

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19580076
研究課題名（和文） ヒト腸管由来の乳酸菌が作る環状抗菌ペプチドの生合成機構
研究課題名（英文） Mechanism of biosynthesis for circular antibacterial peptides produced by lactic acid bacteria from human intestines
研究代表者
川井 泰（KAWAI YASUSHI）
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：00261496

研究成果の概要：ヒトの腸管に住んでいる安全性の高い乳酸菌は、抗菌物質を生産し、整腸作用や食品保存に貢献している。本研究では、乳酸菌によって作られるタンパク質性の抗菌物質（バクテリオシン）に着目し、熱や酸に安定性を与えるタンパク質（通常は一本の鎖状で存在している）のリング（環状）構造形成に関わる因子（遺伝子）を特定することに成功した。本成果は、世界で初めての事例であり、現在、論文を作成中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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

1. 研究開始当初の背景

ガセリ菌 (*Lactobacillus gasseri*) は高頻度でヒト腸管から検出される、安全性の高い乳酸菌であり、その生産される抗菌ペプチド（バクテリオシン）にはリステリア、バチルス、黄色ブドウ球菌などの食中毒菌に対して殺菌効果を発揮するものも多数存在する。当研究室でヒト乳児糞便より分離した *Lb. gasseri* LA39 株により生産される、高活性で幅広い抗菌活性を持つバクテリオシン（ガセリシン A と命名した）は、世界で2例目の N/C 末端がペプチド結合した環状抗菌ペプチドであり、アラニン 18 残基中に 2 残基の D-ア

ラニンが含まれるユニークなバクテリオシンであった。

2. 研究の目的

環状化により分子形状がコンパクトになることで、直鎖状と比較してタンパク質分解酵素からの攻撃を回避している可能性があり、いくつかこれを指示する報告がなされている。ガセリシン A も実際にプロテアーゼ・ペプチダーゼ抵抗性の高いことが判明しているが、環状化の生成機構とその本質的な役割は、科学的に全く解明されていない。また、

構造遺伝子がコードするアミノ酸がそのままD-アミノ酸となっているケースは、これまで真核生物に報告があるのみで、微生物では見出されていない。

そこで、環状バクテリオシン、ガセリシンAの生合成機構、特に環状化とD-アラニンの生成機構を解明し、環状構造の役割とD-アラニン残基がバクテリオシン活性に及ぼす影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ガセリシンAオペロンの*Lb. gasseri*基準株における発現と活性確認

ガセリシンA全遺伝子群（計7遺伝子：*gaaBCADIAE*）を、乳酸球菌由来の発現ベクター（プラスミドpIL253-P32等）に組み込み、エレクトロポレーションにより、*Lb. gasseri* JCM1131基準株に形質導入する。次いで、構築株を精製用の合成（改良MRS）培地にて培養し、その培養上清中のガセリシンA活性を寒天拡散法により測定し、ネイティブのガセリシンAとの比較・検討を行う。

(2) ガセリシンAオペロン各遺伝子欠損株の構築と活性検出

計画（1）で構築した全遺伝子群を組み込んだプラスミドより、PCRを用いて各遺伝子をつつ欠損させた発現ベクターを構築し（計7個）、それぞれ*Lb. gasseri* JCM1131基準株に形質導入を行う。次いで、これら作成株を精製用合成培地にて培養し、培養上清のバクテリオシン活性を測定・比較し、活性発現に関与する可能性の高い遺伝子を特定する。

(3) 計画（1）および計画（2）でバクテリオシン活性が得られた各遺伝子欠損株に関する諸検討

計画（1）および計画（2）で作成した株および各遺伝子欠損株について、精製用合成培地培養上清より定法を用いてガセリシンAを精製し、N末端アミノ酸配列分析、および質量分析（FAB-およびTOF-MS）により、非活性型や非環状型を含むガセリシンA分子の検出を行う。

(4) 環状化に関与する遺伝子とその機構解析

各構築発現ベクターを鋳型として、PCRによりガセリシンA構造遺伝子のN-およびC-末端のアミノ酸を適宜変更したベクターと、環状化遺伝子のアミノ酸配列を変更したベクターを構築する。次いで、JCM1131基準株に形質導入した後、ガセリシンAのアミノ酸配列の選択特異性と環状化遺伝子（タンパク質）の環状化の形成に重要なアミノ酸配列および部位の情報を得る。

(5) バクテリオシンの菌体外への分泌に関する遺伝子とその機構解析

ガセリシンA分子の生産が認められなかった各構築発現ベクターを鋳型として、PCRにより分泌遺伝子のアミノ酸配列を変更したベクターを構築する。次いで、JCM1131基準株に形質導入した後、ガセリシンAの分泌に関わる遺伝子（タンパク質）における重要なアミノ酸配列および部位の情報を得る。

(6) D-アラニンの所在位置決定とD-アラニン組み込み・生成機構の解明

計画（1）で構築した全オペロン保有株の発現ベクターを鋳型として、PCRによりガセリシンA構造遺伝子のアラニン全18残基について、それぞれグリシンに変更したベクターを構築する（計18個）。次いで、JCM1131基準株に形質導入した後、培養上清中のバクテリオシン活性低下の測定と精製後のアミノ酸組成分析により、ガセリシンAにおけるD-アラニン所在位置を決定する。

4. 研究成果

(1) ガセリシンAオペロンの*Lb. gasseri*基準株における発現と活性確認

ガセリシンA遺伝子群（*gaaBCADIAE*）を、プラスミドpIL253-P32に組み込み、*Lb. gasseri* JCM1131基準株に形質導入したが、pIL253-P32で陽性クローンは得られなかった。そこで、他の発現ベクターを用いて構築実験を行い、ガセリシンA全遺伝子群の組み込みに成功した。次いで、構築株を改良MRS培地培養上清中のガセリシンA活性を測定した結果、ネイティブのガセリシンAと同等の活性が得られた。

(2) ガセリシンAオペロン各遺伝子欠損株の構築と活性検出

計画（1）で構築した全遺伝子群導入株を用いて、各一遺伝子欠損株を取得し、それぞれのバクテリオシン活性を測定・比較した結果、活性発現に関与する可能性の高い遺伝子を特定した。

(3) 計画（1）および計画（2）でバクテリオシン活性が得られた各遺伝子欠損株に関する諸検討

計7遺伝子：*gaaBCADIAE*により、ネイティブと同一のガセリシンA（環状型）が生産されていることを確認した。また、各1遺伝子欠損株中、*gaaC*欠損株のみにガセリシンAの活性が培養上清中に回収された。現在、*gaaC*欠損株よりバクテリオシンを精製し、非環状型の可否について、最終確認を行っている途中である（MSでは、非環状型であった）。

微生物からは乳類（ヒトを除く）に至るまで、様々な生物由来の環状ペプチドが現在までに100種類以上見出されているが、環状化に関わる因子（群）は不明であり、本成果は、環状ペプチド研究に先駆けた大きな知見と考えられる。

(4) 環状化に関する遺伝子とその機構解析

gaaC のバイオインフォマティクスでは、2回の膜貫通領域を保有しており、環状化因子としての機能について、詳細な解析を行っている途中である。

(5) バクテリオシンの菌体外への分泌に関する遺伝子とその機構解析 については、遂行出来なかった。

(6) D-アラニンの所在位置決定とD-アラニン組み込み・生成機構の解明

本項目について、精製ガセリシンAを用いて詳細に調べた結果、本抗菌ペプチド中には、D-アラニンは全く含まれていないことが判明した。現在、先の論文 (AEM, 2004) 結果に対する訂正論文を作成中である。

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5件)

- ① Kensuke Arakawa, Yasushi Kawai, Junko Nishimura, Haruki Kitazawa and Tadao Saito, Negative effect of divalent metal cations on production of gassericin T, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasserii*, in milk-based media. *International Dairy Journal*, in press, 2009. 査読有り
- ② Kensuke Arakawa, Yasushi Kawai, Hiroyuki Iioka, Masashi Tanioka, Junko Nishimura, Haruki Kitazawa, Koichi Tsurumi and Tadao Saito, Effects of gassericins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasserii*, with glycine on custard cream preservation. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2365-2372, 2009. 査読有り
- ③ Yasushi Kawai, Joni Kusnadi, Rober Kemperman, Jan Kok, Yoshiyuki Ito, Mikiko Endo, Kensuke Arakawa, Hideaki Uchida, Junko Nishimura, Haruki Kitazawa and Tadao Saito, DNA sequencing and homologous expression of a small peptide conferring immunity to gassericin A, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus gasserii* LA39. *Appl*

ed and Environmental Microbiology, 75 (5), 1324-1330, 2009. 査読有り

- ④ Kensuke Arakawa, Yasushi Kawai, Kenji Fujitani, Junko Nishimura, Haruki Kitazawa, Ken-ichi Komine, Kenzo Kai and Tadao Saito, Bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus gasserii* LA39 isolated from human feces in milk-based media. *Animal Science Journal*, 79(5), 634-640, 2008. 査読有り
- ⑤ Kensuke Arakawa, Yasushi Kawai, Hiroyuki Iioka, Masashi Tanioka, Junko Nishimura, Haruki Kitazawa, Koichi Tsurumi and Tadao Saito, Microbial community analysis of food-spoilage bacteria in commercial custard creams using culture-dependent and -independent methods. *Journal of Dairy Science*, 91 (8), 2938-2946, 2008. 査読有り

[学会発表] (計9件)

- ① 荒川健佑、川井 泰ら、*Lactobacillus gasserii*が生産する抗菌ペプチドを用いたカスタードクリームの新規保存法の開発、日本畜産学会大 110 回 (2008 年度) 大会、平成 21 年 3 月 27 日、日本大学
- ② ○川井 泰ら、バクテリオシン (ガセリシンA) に対する乳酸菌の自己耐性因子とその発現解析、日本畜産学会大 110 回 (2008 年度) 大会、平成 21 年 3 月 27 日、日本大学
- ③ K. Arakawa, Y. Kawai, et al., IMPROVED GROWTH AND INCREASED BACTERIOCIN PRODUCTION OF PROBIOTIC *Lactobacillus gasserii* STRAINS IN MILK-BASED MEDIA. 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria, 平成 20 年 9 月 1 日 Egmond aan Zee (The Netherlands).
- ④ ○Y. Kawai, et al., EFFECT OF FATTY ACIDS (C18:1, OCTADECENOIC ACIDS) TO BACTERIOCIN PRODUCTION AND RESISTANCE OF *Lactobacillus gasserii* STRAINS ISOLATED FROM HUMAN INTESTINE AND FECES. 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria, 平成 20 年 9 月 1 日 Egmond aan Zee (The Netherlands).
- ⑤ 伊藤円香、○川井 泰ら、ヒト由来乳酸桿菌のバクテリオシン生産性と耐性に脂肪酸 (オクタデセン酸、C18:1) が及ぼす影響、日本乳酸菌学会 2008 年度大会、平成 20 年 7 月 14 日、京都大学
- ⑥ 荒川健佑、川井 泰ら、ガセリシンTの生産性に及ぼす二価金属イオンの影響、日本農芸化学会 2008 年度大会、平成 20 年 3 月 28 日、名城大学
- ⑦ 伊藤円香、○川井 泰ら、乳酸桿菌の

バクテリオシン生産性と耐性はオクタデセン酸により変化する、日本農芸化学会2008年度大会、平成20年3月27日、名城大学

- ⑧ K. Arakawa, Y. Kawai, et al., Application of bacteriocin produced by probiotic *Lactobacillus gasser* LA39 to biopreservation of custard cream. The 4th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria & the 3rd International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Health. 平成19年10月15日 Shanghai Everbright Convention & Exhibition Centre International Hotel.
- ⑨ Y. Kawai, et al., Characteristics of bacteriocins and their producing *Lactobacillus gasser* strains isolated from human infant feces. The 4th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria & the 3rd International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Health. 平成19年10月15日 Shanghai Everbright Convention & Exhibition Centre International Hotel.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ガセリシンAの生産方法及び食品保存剤

発明者: 齋藤忠夫、川井 泰、荒川健佑、飯岡宏之、谷岡政司、鶴見幸市

権利者: 東北大学、月島食品工業(株)

種類: 特許

番号: 特開2009-44983

出願年月日: 平成21年3月5日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/douka/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川井 泰 (KAWAI YASUSHI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 00261496

(2) 研究分担者

齋藤 忠夫 (SAITO TADAO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 00118358

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 10204885

西村 順子 (NISHIMURA JYUNKO)

東北大学・大学院農学研究科・技術専門職員

研究者番号: 10241556

(3) 連携研究者

無し