

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05798

研究課題名(和文)塩基性ポリアミノ酸ワールド：放線菌が獲得した準普遍的な生存戦略ペプチド

研究課題名(英文)Basic Poly(amino acid) World: Quasi-ubiquitous Peptides for the Survival Strategy of Actinomycetes

研究代表者

竹原 宗範 (TAKEHARA, Munenori)

滋賀県立大学・工学部・講師

研究者番号：30275169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗菌性を示す塩基性ポリマーを「準普遍的」に生産する微生物群に着目し、その生産と機能に関する生物学的意義を評価することを目指した。

塩基性ポリマーである -PL, -PAB, PAPは、酸性環境下において誘導的に生合成されることから、生産菌のpH恒常性の維持に寄与していることが考えられた。新規な「くし様」構造からなるPAPは、酵母菌に対して高い抗菌活性を示すなど、併産する -PLとは異なる適応範囲の抗菌性を有していた。さらに、-PABの鏡像体ポリマー(-D-PAB)と -PLを併用することで、酵母菌等に対する抗菌作用が相乗的に増大することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「くし様」構造を有する天然の塩基性ポリマーに関する報告例はなく、今回の発見は、微生物が生産する塩基性ポリマーの多様性を顕在化しただけでなく、今後、生合成機構の解析へと研究展開していくうえでも重大な研究成果となった。以前に申請者らが見出した -PL/ -PAB併産菌と同様に、-PL/PAP併産菌も、異なるポリマーを共存させることで、より広範な抗菌作用を獲得してきたと考えられる。また、-PL/ -D-PAB併用で相乗的な機能発現が認められたことから、塩基性ポリマーの多面的な抗菌作用機構の寄与が示唆された。このように、塩基性ポリマーを抗菌剤として効果的に利用するための指針となる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The author focused on a genus of microorganisms that “quasi-ubiquitously” produce basic polymers with antimicrobial properties, and aimed to evaluate and understand the biological significance of their production and function. Since basic polymers such as -PL, -PAB, and PAP are inductively biosynthesized only in an acidic environment, it is considered that they contribute to the maintenance of pH homeostasis of the producing cells. PAP, which has a novel “comb-like” structure and showed high antimicrobial activity against some yeast strains, had a property with a different antimicrobial range from that of -PL coproduced. Furthermore, the combined use of enantiomeric polymer of -PAB (-D-PAB) and -PL synergistically increased the antimicrobial activity against some yeasts and bacilli. On the other hand, these basic polymers could not play a role as metal ion scavenger.

研究分野：応用微生物学

キーワード：塩基性ポリペプチド ポリ(-L-リシン) ポリ(-L-ジアミノ酪酸) ポリ(-D-ジアミノ酪酸) ポリ(L-ジアミノプロピオン酸) 抗菌性 相乗作用 環境応答

1. 研究開始当初の背景

本研究は、抗菌性の塩基性ポリペプチドであるポリ(ϵ -L-リシン) (ϵ -PL) の放線菌による「準普遍的」な生産に着目し、その生産と機能に関する生物学的意義を明らかにするとともに、当該ペプチドの新機能性分子としての利用展開の礎を築くことを目指し、立案したものである。

ϵ -PL は L-リシンの α -位のカルボキシ基が ϵ -位のアミノ基と脱水縮重合したイソペプチドで (図 1), *Streptomyces* 属放線菌により非リボゾーム的に生合成されることから、分子量に分布が生じる ($n=24-36$)。 ϵ -PL は抗菌活性を有し、国内外で天然の食品保存料として用いられているものの、1977 年に ϵ -PL 生産菌が日本国内で発見されて以来、約 30 年間は新規の生産菌株は見出されてこなかった。長い間、 ϵ -PL 生産は特定の放線菌に限定される「特異的」なポリペプチドであると考えられてきたが、我々は新たなスクリーニング法を開発することで、100 株を超える ϵ -PL 生産菌を分離することに成功した。興味深いことに、分離した放線菌株の 10%程度が、 ϵ -PL を生産していることがわかった。さらに、 ϵ -PL の分子量分布には多様性があり、また ϵ -PL 生産菌株のいくつかは、新規なポリペプチドであるポリ(γ -L-ジアミノ酪酸) (γ -PAB) あるいはポリ(ジアミノプロピオン酸) (PAP; 申請当初、構造の詳細は未同定) を併産することを見出した (図 1)。

これらポリペプチドはいずれも抗菌性を示すことから、一義的には、微生物フローラにおける生存競争を勝ち抜くための抗生物質としての役割を果たす物質であると考えられる。しかしながら、 β -ラクタム系やアミノグリコシド系などの既知の抗生物質類と比較して、 ϵ -PL の効能は「マイルド」であり、それゆえ天然の食品保存料として、使用が認可されてきた。また、これら塩基性ポリペプチドは菌体が強酸性下に暴露されることで誘導的に生合成され、さらには菌体密度依存的にポリペプチド生産が制御されるといった生育環境に鋭敏に応答するという特徴を見出してきた。すなわち、これら塩基性ポリペプチドが、抗生物質としての役割以外の生物学的機能を担っていることが示唆された。

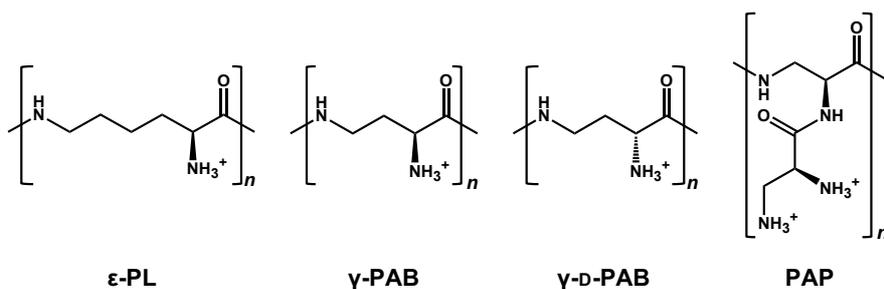


図 1. 放線菌により生産される塩基性ポリペプチド: ポリ(ϵ -L-リシン) (ϵ -PL), ポリ(γ -L-ジアミノ酪酸) (γ -PAB), ポリ(γ -D-ジアミノ酪酸) (γ -D-PAB), ポリ(L-ジアミノプロピオン酸) (PAP). 本研究で新たに見出した PAP は L-ジアミノプロピオニル-L-ジアミノプロピオン酸を繰返し単位とする comb-like (くし様) 構造を特徴としている。

2. 研究の目的

本研究は、放線菌における ϵ -PL 生産の「準普遍性」の発見に端を発し、多様なポリペプチドを生産する放線菌の生存戦略を塩基性ポリアミノ酸ワールドと捉え、包括的にその生産意義を理解することを目的としている。当該の実験計画では、 ϵ -PL および申請者らが発見した 2 つの新奇な塩基性ポリペプチドについて、抗菌剤としての役割を再考するとともに、pH 恒常性の制御分子や金属キレート剤としての役割を検討し、またペプチド生産に関わるシグナル分子についても同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) PAP の構造決定と抗菌性評価

PAP を酸加水分解すると、構成アミノ酸であるジアミノプロピオン酸はラセミ化する。そこで本計画では、イソペプチド結合を切断可能なプロテアーゼ A “アマノ” SD を用いて PAP を加水分解し、分離したジアミノプロピオン酸の鏡像異性体比 (D/L-比) をキラル HPLC (Crownpak CR (+), ダイセル) にて決定した。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) にてポリマーの分子量を評価した。

PAP の種々のグラム陰性・陽性細菌および真菌 (酵母) に対する抗菌活性を 50% 生育阻害濃度 (IC_{50}) で評価した。

(2) 塩基性ポリペプチドの抗菌性発現における相加効果と相乗効果の検定

グラム陰性、陽性菌および出芽酵母や分裂酵母を被検菌として、塩基性ポリペプチドの最小発

育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) およびこれらポリペプチドを任意の割合で混合したときの MIC を測定した。得られた MIC 値を用いてアイソボログラム解析を行うことで、塩基性ポリペプチドの抗菌活性発現における相加/相乗効果を評価した。このとき、FIC (Fractional inhibitory concentration) インデックス = (ポリペプチド A の併用 MIC) / (ポリペプチド A の単一 MIC) + (ポリペプチド B の併用 MIC) / (ポリペプチド B の単一 MIC) として算出した。

(3) 塩基性ポリペプチド生合成遺伝子のノックアウト体の作製と pH 感受性試験

交さ組換えの手法により、 ϵ -PL 生合成遺伝子 (*pls*) または γ -PAB 生合成遺伝子 (*pabs*) をそれぞれアミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼに置換した変異体 (Δpls と $\Delta pabs$) を得た。これら変異体を酸性環境下 (pH 4.0 および 3.5) で培養し、生育能およびポリペプチド生産能を野生株と比較した。

(4) 塩基性ポリペプチドのシデロフォアとしての役割の検討

鉄イオンの培地への添加がポリペプチド生産に対し誘導的に働くか調査した。

(5) ϵ -PL の菌体密度依存的生産：クオラムセンシングによる生産制御

高密度生育環境下で ϵ -PL 生産を抑制するという負の生産制御が行なわれている低重合度 ϵ -PL ($n = 13-23$) 生産菌について、培地への γ -ブチロラクトン添加が濃度依存的にポリペプチド生産における「負の制御」に関与しているか検討した。

4. 研究成果

(1) PAP の構造決定と抗菌性評価

ジアミノプロピオン酸ポリマーは、構成単位として L-ジアミノプロピオン酸のみを有し、くし様構造を特徴とするポリ[β -(L-ジアミノプロピオニル-L-ジアミノプロピオン酸)]、PAP であると同定した (図 1)。PAP は 500 から 1400 の分子量分布 (重合度 $n = 3-8$) を有していた (引用文献①)。

PAP はグラム陰性および陽性細菌に対し抗菌活性を示すものの、 ϵ -PL のほうが高い抗菌能を示した (表 1)。一方、いくつかの真菌 (酵母) に対しては、PAP は ϵ -PL よりも優れた抗菌能を示した。当該の放線菌株は、 ϵ -PL と PAP を併産することで、より広い抗菌スペクトルを獲得してきたと考えられた。

表 1. PAP の抗細菌および抗真菌活性

Test microorganism	IC ₅₀ (g/L)	
	PAP	ϵ -PL
Gram-negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> NBRC 3301	> 2	0.04
<i>Pseudomonas diminuta</i> JCM 2788	1.75 ± 0.07	0.03
<i>Pseudomonas syringae</i> NBRC 14075	0.68 ± 0.02	0.02
Gram-positive bacteria		
<i>Bacillus brevis</i> NBRC 3331	0.67 ± 0.14	0.05
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC 3335	> 2	0.03
Yeasts		
<i>Candida saitoana</i> IAM 1224	0.57 ± 0.25	1.40
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC 2044	0.23 ± 0.10	1.40
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> IAM 477	> 2	0.09

抗菌活性は 50% 生育阻害濃度 (IC₅₀) で示した。

(2) 塩基性ポリペプチドの抗菌性発現における相加効果と相乗効果の検定

二種の塩基性ポリペプチドを混合して抗菌試験を行なったとき、おおむね相加的な効果が得られた (一例として図 2 左に、大腸菌に対する ϵ -PL と γ -D-PAB の併用試験結果を示した)。一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対して γ -D-PAB を ϵ -PL と併用した場合、FIC インデックスは 0.50-0.75 を示し、抗菌能の発現に相乗効果をもたらすことがわかった (図 2 右)。この効果は枯草菌 *Bacillus subtilis* に対しても観測され、これらにおいては ϵ -PL と γ -D-PAB は異なる作用機構で発現していることが強く示唆された。

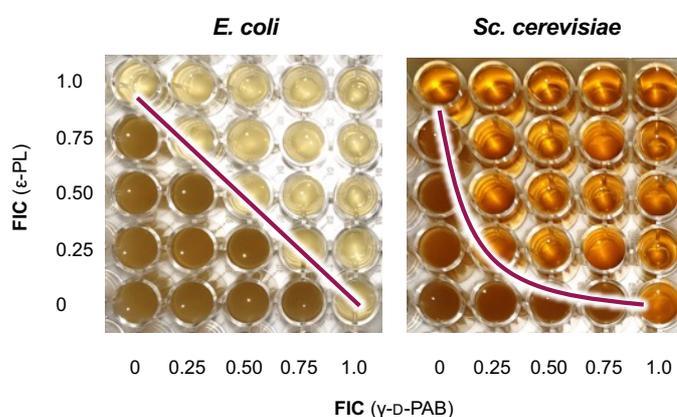


図 2. 大腸菌 (*E. coli*) および出芽酵母 (*Sc. cerevisiae*) に対する ϵ -PL/ γ -D-PAB 併用による抗菌効果のアイソボログラム解析. *E. coli* に対する最小生育阻止濃度 (MIC) : ϵ -PL · HCl (0.044 mg/mL), γ -D-PAB · HCl (0.045 mg/mL). *Sc. cerevisiae* に対する MIC : ϵ -PL · HCl (0.138 mg/mL), γ -D-PAB · HCl (0.100 mg/mL). 併用発育阻止濃度 (FIC) はそれぞれのポリペプチドに関する MIC 値を 1.0 としたときの相対濃度。

(3) 塩基性ポリペプチド生合成遺伝子のノックアウト体の作製と pH 感受性試験

ϵ -PL/ γ -PAB 併産菌のいずれか一方のポリマー生合成遺伝子を破壊した変異体 (Δpls と $\Delta pabs$) は、強酸性条件において、野生型より生育が旺盛になった。また、 $\Delta pabs$ は野生型株 (WT) と比較して、pH 4.0 および pH 3.5 いずれにおいてもポリペプチド (ϵ -PL) 生産が著しく向上した (図 3)。生産したポリマーを菌体表層に「まとう」ことで pH 恒常性を維持する一方で、その生産には著しいエネルギー消費を伴うことから、ポリマーの過剰な生産は生育に抑制的に働くことが考えられた。

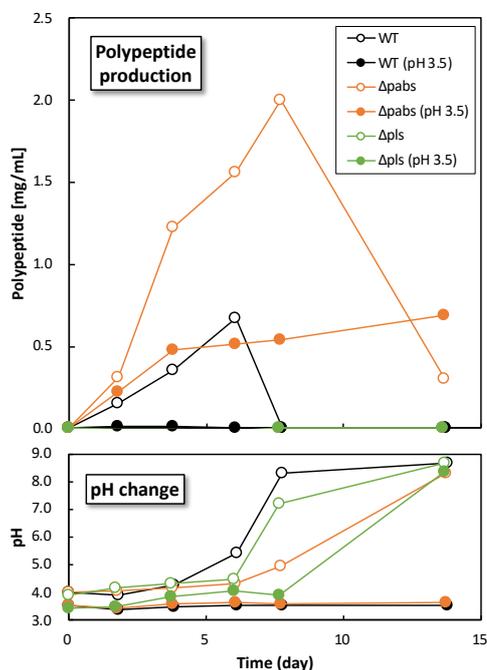


図 3. ϵ -PL/ γ -PAB 併産放線菌の野生型 (WT), ϵ -PL 生合成酵素遺伝子欠損株 (Δpls) および γ -PAB 生合成酵素遺伝子欠損株 ($\Delta pabs$) における塩基性ポリペプチド生産. 培地の初発 pH は 4.0 を標準とし, より強い酸性条件 (pH 3.5) でのポリペプチド生産性を観察した。

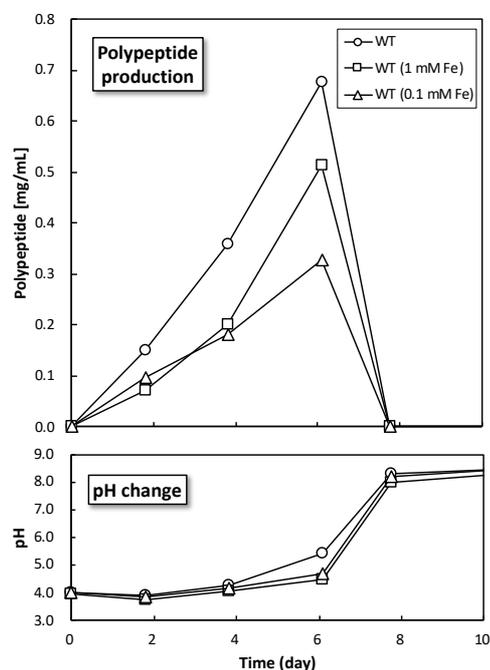


図 4. ϵ -PL/ γ -PAB 併産放線菌の塩基性ポリペプチド生産における鉄イオン添加効果。

(4) 塩基性ポリペプチドのシデロフォアとしての役割の検討

ϵ -PL 生産株に鉄イオンを添加して培養したところ, 無添加区と比較してポリマー生産開始時期がはやまったり, 生産性が向上されることはなかった (図 4)。 ϵ -PL にはシデロフォア (鉄イオンを捕捉する化合物) 様の性質は備わっていないことが考えられた。

(5) ϵ -PL の菌体密度依存的生産: クオラムセンシングによる生産制御

高密度生育下において, ϵ -PL 生産を停止する菌株を低密度で培養する際, γ -ブチロラクトンを添加したところ, 無添加区と比較して ϵ -PL 生産性に有意差は認められなかった。これとは異なるブチロラクトン誘導体の寄与, あるいは新規な生産制御機構の関与が示唆された。

以上, 抗菌性を示す新規な塩基性ポリペプチド PAP の構造解析を達成した。このような「くし様」構造を示す天然由来の塩基性ポリマーの報告はなく, 微生物が生産する塩基性ポリマーの多様性を顕在化しただけでなく, 今後, 生合成機構の解析へと研究展開していくうえでも重大な研究成果となった。また, ϵ -PL と γ -D-PAB を併用することで, これらは類縁の塩基性ポリペプチドであるにもかかわらず, 相乗的な抗菌作用を発現することを見出し, 応用利用の観点からも重要な知見が得られた。一方, 塩基性ポリマーの分子レベルでの生産制御については未明であり, 今後, 継続的な調査が必要である。

<引用文献>

① Takehara, M., Saimura, M., Inaba, H., Kato, Y., Muro, S., Matsunaga, T., and Yamanaka, K. Characterization of an L- α , β -diaminopropionic acid polymer with comb-like structure isolated from a poly(ϵ -L-lysine)-producing *Streptomyces* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105** (8), 3145–3157 (2021) <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11257-3>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takehara Munenori, Saimura Masayuki, Inaba Haruka, Kato Yoshinao, Muro Shogo, Matsunaga Tatsuki, Yamanaka Kazuya	4. 巻 105
2. 論文標題 Characterization of an L- , -diaminopropionic acid polymer with comb-like structure isolated from a poly(-L-lysine)-producing Streptomyces sp.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 3145 ~ 3157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-021-11257-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武内 正輝, 竹原 宗範
2. 発表標題 カチオン性ペプチドPoly(-L-lysine) のカルボジイミド架橋反応による修飾：構造解析および抗菌性分散剤としての特性評価
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 修, 松井 旺大, 永田 智, 竹原 宗範, 野村 亘, 井上 善晴
2. 発表標題 N-アシル化ポリ(-L-リシン)誘導体の合成と抗菌活性の評価
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 芳尚, 稲葉 悠, 室 尚吾, 吉田 修, 竹原 宗範
2. 発表標題 放線菌由来の新規カチオン性ポリペプチド：ポリ(L-ジアミノプロピオン酸)の単離，構造決定と特性評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桐原 一樹, 竹原 宗範, 濱野 吉十, 老川 典夫, 山中 一也
2. 発表標題 放線菌Streptomyces albulusに見出した櫛形構造を有する新規カチオン性ホモポリアミノ酸生成機構の解析
3. 学会等名 2021年度(第35回)日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 摩帆, 吉田 修, 星山 貴文, 松井 旺大, 山中 一也, 竹原 宗範
2. 発表標題 放線菌由来のポリ(-L-ジアミノ酪酸)の構造解析と抗菌活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------