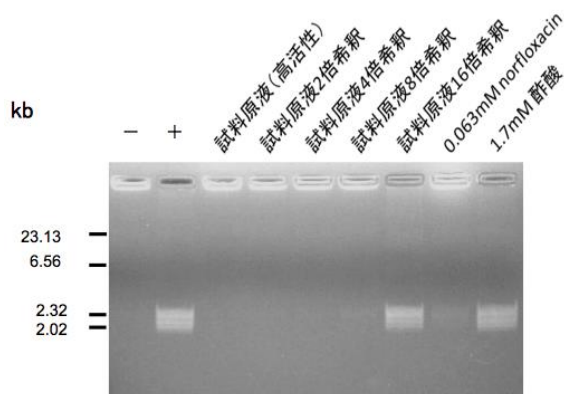


図5. 抗カビ活性画分のTOPOIV Decatenation Assayの結果

目的としている抗カビ性因子は、細菌が増殖するために欠かすことのできない DNA 合成関連酵素を阻害しているということが3つの Assay によって示唆された。3つの結果に共通していることは、抗カビ性因子の希釈倍率が原液の16倍希釈と最も高いレーンにおいて、抗カビ性因子の効果が薄れ、DNA合成関

連酵素の働きを阻害していないという結果が確認された。また、Gyrase と TOPOISOMERASE IV を特異的に阻害するとされるポジティブコントロールの norfloxacin を反応させたレーンは、3 つの結果ともに DNA 合成関連酵素の阻害を確認することができたので、きちんとコントロールがとれていることが示された。norfloxacin の溶媒である酢酸は、結果に影響を及ぼさなかった。従って、3 つの結果とも、阻害作用を示していないことが確認でき、norfloxacin の特異的反応を確認できたことになる。これらの結果から、抗カビ性因子は、DNA 増殖を抑制する効果があり、カビや細菌類の増殖を抑制するのであることが示唆された。

(3) 抗カビ性因子の同定

Lactobacillus sanfranciscensis#2 の培養液から抗カビ活性の高い画分と低い画分を得て、LCMSを用いた差異分析によって抗カビ活性成分の同定を試みた。当初、候補成分と考えられたのは274と358の分子量を示す成分であるが、その後、別条件で解析した結果、そのマクロマトグラムからは有意差が認められなかった。274については、ある分析条件下で9.6分に出現したが、不活性成分の強度が10倍近い強度で出現した。また、358については強度が弱く断定することができなかった。負イオン検出を行ったところ、当初の解析条件と同様に硫酸成分(97)については有意差が検出されたが、乳酸(89)については有意差が認められなかった。有意差のある1.8分のUVピークについて評価したところ乳酸に相当する成分が重なり、特定できなかった。

個々のLCMSによる解析結果は、今後、特許出願、および、学術論文への投稿予定があるので、ここでは参考データのみを次の図6に示す。

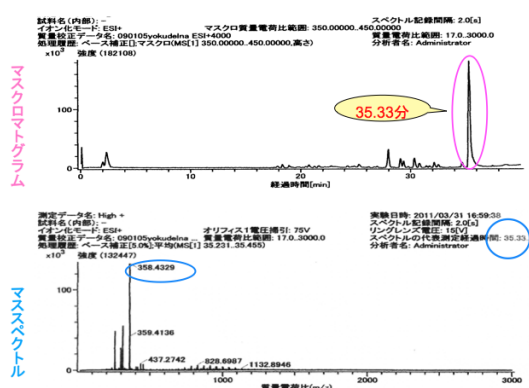


図6. LCMSの解析データの例

有力な候補物質として上がった硫酸については、前出のDNA合成阻害活性を調べた結果、その阻害パターンが精製品と異なることから、追いつめている抗カビ性因子ではないことが推察された。

274前後のピークに有意差のある230と318が観察された。318はエチレングリコールに相当する。その未知成分の組成式も求めることが出来た。アミノ酸のLeu(132)とPhe(166)に有意差が認められた。

以上の結果をまとめると、抗カビ活性画分に特異的に検出された成分は、①エチレングリコール、②未知の成分、③硫酸、④ロイソソ、⑤フェニルアラニンの5つである。このうち、①④⑤については、抗カビ性が認められない物質であるので、活性成分の候補物質から除外される。③については、乳酸菌が分泌することが考えにくいことと、さらに、エーテル抽出の操作において脱水剤として硫酸マグネシウムを使用していることから、これが、昨年と今年の両実験において残留物として検出された要因とも考えられるので、目的因子の候補からは除外した。

目的としている抗カビ性因子は、グラム陰性・陽性菌の双方、および、カビに対して抗菌性を示しているが、このような抗菌スペクトルを示す薬剤は発見されておらず、その抗菌スペクトルの特性と分子量から推定すれば、未同定の本因子は、新しいタイプのニューキノロン系化学療法剤の類縁物質ではないかと期待される。

求めている抗カビ性を示す活性成分は、②の未知成分が候補として残された。組成式が判明しているので、現在、推定される化学構造式を割り出しており、その結果をもとに、目的物質を絞り出して、個々の物質について検討を重ね、最終的には、目的物質であることの確認と、その化学構造を割り出したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 甲斐達男・古川加織、最近のイタリアンパネットーネの製パン法、査読有、16巻、2012、103-112

[その他]

ホームページ等

<http://www.seinan-jo.ac.jp/university/accout/kai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 達男 (KAI TATSUO)
西南女学院大学・保健福祉学部栄養学科・
教授
研究者番号：60331899

(2) 研究分担者

尾上 均 (ONOUE HITOSHI)
西南女学院大学・保健福祉学部栄養学科・
教授

研究者番号：70221166

水間 智哉 (MIZUMA TOMOCHIKA)
西南女学院大学・保健福祉学部栄養学科・
準教授

研究者番号：40555504

田代 幸寛 (TASHIRO YUKIHIRO)
西南女学院大学・短期大学部・準教授
研究者番号：90448481

(平成 22 年度～平成 23 年度)

(3) 連携研究者

杉元 康志 (SUGIMOTO YASUSHI)
鹿児島大学・大学院・先端応用生命科学
教授

研究者番号：10100736

以上