

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380051

研究課題名(和文) 新奇乳酸菌バクテリオシン群の生合成と抗菌作用の分子機構の解明とその展開

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of biosynthesis and action of novel bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications

研究代表者

善藤 威史 (Zendo, Takeshi)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50380556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：新奇乳酸菌バクテリオシンの構造を解析し、エンテロシンNKR-5-3BやエンテロシンF4-9の構造を決定した。リーダーレスバクテリオシンであるラクティシンQ/Zおよび環状バクテリオシンであるロイコサイクリンQなどの生合成遺伝子群を明らかにし、分泌や自己耐性を担う遺伝子を同定した。ラクティシンQの抗菌活性には、孔形成能だけでなく、標的細菌内でのヒドロキシルラジカルの蓄積とその除去能が関連していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Structures of novel bacteriocins from lactic acid bacteria, such as enterocin NKR-5-3 and enterocin F4-9, were analyzed and determined. Biosynthetic gene clusters of leaderless bacteriocins such as lactacin Q and lactacin Z, and circular bacteriocins such as leucocyclicin Q were analyzed, and the genes responsible for their secretion and self-immunity were identified. Antibacterial action of lactacin Q was found to involve pore formation on cell membrane of target cells as well as accumulation and scavenging ability of hydroxyl radicals in target cells.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バクテリオシン 抗菌ペプチド 乳酸菌 細菌 応用微生物

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、新しい抗菌物質として様々な分野での利用が期待されている。日本においても最も代表的な乳酸菌バクテリオシンであるナイシン A の食品保存料としての実用が始まったが、ナイシン A とは異なる特性を持つ優れたバクテリオシンも多数あり、それらを利用することでさらに有効な微生物制御の実現が期待できる。我々もこれまでに多様な新奇乳酸菌バクテリオシンを見出し、とくに、リーダーペプチドを持たないリーダーレスバクテリオシンや、N 末端と C 末端がペプチド結合した環状バクテリオシンなど、特徴的な構造を有する新しいバクテリオシン群が得られてきた。これらの特異な構造をもつ新奇バクテリオシンは、従来のバクテリオシンとは異なる新しい生合成機構および作用機構を有すると考えられる。これらを含めた種々の新奇乳酸菌バクテリオシンの実用、さらにはその生合成機構を利用した新奇抗菌ペプチドの創出を目指すにあたっては、生合成や抗菌作用の分子機構の解明が求められる。

2. 研究の目的

これまでに我々は多種多様な新奇乳酸菌バクテリオシンを見出してきたが、本研究ではとくに、リーダーレスバクテリオシンおよび環状バクテリオシンの生合成および抗菌作用における分子機構を明らかにし、これら新奇バクテリオシン群の利用とその生合成機構の応用を目指す。本研究期間においては、まずこれらの生合成に関わると予想される遺伝子群を解析し、菌体外排出、自己耐性、環化に関わるタンパク質を同定するとともに、作用機構を解析する。

リーダーレスバクテリオシンとしては、ラクティシン Q やラクティシン Z、環状バクテリオシンとしては、ラクトサイクリン Q やロイコサイクリン Q などを見出し、これらについてとくに重点的に解析を進める。また、これら以外にも、特徴的な構造や抗菌作用をもつと予想される新奇バクテリオシンを多数見出し、それらについても解析を進め、新奇乳酸菌バクテリオシン群の生合成と作用機構の分子機構の解明とそれらの新奇ペプチド創出への展開を図る。

3. 研究の方法

(1) 構造未決定のバクテリオシンのうち、構造や抗菌作用に従来のものとは異なる特徴をもつと予想されるものについて、培養液上清から種々のクロマトグラフィーを用いて精製し、分子量やアミノ酸配列を解析した。さらに、得られたアミノ酸配列をもとに、バクテリオシン構造遺伝子および周辺に存在するバクテリオシン生合成遺伝子群の塩基配列を解析した。

(2) バクテリオシン生合成遺伝子群の異種発現系を構築し、バクテリオシンの生合成に最小限必要な遺伝子群を特定した。また、異種発現系や遺伝子破壊によって、各遺伝子群にコードされる種々タンパク質の機能解析を行った。バクテリオシン生合成遺伝子群には、バクテリオシン本体、生産株の自己耐性に関わるタンパク質、バクテリオシンの分泌を担うトランスポーターのほか、環化などの修飾を担うタンパク質、生産制御に関わるタンパク質などがコードされていると考えられる。これらの機能について、バクテリオシン活性などを指標としながら解析する。

(3) 各種感受性細菌やリポソームへのラクティシン Q などの新奇バクテリオシンの作用を解析した。また、作用機構と生産菌株がもつ自己耐性機構は密接に関連していることから、自己耐性機構や推定標的分子の解析も併せて行い、作用機構について考察した。

4. 研究成果

(1) *Enterococcus 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 を生産し、エンテロシン NKR-5-3A を除く 4 種が新奇な構造を有していた。とくに、エンテロシン NKR-5-3B は新奇環状バクテリオシンであることが明らかとなった。

Lactobacillus sakei D98 が生産する 3 種の新奇バクテリオシン、サカシン D98a, D98b, D98c の構造を決定した。サカシン D98b はクラス IIa (抗リステリア) バクテリオシンに類似の配列を有しながらも、クラス IIa バクテリオシンとは異なる抗菌スペクトルを示した。

Lactococcus lactis QU 7 が生産する *Lactococcus* 属に特異的な抗菌活性を示す新奇バクテリオシン、ラクトコッシン Z の構造を決定した。以前、我々が見出した、同様の抗菌スペクトルを示すラクトコッシン Q とは全く異なる構造を有し、それぞれの生産株間には交差耐性が無いことが明らかとなった。

Enterococcus faecalis F4-7 が生産するバクテリオシン、エンテロシン F4-9 の構造を決定した。エンテロシン F4-9 は、2 つのアミノ酸残基が糖による修飾を受け、ジスルフィド結合による 2 ヶ所の架橋構造をもつことを明らかにした。これらの修飾はエンテロシン F4-9 の抗菌活性に必須であった。

このように構造や活性に特徴をもつ種々の新奇乳酸菌バクテリオシンの構造を決定することができた。

(2) *E. faecium* NKR-5-3 が生産する 5 種のバクテリオシン様ペプチドの推定生合成遺伝子群を明らかにした。エンテロシン NKR-5-3A, C, D, Z の生合成遺伝子群はクラ

スターを形成し、エンテロシン NKR-5-3D が、3 成分制御系を介してエンテロシン NKR-5-3 A, B, D, Z の生産を誘導していることが明らかとなった。また、本クラスター中に唯一存在するトランスポーターである EnkT が、この 4 種のバクテリオシン様ペプチドの分泌を担うことが示された。一般に、各バクテリオシンには専用のトランスポーターが存在するが、EnkT は構造の異なる様々なバクテリオシンを分泌するという特異な性質を有していた。

リーダーレスバクテリオシンであるラクティシン Q とラクティシン Z は、それぞれ生合成遺伝子群 *lnqBCDEF*、*lnzBCDEF* の働きによって生産と菌体外分泌が行われることが明らかとなった。リーダーレスバクテリオシンは翻訳後直ちに抗菌活性を有するが、これらの遺伝子群は菌体内外において、生産したバクテリオシンの抗菌活性から生産株自身を保護する自己耐性機構にも関与することが示された。

環状バクテリオシンであるラクトサイクリン Q、ロイコサイクリン Q、エンテロシン NKR-5-3B の推定生合成遺伝子群が明らかとなった。とくに、ロイコサイクリン Q については、環状バクテリオシンの生合成遺伝子群中に広く見出されるタンパク質である DUF95 スーパーファミリーに属する LcyD が生産株のロイコサイクリン Q の分泌と自己耐性の関与していることが明らかとなった。LcyD 破壊株は環化した成熟型のロイコサイクリン Q を菌体内に蓄積していたことから、ロイコサイクリン Q の環化は菌体内で行われることが示唆された。一方、エンテロシン NKR-5-3B の異種発現系の構築に成功し、遺伝子群の種々の組合せによる解析の結果、分泌や自己耐性に関わる遺伝子を特定した。

以上のように、リーダーレスバクテリオシンおよび環状バクテリオシンの生合成に関わる遺伝子群を特定し、各遺伝子群の機能が明らかになりつつある。また、多成分を同時に生産する多成分バクテリオシン生産株によるバクテリオシンの生合成機構や生産制御機構も明らかとなった。これらの新規生合成機構を基に、新奇抗菌ペプチドの創出・評価系の構築を行っている。

(3) ラクティシン Q は菌体表層の標的分子を介さずに細胞膜に孔を形成するが、各感受性菌への抗菌活性の強度や孔形成と細胞膜組成の間には相関性が認められなかった。一方、ラクティシン Q の抗菌活性の強度には、ラクティシン Q の作用によって生じるヒドロキシルラジカルの蓄積量が影響していることが明らかとなった。ラクティシン Q の抗菌活性の選択性には、ラクティシン Q による孔の形成されやすさよりも、ヒドロキシルラジカルの蓄積量とその除去能が影響していることが示唆された。

ロイコサイクリン Q の作用には、他の環状バクテリオシンでも関与が報告されているマルトースの菌体内取り込みを担うトランスポーターが関与していることが明らかとなった。また、細胞膜上に存在するマルトーストランスポーターが、ロイコサイクリン Q の分泌や自己耐性を担うタンパク質と相互作用をしていることが示唆された。

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 14 件)

Maky MA, Ishibashi N, Zendo T, Perez RH, Doud JR, Karmi M, Sonomoto K. Identification and characterization of enterocin F4-9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, in press (2015). 査読有 doi: 10.1128/AEM.00940-15

Rumjuankiat K, Perez RH, Pilasombut K, Keawsompong S, Zendo T, Sonomoto K, Nitisinprasert S. Purification and characterization of a novel plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 983-994 (2015). 査読有 doi: 10.1007/s11274-015-1851-0

Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S3 (2014). 査読有 doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S3

Ishibashi N, Himeno K, Masuda Y, Perez RH, Iwatani S, Zendo T, Wilaipun P, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6647-6655 (2014). 査読有 doi: 10.1128/AEM.02312-14

善藤威史、石橋直樹、園元謙二、乳酸菌バクテリオシンの探索と利用、乳酸菌学会誌、25(1)、24-33 (2014)。査読なし

Mu F, Masuda Y, Zendo T, Ono H, Kitagawa H, Ito H, Nakayama J, Sonomoto K. Biological function of a DUF95 superfamily protein involved in the biosynthesis of a circular bacteriocin, leucocyclicin Q. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(2), 158-164 (2014). 査読有 doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.023

Li M, Yoneyama F, Toshimitsu N, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. Lethal hydroxyl radical accumulation by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8),

3897-3902 (2013). 査読有 doi: 10.1128/AAC.00638-13
Zendo T. Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(5), 893-899 (2013). 査読有 doi: 10.1271/bbb.130014
Sawa N, Koga S, Okamura K, Ishibashi N, Zendo T., Sonomoto K. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 61-69 (2013). 査読有 doi: 10.1111/jam.12226
Iwatani S, Horikiri Y, Zendo T., Nakayama J, Sonomoto K. Bifunctional Gene Cluster *lnqBCDEF* Mediates bacteriocin production and immunity with differential genetic requirements. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2446-2449 (2013). 査読有 doi: 10.1128/AEM.03783-12
Iwatani S, Yoneyama F, Miyashita S, Zendo T., Nakayama J, Sonomoto K. 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(12), 2927-2935 (2012). 査読有 doi: 10.1099/mic.0.062943-0
Perez RH, Himeno K, Ishibashi N, Masuda Y, Zendo T., Fujita K, Wilaipun P, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. Monitoring of the multiple bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 through a developed liquid chromatography and mass spectrometry-based quantification system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(5), 490-496 (2012). 査読有 doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.06.003
Himeno K, Fujita K, Zendo T., Wilaipun P, Ishibashi N, Masuda Y, Yoneyama F, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. Identification of enterocin NKR-5-3C, a novel class IIa bacteriocin produced by a multiple bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(6), 1245-1247 (2012). 査読有 doi: 10.1271/bbb.120089
Ishibashi N, Himeno K, Fujita K, Masuda Y, Perez RH, Zendo T., Wilaipun P, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. Purification and characterization of multiple bacteriocins and an inducing peptide produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai fermented fish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(5), 947-953 (2012).

査読有 doi: 10.1271/bbb.110972

〔学会発表〕(計 22 件)

杉野春貴, Perez RH, 石橋直樹, 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二, 環状バクテリオシン enterocin NKR-5-3B 生合成における環状化部位のアミノ酸残基の影響, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 27 日, 岡山大学

Lim Y, Mu F, Ishibashi N, Zendo T., Sonomoto K. Elucidation of action and immunity mechanisms of a circular bacteriocin, leucocyclicin Q. 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 10 日, 札幌コンベンションセンター

善藤威史, 緒方詩保, Li M, 石橋直樹, 益田時光, 岩谷 駿, 米山史紀, 園元謙二, リーダーレスバクテリオシン, ラクティシン Q の生合成および抗菌機構, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 10 日, 札幌コンベンションセンター

石橋直樹, 善藤威史, 園元謙二, 特異的な抗菌スペクトルを有するラクトコッシン Q の生合成機構の解明, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 10 日, 札幌コンベンションセンター

Woraprayote W, Pumpuang L, Tosukhowong A, Roytrakul S, Zendo T., Sonomoto K, Benjakul S, Visessanguan W. Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with bacteriocin 7293, a novel bacteriocin produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. The 11th Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2014 年 8 月 31 日, Egmond aan Zee (オランダ)

Zendo T., Sawa N, Koga S, Okamura K, Ishibashi N, Sonomoto K. Identification of novel multiple bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* D98. 4th International Symposium on Antimicrobial Peptides, 2014 年 6 月 4 日, ロリアン (フランス)

Ishibashi N, Sushida H, Zendo T., Sonomoto K. Characterization of an ABC transporter (Ent53T) for secretion of multiple bacteriocins, enterocins NKR-5-3. 4th International Symposium on Antimicrobial Peptides, 2014 年 6 月 4 日, ロリアン (フランス)

須志田浩稔, 石橋直樹, Perez RH, 松本南帆, 善藤威史, 園元謙二, マルチプルバクテリオシンの生合成機構の解明, 酵素工学研究会第 71 回講演会, 2014 年 4 月 26 日, 九州大学

石橋直樹, 瀬戸紘美, 古賀祥子, 善藤威史, 園元謙二, 特異的な抗菌スペクトルを有する新奇乳酸菌バクテリオシンの構造と特性, 酵素工学研究会第 71 回講演会, 2014 年 4 月 26 日, 九州大学

須志田浩稔, 石橋直樹, 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二, 多成分バクテリオシンの分

泌を担うトランスポーターの基質認識機構の解明、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学。

善藤威史、園元謙二、乳酸菌バクテリオシンの探索と利用、日本乳酸菌学会 2013 年度秋期セミナー、2013 年 11 月 29 日、東京農業大学

善藤威史、園元謙二、乳酸菌バクテリオシン：ナイシンの実用化に始まる波及効果、そして新たな探索の時代へ、第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 20 日、広島国際会議場

Perez RH, Inoue T, Himeno K, Ishibashi N, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. Elucidation of the biosynthetic mechanism of the circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3B. 第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日、広島国際会議場

石橋直樹、善藤威史、中山二郎、園元謙二、多成分バクテリオシンの分泌機構の解明、第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日、広島国際会議場

沢 稔彦、古賀祥子、岡村かすみ、石橋直樹、善藤威史、園元謙二、*Lactobacillus sakei* D98 が生産する新奇バクテリオシン群の精製および構造と特性、日本乳酸菌学会 2013 年度大会、2013 年 7 月 9 日、北海道大学

石橋直樹、松本南帆、姫野康平、Perez RH、善藤威史、Pongtep W、中山二郎、園元謙二、乳酸菌における多成分バクテリオシンの生産機構の解明、日本乳酸菌学会 2013 年度大会、2013 年 7 月 9 日、北海道大学
Xiao G, 善藤威史、園元謙二、Screening and identification of novel bacteriocins produced by lactic acid bacteria、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 26 日、神戸国際会議場

Masuda Y, Zendo T, Perez RH, Jiménez JJ, Hernández PE, Sorribes CH, Cintas LM, Sonomoto K. Immunity mechanism and nutrition-adaptive regulation system of weissellicins Y and M. two novel leaderless bacteriocins from *Weissella hellenica* QU 13. How bugs kill bugs: progress and challenges in bacteriocin research, 2012 年 7 月 17 日、ノッティングガム (英国)

Perez RH, Inoue T, Ishibashi N, Himeno K, Masuda Y, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. Analysis of the structure and biosynthetic mechanism of enterocin NKR-5-3 (Ent53B), a novel circular bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3. How bugs kill bugs: progress and challenges in bacteriocin research, 2012 年 7 月 17 日、ノッティングガム (英国)

Ishibashi N, Himeno K, Masuda Y, Perez RH, Zendo T, Wilaipun P, Nakayama J, Sonomoto K. Analysis of biosynthesis and regulation mechanism of enterocins NKR-5-3 produced

by *Enterococcus faecium* NKR-5-3. 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides: Today knowledge and future applications, 2012 年 6 月 13 日、リール(フランス)

21 Zendo T, Masuda Y, Mu F, Ono H, Kitagawa H, Ito H, Sawa N, Sonomoto K. Identification and characterization of leucocyclicin Q, a novel circular bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. 3rd International Symposium on Antimicrobial Peptides: Today knowledge and future applications, 2012 年 6 月 13 日、リール(フランス)

22 善藤威史、新奇乳酸菌バクテリオシンの探索とその構造と機能に関する研究、日本農芸化学会西日本支部例会、2012 年 6 月 4 日、キリンビール福岡工場

〔図書〕(計 2 件)

須志田浩稔、石橋直樹、善藤威史、園元謙二、新奇乳酸菌バクテリオシンの探索とその可能性、食品分野における微生物制御技術の最前線、シーエムシー出版、158-168 (2014)

澤 稔彦、善藤威史、園元謙二、乳酸菌が産生する抗菌ペプチド、新しい乳酸菌の機能と応用、シーエムシー出版、142-152 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究成果データベース

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002978/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

善藤 威史 (ZENDO Takeshi)

研究者番号 : 50380556