

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24年 5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780069

研究課題名（和文） 乳酸菌由来抗菌ペプチドの生産制御と抗菌作用における特異性の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular basis of specificity in biosynthetic regulation and action mechanisms of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria

研究代表者

善藤 威史（ZENDO TAKESHI）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：50380556

研究成果の概要（和文）：乳酸菌由来抗菌ペプチド、バクテリオシンの構造を解析し、エンテロシン W、ロイコサイクリン Q、ワイセリシン Y・M などの新奇バクテリオシンの構造が決定された。また、ラクティシン Q、エンテロシン NKR-5-3、ワイセリシン Y・M などの生合成遺伝子群とその機能を解析し、生産制御機構の一端が明らかとなった。さらに、ラクティシン Q やエンテロシン W などの作用機構を解析し、抗菌作用に特異性をもたらす要因の一部が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Structures of antimicrobial peptides, bacteriocins, from lactic acid bacteria were analyzed, and some novel bacteriocins such as enterocin W, leucocyclicin Q and weissellicins YM were identified. Biosynthetic genes and their functions of some bacteriocins such as lactacin Q, enterocins NKR-5-3 and weissellicins YM were analyzed, and their biosynthetic regulation systems were partly unraveled. Action mechanisms of some bacteriocins were studied, and some factors for their specific antimicrobial actions were revealed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、乳酸菌、抗菌ペプチド、バクテリオシン

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンは、次世代の安全な抗菌物質として食品保存料をはじめとするさまざまな用途への利用が期待されている。乳酸菌バクテリオシンの構造と性質は多様であり、優れた特性をもつバクテリオシンの探索が広く行われている。

我々はバクテリオシンの迅速スクリーニ

ング法を構築し、多くの乳酸菌バクテリオシンを見出してきた。ナイシン Q やラクティシン Q、ラクトサイクリン Q のように広い抗菌スペクトルを有するものから、ラクトコッシン Q のように菌種特異的な抗菌活性を示すものまで、多様なバクテリオシンが見出された。また、バクテリオシン生産誘導ペプチドや、性質の異なる複数種のバクテリオシンを生産する乳酸菌も見出された。さらに引き

続き探索を行い、優れた特性をもつ、あるいは新奇の構造を有すると推定されるバクテリオシンが見つかりつつある。

乳酸菌バクテリオシンは一般に、各バクテリオシンに特異的な分泌機構、自己耐性機構を介して生産される。さらには、多くの場合、生産制御機構を有している場合もある。また、大半の乳酸菌バクテリオシンは、きわめて低濃度で抗菌活性を示すことから、標的細菌の何らかの部位を特異的に認識して抗菌作用を示していることが予想される。したがって、乳酸菌バクテリオシンを有効に活用するには、乳酸菌バクテリオシンの生産制御と抗菌作用の特異性の分子基盤の解明が必要と考えられる。分子基盤に基づいて種々のバクテリオシンを適材適所に用いることができれば、耐性菌の出現を防ぎつつ、より効果的な微生物制御の実現が期待できる。将来的には、さまざまな菌種に特異的な抗菌ペプチドのデザインも期待される。

2. 研究の目的

これまでに我々は多種多様な乳酸菌バクテリオシンを発見してきた。多くバクテリオシンの構造を決定してきたが、さらに新しいバクテリオシンを見出しつつある。そこで、本研究は、これら種々乳酸菌バクテリオシンの、より効果的な利用を図るため、生産制御や抗菌作用における特異性に焦点を当て、その要因を解明することを目標とする。まず、多様な新奇バクテリオシンの構造の解析、バクテリオシン生合成遺伝子群および誘導ペプチドの構造の解析を行う。さらに、バクテリオシンの抗菌作用、自己耐性、誘導活性などの機構の解明と、その特異的作用の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 構造未決定の乳酸菌バクテリオシンのうち、抗菌スペクトルなどに特徴をもつものについて、精製・構造決定を試みた。バクテリオシンは、培養液上清から、陽イオン交換、疎水性相互作用、逆相などの各種クロマトグラフィーによって精製した。精製バクテリオシンの分子量を質量分析によって解析し、さらに N 末端アミノ酸配列をエドマン分解によって解析した。得られたアミノ酸配列を元に構築したプライマー等を用いて PCR を行い、バクテリオシン構造遺伝子の塩基配列を解析した。分子量とアミノ酸・核酸レベルの解析の結果から、新奇バクテリオシンの一次構造を決定した。

(2) バクテリオシンの生合成には、バクテリオシン構造遺伝子のほか、翻訳後修飾、菌体外輸送、自己耐性、生産制御などに関わる遺伝子が必要である。これらの遺伝子群は、

一般に、バクテリオシン構造遺伝子の周辺領域にクラスターを形成して存在していることが知られている。そこで、バクテリオシン構造遺伝子の配列情報をもとに、さらに PCR・シーケンス解析を行い、周辺領域の塩基配列を取得した。必要に応じて、それらを適当な乳酸菌株を宿主として発現させ、生合成に必要な遺伝子を特定し、生合成遺伝子群の機能を解析した。

(3) これまでに見出されたラクティシン Q やラクトサイクリン Q などの新奇バクテリオシン、および本研究で構造が明らかになった新奇バクテリオシンの抗菌スペクトルや作用機構を解析した。バクテリオシンの作用による、標的細菌からの ATP 等の漏出や標的細菌細胞の膜電位の崩壊等を解析した。作用に要するバクテリオシン濃度や時間などを比較した。さらに、各種細胞を模したリポソームや標的細菌から抽出した脂質を用いたリポソームを調製し、リポソームに封入した蛍光物質のバクテリオシンの作用による流出を測定することで、各バクテリオシンの孔形成能を解析した。以上の結果をもとに、各バクテリオシンの作用機構の違いや、バクテリオシンの作用に影響する因子を検討した。

4. 研究成果

(1) 抗菌スペクトルなどに特徴をもち、新奇性が高いと判断されたバクテリオシンの精製・構造解析を行った。*Enterococcus faecalis* NKR-4-1 が生産するバクテリオシンは、2つのペプチド、エンテロシン W α と W β から構成され、ともに翻訳後修飾によって生じるランチオニン等の異常アミノ酸を構造中に含む新奇バクテリオシンであることが明らかとなり、エンテロシン W と命名した (図 1)。

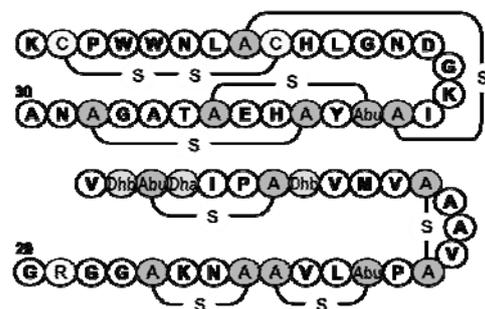


図 1. エンテロシン W の構造

エンテロシン W α (上) と W β (下) の 2 つのペプチドで構成され、翻訳後修飾によって生じるランチオニン等の異常アミノ酸を含んでいる。

E. faecium NKR-5-3 は 5 種のバクテリオシン様ペプチド、エンテロシン NKR-5-3A, B, C,

D, Z を生産することが明らかとなり、それらの構造を決定した。エンテロシン NKR-5-3B, C, D は新奇の構造を有していた。

さらに、*Leuconostoc mesenteroides* TK41401 が生産する新奇環状バクテリオシン、ロイコサイクリン Q (図 2) や、*Weissella hellenica* QU 13 が生産する新奇リーダーレスバクテリオシン、ワイセリシン Y とワイセリシン M (図 3)、*Lactococcus garvieae* BCC 43578 が生産する新奇クラス II バクテリオシン、ガルビエシン Q などの構造を決定した。



図 2. ロイコサイクリン Q の構造
N 末端と C 末端のアミノ酸残基がペプチド結合した環状構造を有している。



図 3. ワイセリシン Y と M の構造
ともに一般のバクテリオシンに見られるリーダー配列を持たず、N 末端にホルミルメチオンンを有する。

(2) 新奇バクテリオシンの生合成遺伝子群、生合成機構を解析した。*Lactococcus lactis* QU 5 が生産する新奇バクテリオシン、ラクティン Q の生合成にかかわる遺伝子群が明らかとなった。ラクティン Q 構造遺伝子のほか、菌体外排出、自己耐性、生産制御にかかわる遺伝子が同定された。ラクティン Q は、一般のバクテリオシンが有する N 末端のリーダー配列をもたずに生産されるリーダーレスバクテリオシンである。リーダーレスバクテリオシンは翻訳後すぐに活性を有するため、通常バクテリオシンとはやや異なる機構で生産されていることが示唆された。

E. faecium NKR-5-3 が生産するバクテリオシン群の推定生合成遺伝子群が明らかとなった。本株においては、エンテロシン NKR-5-3B を除く 4 種の生産が、エンテロシン NKR-5-3D を誘導因子とした三成分制御系によって制御されていることが明らかとなった。

W. hellenica QU 13 が生産する 2 つの新奇リーダーレスバクテリオシン、ワイセリシン Y と M の推定生合成遺伝子群が明らかとなった。ワイセリシン Y と M の生産は、培地条件等によって、独立に制御されていることが明らかとなった。

(3) 新奇バクテリオシンの抗菌スペクトルや作用機構を解析した。*L. lactis* QU 5 が生産するラクティン Q は、グラム陽性細菌に細菌に対しては、結合因子を介さずに細胞膜に孔を形成して強力な抗菌作用を示すものの、グラム陰性細菌に対しては抗菌活性を示さない。グラム陽性・陰性細菌細胞膜をそれぞれ模したリポソームを用いて、作用機構を解析したところ、ラクティン Q の選択性は標的細菌細胞膜の組成によってもたらされることが示された。

Lactococcus sp. QU 12 が生産する新奇環状バクテリオシン、ラクトサイクリン Q は、細菌細胞膜に孔を形成し、細胞内容物を溶出させることで抗菌活性を示すことが明らかとなった。ラクトサイクリン Q は広い抗菌スペクトルを有するが、とくに結合因子を介さずに、単純なリポソームからも内容物を溶出させることが明らかとなった。

E. faecalis NKR-4-1 が生産する新奇ランチビオティック、エンテロシン W は、2 つのペプチド、エンテロシン W α と W β によって構成されている。エンテロシン W は、各ペプチド単独では、ほぼ全く抗菌活性を示さないが、両ペプチドが存在するときは、2 つのペプチドが特異的かつ相乗的に作用を示し、標的菌体の細胞膜に孔を形成して抗菌活性を示すことが明らかとなった。また、両ペプチドは、1:1 の比で相乗作用すること、W α 、W β の順序で標的細胞に作用することなどが明らかとなった (図 4)。

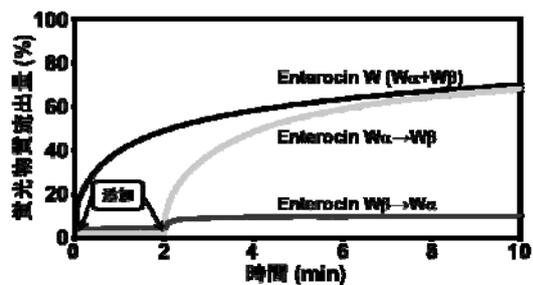


図 4. エンテロシン W のリポソームへの作用
2 つのペプチドを同時に添加、あるいは W α →W β の順に添加した場合には内容物の流出が起こるが、一方のみの添加や W β →W α の順に添加した場合には流出がほとんど起こらない。

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 16 件)

- ① Masuda Y., Zendo T., Sonomoto K. New type non-lantibiotic bacteriocins: circular and leaderless bacteriocins. *Benef. Microbes.*, 3, 3-12 (2012) 査読有

- ② Tosukhowong A., Zendo T., Visessanguan W., Roytrakul S., Pumpuang L., Jaresitthikunchai J., Sonomoto K. Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578. Appl. Environ. Microbiol., 78, 1619-1623 (2012) 査読有
- ③ Sawa N., Wilaipun P., Kinoshita S., Zendo T., Leelawatcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K. Isolation and characterization of enterocin W, a novel two-peptide lantibiotic produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1. Appl. Environ. Microbiol., 78, 900-903 (2012) 査読有
- ④ Masuda Y., Zendo T., Sawa N., Perez R.H., Nakayama J., Sonomoto K., Characterization and identification of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13. J. Appl. Microbiol., 112, 99-108 (2012) 査読有
- ⑤ Masuda Y., Ono H., Kitagawa H., Ito H., Mu F., Sawa N., Zendo T., Sonomoto K., Identification and characterization of leucocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. Appl. Environ. Microbiol., 77, 8164-8170 (2011) 査読有
- ⑥ Yoneyama F., Ohno K., Imura Y., Li M., Zendo T., Nakayama J., Matsuzaki K., Sonomoto K., Lacticin Q-mediated selective toxicity depending on physicochemical features of membrane components. Antimicrob. Agents Chemother., 55, 2446-2450 (2011) 査読有
- ⑦ 石橋直樹, 善藤威史, 園元謙二. 乳酸菌バクテリオシン—戦略的な探索・発見・活用とゼロエミッションPJまで—, 日本乳酸菌学会誌, 22, 38-48 (2011) 査読なし
- ⑧ Hu C.B., Malaphan W., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from its component peptides. Appl. Environ. Microbiol., 76, 4542-4545 (2010) 査読有
- ⑨ Sawa N., Okamura K., Zendo T., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K., Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15, J. Appl. Microbiol., 109, 282-291 (2010) 査読有
- ⑩ Yoneyama F., Shioya K., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Effect of a negatively charged lipid on membrane-lacticin Q interaction and resulting pore formation, Biosci. Biotechnol. Biochem. 74, 218-221 (2010) 査読有
- ⑪ Zendo T., Yoneyama F., Sonomoto K.,

Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. Appl. Microbiol. Biotechnol., 88, 1-9 (2010) 査読有

[学会発表] (計 30 件)

- ① 石橋直樹、姫野康平、益田時光、Perez R.H.、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、園元謙二、多成分バクテリオシン enterocins NKR-5-3 の菌体外分泌機構の解明、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学
- ② 益田時光、善藤威史、Perez R.H.、園元謙二、Weissellicins YM の環境応答型生産制御機構の解明、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学
- ③ Mu F., Masuda Y., Ono H., Kitagawa H., Ito H., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Analysis of gene cluster involved in production of the circular bacteriocin leucocyclin Q by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401, 日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学
- ④ 善藤威史、岩谷 駿、米山史紀、中山二郎、園元謙二、乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q の新規な生合成機構、第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月 27 日、東京農工大学
- ⑤ Perez R.H., Ishibashi N., Himeno K., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K., Investigation of the regulation mechanism of multiple bacteriocin production in *Enterococcus faecium* NKR-5-3 using a developed ESI-LC/MS system, 6th Asian Conference of Lactic Acid Bacteria, 2011 年 9 月 10 日、札幌コンベンションセンター
- ⑥ Zendo T., Sonomoto K., Discovery and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria, IUMS International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011 年 9 月 6 日、札幌コンベンションセンター
- ⑦ Tosukhowong A., Visessanguan W., Roytrakul S., Jaresitthikunchai J., Pumpuang L., Luxananil P., Valyasevi R., Zendo T., Sonomoto K., High throughput detection and validation of bacteriocin screening system by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. IUMS International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011 年 9 月 6 日、札幌コンベンションセンター
- ⑧ Zendo T., Biosynthesis and characterization of newly identified non-lantibiotic bacteriocins, Tenth Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2011 年 8 月 29 日、Egmond

- aan Zee (オランダ)
- ⑨ Zendo T., Iwatani S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K., Biosynthesis mechanism of lactacin Q from *Lactococcus lactis* QU 5, Tenth Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2011年8月29日, Egmond aan Zee (オランダ)
- ⑩ Ishibashi N., Himeno K., Masuda Y., Perez R.H., Zendo T., Wilaipun P., Nakayama J., Sonomoto K., Analysis of biosynthesis mechanism of enterocins NKR-5-3 produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3, Tenth Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2011年8月29日, Egmond aan Zee (オランダ)
- ⑪ Masuda Y., Zendo T., Perez R.H., Jimenes J.J., Herranz C., Cintas L.M., Hernandez P.E., Sonomoto K., Biosynthesis machinery and multiple bacteriocin production system of weissellicin YM, novel leaderless bacteriocins, Tenth Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2011年8月29日, Egmond aan Zee (オランダ)
- ⑫ 石橋直樹、姫野康平、益田時光、Perez R.H.、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、園元謙二、*Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産する多成分バクテリオシン群の生合成機構、日本乳酸菌学会 2011 年度大会、2011年7月11日、関西大学
- ⑬ Zendo T., Sonomoto K., Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria, The 6th Asia-Pacific Biotechnology Congress and 40th PSM Annual Convention and Scientific Meeting, 2011年5月13日、マニラ (フィリピン)
- ⑭ 石橋直樹、姫野康平、益田時光、善藤威史、Wilaipun P.、中山二郎、園元謙二、*Enterococcus faecium* NKR-5-3 が生産する多成分バクテリオシンの生合成機構の解明、第 62 回日本生物工学会大会、2010年10月29日、宮崎シーガイア
- ⑮ 岩谷 駿、米山史紀、堀切佑子、宮下紫穂、善藤威史、中山二郎、園元謙二、*Lactococcus lactis* が生産するラクテイシン Q/Z の生合成機構、日本乳酸菌学会 2010 年度大会、2010年7月27日、フォレスト仙台

[図書] (計4件)

- ① Zendo T., Sonomoto K., Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research., Caister Academic Press, 159-175, 195-204 (2011)
- ② Iwatani S., Zendo T., Sonomoto K., Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications., Springer, 237-252 (2011)

- ③ 善藤威史、園元謙二、食品保存への乳酸菌の利用、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス、京都大学学術出版会、309-316, 416-423 (2010)
- ④ 岩谷 駿、善藤威史、中山二郎、園元謙二、乳酸菌の利用技術と市場、シーエムシー出版、259-267 (2010)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

善藤 威史 (ZENDO TAKESHI)
 九州大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号：50380556

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：