

## 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4月22日現在

機関番号：15301  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23880019  
 研究課題名（和文） 乳酸菌バクテリオシンの腸内動態解明に向けた基礎的検討  
 研究課題名（英文） First step toward ascertaining bacteriocin production from lactic acid bacteria in animal intestinal tract  
 研究代表者  
 荒川 健佑（ARAKAWA KENSUKE）  
 岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教  
 研究者番号：50609930

研究成果の概要（和文）：ヒト小腸内優勢乳酸桿菌である *Lactobacillus gasseri* の多くの株は、抗菌ペプチドであるバクテリオシン「ガセリシン T」を産生する。本研究では、ガセリシン T が産生株の染色体上に存在する 9 遺伝子によって生合成されることを明らかにした。また、ガセリシン T が 2 分子の単純ペプチドで構成され、溶液中で強固に会合していることを見出した。本結果は、腸内細菌由来のバクテリオシンが宿主の腸内細菌叢および健康に与える影響を解明する上で重要な知見となるだろう。

研究成果の概要（英文）：Most strains of *Lactobacillus gasseri*, a predominant in human small intestinal tract, produce an antibacterial peptide, namely bacteriocin “gassericin T”. In this study, we demonstrated that gassericin T is produced from 9 genes in the chromosome of its producer, and that it consists of two simple peptides associated with each other in solution. These results would contribute to future research on the effect of bacteriocins on host-gut microbiota and health.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：酪農科学、食品微生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：乳酸菌、バクテリオシン、抗菌ペプチド、*Lactobacillus gasseri*

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌の産生する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、安全なバイオプリザバティブ

として食品保蔵等に有用であることが知られている。また、プロバイオティック乳酸菌の産生するバクテリオシンは、宿主である

ヒトや家畜等の哺乳動物の腸内細菌叢に影響を与える一因子と見なされている。ヒトの小腸内で優勢とされる細菌種の1つに、乳酸桿菌である *Lactobacillus gasserii* がある。*Lb. gasserii* は、病原細菌の生育・感染抑制、悪玉コレステロール量の低減、免疫システムの調節、および腸内機能・環境の改善などの生理効果を有するプロバイオティクスとして広く認知され、我が国では発酵乳等の製造・販売に用いられている。また、*Lb. gasserii* は、そのほとんどの菌株で、二成分性のバクテリオシンであるガセリシン T を産生することが以前の研究より明らかになっている。つまり、ヒト等の哺乳動物では、*Lb. gasserii* によるガセリシン T 産生が小腸内菌叢のコントロールに関与し、宿主に有益な効果をもたらしている可能性が考えられる。しかし、腸内常在細菌のバクテリオシンと腸内菌叢の関係、およびバクテリオシンの宿主に対する生理機能について具体的に証明した報告はほとんど存在しないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト小腸優勢乳酸桿菌である *Lb. gasserii* の多くの株が産生するバクテリオシン「ガセリシン T」に着目し、その腸内動態（腸内での産生や消長、分布、*in vivo* での抗菌効果など）を解明するための基礎的検討として、ガセリシン T の生合成関連遺伝子群を明らかにし、ガセリシン T の精製および構造解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ガセリシン T 生合成関連遺伝子群の解析

ガセリシン T 産生乳酸菌株 *Lb. gasserii* LA158 (=JCM 11064) から染色体 DNA を抽出し、既知のガセリシン T 構造遺伝子 *gatAX* 周辺領域をプライマーウォーキング法により

シーケンシングした。配列解析は、ソフトウェア GENETYX-MAC を用いて ORF を特定し、BLAST プログラムを用いて日本 DNA データバンク (DDBJ) のデータベースにおける相同性検索を行った。さらに、遺伝子配列に基づくそれぞれのタンパク質 (ペプチド) のアミノ酸配列から、SOSUI および TMHMM プログラムを用いて膜貫通領域を推定した。

### (2) ガセリシン T の精製および構造解析

ガセリシン T 産生菌株として *Lb. gasserii* LA158 を用い、生育培地としてプロテオースペプトンおよびクエン酸三ナトリウムを添加した還元チーズホエー培地 (PP-RCW-TSC) を用いた。通常、*Lb. gasserii* の生育には MRS 培地が用いられるが、MRS 培地培養液からのガセリシン T 精製は困難であると既に判明しているため、以前に開発した食品添加物規格の PP-RCW-TSC を生育培地として用いることとした。ガセリシン T の分離は、培養上清をろ紙ろ過し、水に対して透析後、C4 疎水および C8 逆相クロマトグラフィーに供することで行った。最終工程は、水/2-プロパノール系を移動相とした C8 逆相 HPLC にて行った。取得した分離画分は、抗菌活性測定、タンパク質量、SDS-PAGE・*in situ* 抗菌活性測定、MALDI-TOF-MS および N-末端アミノ酸配列分析に供した。

## 4. 研究成果

### (1) ガセリシン T 生合成関連遺伝子群の解析

ガセリシン T の生合成関連遺伝子群は、既知の *gatAX* の約 5.5 kb 上流の推定プロモーター領域から始まる全長約 6.9 kb の 9 遺伝子 *gatPKRTCZAXI* であることが確認された。推定プロモーター領域より上流およびターミネーター (*gatI* 末端) より下流にはガセリシン T の生合成と関連のあると思われる遺伝子は

存在していなかった。それぞれの遺伝子がコードするタンパク質（ペプチド）は、*gatP*がインデューサー、*gatK*がヒスチジンキナーゼ、*gatR*がレスポンスレギュレーター、*gatT*がABCトランスポーター、*gatC*がATP結合タンパク質、*gatAX*がガセリシンT本体（GatAおよびGatX）、*gatI*が自己耐性タンパク質であると推定され、*gatZ*は機能不明であった。また、GatPKRは転写制御に関わる三成分制御系であり、GatTCはガセリシンT分泌系と考えられた。これらガセリシンT生合成関連9遺伝子は、それぞれ *Lactobacillus johnsonii* VPI 11088の産生する二成分性バクテリオシンであるラクタシンFの生合成関連遺伝子と高い相同性を有し、さらに、*gatC(Z)AXI*は既知のバクテリオシン産生 *Lb. gasseri* K7, LF221 および SBT2055 の遺伝子と98-100%の相同性を有していた。本結果は、染色体上のガセリシンT生合成関連遺伝子群およびその類似遺伝子群が小腸内優勢の *Lb. gasseri* および *Lb. johnsonii* に広く分布していることを示し、小腸内でガセリシンTおよびその類似バクテリオシンが分泌されている可能性を示唆している。

## (2) ガセリシンTの精製および構造解析

PP-RCW-TSCにおける *Lb. gasseri* LA158の培養上清は、37°Cで24時間培養時に最も高い抗菌活性を示した。本培養上清を用いて、ろ紙ろ過後、水に対する透析を約24時間行った。次いで、抗菌活性を有していた透析内液にアセトニトリルを30%量となるように加え、C4疎水クロマトグラフィーに供した。そして、抗菌活性の認められた素通り画分をC8逆相クロマトグラフィーに供し、ステップワイズ溶出したところ、60% 2-プロパノール画分に抗菌活性が検出された。さらに、この抗菌活性画分をC-8逆相HPLCに供し、水/2-プ

ロパノール移動相でグラジエント溶出して、抗菌活性の認められたピークを回収した。抗菌活性の認められたピークはブロードしており、夾雑タンパク質と複合体を形成している可能性が示唆された。このことは、回収画分のSDS-PAGEで夾雑と思われるバンドが微かに観察されたことや、N-末端アミノ酸配列分析で明確な結果が得られなかったことから、その可能性は高いと思われる。また、HPLCにて抗菌画分がブロードしたもう1つの原因として、GatAおよびGatX分子が複雑に会合している可能性が考えられた。この可能性は、回収画分のMALDI-TOF-MS分析でGatAおよびGatXの理論値と同等の分子量を示すスペクトルが同時に検出されたことや、二成分性バクテリオシンの二分子間相互作用部位であるGxxxG配列をGatAおよびGatXが共に複数有していることから十分に考えられる。以上のことから、本研究においてガセリシンTを完全精製したとは言い難いが、MALDI-TOF-MS分析の結果からガセリシンTの二成分は修飾や分子内架橋のない単純ペプチドであることが明らかとなった。

本研究結果は、ヒト小腸内優勢の乳酸桿菌である *Lb. gasseri* の多くの株が産生するバクテリオシンであるガセリシンTの生合成関連遺伝子群を明らかにし、ガセリシンTの構造および存在形態を部分的に解明したという点において非常にインパクトのある成果だったと考えている。また、本研究結果は、バクテリオシンの生理機能や腸内細菌叢に与える影響などを解明する上で基礎となる知見を多く含み、今後の周辺研究の発展に十分貢献するものと期待している。現在、研究協力者とともに本研究結果を原著論文としてまとめている最中である。

## 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) 荒川健佑、*Lactobacillus gasseri*の生産するバクテリオシンの食品利用へ向けた検討、岡山大学農学部学術報告、査読無、101、2012、65-70、  
[http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/file/47692/srfa\\_101\\_065\\_070.pdf](http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/file/47692/srfa_101_065_070.pdf)

[学会発表] (計5件)

- ① 安田成美、川井泰、伊藤喜之、荒川健佑、中村圭志、郭曉艷、水谷陽、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GxxxGモチーフが抗菌活性に及ぼす影響、日本乳酸菌学会2012年度大会、2012年7月13日、つくば国際会議場(茨城県)
- ② 郭曉艷、荒川健佑、上西寛司、中島肇、西村順子、川井泰、北澤春樹、齋藤忠夫、二価金属イオンが二成分性バクテリオシン「ガセリシンT」の生産に及ぼす影響、日本乳酸菌学会2012年度大会、2012年7月12日、つくば国際会議場(茨城県)
- ③ 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年度大会、2012年3月23日、京都女子大学(京都府)
- ④ 安田成美、川井泰、伊藤喜之、荒川健佑、中村圭志、中條貴弘、西村順子、牧野由美子、重信秀治、北澤春樹、齋藤忠夫、改良チーズホエー培地を用いた、二成分性バクテリオシン「ガセリシンT」の精製

とその特性解析、平成23年度日本酪農科学シンポジウム、2011年9月22日、フォレスト仙台(宮城県)

- ⑤ 安田成美、川井泰、伊藤喜之、荒川健佑、中村圭志、中條貴弘、西村順子、牧野由美子、重信秀治、北澤春樹、齋藤忠夫、食品規格培地を用いた、乳酸菌由来の二成分性バクテリオシン「ガセリシンT」の生産、精製とその特性解析、日本畜産学会第114回大会、2011年8月26日、北里大学(青森県)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況(計0件)  
○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

[http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku03\\_7.html](http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku03_7.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒川 健佑 (ARAKAWA KENSUKE)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助教

研究者番号：50609930

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし