

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 3月31日現在

機関番号：15401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790069
 研究課題名（和文）：植物乳酸菌 174A 株が産生する新奇バクテリオシンの作用機序と自己耐性機構の解明
 研究課題名（英文）：Characterization of biosynthetic and self-protection mechanisms on novel bacteriocin produced by plant-derived LAB strain 174A
 研究代表者
 野田 正文（NODA MASAFUMI）
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任講師
 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乳酸菌 *Lactobacillus brevis* 174A によって産生される brevicin 174A は、174A-β および 174A-γ の 2 つのペプチドから成る、class IIb に分類されるバクテリオシンである。本研究では、brevicin 174A に感受性を示す乳酸菌株の膜抽出画分より、本バクテリオシンと相互作用する膜タンパク質を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：Brevicin 174A is classified into the class IIb bacteriocin, and is composed of two peptides, named brevicin 174A-β and 174A-γ. In the present study, the presumed target protein for brevicin 174A was found in the membrane fraction from brevicin 174A-sensitive lactic acid bacteria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

乳酸菌の中には、「バクテリオシン」と呼ばれる抗菌性ポリペプチドを産生する株が存在する。例えば、動物由来の乳酸菌である *Lactococcus lactis* は、ナイシン（nisin）と呼ばれるバクテリオシンを産生する。ナイシンは、熱に強いがヒトの消化酵素によって容易に分解されることから、わが国では 2009 年 3 月より、安全性の高い食品保存剤として、その実用化が始まっている。

申請者は、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（期間：平

成 15-18 年度）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乳酸菌株（174A 株と命名）を分離し、*Lactobacillus (Lb.) brevis* と同定した。意義深いことに、本バクテリオシン（brevicin 174A と命名）は、敗血症の原因菌となる *Listeria monocytogenes* や虫歯菌 *Streptococcus (Str.) mutans* に対して強い抗菌活性を示した。既に、brevicin 174A の生合成遺伝子を含むクラスターのクローニングに成功し（図 1）、得られた DNA 断片の

Open Reading Frame (ORF) 解析から、本バクテリオシンの産生は、クォーラムセンシング機構を介した既存の三分制御系とは異なった、新たな機構により制御されることが推定された。

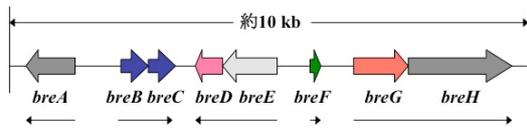


図1 Brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター

最下段の矢印は mRNA の転写単位を示す。

breA, H: brevicin 174A の排出に関与する遺伝子

breB, C: brevicin 174A-β および 174A-γ 生合成遺伝子

breE: brevicin 174A 自己耐性遺伝子

breD, G: 転写調節因子, *breF*: 機能未知

図1に示すように、brevicin 174A 生合成遺伝子クラスター中には、ひとつのオペロンとして同時に転写される二つのバクテリオシン生合成遺伝子 (*breB, breC*) のほか、自己耐性に関わる遺伝子 (*breE*) やバクテリオシンの細胞外排出に関わる遺伝子の存在が確認されたことから、brevicin 174A は class IIb バクテリオシンに分類される可能性が考えられた。

これまでにも class IIb バクテリオシンを産生する乳酸菌株はいくつか知られているが、それらは基本的に単独では抗菌活性を示さず、両者が共存するときに最大の抗菌活性を示すという特徴が知られている。そこで、*breB* および *breC* にコードされているバクテリオシン (それぞれ brevicin 174A-β および 174A-γ) の生合成遺伝子をそれぞれ大腸菌に独立的に発現させることで、各バクテリオシンを精製した。その結果、174A 株の産生する brevicin 174A-β および 174A-γ は、単独でもそれぞれ抗菌活性を示す現象が観察された。また、両者を混合させると、単独では認められない抗菌スペクトラムが得られ、しかも著しい相乗効果が認められた。このことは、brevicin 174A は、これまでは無い特徴を有する新奇な class IIb バクテリオシンであることを強く示唆するものであった。

2. 研究の目的

膜貫通領域を予測する SOSUI program を用いた解析結果から、brevicin 174A に対する自己耐性遺伝子である *breE* は、4 回の膜貫通領域を有する膜タンパク質をコードしていることが推測された。従って、細胞内で作られたその遺伝子産物 (BreE) は、細胞膜に内側から作用し、細胞外側から孔を形成すると考えられるバクテリオシンと直接、あるいは間接的に作用していると考えられ、その作用機構は非常に興味深い。

本研究では、brevicin 174A-β および 174A-γ の 2 つのバクテリオシン (*breB* およ

び *breC* の遺伝子産物) が如何に相互作用するのかを調査するとともに、これらバクテリオシンの標的分子の正体を明らかにすること、そして、自己耐性を担う *breE* 遺伝子産物 (BreE) が、如何に自ら作るバクテリオシンの致死的作用から自身を防衛しているのかを明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) Brevicin 174A-β および 174A-γ の相乗効果の検討

大腸菌ホスト・ベクター系を用い、trigger factor (TF) との融合タンパク質として brevicin 174A-β および 174A-γ を発現させた後、factor Xa によりタグ部分を切り離して精製した。

精製した両バクテリオシンについて、種々の細菌に対する単独作用時、および混合時における抗菌活性の評価・比較を行った。

(2) バクテリオシンおよび自己耐性因子の発現制御様式の検討

① ベクター構築

レポーター遺伝子として β-ガラクトシダーゼ遺伝子 (*β-gal*) を選択し、以前の研究で構築した乳酸菌-大腸菌シャトルベクター pLES003 をベースに、*breBC* オペロンのプロモーター領域 (P_{breBC}) および *breDE* オペロンのプロモーター領域 (P_{breDE}) を適宜組み込んだベクターを構築した。また、それぞれのプロモーター領域に結合することが確認されている転写調節因子の遺伝子 (*breG* → P_{breBC} , *breD* → P_{breDE}) と共存させることで、各転写調節因子がプロモーターに及ぼす影響を調査することとした (図2)。

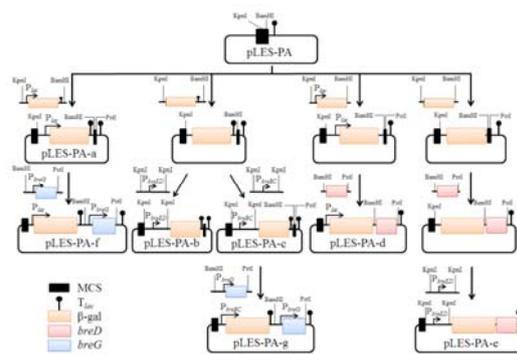


図2 プロモーターアッセイ用プラスミドの構築

pLES-PA は pLES003 にターミネーター配列を挿入したもの。

② プロモーターアッセイ

構築したアッセイ用の各ベクターを保有する大腸菌を被検菌とし、発現した β-ガラクトシダーゼが *o*-nitrophenyl-β-galactoside

(ONPG) を基質として分解することで産生される *o*-nitrophenol 量を定量することで、個々のプロモーターの活性値 (Miller unit; MU) を求めた。

(3) バクテリオシンおよび自己耐性因子の標的分子の探索

① 抗 BreB (brevicin 174A-β), 抗 BreE 抗体の作製

大腸菌宿主・ベクター系を用い、TF との融合タンパク質として brevicin 174A-β および BreE を発現させた。タグ部分を切り離して精製した場合、抗体作製に必要な収量および安定性に乏しく、TF タグ付きタンパク質として抗原に供した。なお、免疫動物としてはモルモットを使用した。

② BreE 発現株の構築

シャトルベクター pLES003 をベースに、*Lactobacillus* 属で高発現する人工プロモーター配列 P11 (Rud, I. *et al.*, *Microbiology*, 2006, 152:1011-1019) の下流に *breE* を連結し、*breE* 発現シャトルベクターを構築した。本ベクターを、brevicin 174A に対して感受性を示す *Lb. plantarum* IFO 3070 へ導入することで、brevicin 174A 耐性株 (E-1 株) を得た。

③ far-western 解析

Lb. brevis 174A, 174A 株のプラスミド脱落変異株 (生合成遺伝子クラスター脱落株; 174A (-) 株), *Lb. plantarum* IFO 3070, そして E-1 株の 4 株を解析対象とし、それぞれの膜タンパク質を抽出した。Prey タンパク質としてそれぞれの膜タンパク質を選択し、SDS-PAGE によって分離後、ニトロセルロース膜に転写した。また bait タンパク質として brevicin 174A を使用し、抗 BreB 抗体によってバクテリオシンと相互作用するタンパク質の検出を行った。

④ 共免疫沈降法 (Co-IP) による解析

抗体の結合担体として磁気ビーズ担体 (Protein A Mag Sepharose) を用い、抗 BreB および抗 BreE 抗体を結合させた。それぞれに上述した 174A 株または E-1 株由来の膜面分と、精製した brevicin 174A-β を混合して反応させることで、膜面分より brevicin 174A および BreE と相互作用するタンパク質の検出を行った。また、174A (-) 株と IFO 3070 株については、抗 BreB 抗体を用いたアッセイのみを行った。

⑤ Blue-Native (BN-) PAGE 法による解析

膜タンパク質の多量体解析法のひとつである BN-PAGE 法により、膜タンパク質と brevicin 174A との相互作用の解析を行った。

上述した 4 菌種由来の膜タンパク質と、粗精製した brevicin 174A を反応させ、BN-PAGE によって複合体として分離した後、ゲル部分を切り出して SDS-PAGE に二次元展開させた。

4. 研究成果

(1) Brevicin 174A-β および 174A-γ における相乗効果

表 1 に示すパイオアッセイの結果から、両バクテリオシンの抗菌スペクトルはほぼ同じ傾向を示したが、両者に対する被検菌の感受性は菌種によって異なっていた。また、両者を混合した場合には、単独では活性に乏しい被検菌に対しても、著しい活性の上昇が確認されると同時に、*Staphylococcus aureus* や *St. mutans* などでは、単独でも活性が認められるものの、相乗効果がさほど認められない菌種が存在することもわかった。

表 1 Brevicin 174A-β および 174A-γ における抗菌スペクトルと相乗効果

Species	Strain	混合比率		
		174A-β 174A-γ	10 0	5 5
<i>Bif. bifidum</i>	NBRC 100015	+	++	+
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	NBRC 100496	ND [‡]	+	ND
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	NBRC 100676	++	+++	+
<i>Lb. plantarum</i>	IFO 3070	+	+++	+
<i>Lb. sakei</i>	IFO 15893	++	+++	++
<i>Lb. hilgardii</i>	IFO 15886	++	++++	++
<i>Lb. fermentum</i>	(clinical isolate)	ND	++	ND
<i>Lb. brevis</i>	174A Δ <i>breA-breH</i>	++	++++	++
<i>S. aureus</i>	IFO 12732	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	NBRC 12993	ND	+	ND
<i>Str. sobrinus</i>	ATCC 27607	ND	ND	ND
<i>Str. mutans</i>	MT 8148R	+	+	+
<i>E. faecium</i>	IFO 3128	ND	+	ND
<i>E. faecalis</i>	IFO 12964	ND	ND	ND
<i>E. avium</i>	NBRC 100477	++	+++	+
<i>B. coagulans</i>	IFO 12583	++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	ND	+	ND
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 15313	ND	+	ND

[‡] ND, not detected.

(2) *BreB*, *breC* および *breE* の発現制御様式

図 3 に、各ベクター導入株について行ったプロモーターアッセイの結果を示す。*BreDE* オペロンのプロモーターである P_{breDE} は、コントロールとして用いた P11 と比べて活性が著しく低下しているが、*breD* と共存させた場合にはその活性がおおよそ 70 倍上昇した。このことから、*BreD* は、アクチベーターとして機能していることが考えられた。一方、*breBC* オペロンのプロモーターである P_{breBC} では、*breG* の有無によるその活性の違いは

認められなかった。このことから、BreG は他の因子と共同で機能する可能性が考えられた。

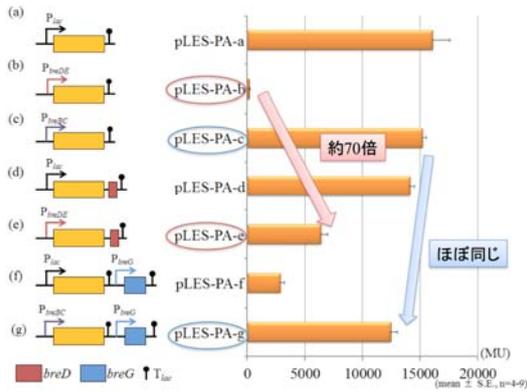


図3 各ベクターのプロモーターアッセイ結果

(3) Brevicin 174A および BreE の標的分子の探索

① far-western 法による解析

諸条件を検討しつつ解析を進めたが、メンブレン上で特異的に検出されるシグナルは認められなかった。

② Co-IP 法による解析

膜画分中から、抗 BreB および抗 BreE 抗体を用いた Co-IP 法によって特異的に回収されるタンパク質を検出することはできなかった。また、磁気ビーズ担体自体に brevicin 174A- β が非特異的に吸着してしまうことが明らかとなり、アッセイ系として不適當であることがわかった。

③ BN-PAGE 法による解析

解析を行った被検菌のうち、IFO 3070 株において、brevicin 174A の添加により、バンドパターンにはっきりとした変化が認められた (図 4, 矢印部分)。E-1 株では同様のパターンが若干ではあるが観察された。

(4) 総括

本研究課題では、class IIb バクテリオシンに分類される brevicin 174A の二つの構成ペプチドである brevicin 174A- β および 174A- γ が如何に相互作用をしているのか、そして本バクテリオシンの自己耐性因子である BreE が如何にしてバクテリオシンの活性を制御しているのかを突き止めるべく、実験に取り組んだ。当初計画をしていた、抗体との相互作用を利用した実験系 (far-western 法, Co-IP 法) では、特異的に作用するタンパク質を見出すことはできなかったが、BN-PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動法により、brevicin 174A と相互作用していると考えられる膜タンパク質

のバンドを確認することができた。膜タンパク質として、BreE を発現している E-1 株由来のものを使用した場合には、このバンドは非常に薄くなっており、BreE の存在によって結合が抑制されている可能性が考えられた。すなわちこのタンパク質は、直接的、あるいは間接的に BreE とも作用していることが考えられる。

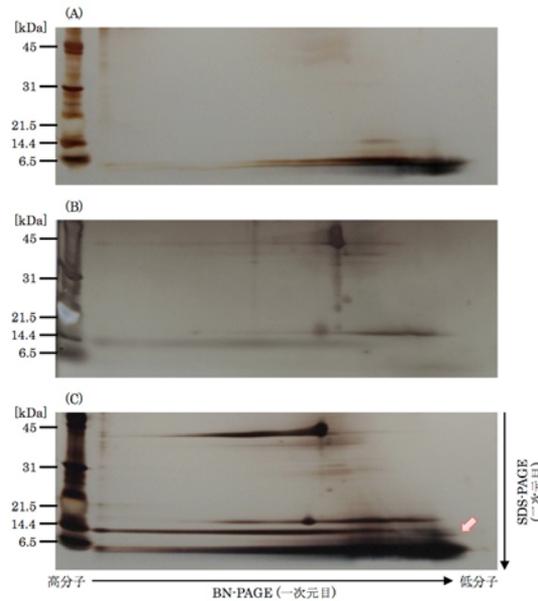


図4 BN-PAGE 法による解析結果

一次元目 (BN-PAGE) のゲルから泳動レーンを切り出し、二次元目 (SDS-PAGE) の泳動を行った。本写真で使用した膜タンパク質は IFO 3070 株由来のもの。(A), Brevicin 174A- β および 174A- γ のみ (B), 膜タンパク質のみ (C), 膜タンパク質と両ペプチドを混合したもの

また、breB, breC および breE の発現制御様式を解析する中で、これまでの研究成果では、その結合位置からレプレッサーであると予測していた BreD が、実際はアクチベーターとして機能していることが示唆された。一方、アクチベーターであると予測していた BreG では、活性の上昇は認められなかった。このことから、BreG が認識するプロモーターの活性化には、他に必要な分子 (コアクチベーター) が存在する可能性が考えられた。

一方、リコンビナントのペプチドとして精製した brevicin 174A- β および 174A- γ を用いた活性評価の結果から、種々の菌株において両バクテリオシンの相乗効果が認められるとともに、それぞれのペプチド単独での活性の違いも明らかとなった。BN-PAGE 法による解析を進める中で、brevicin 174A- γ のみを膜タンパク質と反応させた場合にも、僅かではあるが両ペプチドを添加した時と同じバンドの変化が観察された (data not shown)。Brevicin 174A- β のみと反応させた

場合には、このような変化は認められなかったことから、両ペプチドが相互作用によって最大の抗菌活性を示す場合に、個々のペプチドが持つ役割（結合部分）が異なっている可能性が考えられた。今回見出されたタンパク質の同定は今後の研究課題であるが、未だ同定されていない class IIb バクテリオシンの標的分子と考えられるタンパク質が見出されたことは、非常に興味深い成果であったと考える。

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 杉山政則, 野田正文: 植物乳酸菌のヘルスサイエンス, (2011) *New Food Industry*, 53, 7-14. (査読なし)

〔学会発表〕(計6件)

① 野田正文: 植物乳酸菌の予防医学への応用. 長崎県工業技術センター平成 22 年度バイオ技術研究会, 長崎県大村市, 2010 年 7 月 22 日 (招待講演)

② 野田正文: 伊予柑より分離された乳酸菌 174A 株の産生する二種類のバクテリオシンの特性. 日本乳酸菌学会 2010 年度大会, 宮城県仙台市, 2010 年 7 月 26 日~27 日

③ Masafumi Noda: Health benefit effects by plant-derived lactic acid bacteria. 2010 International Symposium on "Green and Personalized Foods", Daegu, Korea, October 27-29, 2010 (Invited Lecture)

④ Masafumi Noda: Anti-obesity effect of plant-derived lactic acid bacteria isolated. InnovAsia 2011: Food in the Future, Bangkok, Thailand, September 15-17, 2011 (Invited Lecture)

⑤ 町田千帆, 杉本好美, 野田正文, 島田歩, 小田康祐, 的場康幸, 熊谷孝則, 東川史子, 杉山政則: 齧蝕原性細菌のバイオフィルム形成を阻害する植物乳酸菌の探索研究, 日本乳酸菌学会 2012 年度大会, 茨城県つくば市, 2012 年 7 月 12 日~13 日

⑥ Masafumi Noda, Masanori Sugiyama: Correlation between lactic acid bacteria isolated from oral cavity of pre-school children and dental caries. The 5th International Symposium for lactic acid bacteria to urge industry-university cooperation, Seoul, Korea, December 4-5,

2012 (Invited Lecture)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 正文 (NODA MASAFUMI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任講師
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: