

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630386

研究課題名(和文)新規酵素群による食品製造工程のTAB汚染解決手法の開発 極限環境適応能力の活用

研究課題名(英文)Development of the solution by lytic enzymes for TAB spoilage concerned in food manufacturing process - application of ability to adapt to extreme environment -

研究代表者

森 梢 (Mori, Kozue)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・技術副主事

研究者番号：80463090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：飲料業界で大変問題視されている細菌である好熱性好酸性菌(TAB: Thermo Acidophilic Bacilli)に対し、深海由来の放線菌の培養上清から強い溶菌効果を持つ酵素を見出した。この分子量24kDaの酵素の溶菌はTAB特異的であり、大腸菌とTABの混合菌体懸濁液中の本酵素の作用の光学顕微鏡観察によってもTABを選択的に溶菌する様子が確認できた。また本酵素のTABに対する溶菌活性は、一定量タンパク当たりで評価した結果卵白由来リゾチームに比べ高い活性を示した。さらにリンゴジュース含有条件でも本酵素はTABの菌体濁度、グアイアコール産生とも有意な抑制能を示した。

研究成果の概要(英文)：In drink industry, Thermo Acidophilic Bacilli (TAB) are recognized as food spoilage organisms because its harm products with off-flavor. This study found that culture supernatant of deep-sea origin actinomycete has strong bacteriolytic effects against TAB. A purified enzyme (estimated molecular mass, 24 kDa) contributing the effect has high specificity for TAB. Furthermore, light microscope observation also showed that the lytic enzyme selectively destroyed TAB cells in bacterial suspension mixture of Escherichia coli and TAB. The lytic enzyme activity against TAB showed about 60-fold higher compared with hen egg white lysozyme when their activities were measured per fixed amount of protein. The enzyme revealed significant suppression of TAB cell growth and guaiacol production even in condition containing apple juice.

研究分野：酵素学、食品微生物学

キーワード：溶菌酵素 微生物による食品の変敗

### 1. 研究開始当初の背景

1982年にリンゴ果汁の大規模な微生物汚染事故が発生して以来、好熱性好酸性菌 (TAB: Thermo Acidophilic Bacilli) による飲料・原料(果汁・液糖等)の汚染が増加の一途を辿っていた。この汚染は、製品に混入したTABがグアイアコール等の異臭物質を産生することによって製品の著しい劣化を招くため、その制御は重要な課題であった。さらにTABが普遍的な土壌微生物であることや、原料の輸出入に伴い、TABの汚染や検出事例が各国で相次いでいた。だが、TABは通常果汁で採用されている加熱殺菌条件では死滅せず、従来の方法では製品への混入とその増殖の検出が困難であった。これまで30種類近い物質の投与による対処法と高圧、放射線、周波などの物理的な処方が検討・提案されているが、大量投与が必要、芽胞に効果がない、品質低下を伴う、除菌コストが高い、製造ラインの劣化を招くなどの理由で、実際の製造システムに適合したTABの排除、不活化、滅菌手法が確立されていなかった。<sup>(1)(2)</sup>

### 2. 研究の目的

本研究では、低エネルギーかつ環境低負荷型の新規酵素群によるTAB汚染の解決法取得を目的とした。研究分担者はこれまでに、極限環境である深海から分離された微生物が持つ特徴ある酵素を数多く見出している。深海には新奇で多様な多細胞生物や微生物が存在することも明らかになっている。新奇性が期待できる深海微生物のうち、二次代謝産物生産能が高く、古くから有用性が知られており安全性の高い放線菌の *Streptomyces* 属細菌をTAB溶菌酵素の生産菌とした。取得した *Streptomyces* 属細菌由来のTAB溶菌酵素群について、TAB汚染仮想製造ラインによる効能分析を行い、実際の処方環境条件に適応した酵素と処方の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1)本研究で使用したTAB(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)及び410株の放線菌は、所属機関が保有している微生物ライブラリから入手した。基質として用いたTAB培養液は、TABを液体培地(0.5% glucose, 0.3%  $\text{KH}_2\text{SO}_4$ , 0.2% yeast extract, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.025%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH5.0)を用いて37°Cで一晩振とう培養(600 nmのOD値: 約0.3)した。放線菌は液体培地(2% polypeptone S, 1% soluble starch, 0.5% tryptone, 0.25% yeast extract)を用いて30°Cで72時間振とう培養(130 rpm)し、その培養液を遠心分離(6000 ×g, 10 min)して生じた培養上清を粗酵素液としてTABに対する溶菌能のスクリーニングに使用した。

放線菌が培養液中に産生するTAB溶解能は、TAB用平板培地にできたTABの生育阻止円により検出し、液体法によりその程度を

測定した。液体法による測定は、TAB培養液108 µl中に酵素液12 µlを添加し、25°Cで適当な時間酵素反応を行った。反応後直ちに反応液100 µlの菌体濁度(600 nm)を測定し、その濁度低下を溶菌活性とした。なお、コントロールは100°Cで10分間熱処理した酵素液を用いた。各試験の反応温度(5-60°C)、反応時間は必要に応じて変化させた。特段言及のない場合は、この方法を標準溶菌酵素活性測定法として用いた。

(2)TAB、*Bacillus subtilis*、*Kocuria rhizophila*、*Staphylococcus aureus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*の7種を対象菌として選定し、溶菌・抗菌の活性評価を行った。溶菌評価はTABと同様に行った。抗菌評価は、対象菌をLB培地1 mlで37°Cで250 rpmの速度で培養し、100 µlの菌液と放線菌の培養上清を12 µlを添加し、添加直後及び24時間後の菌液の菌体濁度(600 nm、25°C)の変化によりその抗菌性を評価した。

(3)溶菌酵素の精製は、放線菌の培養上清を疎水性カラムクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行い、限外ろ過カラムで濃縮した。目的酵素の精製の精度はSDS-PAGEにより確認した。本報告では、部分精製酵素と言及した場合は、ハイドロキシアパタイトのステップまで精製した酵素液を指す。精製酵素のN末端アミノ酸配列を決定し、酵素の遺伝子配列は、設計した複数セットのプライマーを用いて解析、決定した。

(4)放線菌由来の溶菌酵素と卵白由来リゾチーム(HEWL)のタンパク量を揃えて、TABに対する溶菌活性比較を行った。各々の酵素液10 µlを、TAB培養液90 µlに添加し、混合溶液の10分間の菌体濁度の低下を溶菌活性として1分間隔で測定した。

(5)溶菌酵素によるTAB細胞の溶菌時の形態観察はOlympus BX51顕微鏡を使用して観察した。更にその詳細を走査電子顕微鏡(Jeol JSM-6700F scanning electron microscope: SEM)とネガティブ染色した細胞を透過型電子顕微鏡(Jeol JEM-1210 transmission electron microscope: TEM)を用いて、それぞれ加速電圧5 kV、200 kVで観察した。

(6)pRSET-EmGFP (Invitrogen)で形質転換された大腸菌*E. coli* BL21(DE3)(この実験における大腸菌は、以後注記がなくともこの形質転換体を指す)を対照微生物として用いて、溶菌酵素のTABに対する特異性を光学顕微鏡で観察した。TABと大腸菌は、TAB用培地と、100 µl/ml ampicillinを含むLBプレート培地にそれぞれ植菌して、30°Cで26時間培養した。培養後、生育したコロニーを

プレートから掻き取り、同じ濁度 (600 nm の OD 値: 約 4.5) になるように別々に TAB 用液体培地に懸濁した。これらの 2 種の菌体懸濁液を等量で混合し、これを混合菌体懸濁液とし、さらにこの菌体混合液と等量の部分精製酵素液と混合した。25° C の室温で酵素添加直後から反応開始後 50 分までの間、蛍光顕微鏡 (Olympus BX51) 像の同じ視野で、TAB と大腸菌の菌体混合液に対する酵素の溶菌作用を観察した。

(7) TAB 汚染仮想製造ラインとして、リンゴジュースを含む条件で放線菌培養上清の TAB に対する溶菌反応を行い、その効果を市場で流通している TAB 検出法を用いて評価した。YSG-juice 培地は YSG 培地 (0.2% yeast extract, 0.2% soluble starch, 0.1% glucose, pH3.7) と市販の無添加 100% リンゴジュースを等量で混合して作製した。YSG-juice 培地にその 4% の TAB シード培養液と 1% の放線菌培養上清を添加して 30° C、200 rpm で振とう培養した。コントロールは培養上清の代わりに酵素生産培地を添加した。培養液を経時的に分取し、菌体濁度と、グアイアコール検出キット (極東製薬工業) を用いたグアイアコール産生の測定を行った。培地中に産生されるグアイアコールは、製品の指示に従いペルオキシダーゼ法によって呈色した試料 200  $\mu$ l の 470 nm の値をマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 深海由来の放線菌 410 株を対象に、TAB の生育阻害ならびに液体法による TAB の菌体濁度低下を指標とした溶菌能の簡易スクリーニングの結果、TAB に対して最も高い溶菌能を持つ *Streptomyces* sp. MBE22 株を選出した。

(2) 様々な微生物に対する溶菌・抗菌活性を評価した結果、いずれの選定菌に対しても TAB に対して観察される程度の強い溶菌活性は観察されず、MBE22 株由来溶菌酵素は TAB に対して特異的に作用することが明らかになった。この結果は非常に興味深く、例えば大腸菌を用いたタンパク質生産時に使用すれば、大腸菌を損傷させることなく不要な TAB の効率的な排除が期待できる。

(3) この MBE22 株由来の溶菌酵素は、*Streptomyces* sp. MBE22 株の培養上清から精製し、酵素の生化学的性質、遺伝学的性質を決定した。SDS-PAGE により精製酵素の精度を確認し、分子量は約 24 kDa と推測した。これは、後述する成熟タンパクから算出した分子量 23.7 kDa とほぼ一致した。本溶菌酵素は、至適 pH が 6.5 で、pH3.5 と pH9.0 でそれぞれ最大時の 20% と 30% の活性を維持していた。至適温度は 55° C であり、温度安定性は、処理温度 30° C までは最大活性を示

したが、処理温度 30° C 以上で徐々に残存活性は低下し、50° C で最大活性の 60%、55° C で最大活性の 10% になり、80° C では残存活性がほぼなかった。

解析した酵素遺伝子は 240 アミノ酸をコードしており、240 アミノ酸からシグナルペプチドを除いた配列を成熟酵素タンパク (217 アミノ酸) とした。Blast プログラムを使用して、データベース中にある本溶菌酵素のアミノ酸配列の類似配列を検索した結果、本溶菌酵素は、*Chalaropsis-type* (*ch-type*) リゾチーム、すなわち細胞壁分解に関連する酵素に分類される配列群と近縁であった。さらに配列を基にした Blast の検索結果は、*ch-type* のリゾチームらが保存している分解反応に関連する触媒残基を、MBE22 株由来の溶菌酵素も保存していることを示した。

(4) リゾチームは、主な細菌の細胞壁ポリマーであるペプチドグリカン中の、*N*-acetylmuramic acid と *N*-glucosamine 間の  $\beta$ -(1,4)-glucoside 結合を加水分解する酵素であり、ありとあらゆる生物から見ついている。それらの機能は多様で、その抗細菌防御能力は食品保存料や薬剤としても使用されている。中でもリゾチームの重要な商業的供給源は鶏の卵白で、*c-type* (*chicken* あるいは *conventional type*) に分類される HEWL は、立体構造や触媒メカニズムが最も良く知られた代表的なリゾチームである。

HEWL と MBE22 株由来の溶菌酵素のタンパク量を揃えて TAB に対する溶菌活性測定を行ったところ、単位タンパク量当たりで、MBE22 株由来の溶菌酵素 (粗酵素液) は HEWL の約 60 倍高い溶菌活性を示した。アライメントソフト Clustal W and Clustal X version 2.0 を用いた、MBE22 株由来の溶菌酵素のアミノ酸配列と HEWL (Lysozyme C, accession no; P00698) 配列のアライメント結果は、その双方の配列の一致が 12.44% (27/127 アミノ酸) と非常に低いことを示した。

主要なリゾチームは、*c-type*、*ch-type* リゾチームの他に、*goose type* (*g-type*)、*invertebrate type* (*i-type*) が知られている。Callewaert らによると *c-type*、*g-type*、*i-type* の 3 タイプは、一次配列のレベルでは類似性が乏しい、もしくはないにもかかわらず、それらの立体構造は顕著な類似性を示すと報告している。<sup>(3)</sup> また、いくつかの細菌由来の細胞壁加水分解酵素の比較的狭い特異性と、その食品応用への潜在的な可能性について言及している。<sup>(4)</sup> MBE22 株由来の溶菌酵素は、大分類はリゾチームであるものの、その分類が HEWL とは異なることから、アミノ酸配列のみならず、立体構造の特徴や基質特異性も HEWL とは大きく異なることが推測された。TAB 溶菌については、粗酵素液ではあるものの汎用されている HEWL に引けを取らないこの結果と TAB への特異性について更にその詳細を調べるために、当初計画し

ていた研究を一部変更した。

(5) MBE22 株の粗酵素液で処理をした TAB 細胞の電子顕微鏡観察では、溶菌の過程で、TAB 細胞の先端 (図 1-A 矢印) や、細胞分裂あるいは孢子形成過程の中隔部位 (図 1-B 矢印) からの細胞の内容物の漏出が多く見られた。損傷した細胞の表面は粗く、しわやくぼみ (図 1-B ブロック矢印) や穴が生じていた。その他にも直線的に鋭利な刃物で切ったような断面を持つ平らになった細胞壁や、細胞が膨張し細胞壁が溶解している様子が観察された。一方、粗酵素液の代わりに同酵素液を 100°C で 10 分間熱処理した試料を用いたコントロールにおいては、TAB 細胞の表面は平滑で損傷はほぼなかった。細胞の端や中隔から内容物が漏出するという TAB 細胞の溶菌過程は、光学顕微鏡でも同様に観察された。酵素で処理された *A. acidoterrestris* 細胞の溶菌について、顕微鏡でその詳細を観察した報告はこれまでにない。

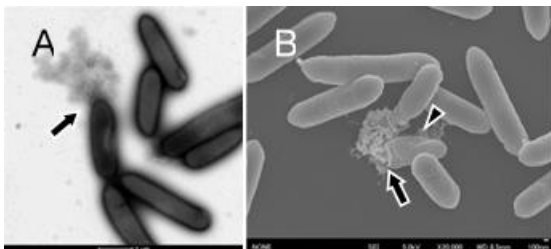


図 1. 溶菌酵素で処理した TAB 細胞の TEM (A) と SEM (B) による電子顕微鏡写真

(6) TAB と大腸菌の菌体混合液に対する MBE22 株由来の部分精製酵素液の溶菌作用を蛍光顕微鏡で観察した。溶菌反応開始 2 分後に観察を開始し、50 分後まで同一視野での観察を行った顕微鏡写真では、GFP が退光して次第に見分けが付かなくなるため、反応開

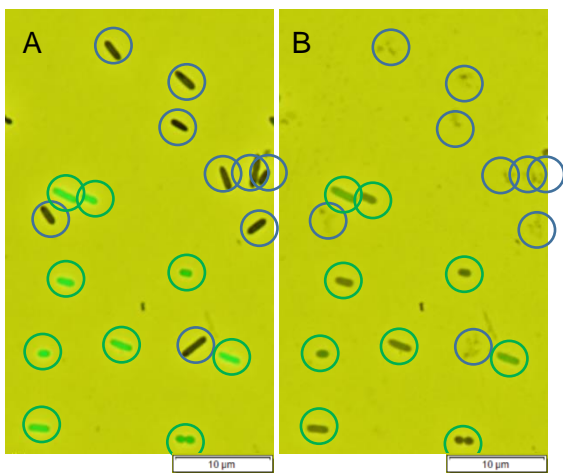


図 2. 酵素処理をした TAB と大腸菌混合液の蛍光顕微鏡観察画像。青と緑の丸印は TAB と大腸菌を示す。(A)は反応開始 2 分、(B)は 50 分後

始直後 2 分の時点で蛍光発光していたものを大腸菌、蛍光していないものを TAB と識別した。反応開始後 2 分では、ほぼ同数の TAB 細胞と大腸菌細胞が存在するが、50 分後では TAB のみが溶菌して大腸菌はそのままの形態を維持した (図 2)。なお、MBE22 株由来の酵素液の代わりに、熱処理した同酵素液あるいは酵素生産培地そのものを添加して同様に観察した結果、TAB、大腸菌どちらも溶菌は観られなかった。従って MBE22 株由来酵素液を添加した際の TAB と大腸菌の差異は、溶菌酵素作用によるもので、本酵素は大腸菌よりも TAB を選択的に溶菌することがこの観察によっても明らかとなった。

(7) リンゴジュース含有条件における MBE22 株粗酵素液の TAB に対する作用評価を行ったところ、図 3-A,B に示したように、リンゴジュース含有条件において、コントロールは培養開始 26 時間までに、TAB 菌体濁度及びグアイアコール産生に顕著な増加が確認された。その一方、MBE22 株の粗酵素液を添加した培養液では、培養から 30 時間までの間 TAB 菌体濁度、グアイアコール産生ともに、培養開始時とほぼ変わらない値だった。この結果は MBE22 株の粗酵素液が明らかに TAB 菌体濁度上昇とグアイアコール産生を抑制すること、さらには、リンゴジュース成分が存在する条件においても十分に本酵素液が TAB に対して増殖抑制作用を維持すること示した。

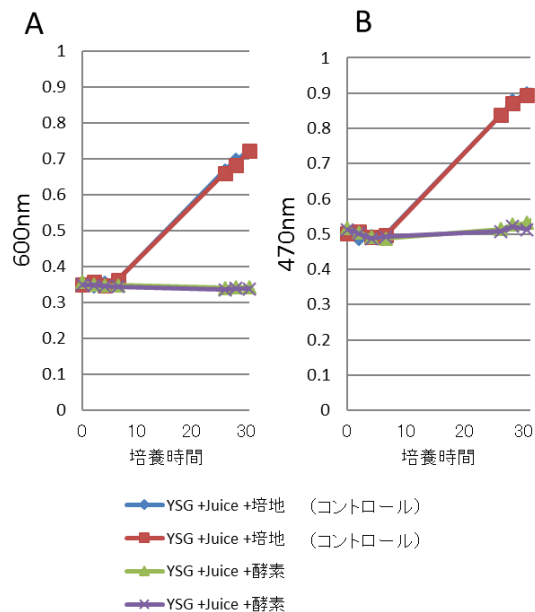


図 3. リンゴジュース存在条件における溶菌酵素の TAB 菌体濁度 (A) とグアイアコール産生の検出 (B)

<引用文献>

- (1) 好熱性好酸性菌 - *Alicyclobacillus* 属細菌 - (2004) 横田明・藤井建夫 監修 ILSI JAPAN 食品安全研究部会微生物分科会

編

- (2) Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: new methods for inhibiting spore germination. International journal of food microbiology, 125(2), 103-110.
- (3) Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. Journal of biosciences, 35(1), 127-160.
- (4) Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W., & Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. Current opinion in biotechnology, 22(2), 164-171.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森 梢 (MORI, Kozue)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋  
生命理工学研究開発センター・技術副主事  
研究者番号：80463090

##### (2) 研究分担者

秦田 勇二 (HATADA, Yuji)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋  
生命理工学研究開発センター・グループリ  
ーダー  
研究者番号：20399562

##### (3) 研究協力者

湯川 清孝 (YUKAWA, Kiyotaka)

植松 勝之 (UEMATSU, Katsuyuki)  
株式会社マリン・ワーク・ジャパン