

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790065  
 研究課題名 (和文)  
 クォーラムセンシングによらない新規バクテリオシン産生制御システムの解明  
 研究課題名 (英文)  
 Characterization of novel regulatory system for the bacteriocin biosynthesis  
 研究代表者  
 野田 正文 (NODA MASAFUMI)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・寄附講座助教  
 研究者番号：40457289

研究成果の概要 (和文)：伊予柑から分離された植物乳酸菌 174A 株は、バクテリオシンと呼ばれる、虫歯菌や食中毒菌に対して活性を示す抗菌ペプチド (brevicin 174A) を産生する。本研究課題では、他のバクテリオシンの生合成遺伝子中にはみられない、brevicin 174A のもつ特徴的な産生制御システムの一部を明らかにするとともに、その抗菌活性から自己を防衛する働きを担う、新規の免疫タンパク質 (immunity protein) を見出すことに成功した。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, a part of the particular bacteriocin biosynthesis regulatory system for brevicin 174A produced by plant-derived lactic acid bacteria was elucidated, and novel bacteriocin immunity protein was determined from the biosynthesis gene cluster.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：微生物, 発現制御, バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌とは、糖を発酵し、多量の乳酸を産生する細菌の総称であり、古来よりヨーグルトをはじめ、バターやチーズ、漬物から味噌に至るまで、広く発酵食品の製造に利用されてきた歴史をもつ。乳酸菌の中には、バクテリオシンと呼ばれる抗菌ポリペプチドを産

生する株が存在し、例えば *Lactococcus lactis* が産生するナイシン (nisin) と呼ばれるバクテリオシンは、摂食後ヒトの消化酵素によって速やかに分解される安全性の高い食品保存剤として、欧米諸国では 50 年以上前から実用化されている。

研究代表者は以前、文部科学省・知的クラ

スター創成事業におけるプロジェクト研究の一環として、機能性分子を産生する植物乳酸菌の分離探索研究に携わった際、伊予柑からバクテリオシンを産生する植物乳酸菌 *Lactobacillus (Lb.) brevis* 174A を分離することに成功した。また、本菌株の培養上清より精製したバクテリオシン (brevicin 174A) は、虫歯や敗血症の原因菌として知られる *Streptococcus mutans* や *Listeria monocytogenes* 等に対して抗菌活性を示すことが確認された。Brevicin 174A の生合成遺伝子とその周辺領域 (brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター) のクローニングおよび塩基配列の決定を行った結果、brevicin 174A 生合成遺伝子 (*orf2*, *orf3*) とその排出に関わる遺伝子 (*orf1*, *orf7*) の他、転写調節因子をコードすると予測される 2 つの遺伝子 (*orf4*, *orf6*) が存在することがわかった (図 1)。

一般的に、乳酸菌におけるバクテリオシン産生のコントロールは、インデューサーペプチド (IP)、ヒスチジンプロテインキナーゼ (HPK)、レスポンスレギュレーター (RR) の 3 つからなる、三成分制御系によるものが知られている。菌体外に放出された IP は、ある閾値を越えると HPK に結合して RR のリン酸化を促し、活性化された RR は標的遺伝子の転写活性を向上させる。こういった一連の遺伝子制御機構はクォーラムセンシング (quorum-sensing) 機構と呼ばれ、微生物が自身の増殖環境を感知し、必要に応じて遺伝子のスイッチを切り替える仕組みとして注目を集めている。

興味深いことに、今回塩基配列を決定した生合成遺伝子クラスターの中には、三成分制御系に関わっている HPK および RR と相同性を示す ORF は存在しなかった。また、転写調節因子と予測された *orf4*, *orf6* にも、リン酸化を介したシグナル伝達に関与すると思われる特徴はみられなかった。以上のことより、「brevicin 174A の産生は三成分制御系とは異なった新規メカニズムにより制御されている」との仮説を立て、まず、Orf4 および Orf6 がクラスター内のどの遺伝子の調節に関わっているかを調査するために、それぞれの組換えタンパク質を用いたゲルシフトアッセイを行い、個々が特異的に結合し得る領域を見出した (図 1)。このことは、*Lb. brevis* 174A 株におけるバクテリオシン産生が、2 つの転写調節因子によって制御される、独自の機構によるものであることを強く示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、可用性および膜結合型の 2 つの転写調節因子 (Orf4 および Orf6) が特異的に認識する塩基配列、およびその局在性に

ついて明らかにするとともに、brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター中に見出された他の ORF の機能解析を通じ、新規バクテリオシン産生制御システムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 2 つの転写調節因子の認識する結合配列  
大腸菌ホスト・ベクター系を用い、Orf4 および Orf6 (Orf6 は N 末端領域のみ) を組換えタンパク質として精製した後、ゲルシフトアッセイによって結合することが確認されている領域 (図 1) を DNA プローブとし、DNase I footprinting アッセイによって、2 つの転写調節因子がそれぞれ特異的に認識する結合配列を決定した。また、プライマー伸長法により、結合配列の近傍にある遺伝子の転写開始点を決定した。

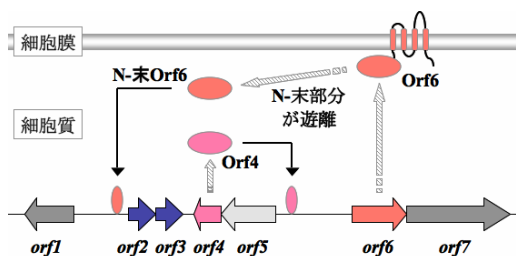


図 1 2 つの転写調節因子の結合領域と予測される制御メカニズム

*orf1*, 7: brevicin 174A 排出遺伝子  
*orf2*, 3: brevicin 174A 生合成遺伝子  
*orf4*, 6: 転写調節因子, *orf5*: 機能未知

(2) Orf6 の細胞内局在性の経時変化

組換えタンパク質として精製した Orf6 の N 末端ドメインを抗原とし、抗体を調製した。この抗体を用い、174A 株より経時的に回収した膜画分および可用性画分を対象として、ウェスタン解析を行った。

(3) Brevicin 174A 生合成遺伝子クラスターに含まれる ORF の機能解析

① *orf4* および *orf6* 導入株の構築

自ら構築した乳酸菌-大腸菌シャトルベクター pLES003 に *orf5-4* オペロンおよび *orf6* をそれぞれ挿入し、ノボビオシン処理によって取得した 174A 株プラスミド脱落変異株にエレクトロポレーション法により導入した。

② Brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター導入株の構築

シャトルベクター pLES003 上に、*orf1*~*orf7* を含むように brevicin 174A 生合成遺伝子クラスターを再構築し、brevicin 174A 感受性株である同じ *Lactobacillus* 属の乳酸菌株に導入した。また再構築する際、遺伝子内に終止コドン挿入することで、*orf4* および *orf6* をそれぞれ単独で、若しくは共に破壊し

たクラスターも構築し、同様に導入株を作製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 2つの転写調節因子の認識する結合配列

DNase I footprinting アッセイの結果から、Orf4 および Orf6 がそれぞれ認識して結合する塩基配列が明らかとなった (図2および3)。

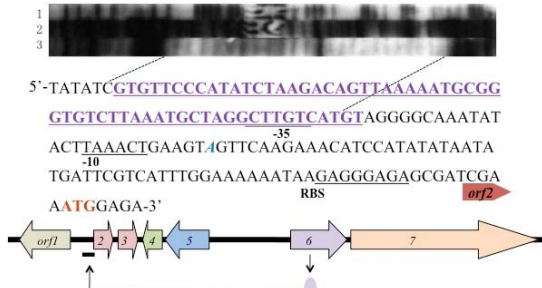


図2 Orf6の結合配列とその周辺領域

塩基配列部分に太字下線で結合配列を示す。

1; A+G ラダー, 2; Orf6 (-), 3; Orf6 (+)

斜字体; 転写開始点 (アデニン)

-10, -35; プロモーター配列,

RBS; リボソーム結合領域

Orf6 の認識配列においては、片側の鎖についてしか決定できなかったものの、併せて決定した *orf2-3* オペロンの転写開始点 (開始コードンの 67 塩基上流) からそのプロモーター配列を推測することができた (図2)。その結果、Orf6 の認識配列は *orf2-3* プロモーターの上流域に存在しており、この特徴はアクチベーターに一般的によくみられることから、Orf6 は *orf2-3* の転写を正に調節する因子であると推測された。

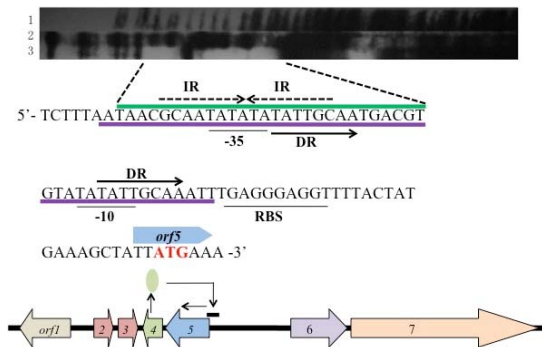


図3 Orf4の結合配列とその周辺領域

塩基配列部分に太線で両鎖における結合配列を示す。

1; A+G ラダー, 2; Orf4 (-), 3; Orf4 (+)

IR; inverted repeat, DR; direct repeat,

-10, -35; 予測されるプロモーター配列

RBS; リボソーム結合領域

一方、Orf4 の認識配列中には、8 塩基からなる inverted repeat および 12 塩基からなる direct repeat が存在していた (図3)。実

験の結果、*orf5-4* オペロンの転写開始点を決定することはできなかったが、その予測されるプロモーター配列から、Orf4 の認識配列は丁度そのプロモーター領域を覆う形で存在していることが明らかとなった。この特徴はレプレッサータンパク質に一般的によくみられることから、Orf4 は *orf5-4* オペロンの転写を負に調節する因子であると推測された。

##### (2) Orf6 の細胞内局在性の経時変化

Orf6 は膜結合型ドメインを有するため、まずその N 末端側に存在する DNA 結合ドメインのみを可溶性のタンパク質として調製し、抗 Orf6 ウサギ抗体を作製した。経時的に回収した 174A 株の膜画分および可溶性画分に対し、ウェスタン解析を行った結果、DNA 結合ドメインのみを抗原としたためか、抗体の特性が著しく低く、経時的に画分を移行するバンドを特定するには至らなかった。

抗体の問題を改善すべく、大腸菌の宿主・ベクター系を利用し、全長型 Orf6 タンパク質の取得を試みたが、発現系の構築には至らなかった。

##### (3) Brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター中に含まれる ORF の機能解析

###### ① *orf4* および *orf6* 導入株の構築

Brevicin 174A 産生能および耐性を失った、174A 株のプラスミド脱落変異株に対する *orf4* および *orf6* 導入株を構築した。この時、*orf4* はオペロンを形成している *orf5* の下流側に存在するため、*orf5-4* オペロンとしてシヤトルベクターに挿入した。それぞれの導入株において、生育速度等に目立った変化は観察されなかったが、*orf5-4* を導入した株においては、brevicin 174A に対する耐性が上昇する現象が観察された (図4)。この結果から、機能未知であった *orf5* は、brevicin 174A の immunity protein (自己耐性因子) をコードしていることが明らかとなった。

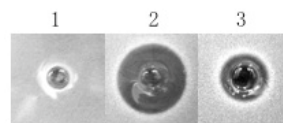


図4 *orf5-4* 導入株の brevicin 174A 耐性

arar-well diffusion アッセイによる。

1; *Lb. brevis* 174A (WT)

2; 174A プラスミド脱落変異株 [pLES003]

3; 174A プラスミド脱落変異株 [pLES003/*orf5-4*]

###### ② Brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター導入株の構築

シヤトルベクター pLES003 (6.1 kb) 上に、*orf1-orf7* よりなる brevicin 174A 生合成遺伝子クラスターの全長 (約 10 kb) を再構築するのは物理的に非常に困難であったため、

*orf5* と *orf6* の間の intergenic region のうち約 3 kb を除いてプラスミドを作製した (図 5)。174A 株のプラスミド脱落変異株への本プラスミドの導入が困難であったため、brevicin 174A へ感受性を示す、同じ *Lactobacillus* 属乳酸菌への導入を試みた。その結果、*orf1*~*orf7* 導入株では、brevicin 174A の産生性および耐性ともに変化は見られなかった。しかしながら、*orf4* を欠損させたものでは brevicin 174A に対する耐性の上昇が観察された (表 1)。この結果は、*orf4* が自己耐性因子をコードしている *orf5* を負に制御することを裏付けるものであった。

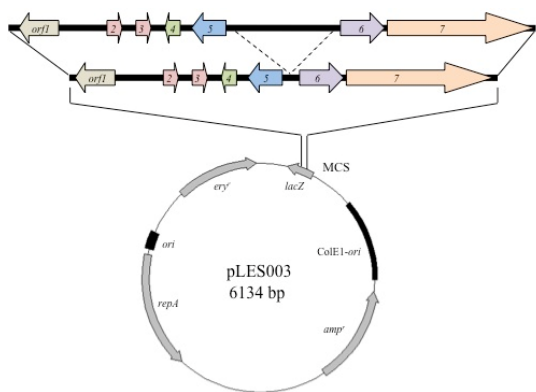


図 5 Brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター再構築の様子

表 1 生合成遺伝子クラスター各導入株における brevicin 174A 産生性と耐性の様子

brevicin	pLES003/ <i>orf1</i> -7 導入株	遺伝子破壊株		
		$\Delta$ <i>orf4</i>	$\Delta$ <i>orf6</i>	$\Delta$ <i>orf4, 6</i>
産生性	-	-	-	-
耐性	-	+	-	+

#### (4) 総括

本研究課題では、brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター中に見出された 2 つの転写調節因子である Orf4 および Orf6 が、本バクテリオシンの生合成および自己耐性発現において、どのように機能するのかを明らかにすべく、実験に取り組んだ。当初計画をしていた、膜結合型ドメインを有する Orf6 の局在性を突き止めることはできなかったが、両遺伝子産物の認識する配列を決定し、Orf4 においてはレプレッサーとして機能していること、ならびにオペロンを形成している *orf5* が、自己耐性因子である immunity protein をコードすることを明らかにした。実際 Orf5 は、他に報告されているバクテリオシンの自己耐性因子を含め、既存のタンパク質とほとんど相同性を示さなかったこともあり、研究開始当初は、その相同性検索結果からバクテリオシンの排出タンパク質であると推定された Orf7 が自己耐性を担っていると予測していた。このことから、Orf5 は新規の

immunity protein であるといえる。

シャトルベクター上に構築した brevicin 174A 生合成遺伝子クラスターを導入した株では、brevicin 174A に対する耐性、およびバクテリオシンの産生性は認められなかった。この原因としては、ベクターに挿入可能なサイズの限界故に削除した、intergenic region としていた約 3 kb の領域や、シャトルベクターのコピー数に起因する可能性もあり、生合成にはまだ未知の制御が関与していることが考えられた。但し、*orf4* を破壊したクラスター導入株では、*orf5* の抑制の解除により、この条件下でも耐性の上昇が観察された。

一方、ORF の解析を進める中で、バクテリオシンである Orf2 および Orf3 をリコンビナントのタンパク質として精製し、活性を調査したところ、それぞれ単独でも活性を示し、両者を混合した場合には著しい相乗効果を示すことが確認された (data not shown)。このことから、brevicin 174A は新しいタイプの two-peptide バクテリオシン (クラス IIb) に分類される可能性が考えられた。現在のところ、このクラスのバクテリオシンの作用機序ならびに自己耐性機構については不明な点が多く、本研究課題においては、遺伝子発現制御に関する知見のみならず、今後の研究課題として非常に興味深い結果が得られたと考える。

#### 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 Wada, T., Noda, M., Kashiwabara, F., Jeon, H.-J., Shirakawa, A., Yabu, H., Matoba, Y., Kumagai, T, Sugiyama, M. Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A, and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. (2009) Microbiology. 155, 1726-1737. (査読有り)

〔学会発表〕 (計 3 件)

① 野田正文, 松尾隆広, 的場康幸, 熊谷孝則, 杉山政則: 植物乳酸菌 *Lactobacillus brevis* 174A の産生する新奇バクテリオシン, 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月 28 日~30 日

② 古林泰子, 野田正文, 柏原ふみ, 松尾隆広, 全亨濬, 的場康幸, 熊谷孝則, 杉山政

則：クラスIIbバクテリオシンbrevicin 174Aの産生制御の分子機構解明，第61回日本生物工学会大会，名古屋，2009年9月23日～25日

③ 野田正文，和田貴臣，全亨濬，柏原ふみ，的場康幸，熊谷孝則，杉山政則：バクテリオシン生産性植物乳酸菌925A株の保有する4種類のプラスミドの構造と機能，日本乳酸菌学会2009年度大会，山梨，2009年7月6日～7日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野田 正文 (NODA MASAFUMI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・寄附講座助教  
研究者番号：40457289

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：