

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580101

研究課題名(和文) N・C末端でリンクした環状抗菌ペプチドの生合成機構と環化意義の解明

研究課題名(英文) Biosynthesis mechanism of a cyclic antibacterial peptide linked at N- and C-terminal amino acids and elucidation of the cyclization significance

研究代表者

川井 泰 (Kawai, Yasushi)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00261496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：58アミノ酸残基からなるN・C末端で環化した環状抗菌ペプチド(バクテリオシン)である「ガセリシンA」の生合成遺伝子を特定し、遺伝子発現解析からリーダー配列は環状化ではなく生産に重要であることを明らかにした。また、ガセリシンAは、推定新規プロテイナーゼによりリーダーが切断された後に、ABC-トランスポーターにより環状構造となり菌体外に分泌されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A biosynthesis genes for gassericin A, which was the cyclic antibacterial peptide (bacteriocin) linked at N- and C-termini consisting of 58 amino acid residue, were identified, and gene expression analysis clarified that the leader sequence was important to production of gassericin A not the cyclization. In addition, it was suggested gassericin A was linked at N- and C-terminal amino acids by an ABC-transporter and then secreted to outside the producer cells after cleavage of the leader peptide by a putative novel proteinase.

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：バクテリオシン 抗菌ペプチド 環状構造 乳酸菌 ガセリ菌

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、ヒト腸管に在住する乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* (ガセリ菌) の抗菌ペプチド (バクテリオシン) について研究を行ってきた。中でも、ヒト乳児糞便由来の *L. gasseri* LA39 株により生産されるバクテリオシン「ガセリシン A」は、リステリア、バチルス、黄色ブドウ球菌などの病原性食中毒細菌に対して高い殺菌効果を有しており、精製と構造遺伝子のクローニングから、 α -ヘリックス主体の二次構造および指標菌体からのカリウムイオン溶出による殺菌機構までを明らかにした。また、食品グレードの培地に大量に本バクテリオシンを生産させ、アミノ酸であるグリシンとの共用で、グラム陽性および陰性病原性細菌を網羅的に抑制する応用技術を開発し、特に 58 アミノ酸残基からなるガセリシン A が、N・C 末端でペプチド結合した微生物由来リボソーム性環状抗菌ペプチドであることを世界の 2 例目として報告した。

2. 研究の目的

N 末端と C 末端でペプチド結合した環状ペプチドは、これまで微生物、植物からヒトを除く哺乳類より 100 種類以上が見出され、構造や推定環化形成機構が報告されているが、国内外を問わず詳細な生合成機構は解明されていない。また、環状ペプチドはコンパクトな形状を保持し、熱や pH、プロテイナーゼ分解、とくに N 末端や C 末端からのエキソタイプのペプチダーゼによる切断を免れると推定されているが、環状化の利点と生物学的意義は正確に証明されておらず、新しい機能性やヒトにもその存在の可能性と役割が推定されるなど、世界的に進展が期待される研究領域の一つとなっている。そこで本研究では、ガセリシン A の環状化機構とその意義について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) N・C 末端で環化した環状バクテリオシン「ガセリシン A」の 7 つの推定生合成遺伝子 {*gaaBCADITE*: *gaaA* (構造遺伝子)、*gaaI* (自己耐性・免疫遺伝子)、*gaaTE* (推定 ABC-トランスポーター)、および機能未知の *gaaBCD*} を組み込んだ発現ベクター (pGAA2) を作製後、*L. gasseri* 基準株 (JCM1131^T) に形質転換し、分子生物学的手法 (各遺伝子) によりガセリシン A の環化に関与する遺伝子の同定を行う。

(2) ガセリシン A の環状化は未知の環化酵素による可能性が高いことから、前駆体ガセリシン A (全 91 残基) のアミノ酸残基変更による基質特異性を網羅的

に調べる。

(3) 環化形成酵素の触媒アミノ酸残基を特定と前駆体ガセリシン A との親和性を調べ、ガセリシン A 環状化機構の全貌を確定する。

4. 研究成果

(1) 各遺伝子 (*gaaBCADITE*) 欠損試験から全ての遺伝子がガセリシン A の生合成に関与していることを明らかにした。また、*gaaC* 欠損株では、D22 の一カ所で切断された非環状ガセリシン A が得られ、GaaC が環化後のガセリシン A を自身または他の推定プロテイナーゼによる切断から保護している可能性が示唆された。

(2) 発現ベクター (pGAA2) 中の *gaaA* に塩基置換を行い、ガセリシン A のリーダー切断サイト近傍と N・C 末端近傍のアミノ酸残基を変更したところ、N-1 および I1 残基の自由度が比較的高い一方で、環状化形成には A58 残基が重要であることが明らかになった。また、リーダーペプチドの N 末端から Met を除く 14 アミノ酸残基の欠損により、培養上清にガセリシン A の活性が消失したことから、ガセリシン A はこれまで報告されている他のリーダー配列が短い環状バクテリオシンとは異なり、リーダー配列は環状化ではなく生産に重要であることが示唆された。

(3) 低濃度のガセリシン A に暴露して作出したガセリシン A 自然耐性株 *L. gasseri* 1131GAR に pGAA2 Δ *gaaTE* を導入したところ、培養上清に抗菌活性が認められた。そこで C8 逆相クロマトグラフィーを用いて活性成分を精製し、質量分析に供したところ、 m/z は 5,671 で、環化 GA の m/z 5,651 より約 20 (水 1 分子) 高値であった。また、N 末端アミノ酸配列解析では、5 残基以降の 9 残基中 7 残基で成熟体ガセリシン A と同じ配列が得られた。本結果から、1131GAR (pGAA2 Δ *gaaTE*) のガセリシン A は *gaaBCADI* から生産された非環状化構造であり、GaaTE が環化形成に関与する因子である可能性が示唆された。またガセリシン A は、GaaBCD のいずれかまたは複合体によりリーダーが切断された後、GaaTE により環化形成が行われる 2 段階の生合成機構で分泌されるものと推定された。

(4) ガセリシン A のリーダー切断酵素と推定される GaaB (全 174 アミノ酸残基) の分子内に存在するアミノ酸残基 (His83、Cys97、Ser99、Glu144、および Asp147) を置換し、活性低減・消失 (ガセリシン A 非生産) から触媒中心アミノ酸残基の特定を試みた。その結果、改変株全てに抗菌活性が認められたことか

ら、GaaB が少なくともシステインプロテイナーゼ、および多数の報告例を占める His, Ser, Glu, Asp を触媒残基とするセリンプロテイナーゼではないことが推定された。本成果から、GaaB は新規のプロテイナーゼである可能性が高く、前駆体ガセリシンAのリーダー切断に関わるポケット部位の特定が期待される。

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 K. NAKAMURA, K. ARAKAWA, Y. KAWAI, N. YASUTA, T. CHUJO, M. WATANABE, H. IIOKA, M. TANIOKA, J. NISHIMURA, H. KITAZAWA, K. TSURUMI and T. SAITO, Food preservative potential of gassericin A-containing concentrate prepared from cheese whey culture supernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39. Animal Science Journal, 84, 144-149, 2013. 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

- ① 春日元気、吉田光希、松島裕樹、荒川健佑、川井 泰、宮本 拓、増田哲也、食品添加用酵母エキスをを用いた *Lactobacillus gasseri*用の食品グレード培地の創製と生育促進物質の検索、日本乳酸菌学会、2014年07月17日、広島・メルパルク広島
- ② 春日元気、松島裕樹、吉田光希、荒川健佑、川井 泰、宮本 拓、増田哲也、*Lactobacillus gasseri*用の安価な食品グレード培地の創製 - 最適食品添加用酵母エキスの選抜 -、日本畜産学会、2014年03月27日、つくば・つくば国際会議場
- ③ 鈴木はるか、中村圭志、荒川健佑、安田成美、川井 泰、西村順子、北澤春樹、浅見幸夫、齋藤忠夫、環状バクテリオシン「ガセリシンA」の生合成機構に関する研究、日本酪農科学会、2013年09月13日、岡山・岡山大学

- ④ 鈴木はるか、川井 泰、荒川健佑、中村圭志、安田成美、木ノ内智之、郭 暁艶、水谷 陽、西村順子、北澤春樹、浅見幸夫、齋藤忠夫、N/C末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシンA」の生合成機構に関する研究、日本乳酸菌学会、2013年07月09日、札幌・北海道大学
- ⑤ 鈴木はるか、川井 泰、荒川健佑、中村圭志、安田成美、木ノ内智之、郭 暁艶、水谷 陽、西村順子、北澤春樹、齋藤忠夫、N/C末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシンA」の生合成機構に関する研究、日本農芸化学会、2013年03月25日、仙台・東北大学
- ⑥ 鈴木はるか、中村圭志、荒川健佑、安田成美、川井 泰、伊藤喜之、西村順子、北澤春樹、齋藤忠夫、N/C末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシンA」の生合成機構に関する研究、日本酪農科学会、2012年08月17日、東京・大妻女子大学
- ⑦ 鈴木はるか、中村圭志、荒川健佑、安田成美、川井 泰、伊藤喜之、西村順子、北澤春樹、齋藤忠夫、N/C末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシンA」の生合成機構に関する研究、日本乳酸菌学会、2012年07月12日、つくば・つくば国際会議場
- ⑧ 川井 泰、腸内細菌により生産されるバクテリオシン(抗菌性ペプチド・タンパク質)の最新事情: ~構造、機能から近未来の利用性まで~、日本栄養・食糧学会大会、2012年05月20日、仙台・東北大学、招待講演
- ⑨ 安田成美、川井 泰、伊藤喜之、荒川健佑、中村圭志、西村順子、北澤春樹、齋藤忠夫、二成分性バクテリオシン「ガセリシンT」の発現および GxxxG モチーフが抗菌活性に及ぼす影響、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都・京都女子大学

- ⑩ 中村圭志、荒川健佑、鈴木はるか、安田成美、川井 泰、伊藤喜之、西村順子、北澤春樹、齋藤忠夫、N・C末端がリンクした環状バクテリオシン「ガセリシンA」の生合成機構に関する研究、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都・京都女子大学
- ⑪ Y. Kawai, K. Nakamura, K. Arakawa, N. Yasuta, T. Chujo, H. Iioka, M. Tanioka, J. Nishimura, H. Kitazawa, K. Tsurumi and T. Saito, MASS PREPARATION OF GASSERICIN A CONCENTRATE FROM CHEESE WHEY CULTURE SUPERNATANT OF *Lactobacillus gasseri* LA39 FOR APPLICATION TO FOOD PRESERVATION. LAB10 (TENTH SYMPOSIUM ON LACTIC ACID BACTERIA), 2011年8月28日-9月1日、オランダ・Egmond aan Zee

[図書] (計2件)

- ① 川井 泰、ヨーグルトの事典・抗菌(性)物質、朝倉書店(齋藤忠夫、伊藤裕之、岩附慧二、吉岡俊満編)、2014 発刊予定
- ② Yasushi Kawai and Tadao Saito, Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research, Caister Academic Press, 177-208, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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： 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井 泰 (KAWAI, Yasushi)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：00261496

(2) 研究分担者

齋藤 忠夫 (SAITO, Tadao)
東北大学・農学研究科・教授
研究者番号：00118358

(3) 連携研究者

西村 順子 (NISHIMURA, Junko)
東北大学・農学研究科・技術専門職員
研究者番号：10241556