

乳酸菌バクテリオシンの生合成機構の解明とそれを利用した新奇抗菌ペプチドの創出

九州大学 大学院農学研究院 生命機能科学部門

善藤 威史

はじめに

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、腸管内の酵素や環境中で容易に分解される抗菌ペプチドであり、安全性の高い抗菌物質と考えられる。これまでに多種多様な乳酸菌バクテリオシンが見出されており、食品保存をはじめとするさまざまな用途に応じた使い分けが期待される。さらに、バクテリオシンは遺伝子にコードされているため、構造改変が容易と考えられ、既存のバクテリオシンとその生合成機構を基盤として、より効果的な抗菌ペプチドの創出も期待される。中でも、リーダーレスバクテリオシンは比較的単純な構造をもち、その対象として最適と考えられる。そこで本研究では、とくに我々が見出した新奇リーダーレスバクテリオシンであるラクティシン Q を対象とし、その生合成機構の解明と新奇抗菌ペプチド創出への応用を試みた。

結果と考察

1. ラクティシン Q 生合成機構の解析

バクテリオシンの生合成には、バクテリオシン本体、菌体外分泌を担うトランスポーター、自身を保護する自己耐性タンパク質をそれぞれコードする遺伝子が最低限必要である。これまでに得られていたラクティシン Q 生合成遺伝子群を構成する、*lnqQBCDEF* の個々の遺伝子の役割を明らかにするために、これらを様々に組み合わせた異種発現株を構築し、ラクティシン Q の生産能や菌体内外での自己耐性を評価し、ラクティシン Q の生合成機構を推定した(図 1)。ラクティシン Q の分泌生産には、ラクティシン Q をコードする *lnqQ* 以下、*lnqBCDEF* の全ての遺伝子が必須であり、これらがコードする 5 つのタンパク質が協調して、菌体内で合成されたラクティシン Q が菌体外に分泌されることが明らかとなった。また、*lnqBCD* と *lnqEF* の発現によってそれぞれ独立して菌体内外の自己耐性を付与することで、2 つの独立した機構が菌体内外のラクティシン Q に対する自己耐性を担うことが

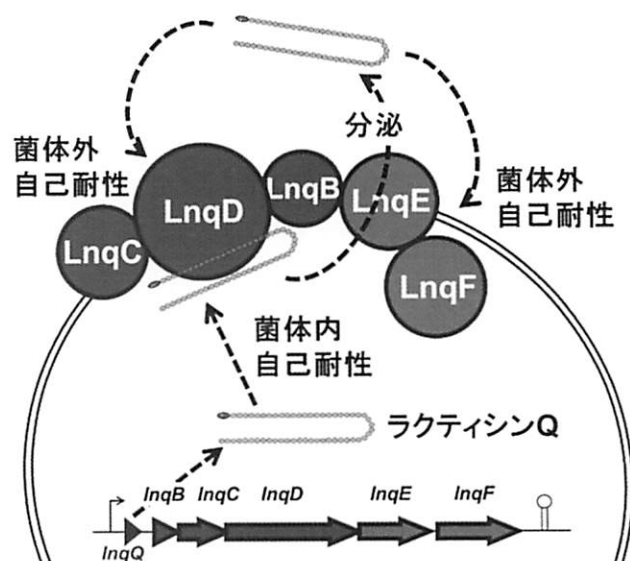


図 1. ラクティシン Q の推定生合成機構

明らかとなった。これらの結果から、他の一般的なバクテリオシンとは異なり、リーダー配列を伴わずに活性型として合成されるラクティシン Q では、分泌機構が自己耐性機構の一端を担っていることも推察された。

2. 生合成機構を利用したラクティシン Q の改変とその評価

菌体内自己耐性の付与が認められた LnqEF を利用した新奇抗菌ペプチドの創出・評価系の構築を試みた。ラクティシン Q 感受性の乳酸菌株を宿主として、ラクティシン Q 本体 (LnqQ) と LnqEF を共発現する系を構築し、誘導発現させるラクティシン Q 本体にランダムな変異を与え、LnqEF による菌体内自己耐性能を上回る抗菌活性を示すラクティシン Q 変異体の取得を試みた。その結果、菌体内自己耐性能を上回る抗菌活性、つまり宿主の乳酸菌株への毒性を示す変異体が得られ、その変異体の大半で、ラクティシン Q の C 末端部分への変異が確認された (図 2)。また、得られたラクティシン Q 変異体の多くで、抗菌スペクトルの変化が認められた。

以上より、この方法は、ラクティシン Q をはじめとするリーダーレスバクテリオシンを基にした新奇抗菌ペプチドの創出や、構造活性相関の解析、自己耐性機構の解析に有効と考えられた。

LnqQ	MAGFLKVVQLLAKYGSKAVQWAWANKGKILDWLNAGQAIDWVSVKIKQILGIK
変異体A	MAGFLKVVQLLAKYGSKAVQWAWANKGKILDWLNAGQAIDWVVHCTAGLILGIK
変異体B	MAGFLKVVQLLAKYGSKAVQWAWANKGKILDWLNAGQAIDWVVSALRWLGIK
変異体C	MAGFLKVVQLLAKYGSKAVQWAWANKGKILDWLNAGQAIDWVSVKIKQIPPPW

図 2. ラクティシン Q と得られた変異体の例

ラクティシン Q (LnqQ) の C 末端側のアミノ酸残基が置換された変異体が多く得られた。変異体 A と B では抗菌スペクトルの選択性が高まったのに対し、変異体 C はラクティシンと同様の抗菌スペクトルを示した。

3. 部位特異的変異によるラクティシン Q の改変とその評価

ラクティシン Q 本体 (LnqQ) と他のラクティシン Q 生合成タンパク質 (LnqBCDEF) を共発現する系を用いて、LnqQ の特定の部位を他のアミノ酸にランダムに置換し、抗菌活性の変化する変異体の取得を試みた。とくに、抗菌活性に重要と考えられる 4 つの α ヘリックス領域についてアミノ酸置換を試み、得られた変異体の抗菌活性を評価した。その結果、4 番目の α ヘリックス中に存在する 40 残基目のアスパラギン酸のグルタミン酸への変異体 (D40E) では抗菌活性が向上し、一方でグリシンへの変異体 (D40G) では抗菌活性が消失した。

以上より、 α ヘリックス中の特定のアミノ酸残基が抗菌活性に重要であり、部位特異的変異による改変の対象として有効であることが明らかとなった。