

平成22年 5月20日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20780055
研究課題名（和文） 乳酸菌由来抗菌ペプチドの特異的作用機構における分子基盤の解明
研究課題名（英文） Elucidation of molecular basis of specific action mechanisms of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria
研究代表者
善藤 威史（ZENDO TAKESHI） （九州大学・大学院農学研究院・助教）
研究者番号：50380556

研究成果の概要（和文）：種々の乳酸菌由来新奇抗菌ペプチド、バクテリオシンの構造が明らかとなった。とくに、ラクトサイクリシン Q は N 末端と C 末端が結合した新奇環状ペプチドであった。一方、ラクティシン Q は細菌細胞膜に巨大な孔を形成し、ATP や小さなタンパク質などの細胞内容物を流出させることで抗菌活性を示すことが明らかとなった。作用時のラクティシン Q および細胞膜脂質の挙動が Toroidal Pore モデルの特徴によく一致することから、この作用機構を「Huge Toroidal Pore モデル」と命名した。

研究成果の概要（英文）：The structures of various novel antimicrobial peptides, bacteriocins, from lactic acid bacteria were determined. One of the novel bacteriocins, lactocyclin Q, is a cyclic peptide whose N- and C-terminals are bound with a peptide bond. Lacticin Q exerts antimicrobial activity via huge pore formation on bacterial cell membrane that causes leakage of cellular components such as ATP and small proteins. Since the actions of lacticin Q and lipids accords with the characteristics of Toroidal Pore model, the action mechanism of lacticin Q was termed “Huge Toroidal Pore model”.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能、乳酸菌、抗菌ペプチド、バクテリオシン

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンは、次世代の抗菌物質として食品保存料をはじめ、さまざまな分野での応用が期待されている。これまでに多様な乳酸菌バクテ

リオシンが見出され、その抗菌スペクトルや抗菌活性の強さも多様である。他の生物種由来の抗菌ペプチドと比べてとくに注目すべき点は、きわめて低濃度で活性を示すこと、一部のものでは菌種特異的な活性を有する

ことである。しかし、その作用機構には未だ不明な点が多く、バクテリオシンの種類によっても異なることが予想されている。

我々は、乳酸菌バクテリオシンの特徴を活かした高度な微生物制御の実現を目指し、新奇バクテリオシンの迅速スクリーニング法を構築し、ナイシン Q、ラクトコッシン Q、ラクティシン Q をはじめとする、多くの新奇乳酸菌バクテリオシンを見出した。また、バクテリオシンの構造と機能は多様性に富んでいることが明らかになった。とくに、ラクティシン Q はナイシンとは全く別の機構で作用していることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

乳酸菌バクテリオシンの作用機構は多様であり、作用機構の異なるバクテリオシンを適材適所に用いることで、耐性菌の出現を防ぎつつ、より効果的な微生物制御が実現されると考えられる。とくに、抗菌スペクトルが特異的・限定的なバクテリオシンを活用することで、対象菌種のみを狙い撃ちが可能となる。そこで、本研究では、新奇乳酸菌バクテリオシンの構造を明らかとし、各種乳酸菌バクテリオシンの抗菌作用に差異や特異性をもたらす要因を解明することを目的とした。本研究の成果によって、分子的基盤に基づいた効果的な微生物制御が可能となることが期待される。また、将来的には、菌種特異的な抗菌ペプチドや検出プローブのデザインも可能となることが期待される。さらには、バクテリオシンを介した細菌間相互作用という観点からも、新たな知見を得ることが期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 構造未決定のバクテリオシンのうち、特徴的な抗菌スペクトルを示すものについて構造解析を行った。バクテリオシンは、各種クロマトグラフィーによって精製し、アミノ酸配列を解析した。得られたアミノ酸配列を元に構築したプライマーを用いて PCR を行い、バクテリオシン構造遺伝子の塩基配列を解析した。これらのアミノ酸レベルと核酸レベルの解析結果から、新奇バクテリオシンの一次構造の決定を試みた。さらに、必要に応じて、CD スペクトルや NMR 等の解析を行い、作用機構において重要な役割を果たす高次構造を解析した。

(2) ラクティシン Q およびその他新奇バクテリオシンの抗菌スペクトルを調べた。また、標的細菌からの ATP 等の漏出や標的細菌細胞の膜電位の崩壊を解析した。作用に要するバクテリオシン濃度や時間などを検討し、ナイシンとの作用機構の相違を検討した。

また、各種細胞を模したリポソームを調製

し、各バクテリオシンの孔形成能を解析した。リン脂質の電荷やその比率を変えたものや、細胞膜に局在する分子を組み込んだものを作成し、各バクテリオシンの作用の違いを調べ、バクテリオシンの作用に影響する因子を検討した。また、リポソーム内に蛍光ラベルした分子量マーカータンパク質を包埋し、形成される孔の大きさを解析した。

(3) 培地に添加するナイシンの量を徐々に増加しながら継代することで、実験室レベルでは感受性菌がナイシン耐性を獲得することが知られている。他のバクテリオシンについても同様の検討を行い、耐性化に寄与する因子を検討した。

また、バクテリオシンの標的分子の探索や、バクテリオシンの標的認識部位の特定を目指し、バクテリオシンと標的細胞との相互作用の解析を試みた。まず、その前段階として、バクテリオシンとリポソームの相互作用を表面プラズモン共鳴測定装置を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 抗菌スペクトル等の性質によって、新奇性が高いと判断されたバクテリオシンの精製および構造解析を行った。その結果、*Lactococcus* sp. QU12 が生産するバクテリオシンは、N 末端と C 末端が結合した新奇の環状ペプチドであることが明らかとなり、本バクテリオシンをラクトサイクリン Q と命名した (図 1)。また、得られたアミノ酸配列を元に、ラクトサイクリン Q をコードする遺伝子の塩基配列も明らかとなった。

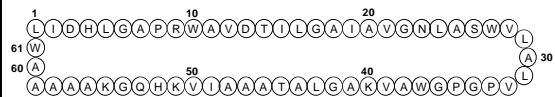


図 1. ラクトサイクリン Q の構造

ラクトサイクリン Q は 61 アミノ酸残基で構成され、N 末端と C 末端がペプチド結合によって環状化している。

その他にも、ロイコシン Q・N、ワイセリシン Y・M、エンテロシン X、エンテロシン W などの新奇バクテリオシンを見出し、それらの構造および塩基配列を明らかにした。

また、ラクティシン Q やその他新奇バクテリオシンの生合成遺伝子群の解析を行い、生合成に必要な遺伝子の特定と、それらの機能解析を進めている。

(2) *Lactococcus lactis* QU5 が生産するバクテリオシン、ラクティシン Q の作用機構を種々の微生物およびリポソームを用いて解析した。その結果、ラクトサイクリン Q は

特定のレセプターを介さずに細菌細胞膜に孔を形成し、細胞内物質を流出させることが明らかとなった。また、ラクティシン Q は感受性細菌の細胞膜やリボソームに他に類を見ない巨大な孔を形成し、小さなタンパク質をはじめとする種々の細胞内物質を流出させることが明らかとなった。孔形成時のラクティシン Q および細胞膜脂質の挙動がトロイダルポアモデルの特徴によく一致していたことから、ラクティシン Q の孔形成機構を「Huge Toroidal Pore モデル」と命名した(図 2)。一方、ラクトサイクリン Q やエンテロシン W の作用機構についても、同様にして解析したところ、孔形成は確認されたものの、ラクティシン Q やナイシンとは異なる機構で作用していることが示唆された。

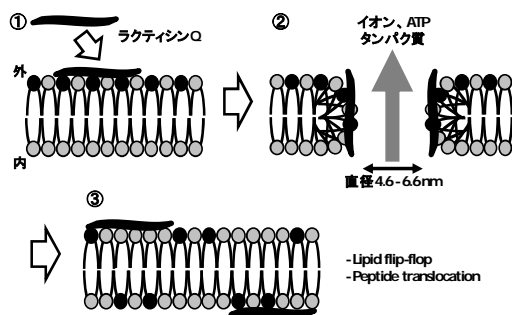


図 2. ラクティシン Q の作用機構

①まず、ラクティシン Q は標的細胞膜に付着する。②脂質を抱きかかえるように巨大な孔を形成し、イオンや ATP、小さなタンパク質などの細胞内物質を流出させる。③脂質のフリップフロップおよびラクティシン Q ペプチドのトランスロケーションが起こる。このラクティシン Q の作用機構を「Huge Toroidal Pore モデル」と命名した。

(3) ナイシンと同様に、ラクティシン Q についても、培地への添加濃度を徐々に上昇させることで、感受性株を耐性化させることができた。野生株(感受性株)と耐性化株、および自然耐性株(低感受性株)のバクテリオシン感受性を調べたところ、各株の最小生育阻止濃度と膜電位の崩壊に要する濃度に明確な相関は見られなかった。最小生育阻止濃度の高い菌株では、孔形成に対する耐久力や回復力が高いと考えられ、細胞膜成分は選択的抗菌活性の決定要因ではないと考えられた。

電荷の異なる種々のリボソームを用い、ラクティシン Q の膜への付着と孔形成に対する膜の電荷の影響を調べた。膜の負電荷は、正電荷をもつラクティシン Q の付着を加速させるものの、孔形成能には影響しないことが明らかとなった。

## 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 10 件)

- ① Fukao M., Obita T., Yoneyama F., Kohda D., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Complete covalent structure of nisin Q, the new natural nisin variant, containing post-translationally modified amino acids, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 査読あり, 2008, 72(7), 1750-1755
- ② Hu C.-B., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Description of durancin TW-49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49, *Journal of Applied Microbiology*, 査読あり, 2008, 105(3), 681-690
- ③ Yoneyama F., Fukao M., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Biosynthetic characterization and biochemical features of the third natural nisin variant, nisin Q, produced by *Lactococcus lactis* 61-14, *Journal of Applied Microbiology*, 査読あり, 2008, 105(6), 1982-1990
- ④ Yoneyama F., Imura Y., Ichimasa S., Fujita K., Zendo T., Nakayama J., Matsuzaki K., Sonomoto K., Lacticin Q, a lactococcal bacteriocin, causes high-level membrane permeability in the absence of specific receptors, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読あり, 2009, 75(2), 538-541
- ⑤ Sawa N., Zendo T., Kiyofuji J., Fujita K., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K., Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読あり, 2009, 75(6), 1552-1558
- ⑥ 姫野康平、奥田賢一、善藤威史、園元謙二、細菌間の攻防—バクテリオシンの構造・機能・応用、生物の科学 遺伝、査読なし、2009、63(2)、35-40
- ⑦ Yoneyama F., Imura Y., Ohno K., Zendo T., Nakayama J., Matsuzaki K., Sonomoto K., Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 査読あり,

2009, 53(8), 3211-3217

- ⑧ 善藤威史、米山史紀、澤 稔彦、園元謙二、乳酸菌が生産する抗菌性物質、防菌防黴、査読なし、2009、37(12)、903-911
- ⑨ 善藤威史、澤 稔彦、米山史紀、園元謙二、乳酸菌由来抗菌性ペプチド、ナイシンーその基礎と利用、乳業技術、査読なし、2009、59、77-86
- ⑩ Yoneyama F., Shioya K., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Effect of a negatively charged lipid on membrane-lactacin Q interaction and resulting pore formation, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 査読あり、2010, 74(1), 218-221

[学会発表] (計25件)

- ① 米山史紀、井村雄一、大野香菜子、善藤威史、中山二郎、松崎勝巳、園元謙二、乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q の作用メカニズムに関する研究、日本乳酸菌学会 2008 年度大会、2008 年 7 月
- ② 米山史紀、井村雄一、大野香菜子、善藤威史、中山二郎、松崎勝巳、園元謙二、乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q の作用メカニズムの解明、第 60 回日本生物工学会大会、2008 年 8 月
- ③ 澤 稔彦、善藤威史、清藤順子、富士田浩二、中山二郎、園元謙二、*Lactococcus* sp. QU 12 が生産する新奇環状バクテリオシン、lactocyclin Q の構造解析、第 60 回日本生物工学会大会、2008 年 8 月
- ④ Iwatani S., Fujita K., Ichimasa S., Yoneyama F., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Brand-new type of bacteriocins, lacticins Q and Z, from *Lactococcus lactis*, The 9th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2008 年 9 月
- ⑤ Zendo T., Hu C.-B., Nakayama J., Fujita K., Sonomoto K., Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification, The 9th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2008 年 9 月
- ⑥ 益田時光、善藤威史、中山二郎、園元謙二、漬物樽から単離された乳酸菌が生産する新奇バクテリオシン、平成 20 年度日本農芸化学会西日本支部大会、2008 年 9 月
- ⑦ 大野香菜子、米山史紀、善藤威史、中山二郎、園元謙二、乳酸菌が生産する新奇バクテリオシン、ラクティシン Q の選択毒性の解明、第 15 回日本生物工学会九州支部熊本大会、2008 年 12 月
- ⑧ 益田時光、善藤威史、中山二郎、園元謙二、*Weissella hellenica* QU 13 が生産する新奇乳酸菌バクテリオシンの諸特性と構造解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月
- ⑨ 姫野康平、Perez R.、富士田浩二、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、園元謙二、*Enterococcus faecium* NKR-5-3 によるバクテリオシンの生産制御、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月
- ⑩ 石橋直樹、姫野康平、益田時光、富士田浩二、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、園元謙二、*Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産するバクテリオシン群の生合成遺伝子の解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月
- ⑪ 澤 稔彦、善藤威史、清藤順子、富士田浩二、中山二郎、園元謙二、*Lactococcus* sp. QU 12 が生産する新奇環状バクテリオシン、lactocyclin Q、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月
- ⑫ 大野香菜子、米山史紀、善藤威史、中山二郎、松崎勝巳、園元謙二、乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q の脂質依存的な抗菌活性、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月
- ⑬ 善藤威史、米山史紀、井村雄一、大野香菜子、中山二郎、松崎勝巳、園元謙二、乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q の巨大な孔形成を伴う作用機構、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月
- ⑭ Masuda Y., Zendo T., Sawa N., Nakayama J., Sonomoto K., Characterization and structure analysis of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13, Second Symposium on Antimicrobial Peptides Food Veterinary and Medical Application, 2009 年 6 月
- ⑮ Zendo T., Sawa N., Kiyofuji J., Fujita K., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K., Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12, Second Symposium on Antimicrobial Peptides Food Veterinary and Medical Application, 2009 年 6 月
- ⑯ 石橋直樹、姫野康平、益田時光、富士田浩二、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、園元謙二、*Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産するバクテリオシン群の生合成遺伝子の解析、第 46 回化学関連支部合同九州大会、2009 年 7 月
- ⑰ 姫野康平、Perez R.、富士田浩二、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、園元謙二、*Enterococcus faecium* NKR-5-3 による

- バクテリオシンの生産制御、第 46 回化学  
関連支部合同九州大会、2009 年 7 月
- ⑱ 岩谷 駿、堀切佑子、宮下紫穂、米山史  
紀、善藤威史、中山二郎、園元謙二、新  
奇乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン  
Q 生合成機構の解明、第 61 回日本生物  
工学会大会、2009 年 9 月
- ⑲ 石橋直樹、姫野康平、益田時光、富士田  
浩二、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、  
園元謙二、*Enterococcus faecium*  
NKR-5-3 が生産する複数のバクテリオ  
シンの生合成遺伝子の解析、第 61 回日本  
生物工学会大会、2009 年 9 月
- ⑳ 澤 稔彦、岡村かすみ、善藤威史、中山  
二郎、園元謙二、*Leuconostoc*  
*pseudomesenteroides* QU 15 が生産す  
る新奇バクテリオシン、第 61 回日本生物  
工学会大会、2009 年 9 月
- 21 李 夢琦、米山史紀、利光菜由、大野香  
菜子、善藤威史、中山二郎、園元謙二、  
乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q  
の選択的抗菌活性に差異をもたらす要因  
の解析、第 16 回日本生物工学会九州支部  
大会、2009 年 12 月
- 22 胡 智柏、W. Malaphan、善藤威史、中  
山二郎、園元謙二、*Enterocin A, B* 生産  
菌 *Enterococcus faecium* KU-B5 が生産  
する新奇二成分バクテリオシン  
*enterocin X*、日本農芸化学会 2010 年度  
大会、2010 年 3 月
- 23 益田時光、J.J. Jimenes、善藤威史、中  
山二郎、園元謙二、新奇乳酸菌バクテリ  
オシン *weissellicin Y, M* の生合成機構の  
解明、日本農芸化学会 2010 年度大会、  
2010 年 3 月
- 24 岩谷 駿、米山史紀、宮下紫穂、善藤威  
史、中山二郎、園元謙二、*Lactococcus*  
*lactis* が生産する新奇バクテリオシン、  
*lacticin Q/Z* 生合成遺伝子群の比較と機  
能解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、  
2010 年 3 月
- 25 木下靖介、李 夢琦、澤 稔彦、米山史  
紀、善藤威史、園元謙二、新奇乳酸菌バ  
クテリオシンの作用機構の解析、日本農  
芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月

[図書] (計 1 件)

- ① 園元謙二、澤 稔彦、善藤威史、中山二  
郎、微生物資源国際戦略ガイドブック、  
株式会社サイエンスフォーラム、第 2 章  
活性の高い微生物資源、第 4 節 バクテ  
リオシン、2009、259-267

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規バクテリオシン及びそれをコード

する遺伝子  
発明者：園元謙二、中山二郎、善藤威史、澤  
稔彦  
権利者：国立大学法人九州大学  
種類：特許  
番号：特願 2008-196534  
出願年月日：2008 年 7 月 30 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
善藤 威史 (ZENDO TAKESH)

研究者番号：50380556

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：