

農学研究院若手教員支援事業成果報告書

平成23年 2月18日

支援対象研究分野：食科学

研究課題名：乳酸菌が生産する新奇抗菌ペプチドの構造と特性の解析

支援期間：平成21年11月～平成22年10月

所属部門・研究分野：生命機能科学部門・微生物工学分野

研究代表者氏名：善藤威史

1. 研究の成果，達成度

乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンは、安全な抗菌物質として食品保存をはじめとする様々な分野での利用が期待されている。とくに、乳酸菌 *Lactococcus lactis* の一部の株が生産するナイシン A は優れた特性を有し、日本を含む世界 50 ヶ国以上で食品保存料として実用されている。乳酸菌バクテリオシンの構造や抗菌スペクトルには様々なバリエーションがあり、ナイシン A に続く新奇バクテリオシンの探索が広く行われている。これまでに申請者は、新奇乳酸菌バクテリオシンの食品保存への利用を目指して広く探索を行ってきた。とくに、ナイシン A と同じく *Lactococcus* 属乳酸菌が生産する新奇バクテリオシンとして、ラクティシン Q やラクトサイクリシン Q を見出してきた。本研究では、申請者が見出した種々の新奇バクテリオシンについて、それらの構造と特性を明らかにし、ナイシン A を凌駕する優れた特性をもつバクテリオシンを見出すことを目的とした。

① バクテリオシンの構造解析

これまでの予備的な検討によって、新奇性が高いと判断されたバクテリオシンについて構造決定を試みた。各バクテリオシンは、生産乳酸菌の培養液上清から、各種クロマトグラフィー等により精製した。精製バクテリオシンについて、分子量、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、バクテリオシンをコードする遺伝子の塩基配列を決定し、バクテリオシンの一次構造の決定を試みた。その結果、下記のものをはじめ、数種の新奇バクテリオシンの構造が明らかとなった。

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含む新奇な構造を有することが明らかとなり、本バクテリオシンをエンテロシン W と命名した。

Enterococcus faecium NKR-5-3 は5種のバクテリオシン様ペプチドを生産することが明らかとなっているが、その中で唯一構造未決定であったペプチド B が新奇の環状構造を有することが明らかとなった。

Weissella hellenica QU 13 は、2 種の新奇バクテリオシン、ワイセリシン Y とワイセリシン M を生産することが明らかとなった。

② バクテリオシン生産機構の解析

新奇バクテリオシンの生合成にかかわる遺伝子群の機能解析とバクテリオシンの生産挙動の解析を行った。

Lactococcus lactis QU 5 などが生産する新奇バクテリオシン、ラクティシン Q の生合成にかかわる遺伝子群が明らかとなった。ラクティシン Q 構造遺伝子である *lnqQ* のほか、菌体外排出にかかわる *lnqEF*、自己耐性にかかわる *lnqBCD*、生産制御にかかわる *lnqR* が同定された。

Enterococcus faecium NKR-5-3 は 5 種のバクテリオシン様ペプチドを生産するが、ペプチド B を除く 4 種の生産が、ペプチド D 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。

③ バクテリオシン作用機構の解析

新奇バクテリオシンの作用機構をリポソームや感受性細菌を用いて解析した。

Lactococcus sp. QU 12 が生産する新奇環状バクテリオシン、ラクトサイクリシン 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。

Enterococcus faecalis NKR-4-1 が生産する新奇二成分バクテリオシン、エンテロシン W は、2 つのペプチド ($W\alpha$ と $W\beta$) の相乗的な作用によって抗菌活性を示すことが明らかとなった。

以上のように、種々の新奇バクテリオシンについて、構造、生産機構、作用機構を解析した。とくに、ラクティシン Q やラクトサイクリシン Q は、ナイシン A と同様に広い抗菌スペクトルを有しながらも、ナイシン A とは異なる作用機構や安定性を有することから、ナイシン A に続く実用化が期待される。他に、エンテロシン W をはじめとする複数の新奇バクテリオシンの構造が明らかとなったが、これらの特性については、さらに検討・評価を要する。

2. 論文等の研究発表状況

本研究に関連し、支援期間およびそれ以降に、以下の原著論文、総説論文、著書を発表した。

<原著論文>

1. Yoneyama F, Shioya K, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. (2010) Effect of a negatively

- charged lipid on membrane-lactacin Q interaction and resulting pore formation. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 74(1), 218-221.
2. Sawa N, Okamura K, Zendo T, Himeno K, Nakayama J, Sonomoto K. (2010) Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* QU 15. *J Appl Microbiol.*, 109(1), 282-291.
 3. Hu CB, Malaphan W, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. (2010) Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl Environ Microbiol.*, 76(13), 4542-4545.
 4. Villarante KI, Elegado FB, Iwatani S, Zendo T, Sonomoto K, de Guzman EE. (2011) Purification, characterization and in vitro cytotoxicity of the bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 against human colon adenocarcinoma (HT29) and human cervical carcinoma (HeLa) cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, in press.
 5. Yoneyama F, Ohno K, Imura Y, Li M, Zendo T, Nakayama J, Matsuzaki K, Sonomoto K. (2011) Lactacin Q-mediated selective toxicity depending on physicochemical features of membrane components. *Antimicrob Agents Chemother.*, in press.

<総説論文>

1. 善藤威史, 米山史紀, 澤 稔彦, 園元謙二 (2009) 乳酸菌が生産する抗菌性物質, 防菌防黴, 37(12), 903-911.
2. 善藤威史, 澤 稔彦, 米山史紀, 園元謙二 (2009) 乳酸菌由来抗菌性ペプチド、ナイシン—その基礎と利用, 乳業技術, 59, 77-86.
3. 益田時光, 善藤威史, 園元謙二 (2010) ナイシン—類稀な抗菌物質—, ミルクサイエンス, 59(1), 59-65.
4. Zendo T, Yoneyama F, Sonomoto K. (2010) Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 88(1), 1-9.
5. 北崎宏平, 馬場武志, 古賀康弘, 桑野剛一, 福田浩章, 河田恵美, 高巢祐介, 竹花稔彦, 古賀祥子, 永利浩平, 島田信也, 農 新介, 林 龍鶴, 前田幸子, 川崎貞道, 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二 (2010) ナイシン A を利用した酪農分野における牛感染症防除, FFI ジャーナル, 特集「保存料等食品添加物の研究の最前線」, 215(4), 449-456.
6. 石橋直樹, 善藤威史, 園元謙二 (2011) 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, 印刷中.

<著書> (いずれも分担執筆)

1. 岩谷 駿, 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二 (2010) 乳酸菌が生産する抗菌ペプチド

- 探索と応用研究—, 乳酸菌の利用技術と市場, シーエムシー出版, p. 259-267.
2. 米山史紀, 善藤威史, 園元謙二 (2010) 抗菌性ペプチド: ナイシン (4章 乳酸菌・ビフィズス菌の産生する有用物質), 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス (日本乳酸菌学会 編), 京都大学学術出版会, p. 309-316.
 3. 善藤威史, 園元謙二 (2010) 食品保存への乳酸菌の利用 (5章 乳酸菌・ビフィズス菌の食品・家畜飼料中での挙動と利用), 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス (日本乳酸菌学会 編), 京都大学学術出版会, p. 416-423.
 4. Iwatani S, Zendo T, Sonomoto K. (2011) Class Iid Bacteriocins (Chapter 4.1. Genetics, biosynthesis, structure and mode of action of AMP from Gram positive bacteria in Chapter 4. Biology of prokaryotic antimicrobial peptides). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications, Djamel Drider & Sylvie Rebuffat (eds.), Springer, in press.
 5. Zendo T, Sonomoto K. (2011) Chapter 9. Classification and diversity of bacteriocin. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research, Kenji Sonomoto & Atsushi Yokota (eds.), Caister Academic Press, in press.
 6. Yoneyama F, Zendo T, Sonomoto K. (2011) Chapter 10. Lactococcal bacteriocins. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research, Kenji Sonomoto & Atsushi Yokota (eds.), Caister Academic Press, in press.
 7. Zendo T, Sonomoto K, Kawai Y, Saito T. (2011) Chapter 12. Other bacteriocins. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research, Kenji Sonomoto & Atsushi Yokota (eds.), Caister Academic Press, in press.

3. 研究の波及効果

上記の研究論文の発表に加え、多数の学会発表（海外3件、国内10件）を行った。さらに、これらの成果をもとに、総説の執筆と招待講演の依頼を受けた。また、複数の食品関連企業より、乳酸菌由来抗菌ペプチドの利用について、照会・相談があった。一部については、共同研究を行っている。

さらに、以下の国際交流事業を継続・開始し、乳酸菌および乳酸菌が生産する抗菌ペプチドについて、各国の研究者との研究交流を行っている。

- ・ 日本学術振興会・アジア研究教育拠点事業「微生物の潜在能力開発と次世代発酵技術の構築」（日本、タイ、ベトナム、ラオス）2008～2013年度.
- ・ 日本学術振興会・アジア研究教育拠点事業「亜熱帯微生物資源を活用する次世代物造りバイオ技術の構築」（日本、タイ、ベトナム、カンボジア、ラオス）2009～2014年度.
- ・ 科学技術振興機構・戦略的国際科学技術協力推進事業・日本－南アフリカ研究交流

「新奇乳酸菌のプロバイオティクスならびに抗菌性ペプチドを用いた病原菌に対する新たな戦略」（日本、南アフリカ）2009～2012年度.

- ・ 九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト「ネパールの食品および環境中の遺伝資源の高度有効利用」（日本、ネパール）2010～2011年度.

4. 外部資金獲得に向けての取組状況

本研究に関連して、本事業の支援以降に、以下の外部資金を得ることができた。

- ・ 科学研究費補助金・若手研究（B）（代表）：「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」2010～2011年度.
- ・ 経済産業省・戦略的基盤技術高度化支援事業（分担）：「新規二段階乳酸菌発酵・精製法を利用した微生物制御剤等の開発」2010～2011年度.