

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658081

研究課題名（和文）ラクティシン Q はなぜスーパーバクテリオシンなのか？

研究課題名（英文）Why is lacticin Q a super-bacteriocin ?

研究代表者

園元 謙二 (SONOMOTO KENJI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10154717

研究成果の概要（和文）：ラクティシン Q は強い抗菌力と広い抗菌スペクトルを持ち、安定性の高い（100℃、pH 2～10 でも安定）優れたバクテリオシンである。ラクティシン Q は特異的なレセプターを必要とせずに、細胞膜に巨大な孔形成し（Huge Toroidal Pore）、細胞の内容物を流出させることで細胞死を引き起こした。ラクティシン Q の選択的抗菌活性は、標的細胞膜の脂質構成成分に依存した。

研究成果の概要（英文）：Lacticin Q, a lactococcal pore (Huge Toroidal Pore)-forming bacteriocin, shows activity toward Gram-positive bacteria but not Gram-negative bacteria. Lacticin Q did not induce permeability of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Experiments using model membranes containing outer membrane components suggested that lacticin Q binds to the outer membrane of Gram-negative bacteria but is unable to penetrate it. The lack of activity of lacticin Q was attributed to physicochemical features of the outer membrane components.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：乳酸菌、バクテリオシン、ラクティシン Q、選択的抗菌活性、Huge Toroidal Pore モデル、膜電位崩壊、細胞膜成分、レセプター

## 1. 研究開始当初の背景

バクテリオシンとは、バクテリアが生産する抗菌性のペプチドで多方面での応用が期待されている。乳酸菌バクテリオシンの利点は、(i) 高い安全性、(ii) nM～μM レベルの高い抗菌力、(iii) 高い酸・熱安定性、(iv) 標的細胞以外には効果がない高い選択性、が挙げられる (Cotter, P. D. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777 (2005))。

ナイシンは優れた抗菌力と安全性から最

もよく研究されたバクテリオシンである。ナイシンの巧みな作用機構を図 1 に示す (Breukink, E. *et al.*: *Science*, 286, 2361 (1999); Hsu, S. T. *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 963 (2004); Wiedemann, I. *et al.*: *J. Bacteriol.*, 186, 3259 (2004))。ナイシンは細胞膜上に孔を形成し抗菌効果を発揮するが、特異的レセプターとして細胞膜上のリポド II を必要とする。ナイシンはリポド II を用いることで、nM レベルの強力な抗菌活性とグラム陽性細菌以外

には効果を発揮しない選択性を実現させている。

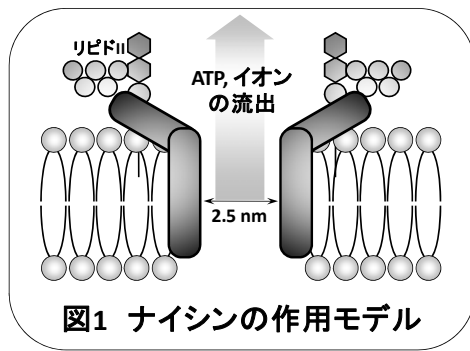


図1 ナイシンの作用モデル

我々が発見したラクティシン Q は、他を凌駕するスーパーバクテリオシンであった。ラクティシン Q は 53 アミノ酸から成り (図 2)、以下の優れた特徴を有していた (Fujita, K. *et al.*: *Appl. Environ Microbiol.*, 73, 2871 (2007))。さらに、ラクティシン Q の類縁体であるラクティシン Z も発見した (Iwatani, S. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1984 (2007))。

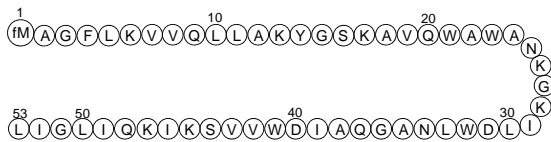


図2 ラクティシンQの構造

- ・安全な乳酸菌の代表種、*Lactococcus lactis* が生産する
- ・グラム陽性細菌のみに作用し、nM レベルの高い抗菌力を示す。
- ・幅広い pH 条件下で煮沸しても、活性が全く低下しない
- ・細胞膜に孔を形成し、ナイシンよりも早く大量に ATP の漏出を引き起こす (図 3)

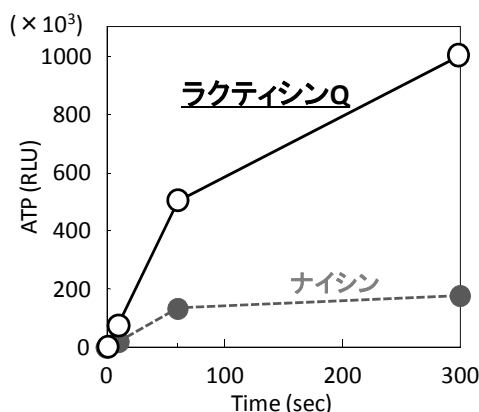


図3 ラクティシンQによる菌体からのATPの漏出

## 2. 研究の目的

我々が発見した乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q は、抗菌力や物質安定性において全てのバクテリオシンを凌駕するスーパーバクテリオシンである。我々はラクティシン Q がスーパーバクテリオシンたる所以は作用時に形成する細胞膜上の孔にあると考え、主に人工リン脂質二重膜を用いてペプチド-膜超分子複合体の解析を行う。すなわち、脂質の複合体である生体膜と数分子のラクティシン Q が形成する孔は、分子間相互作用を超えたいわば超分子複合体であると思われる。本研究は、ラクティシン Q を未来の高度な微生物制御を担う物質として、その可能性を示すことにある。本研究の成果は、次世代のオーダーメイド抗菌剤の創生へと展開が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) ラクティシン Q の特異的レセプターの探索

ラクティシン Q は、その抗菌活性の高さから特異的レセプターがあることが予想された。しかし、化学合成したリン脂質からリポソーム (人工リン脂質二重膜) を調製し、内封した蛍光物質の漏出をモニターしたところ、高い孔形成能が確認された。一方、ナイシンはレセプターがないため、ほとんど漏出を引き起こさなかった (Yoneyama, F. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 538 (2009))。

リポソームに対する孔形成の実験は、本研究の達成に向けて極めて重要である。そこで、より精細な実験系を構築し、ラクティシン Q が特異的レセプターを持たないことを証明するために、以下の具体的な実験項目を計画した。①内封する蛍光物質と濃度の検討 ②生物由来の脂質を用いたリポソームの調製 ③レセプターを必要とするナイシンとの比較 (*Biochemistry*, 34, 6521 (1995); *Biophys. J.*, 73, 831 (1997)に基づく)

### (2) ラクティシン Q の作用スペクトルの詳細な解析と、膜電位の測定

前述のとおり、ラクティシン Q はグラム陽性細菌に対しては超強力な抗菌活性を持つが、グラム陰性細菌や血球細胞には効果が確認されていない。各細胞に対するラクティシン Q の選択性において、活性の有無を決定する分子を特定するために、以下の具体的な実験項目を計画した。①グラム陰性細菌、真菌、ヒト腸管上皮細胞に対する活性試験 ②膜電位特異的蛍光プローブを用いた、各細胞に対する膜電位変化の測定 ③ラクティシン Q を添加した後の、各細胞の形態観察 (原子間力顕微鏡)

### (3) ラクティシン Q が形成する孔のサイズ測定と作用機構の解明

ラクティシン Q は同等の抗菌力があるナイシンよりも、早く大量の ATP を流出させる。この現象は、ラクティシン Q がより巨大な孔を形成するために引き起こされたと予想した。そこで、ラクティシン Q が形成する孔のサイズを測定し、ラクティシン Q 分子や脂質分子の挙動を解析した。まずはリポソーム上で超分子複合体の特徴を解明し、同様の現象が細胞膜上でも起こるか検証するために、以下の具体的な実験項目を計画した。①2次構造の解析 (CD スペクトル) ②異なる分子量の蛍光標識デキストランの流出試験 ③ラクティシン Q の挙動の追跡 (膜への結合と膜内への移動 (Translocation)) ④膜を横断する脂質分子の検出 (フリップフロップ) ⑤生細胞から流出するタンパク質や RNA の検出 (*Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 1160 (2007) に基づく)

### (4) ラクティシン Q の選択性を決定する細胞膜成分の同定

(1)で構築した、リポソームへの孔形成の実験系を用いて研究を行った。まずはグラム陰性細菌の外膜と、ヒトの細胞膜を模したリポソームを調製し、ラクティシン Q による孔形成を各リポソームで比較することで、ラクティシン Q の選択性の解明を行った。

## 4. 研究成果

ラクティシン Q は強い抗菌力と広い抗菌スペクトルを持ち、安定性の高い (100°C、pH 2~10 でも安定) 優れたバクテリオシンである。ラクティシン Q は特異的なレセプターを必要とせずに、細胞膜に巨大な孔形成し、細胞の内容物を流出させることで細胞死を引き起こす。しかし、ラクティシン Q の抗菌力 (最小生育阻止濃度; MIC) は、検定菌により大きく異なり、近縁種の間においても異なる場合がある。そこで、このラクティシン Q の選択的抗菌活性に差異をもたらす要因を明らかにすることを試みた。

### (1) ラクティシン Q の特異的レセプターの探索

まず、細胞膜成分に注目し解析を行った。ラクティシン Q に対する MIC が異なる種々の検定菌から抽出した脂質を用いて、蛍光プローブを内封したリポソームを作成した。ラクティシン Q の添加によって、各リポソームから流出した蛍光プローブの強度を測定した。その結果、各リポソームから蛍光プローブの流出が認められたが、リポソームへの孔形成と MIC に明確な関連を見出すことはできなかった。細胞膜成分は選択的抗菌活性の

決定要因ではないことが示唆された。

### (2) ラクティシン Q の作用スペクトルの詳細な解析と、膜電位の測定

次に、ラクティシン Q による細胞膜への孔形成と MIC の関連を検討するため、ラクティシン Q による検定菌の膜電位の変化を測定した。膜電位特異的プローブ DiSC<sub>3</sub>(5)は、膜の電位差特異的に細胞膜上に凝集し消光状態となる。膜電位が崩壊すると、水溶液中に拡散して蛍光を放ち、蛍光強度は細胞膜への孔形成によるダメージの強さを示すと考えられる。その結果、MIC の大小にかかわらず、ラクティシン Q の添加によって各検定菌の膜電位の崩壊が確認された。MIC の高い検定菌では、孔形成に対する耐久力や回復力が高いと考えられた。

### (3) ラクティシン Q が形成する孔のサイズ測定と作用機構の解明

ラクティシン Q の細胞膜上における分子挙動を解析した結果、ラクティシン Q は両親媒性の  $\alpha$ -helix を保持して負電荷の膜に直ちに結合した。また、flip-flop を伴い、直径 4.6 nm 以上の巨大な孔を形成して、菌体内の物質流出を引き起こした後、一部のラクティシン Q 分子は膜の内部に移動した。このような性質を持つバクテリオシンの報告はなく、ラクティシン Q の作用機構を Huge Toroidal Pore モデルと命名した。

### (4) ラクティシン Q の選択性を決定する細胞膜成分の同定

ラクティシン Q はグラム陰性細菌外膜を透過できなかった。また、グラム陽性細菌を模したリポソーム (PC/PG = 5:5) と比較すると、グラム陰性細菌の外膜の内側に存在するフォスファチジルエタノールアミン (PE) と外側に存在するリポ多糖 (LPS) をそれぞれ混合したリポソーム (PE/PG = 5:5、PC/PG/LPS = 5:3:2) では、ラクティシン Q の孔形成能はわずかに低下した。一方、外膜全体を模した PE と LPS を混合したリポソーム (PE/PG/LPS = 5:3:2) では、ラクティシン Q の孔形成能が劇的に低下した。しかし、ラクティシン Q は外膜に結合することも示された。よって、ラクティシン Q は外膜に結合するものの PE と LPS が複合的に孔形成を阻害することが示された。動物細胞に豊富に含まれるコレステロール (Cho) および真菌に豊富に含まれるエルゴステロール (Erg) を含むリポソーム (PC/Cho = 9:1、PC/PG/Erg = 4:5:1) では、ラクティシン Q は結合するものの孔形成能は顕著に低下したことから、真核細胞の細胞膜中に多く存在するステロール類が、ラクティシン Q の孔形成を阻害することが示された。以上の結果から、ラクティシン Q の選択的抗

菌活性は、標的細胞膜の脂質構成成分に依存することが明らかになった。

#### 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6件)

(1) Shun Iwatani, Yuko Horikiri, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama & Kenji Sonomoto, Bifunctional gene cluster, *lnqBCDEF*, mediates bacteriocin production and immunity with differential genetic requirements. Applied Environmental Microbiology, **79**, 2446-2449 (2013) 査読有  
DOI: 10.1128/AEM.03783-12

(2) Shun Iwatani, Fuminori Yoneyama, Shiho Miyashita, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama & Kenji Sonomoto, Identification of the genes involved in the secretion and self-immunity of lactacin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. Microbiology, **158**, 2927-2935 (2012) 査読有  
DOI: 10.1099/mic.0.062943-0

(3) Mami Nishie, Jun-ichi Nagao & Kenji Sonomoto, Antibacterial peptides “Bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications. Biocontrol Science, **17**, 1-16 (2012) 査読有  
DOI: 10.4265/bio.17.1

(4) Yoshimitsu Masuda, Takeshi Zendo & Kenji Sonomoto, New type non-lantibiotic bacteriocins: circular and leaderless bacteriocins. Beneficial Microbes, **3**, 3-12 (2012) 査読有  
DOI: 10.3920/BM2011.0047

(5) Fuminori Yoneyama, Kanako Ohno, Yuichi Imura, Mengqi Li, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama, Katsumi Matsuzaki & Kenji Sonomoto, Lactacin Q-mediated selective toxicity depending on physicochemical features of membrane components. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **55**, 2446-2450 (2011) 査読有  
DOI: 10.1128/AAC.00808-10

(6) 石橋直樹、善藤威史、園元謙二、乳酸菌バクテリオシンー戦略的な探索・発見・活用とゼロエミッションPJまでー、日本乳酸菌学会誌、**22**, 38-48 (2011) 査読有

[学会発表] (計1件)

① Kenji Sonomoto, New Era of Lactic Acid

Bacteria to Open the Future, The Young Scientist Seminar 2011 - Bioresources: Their Potentials & Applications, January 31, 2012, Bangkok, Thailand

[図書] (計2件)

(1) 澤 稔彦、善藤威史、園元謙二、シーエムシー出版、新しい乳酸菌の機能と応用、2013, 224 (pp. 142-152)

(2) Kenji Sonomoto & Atsushi Yokota, Caister Academic Press, Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research, 2011, 286

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/microbt/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

園元 謙二 (SONOMOTO KENJI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10154717