

Lactobacillus gasseri が生産する新規二成分性バクテリオシン
“ガセリシン S” の特性に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻

博士後期課程

春日元気

2018

目次

第 1 章	緒論	1
第 2 章	<i>Lactobacillus gasserii</i> 向けの完全食品グレード培地の創製と ガセリシン生産	
第 1 節	諸言	20
第 2 節	材料と方法	23
第 3 節	結果	29
第 4 節	考察	39
第 3 章	<i>gas</i> 遺伝子発現株の構築と GS における二成分性および特性の解析	
第 1 節	諸言	44
第 2 節	材料と方法	52
第 3 節	結果	89
第 4 節	考察	118
第 4 章	GS 遺伝子が GT 生産に及ぼす影響に関する検討	
第 1 節	諸言	128
第 2 節	材料と方法	131
第 3 節	結果	138
第 4 節	考察	141

第 5 章 総括 144

謝辞 149

参考文献 150

第 1 章

緒論

ヒトを含む従属栄養生物にとって、食物を摂取することは生命活動における最も基本的な行動の一つであり、日々摂取する食品は安全性および品質にすぐれることが不可欠である。しかしながら多数の国々で、疫病などの大流行が飲食物を介して発生したという事例が歴史的事実として記録されている¹⁾。人類はこのような経験を繰り返してきた過程において、食物を調理、加工、保存する技術や、食品の安全に関する様々な知見を身につけてきたが、今後も食に関する問題が完全に取り除かれることは無いと考えられている。近年でも、我が国において年間 2-4 万人程度の食中毒患者が発生しており²⁾、死亡例（～10 人）も報告されている。さらに、アメリカ合衆国の疾病管理予防センター（The Centers for Disease Control and Prevention）によると、アメリカ合衆国では年間で約 7,600 万人が食中毒を発症し、約 5,000 人が死亡している³⁾とされているほか、WHO（World Health Organization）によれば、世界的全体の死亡者数は年間 200 万人（飲み水起源を含む）にのぼり、食品の衛生に関する問題はいまだ深刻といえる。また、食中毒の定義や分類は国によって異なるが、我が国では厚生省の食中毒統計に基づいた分類により、病原物質としては細菌性、化学性および自然毒食中毒の 3 つに分けられている⁴⁾。しかし、その内訳には大きな偏りがあり、厚生労働省が出した病原物質別食中毒の統計⁵⁾によれば、事件数では 80%、患者数では 90%以上を細菌性食中毒が占めていることから、

食品の安全性を確保するためには、微生物による汚染の防止が最も重要とされている。実際に、*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, および *Staphylococcus aureus* などに関連する食中毒が世界的に多発しており、特に米国では、これらに関連するコストは年間 65-349 億ドルにもものぼることが報告⁶⁾されており、食中毒による被害は経済面でも大きいことがわかる。

また、近年では既存の医療向けに使用されている抗生物質に対する抵抗性を有した、薬剤耐性菌の勢力拡大が世界的な問題となってきた。1960年代に初めてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が臨床学的に分離されて以降⁷⁾、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)⁸⁾や薬剤耐性緑膿菌(MDRP)⁹⁾などが相次いで報告されてきている(Table 1-1)¹⁰⁾。現在、これら薬剤耐性菌による犠牲者は全世界において、年間 70 万人程度とされているが、2050年には 1,000 万人にも達するという指針¹¹⁾も存在し、ガンによる死者が年間 820 万人程度であることを鑑みると、非常に深刻な問題と言える。不適切な抗生物質の使用(不必要な処方や投薬量・期間の不足など)が、薬剤耐性菌の拡大を促進するとされていることから、世界的に抗生物質消費量の削減が課題とされている^{12,13)}。実際に、我が国でも 2020 年までに抗生物質の使用量を 2/3 へ削減するという目標を掲げており、適切な手続きにしたがって抗生物質を不要と診断した医療機関へ報酬を出す(小児抗菌薬適正使用支援加算 80 点)という試みも行われている¹⁴⁾。

しかしながら、米国では販売されている全ての抗生物質の内、80%程度が家畜向けとして消費されており¹⁵⁾、実際に畜産現場および食肉製品における薬剤耐性菌の検出を示す報告例が多数存在する¹⁶⁻²¹⁾。

畜産現場で発生した薬剤耐性菌は、家畜の糞便（堆肥）を介して水源や土壌を汚染し、農作物や食肉の接触および消費によってヒトへ伝播するリスクが考えられる（Fig. 1-1）²²⁾。したがって、畜産現場における薬剤耐性菌の出現リスクを最小限に留める必要があり、ヒトにおける耐性菌の感染リスクを低減するためにも重要な課題と言える。実際に、EUでは2006年より家畜に対する生育促進剤としての抗生物質の使用を禁じている。これよりも先に、デンマークでは1998年から同様の規制を行っているが、その結果、家畜に対する抗生物質の使用量は全体で26%程度減少したが、治療目的での使用量が2倍以上に増加し、生産コストはむしろ増加した²³⁾。そのため、単純に抗生物質の使用を中止するだけでは不十分であり、抗生物質に代わる新たな抗菌剤の開発が求められている。

さらに、期限切れによる食品（可食）の廃棄（= 食品ロス）量が年々増加してきており、我が国では年間800万トン（2010年）にもなり、これは世界全体の食糧援助量（400万トン、2011年）の2倍量に相当する。また、全世界での廃棄量は年間13億トン（7,500億ドル相当）にのぼり、世界全体で年間に生産される食料品の1/3量にも達するとされていることから、国際的に無視できない社会問題となっている^{24,25)}。安全性と経済性を両立するためにも、食品業界において、さらなる微生物混入リスクの低下と日持ち（shelf life）の向上が可能な保蔵技術の発展が求められている。

現代の食品保蔵では、適切な加熱殺菌、紫外線殺菌（主に飲料）、放射線殺菌（日本では殺菌目的の実用例なし）、水分活性やpHの調整、真空あるいはガス置換包装、低温および凍結保存、保存料の添加など、食品微生物の制御に様々な手法・薬剤を利用している²⁶⁾。なかでも、合成保存料として知られる安息香酸および安息香酸Na²⁷⁾、

ソルビン酸およびソルビン酸 Na²⁸⁻³⁰⁾ は、様々な細菌、酵母、カビに対する強力な生育阻害効果を有しているが、pH によってその効果は左右され、中性-アルカリ領域の食品への利用には向かないという欠点がある³¹⁾。さらに、近年では無添加、化学調味料不使用や無農薬を謳う食品の台頭に代表されるように、素材の特徴を生かしたナチュラルな食品を求めるニーズが高まっており、化学合成された保存料は敬遠される傾向が強まってきている。また、食品の三次機能（健康性機能、生体調節機能）を特化させた、トクホという呼び名で親しまれている特定保健用食品や栄養機能食品の需要急増に見られるように、消費者の健康意識も高まってきており、食塩や砂糖のような調味料を低減および代替した食品が増加傾向にある。しかし、これらの添加物や調味料は食品に対する微生物の混入防止や増殖抑制という役割も担っている³²⁾ ため、これらの使用を過度に控えることは、微生物汚染のリスクを増大する恐れがある。

以上のような背景から、既存の化学合成保存料の使用とは異なる方法により、食品自体に対して微生物への抵抗性を付与するような技術と、Leistner の提唱するハードル理論³³⁾ に基づく利用（加熱、包装、ガス置換、pH の設定、水分活性の調整などの併用を行う）が必要と考えられている。その手段として、植物、動物、ならびに微生物起源の抗菌物質（バイオプリザバティブ）を利用する食品の保蔵方法である“バイオプリザベーション”^{26,34,35)} が静かな脚光を浴びている。1992 年に本保蔵方法を提唱した Ray は、ヒトにおける長年の食経験がありながら何ら害作用も確認されていないことを条件に、乳酸菌とそれらの産生物をバイオプリザバティブとして推奨している³⁴⁾。

乳酸菌が産生する抗菌物質としては、有機酸（乳酸、酢酸、ギ酸、

プロピオン酸)、エタノール、ジアセチル、アセトアルデヒド、二酸化炭素、過酸化水素などが広く知られ³⁶⁾、乳酸については米国を中心として食品保存目的で工業的に生産・利用されているが³⁷⁾、これらの抗菌物質は食品中でも通常の発酵過程で産生され、自然な形で食品保蔵に貢献してきた³⁸⁾。乳酸菌には上記抗菌物質に加え、バクテリオシンと呼ばれる主に類縁菌に対して抗菌活性を示すペプチドおよびタンパク質の生産が確認されており、特に乳酸菌由来のものは殺菌効果が高く、ヒト細胞に対する毒性についても報告が無いことから、大きな注目を集めている³⁹⁾。

バクテリオシンは、Jacobら(1953)によりはじめて用いられた、「感受性菌の細胞上のレセプターに吸着することにより同一種あるいは近縁菌種に対して作用するタンパク性抗菌物質」を指す用語である。その後、Tagg(1991)はペプチド部分が抗菌活性発現に必要であること、抗菌スペクトルが(抗生物質に比べて)狭いこと、感受性細菌に対して殺菌的に作用することの3つを満たす場合にのみ、バクテリオシンという用語を用いるべきとし、それ以外の抗菌物質はBacteriocin-Like Inhibitory Substance (BLIS) と呼称するべきとした³⁶⁾。また、近年において、バクテリオシンは細菌がリボソーム上で生合成する抗菌性のペプチド・タンパク質の総称と考えられるようになった⁴⁰⁾。そして、現在ではバクテリオシンとペプチド性抗生物質における最大の相違点として、活性本体および前駆体をコードする構造遺伝子がゲノム DNA 上に存在する点が挙げられている。

バクテリオシンは、その作用機序や構造からいくつかのクラスに分類されるが、分類体系は各研究者によって異なっている。本論文では、乳酸菌由来のバクテリオシンに焦点を当てた Alvarez-Sieiro ら

(2016)⁴¹⁾ の分類体系を採用した。同分類体系では、全ての乳酸菌バクテリオシンが class I: 10 kDa 未満の翻訳後修飾を受けたペプチド (Ribosomally produced and Posttranslationally modified Peptides: RiPPs)、class II: 10 kDa 未満の非翻訳後修飾ペプチド、および class III: 10 kDa を超える非翻訳後修飾タンパク質の 3 つに大別される。また、class I は 6 つの subclass: class Ia (lanthipeptides)、class Ib (head-to-tail cyclized peptides)、class Ic (sactibiotics)、class Id (linear azol(in)e-containing peptides)、class Ie (glycocins)、および class If (lasso peptides) によって細分化される。また、class II についても 4 つの subclass: class IIa (Pediocin-like bacteriocins)、class IIb (two-peptide bacteriocins)、class IIc (leaderless bacteriocins)、および class IId (non-pediocin-like, single-peptide bacteriocins) に細分化される。

乳酸菌のようなグラム陽性細菌由来のバクテリオシンでは、一般的な作用機序として、目標菌体の細胞膜に対する孔形成によるイオン (H^+ 、 K^+ など)、ATP などの低分子物質の流出に伴った、膜電位および pH 勾配の消失、プロトン駆動力の欠損および ATP の枯渇が考えられている⁴²⁻⁴⁷⁾。また、colicin^{48,49)} のようなグラム陰性細菌由来のバクテリオシンでは、前述した機構に加え、RNA および DNA の分解や、タンパク質合成への干渉も作用機構として含まれている⁵⁰⁾。バクテリオシンが菌体に接触するための初期因子は、正に荷電したバクテリオシン (特にグラム陽性菌由来バクテリオシンの大多数は、正に荷電するといわれている) と標的菌体の細胞膜における負に荷電した脂質成分間の静電氣的吸着であり、膜への挿入にはペプチドの疎水性が不可欠とされている⁵¹⁾。さらに、孔の形成様式としては、くさび状に折れ曲がって細胞内へ進入する wedge-like

pore model と、自身が細胞膜を貫通し複合体を形成することで孔を形成する barrel-stave pore model などが考えられている^{52,53)} (Fig. 1-2)。

最も著名なバクテリオシンとして、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が生産する Nisin A^{54,55)} がある。Nisin A は乳酸菌および、*List. monocytogenes*, *Staph. aureus*, *Bacillus cereus*, および *Clostridium botulinum* といった食品汚染・病原性菌を含むグラム陽性菌に対する広い抗菌スペクトル⁵⁶⁾ を有しているうえ、EDTA との併用時には、グラム陰性菌 (*E. coli*, *Sal. typhimurium*) に対しても抗菌活性を示すことが報告されている⁵⁷⁾。また、Nisin A には残基数 (57 アミノ酸) の同じ類縁体 (Nisin Z, Q, F, および H)⁵⁸⁻⁶¹⁾ が 4 種存在し、さらに、残基数の異なる類縁体 (Nisin U, U2, P, および O)⁶¹⁻⁶³⁾ が 4 種存在するが (Fig. 1-3)、世界的に食品保蔵剤として実用されているバクテリオシンは Nisin A のみである。Nisin Z については、中国でのみ使用が認可されていると言われているが、ベルギーの Handary 社により食品添加剤として製剤化および販売されているため (NisinZ® Vegetal Nisin Z : <http://www.handary.com/product-id-2000010>)、実際には Nisin Z も Nisin A と同様の基準によって多くの国々で使用されている可能性が高い。Nisin A は 1928 年に発見されて以降、様々な特性について解明がなされており、1953 年にはイングランドにおいて食品への応用が開始され、その後、FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation) と WHO により食品保存料として認可された。また、1988 年には FDA (Food and Drug Administration) により、GRAS (Generally Recognized As Safe) 物質として認定されている。さらに、日本でも 2003 年からの食品安全委員会での審議を経て、2009 年 3 月 2 日

に初めて厚生労働省によって食品添加物として認可され（食安発第0302006号）、Nisin A を使用した食品の輸入も可能となった⁶⁴⁾。Nisin A は様々な食品（チーズ、脱脂乳、ソーセージ、キムチなど⁶⁵⁻⁶⁸⁾において効果と応用性が実際に試験されており、その評価が高いことも手伝って、pediocin PA-1 のような乳酸菌バクテリオシンの研究も精力的に行われており、実際に食品保蔵目的で利用されている^{69,70)}。しかしながら、Nisin A は酸性域において最大の活性を示す一方で、中性-アルカリ性領域においては不溶化（pH 2 に比べて、pH 8 では溶解度が 1/228 に低下することが報告されている⁷¹⁾により、活性が大幅に低下、もしくは完全に消失するという欠点^{72,73)}が知られている。そのため、Nisin A の欠点（中性 pH における不安定性）を補うことが可能な使用方法や、新規の乳酸菌バクテリオシンの発見および研究発展、そして応用が求められている。

当研究室では、ヒト小腸における lactobacilli（乳酸桿菌）の最優勢種⁷⁴⁾であり、古くからヒトの腸管および糞便⁷⁵⁾のみならず、口腔⁷⁶⁾、乳輪⁷⁷⁾、膣管^{78,79)}からも検出され、有力なプロバイオティクスの候補である *Lactobacillus gasseri* 由来のバクテリオシン（ガセリシン）に注目し、ガセリシン A (GA) とガセリシン T (GT) の 2 種を見出し、報告してきた。

GA は、ヒト乳児（4 か月齢、男児）の糞便より単離した *Lb. gasseri* LA39 (JCM11657) が生産する、N/C 末端結合型の環状バクテリオシン (class IIId) である^{80,81)}。GA は、疎水性に富んだ 58 アミノ酸残基（分子量 5652）からなり^{82,83)}、二次構造として α -helix に富んでいることが推定されているほか、作用機序として、標的細胞膜からのカリウムイオンといった低分子成分の漏出（ATP の漏出は認められていない）が確認されている⁸⁴⁾。また、株式会社明治（研究本

部、食機能科学研究所)との共同研究により、GAの生合成と自己耐性は、内在性のプラスミドDNA：pLgLA39(33,333 bp, 44 ORFs)上に形成された遺伝子クラスター：*gaaBCADITE*(Fig. 1-4)によって行われることが推定されている^{85,86)}。

GTは、ヒト幼児(6ヵ月齢、男児)より単離した*Lb. gasseri* LA158(JCM11046)が生産し、GatA(構造遺伝子：*gatA*)とGatX(構造遺伝子：*gatX*)の異なる2つのペプチドからなる二成分性バクテリオシン(class I Ib)である^{88,89)}。GT(GatA、GatX)は、*Lb. johnsonii* VP11088が生産するclass I IbバクテリオシンのLactacin Fと高い相同性を有していることから^{35,90)}、Lactacin Fと同様の孔形成による殺菌作用が推定されており、実際にGTを感作した指標菌(*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T)からは低分子物質(115 Da (C₅H₉NO₂)：推定プロリン、246 Da (C₈H₁₄N₄O₅)：推定4量体グリシン、268 Da (C₁₀H₁₂N₄O₅)：推定イノシン)の流出が確認されている⁹¹⁾。さらに、(株)明治(食機能科学研究所)との共同研究により、GTの生合成と自己耐性は染色体DNA上に形成された遺伝子クラスター：*gatPKRTC (Z) AXI*(*gatZ*は機能不明)(Fig. 1-5)によって行われることが推定されている⁹²⁾。

これらガセリシンは、乳酸菌以外に*B. cereus*、*List. monocytogenes*、*Staph. aureus*といった食中毒・病原性菌を含むグラム陽性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示し、高い耐熱性(121℃, 15 min後も活性残存)とpH安定性(pH 2-10において活性が一定)を有しているため、特に食品保蔵剤としての応用が期待されている。実際に、カスタードクリーム(GA/GT)やウシ乳房炎の治療剤(GA)としての応用性が研究され、高い有効性が確認されている^{35,90,93)}。

しかしながら、これらガセリシンにおいては食品グレードでの生産系が確立されていない。バクテリオシンを食品へ応用するには、食品への添加が認められた成分のみで構成される、食品グレード培地によって生産株を培養することが必須となる。乳酸菌向けの代表的な食品グレード培地として、脱脂乳培地が挙げられるが、*Lb. gasseri* を含む *acidophilus* グループ乳酸菌^{94,95)} は、一般的に乳培地での生育が緩慢なことが知られており、*Lb. gasseri* およびその生産物における利用性が制限されている。そこで、*Lb. gasseri* 向けの完全食品グレード培地の開発と、各ガセリシンにおける食品グレード生産系の確立を本研究における第一の目標とした。

これまでに GA と GT に継ぐ第 3 のガセリシンが報告されている。Matijasic ら (1998)⁹⁶⁾ は *Lb. gasseri* LF221 が生産する acidocin LF221A (Acd LF221A) および acidocin LF221B (Acd LF221B) について報告し、後者の Acd LF221B は GT の類縁体であったが、前者の Acd LF221A については他に相同性の高いバクテリオシンが存在せず、新規のガセリシンであることを明らかにした。その後、2004 年には Acd LF221A の 3 ORFs によって構成される推定遺伝子クラスター (Fig. 1-6) が特定され、その遺伝子情報から Acd LF221A は二成分性バクテリオシン (Acd 221a + Acd 221A) である可能性が示された⁹⁷⁾。しかしながら、1 番目のペプチド (Acd 221a) は N 末端領域における配列が未決定であり、実際には 2 番目のペプチド (Acd221A) のみが単離精製されたに過ぎないため、Acd LF221A が本当に二成分性バクテリオシンであるかは未証明のままである。以降、Acd LF221A に関する研究報告は途絶え、特性についてもほとんど解明されていないのが現状である。その後、当研究室で保有する *Lb. gasseri* 株において各ガセリシン構造遺伝子の保有状況を試

験した結果、ヒト成人大腸組織切片由来の *Lb. gasseri* LA327 において、GTに加えて Acd LF221A と推定される遺伝子が検出された。そこで、LA327 株において検出された Acd LF221A と推定される遺伝子の全長配列決定と、同バクテリオシンの特性解析を本研究における第二の目標とした。

しかしながら、GT および Acd LF221A を含めた *Lb. gasseri* 由来の二成分性バクテリオシンにおいて、抗菌ペプチド 2 種の完全精製に成功した例は無いため、いずれも実際に二成分性バクテリオシンであるという証明はされていない。したがって、従来の精製技術に頼った推定 Acd LF221A の特性解析は困難であると考えられたため、本研究では Acd LF221A (Acd 221 α および Acd 221A) を単独で生産する発現株の構築目指した。

タンパク質・ペプチドの解析において、大規模化およびハイスピード化が求められる現代では、対象タンパク質・ペプチドを効率よく発現し、精製することは重要である。近年ではそれらを可能にする手段として、異種発現を用いた解析法が一般的となっており、自然株からの取得が困難な試料から、重原子や安定同位体導入試料の調製や変異導入も可能であることから、医学的研究分野、バイオテクノロジー産業において必要不可欠な技術となっている⁹⁸⁾。発現系としては大腸菌や酵母などの細菌^{99,100)}、そして昆虫および動物細胞^{101,102)} が主に知られているが、なかでも培養時間が短く、遺伝子操作が簡便で、低コストかつ安定的な生産が可能である大腸菌 (*E. coli*) を用いた発現系が最も一般的となってきた^{98,103)}。実際にバクテリオシンの分野でも、*Enterococcus faecalis* S-48 が生産する Enterocin AS-48 や、*Brochothrix campestris* ATCC 43754 が生産

する Brochocin-C などは *E. coli* からの異種発現に成功している (104,105)。

しかしながら、*E. coli* における異種発現では翻訳後のプロセッシングや修飾機構の違いにより、屈折体、封入体形成などの問題 (106,107) がしばしば起こり、目的の物質が本来の形および機能で生産されない場合があるため、万能な手段とはいえない。実際に、*E. coli* による GT の GatA および GatX を単独で生産する異種発現株の構築を試みた結果、GatX のみが微弱な活性を示し、混合しても相乗効果が得られなかったことから、本来と異なった構造で発現されている可能性が高いと考えられる (108)。したがって、乳酸菌が生産するバクテリオシンの機能を本質的に追求するためには本来の宿主、すなわち同種の乳酸菌を発現系に用いることが理想的であると考え、本研究における発現株の構築には、*Lb. gasseri* を宿主として用いることにした。

以上、本研究ではガセリシンにおける食品グレード生産系の確立から、同種発現株の構築による推定 Acd LF221A における二成分性の証明、そして食品への応用に向けた諸性質に関する解析を試みた。

Table 1-1. The history of emergence in major antibiotic-resistant bacteria.¹⁰⁾

報告年	耐性菌名	菌種	耐性抗菌薬
1961	MRSA	黄色ブドウ球菌	β -ラクタム系薬全般
1967	PRSP	肺炎球菌	ペニシリン
1983	ESBL 産生菌	大腸菌、肺炎桿菌等	第3世代セフェム
1986	VRE	腸球菌	バンコマイシン、(テイコプラニン)
1988	MBL 産生菌	緑膿菌等	カルバペネム系薬
1990年代	MDRA	アシネトバクター	一部薬剤 ¹⁾ を除き抗菌薬全般
1996	VISA	黄色ブドウ球菌	バンコマイシン、テイコプラニン
1996	KPC 産生菌	肺炎桿菌 (腸内細菌科)	一部薬剤 ¹⁾ を除き抗菌薬全般
2002	VRSA	黄色ブドウ球菌	バンコマイシン、テイコプラニン
2009	NDM-1 産生菌	大腸菌 (腸内細菌科)	一部薬剤 ¹⁾ を除き抗菌薬全般

MBL: メタロ- β -ラクタマーゼ、MDRA: Multiple Drug-Resistant *Acinetobacter*、

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase、NDM-1: New Delhi metallo- β -lactamase 1

1) コリスチン、ポリミキシン B、チゲサイクリンなど

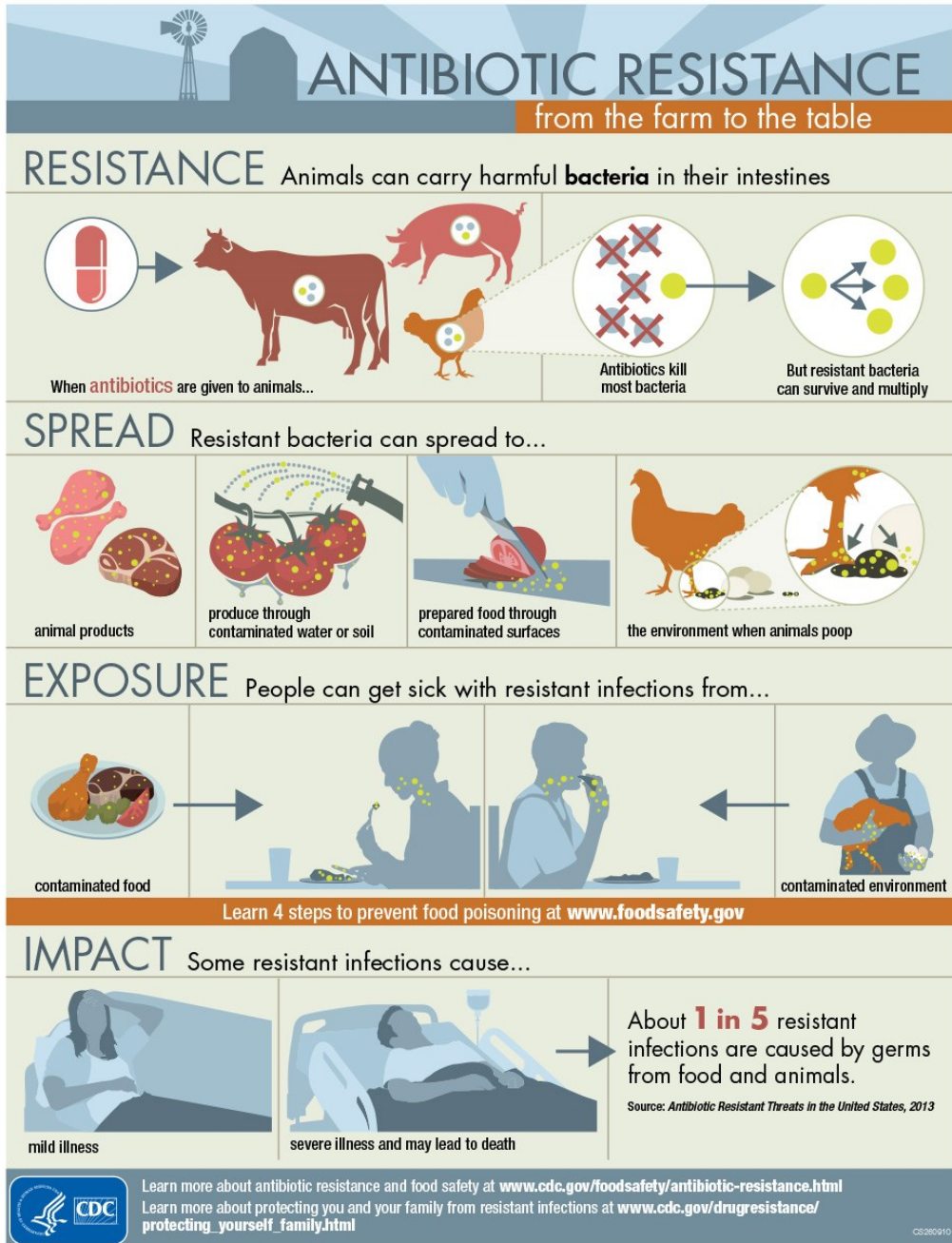


Fig. 1-1. The image of antibiotic-resistant bacteria from the farm to the table. ²²⁾

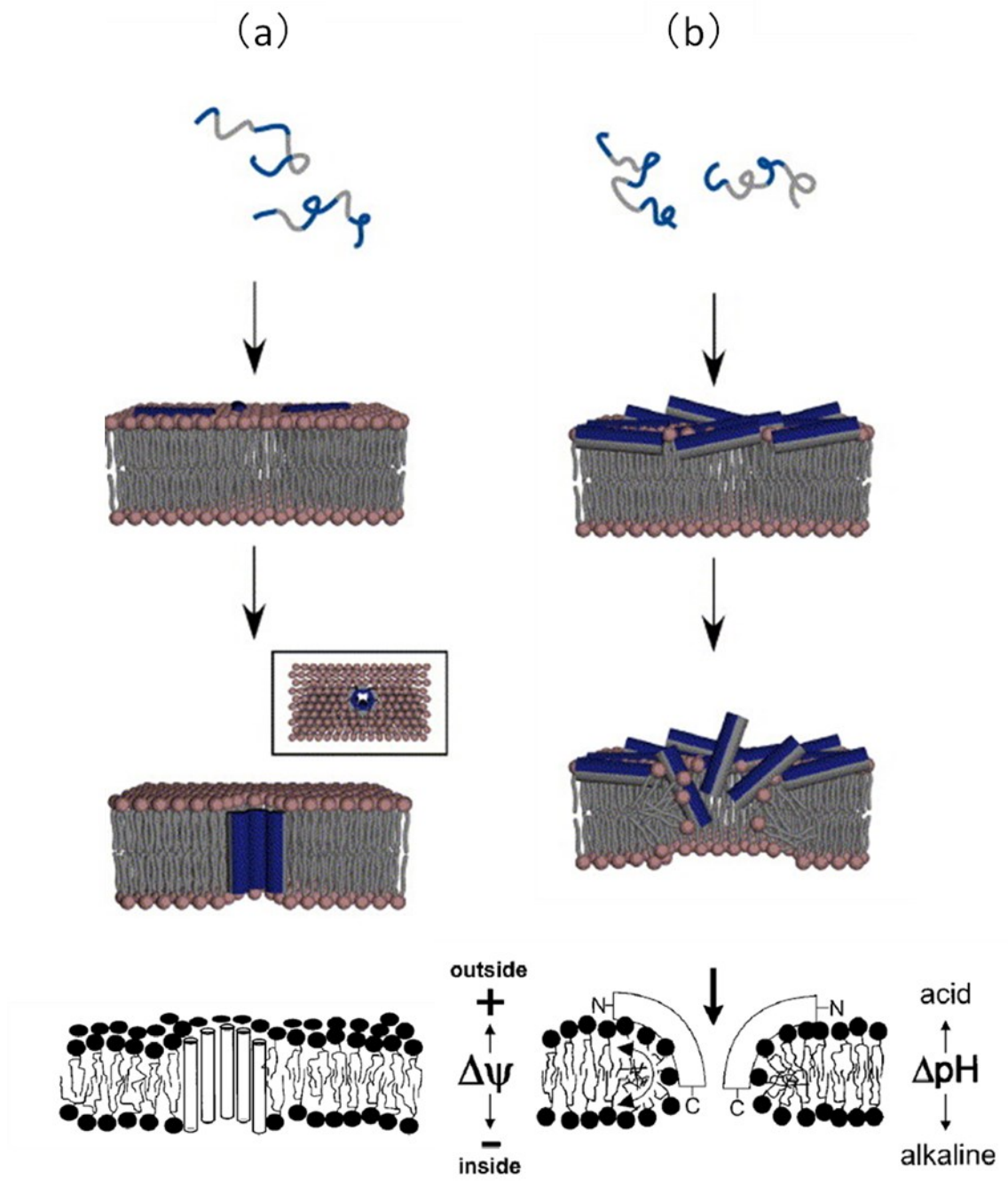


Fig. 1-2. The pore-formation model of bacteriocins. ^{52,53)}

barrel-stave pore (a), wedge-like pore (b)

		*		20		*		40		*																																																				
Nis A	:	-	M	S	T	K	D	F	N	L	D	L	V	S	V	S	K	K	D	-	S	G	A	S	P	R	I	T	S	I	S	L	C	T	P	G	C	K	T	G	A	L	M	G	C	N	M	K	T	A	T	C	H	C	S	I	H	V	S	K	:	57
Nis F	:	-	M	S	T	K	D	F	N	L	D	L	V	S	V	S	K	K	D	-	S	G	A	S	P	R	I	T	S	I	S	L	C	T	P	G	C	K	T	G	A	L	M	G	C	N	M	K	T	A	T	C	N	C	S	V	H	V	S	K	:	57
Nis H	:	-	M	S	T	N	D	F	N	L	D	L	V	S	V	S	K	S	N	-	A	G	A	S	T	R	F	T	S	I	S	M	C	T	P	G	C	K	T	G	A	L	M	T	C	N	Y	K	T	A	T	C	H	C	S	I	K	V	S	K	:	57
Nis Q	:	-	M	S	T	K	D	F	N	L	D	L	V	S	V	S	K	T	D	-	S	G	A	S	T	R	I	T	S	I	S	L	C	T	P	G	C	K	T	G	V	L	M	G	C	N	L	K	T	A	T	C	N	C	S	V	H	V	S	K	:	57
Nis Z	:	-	M	S	T	K	D	F	N	L	D	L	V	S	V	S	K	K	D	-	S	G	A	S	P	R	I	T	S	I	S	L	C	T	P	G	C	K	T	G	A	L	M	G	C	N	M	K	T	A	T	C	N	C	S	I	H	V	S	K	:	57
Nis U2	:	-	M	S	T	K	D	F	N	L	D	L	V	S	V	S	K	K	D	-	S	G	A	S	P	R	V	T	S	K	S	L	C	T	P	G	C	K	T	G	I	L	T	G	C	P	L	K	T	A	T	C	G	C	H	F	G	-	-	-	54	
Nis U	:	-	M	N	N	E	D	F	N	L	D	L	I	K	I	S	K	E	N	N	S	-	G	A	S	P	R	I	T	S	K	S	L	C	T	P	G	C	K	T	G	I	L	M	T	C	P	L	K	T	A	T	C	G	C	H	F	G	-	-	-	55
Nis P	:	-	M	N	N	E	D	F	N	L	D	L	V	T	I	S	K	E	N	N	S	-	G	A	S	P	R	V	T	S	K	S	L	C	T	P	G	C	K	T	G	I	L	M	T	C	A	I	K	T	A	T	C	G	C	H	F	G	-	-	-	55
Spa A	:	M	S	K	F	D	D	F	D	L	D	V	V	K	V	S	K	Q	D	-	S	K	I	T	P	Q	W	K	S	E	S	L	C	T	P	G	C	V	T	G	A	L	Q	T	C	F	L	Q	T	L	T	C	N	C	K	I	T	S	K	-	-	56
Nis O_1	:	M	G	K	F	D	D	F	D	L	D	V	T	K	T	A	A	Q	G	-	G	I	E	P	K	Y	K	S	K	S	A	C	T	P	G	C	P	T	G	I	L	M	T	C	P	L	K	T	A	T	C	G	C	H	I	T	G	K	-	56		
Nis O_2	:	M	G	K	F	D	D	F	D	L	D	V	T	K	T	A	A	Q	G	-	G	I	E	P	K	Y	K	S	K	S	A	C	T	P	G	C	P	T	G	I	L	M	T	C	P	L	K	T	A	T	C	G	C	H	I	T	G	K	-	56		
Nis O_3	:	M	A	K	F	D	D	F	D	L	D	V	T	K	T	A	A	Q	G	-	G	I	E	P	K	Y	K	S	K	S	A	C	T	P	G	C	P	T	G	I	L	M	T	C	P	L	K	T	A	T	C	G	C	H	I	T	G	K	-	56		
Nis O_4	:	M	A	K	F	D	D	F	D	L	D	I	E	K	K	V	R	R	D	I	-	I	P	A	S	I	T	S	Q	H	S	F	C	T	P	N	L	T	G	F	L	C	P	-	P	K	T	Q	L	T	C	T	C	K	L	K	G	Q	-	57		

Fig. 1-3. Deduced amino acid sequences of Nisin A and the analogues. ⁶³⁾

Spa: subtilin の構造遺伝子 (*spaA*) の推定ペプチド
 Nis O_1, 2, 3, and 4: Nisin O における 4 つの構造遺伝子 (*nso A1-4*) の推定ペプチド
 濃い青、青、水色、白のマークは、それぞれの残基における保存率 100%、80%、60%、および >40% を示す

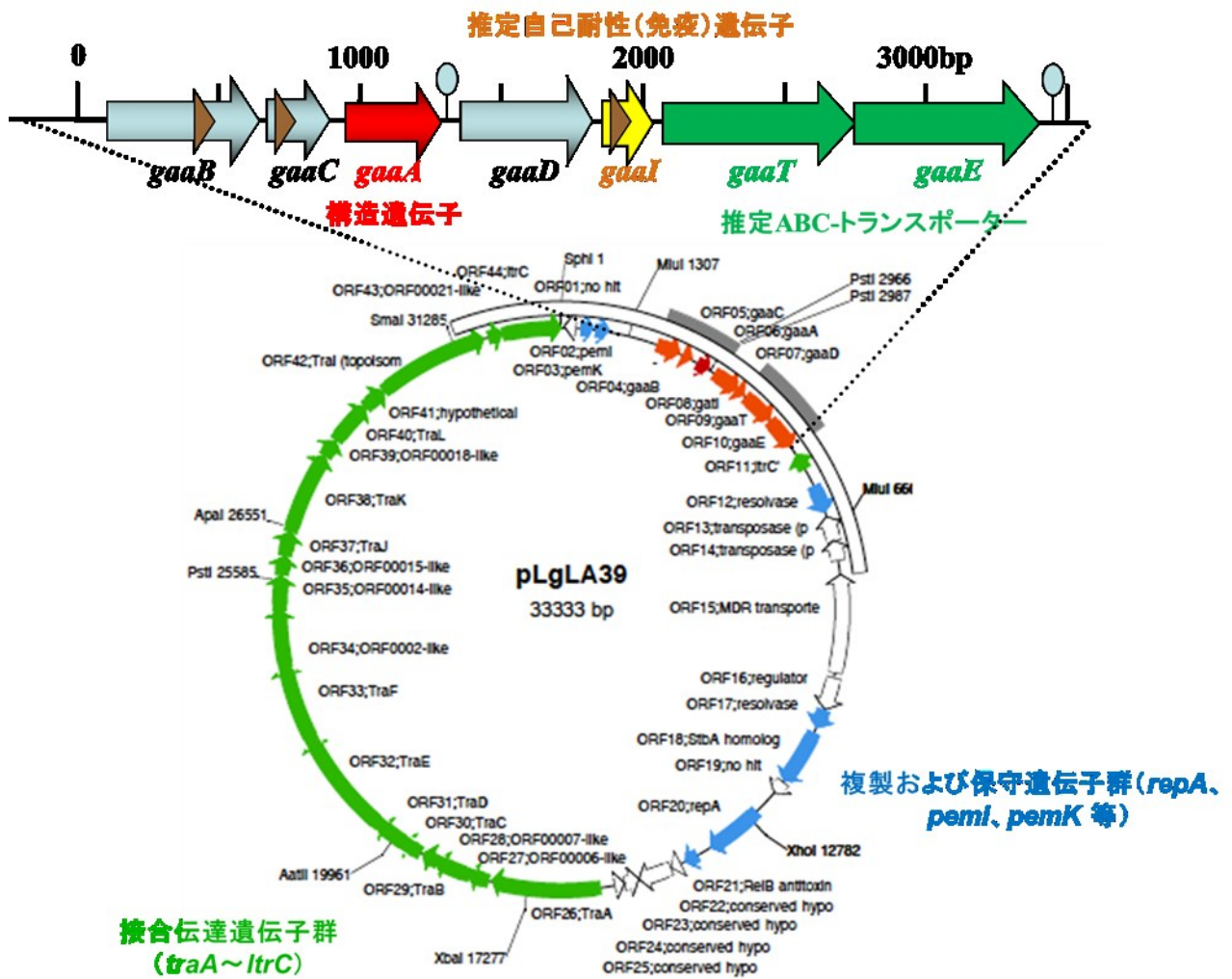


Fig. 1-4. Plasmid map of pLgLA39 encoding GA gene cluster from *Lb. gasseri* LA39^{85,86)}

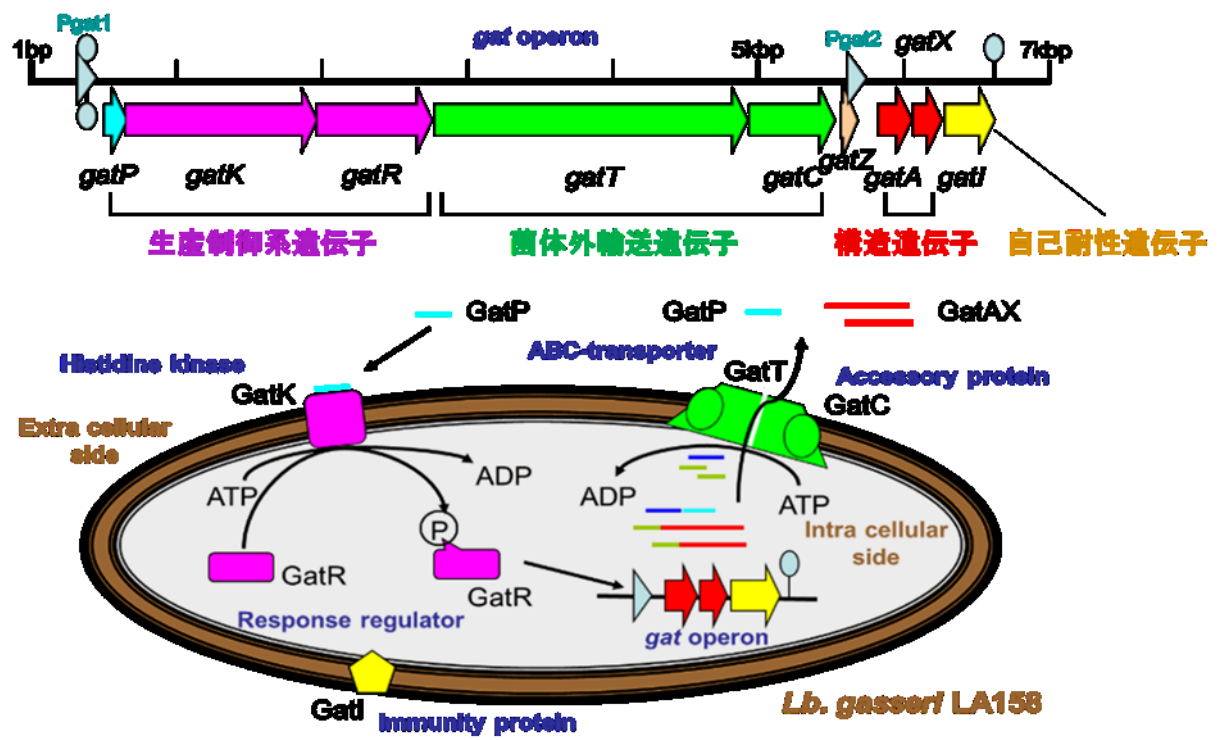


Fig. 1-5. GT genes cluster located in chromosomal DNA of *Lb. gasseri* LA158. ⁹²⁾

```

→ Part of OrfA1
GATCCTTTTT TGGTCAGCCA GTTCTGTAG GAACAGGTGC ACTAATCGGT GCAAGTGCTG 60
  S F F G Q P V S V G T G A L I G A S A

GTGCAATTGG CGGATCAGTA CAATGTGTGG GCTGGTTAGC TGGAGGTGGA AGATAATGAT → 120
  G A I G G S V Q C V G W L A G G G R • M

OrfA2
CGAAAAAGTT TCTAAAAATG AACTAAGCCG GATATATGGT GGAAACAACG TAAATTGGGG 180
  I E K V S K N E L S R I Y G2 G1 N N V N W

TAGTGTGCA GGATCATGTG GTAAAGGTGC AGTAATGGAA ATATATTTTCG GGAATCCCAT 240
  G S V A G S C G K G A V M E I Y F G N P

ATTAGGGTGC GCTAACGGAG CTGCAACATC ATTGGTTCTA CAAACTGCTA GTGGAATATA 300
  I L G C A N G A A T S L V L Q T A S G I

TAAAAATTAT CAAAAAAGA GATAGTATAT → OrfA3 GACGGGAATA TGGATAGTAA TTATTAGTAT 360
  Y K N Y Q K K R • M T G I W I V I I S

TATTGTGCTT TCAATAATTA TCACCAATAT AGTAGCTCTA ATACAGACAC TATTACATAA 420
  I I V L S I I I T N I V A L I Q T L L H

GAAAAATGAA AAATATTATT TTGATAAATC TTTTGGAGCC TATGCAGGTA AAAATAATCC 480
  K K N E K Y Y F D K S F G A Y A G K N N

AAAATATCTG TTTAATAATG TTGAACATCA TGATTTTTTC CATGTATTTT ATCAGTATTT 540
  P K Y L F N N V E H H D F F H V F Y Q Y

TATTTGCTCA TATATCCAT TTATAGATGT CATTTTTTGG TTCTTAGGIT CAATTTGGTA 600
  F I C S Y I P F I D V I F W F L G S I W

ATAATCAAAA AAGGTCGAAA CTTCATCTTA GTACGAAGTT TCGACCTTTT TTTATTTCAA 660
  •

ATTATTTTTA TTGCTTCCAC GCTGCATCAA ATTTTGCTTT ACCTGCTTTA ATTTGATTAT 720
CAACATTTTG ACCATTCTTA GCTGCATACA AAATCTTAGC CATAATGGA TCTAATGAC 780
TGTAGGCAGC GTTTGAGTTC TTAGCTACTG GAATACTGTA CAAGTGTTTC ATAGCCCCTT 840
CTAACTTAGC TGGAAGCT 858

```

Fig. 1-6. DNA digestion fragment (0.9 kbp) by BamHI/HindIII encoding Acd LF221A genes (three ORFs) from chromosomal DNA of *Lb. gasseri* LF221. ⁹⁷⁾

Two possible ribosome-binding sites (RBS) are *underlined*, whereas the *dots* indicate three termination codons. The inverted repeat of the putative terminator located downstream of *orfA3* is indicated by the *thick line*. *orfA2* encodes the structural gene encoding acidocin LF221 A and the *bold-marked G⁻¹* at nucleotide position 163 shows the cleavage site of the N-terminal extension in the translated peptide

第 2 章

Lactobacillus gasseri 向けの完全食品グレード培地の 創製とガセリシン生産

第 1 節

諸言

乳酸菌はヒトによる長い食経験から、一般的に安全な GRAS 微生物として多くの菌種および菌株が認定されており、特に乳酸桿菌 (lactobacilli) はビフィズス菌と並んで、ヒトおよび動物の消化管内における重要かつ有益な菌叢の 1 つであることが知られている^{109,110}。特に、*Lb. gasseri* はヒト腸管内における lactobacilli の最優勢種であり、腸管や糞便のみならず、口腔、膣、および母乳からも単離されてきており、代表的なプロバイオティクスの 1 つとして知られている^{74,76,79,111}。この *Lb. gasseri* が有する有益な効果として、免疫賦活効果、抗アレルギー症状、抗細菌およびウイルス感染、抗腫瘍効果、脂質吸収阻害などが報告されている¹¹²⁻¹¹⁷。

また、*Lb. gasseri* LA39 が生産するガセリシン A (GA)、および *Lb. gasseri* LA158 が生産するガセリシン T (GT) は、高い pH 安定性 (pH 2-10) および耐熱性 (121°C, 15 min 後も活性を残存) を有し、乳酸菌に加えてグラム陽性の食中毒・病原性菌 (*B. cereus*, *List. monocytogenes*, および *Staph. aureus*) に対して抗菌活性を示すことから、特に食品保蔵剤としての応用が期待されている^{80,88,90,118}。さらに、最近になって *Lb. gasseri* LA327 より第 3 のガセリシンであるガセリシン S (GS) が見出された (第 3 章において同定および解析)。しかしながら、これらガセリシンにおける完全食品グレード

生産系は確立されていない。バクテリオシンを食品へ応用することを考慮すると、食品への添加が許可された成分のみで構成された食品グレード培地によって、生産株を培養する必要があり、産業規模では安全性に加えて低コストであることも重要となる。

乳酸菌における代表的な食品グレードとしては脱脂乳培地 (RSM: Reconstituted Skim Milk) が挙げられ、安全かつ低コストであるが、その一方で遊離アミノ酸やペプチドは乏しいため、*acidophilus* グループ A および B の 6 菌種 (*Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. crispatus*, and *Lb. gallinarum*)^{94,119)} における大部分の菌株は、何も添加されていない乳における生育が緩慢であることが知られている。酵母エキスやペプトンなどの添加によって、これら乳酸菌の乳中における緩慢な生育が改善可能であるが¹²⁰⁻¹²³⁾、添加した窒素源が製品の風味を損なう可能性が考えられる。また、乳培地のプロテアーゼ処理もしくはその分解産物の添加による、*Lb. gasseri* を含む *acidophilus* グループ乳酸菌の生育改善に関する報告¹²⁴⁻¹²⁶⁾ もあるが、産業レベルではコストが問題となる。さらに、代表的なヨーグルトスターター乳酸菌である *Streptococcus thermophilus* との共培養によって *Lb. acidophilus* の乳中における生育改善が可能であることも報告されているが¹²⁷⁾、バクテリオシン生産株の場合にはスターター乳酸菌の生育を阻害する可能性が考えられる。また、乳をベースとする培地の場合では、乳中のカゼインタンパク質がバクテリオシンを吸着することで、バクテリオシンの活性と回収を阻害する¹²⁸⁾ 可能性がある。さらに、乳中で豊富に含まれる二価金属イオン (Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , および Mn^{+2} など) が GT の生産を阻害する^{123, 129)} ことも知られており、乳アレルギーのリスクまでを考えると、乳培地はバクテリオシンの

生産には不向きと考えられる。

研究分野において lactobacilli の培養に多用される MRS 人工合成培地¹³⁰⁾ は、乳成分を含まないことから、バクテリオシンおよび菌体の生産と回収に向いているが、コストが高く、人体に有害とされる MnSO_4 ¹³¹⁻¹³⁵⁾ を含有しているため、食品への応用には不向きである。

そこで、本章では MRS 培地の組成より全ての窒素源成分を安価で安全な食品添加用酵母エキスへ置換し、人体に有害な MnSO_4 を除去することで、*Lb. gasseri* 向けの低コストな完全食品グレード培地の開発を試みた。さらに、開発した食品グレード培地を用いた、各ガセリシン (GA、GT、および GS) における食品グレード生産を目指した。

第 2 節

材料および方法

2-2-1. 試薬

本実験において、特に断りのない限り、和光純薬工業株式会社（大阪）の特級試薬または一級試薬を用いた。

2-2-2. 器具、培地および試薬類の滅菌

本実験において使用する器具、培地および試薬類の滅菌処理は、特に断りのない限りオートクレーブ滅菌機（SDL-320、TOMY、東京）を用い、121℃、15 min の条件で行った。例外的に 12% (w/v) reconstituted skim milk (RSM)（還元脱脂乳培地、森永乳業、東京）は 110℃、10 min の条件で滅菌した。

2-2-3. 使用菌株および培地

本実験で用いた菌株は Table 2-1 にまとめた *Lb. gasseri* 6 菌株：JCM 1131^T、JCM 1131、JCM 5343、JCM 8790、JCM 11046(LA158)、および JCM 11657 (LA39)；さらに lactobacilli の 3 基準株：*Lb. acidophilus* JCM 1132^T、*Lb. casei* JCM 1134^T、および *Lb. helveticus* JCM 1120；バクテリオシン活性測定における指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T の計 10 菌株は Japan Collection of Microorganisms (JCM: 理化学研究所、茨城) より入手した。これらの菌株は MRS 培地 (Oxoid Ltd, Hampshire, England) により 37℃、24 h の条件で培養した。

9 種の食品添加用酵母エキスを 3 社より入手し (キリン共和フーズ、

東京：S、SA-M、SA-R、SL-W、FR、KOUMI powder、および KOUMI paste；キリンフードテック、兵庫：HR；三栄源 FFI、大阪：RN-1)、食品グレード培地 (FGM) の作製に用いられた。

MRS 培地より窒素源成分と MnSO_4 を除去し、0.9% (w/v) 量の食品添加用酵母エキスを添加することで、計 9 種の FGM を作製した。MRS 培地と FGM の組成については Table 2-2 にまとめた。

2-2-4. バクテリオシン活性測定

バクテリオシン抗菌活性は寒天拡散法 (agar-well diffusion method) により、Tagg と McGiven¹³⁶⁾ の方法を改良した Toba らの方法¹³⁷⁾ に従って、以下の通りに測定した。

指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T の 18-24 h 培養液を MRS 培地で 10 倍希釈し、そのうち 250 μL を、105°C、5 min にて加熱溶解後 55°C で恒温保持した MRS 軟寒天培地 [0.75% (w/v) 寒天、AGAR BACTERIOLOGICAL, Oxoid, UK] 10 mL に混合した後、MRS 寒天平板培地 [1.5% (w/v) 寒天、Oxoid] に重層して固化させた。次いで、コルクボーラー No.2 (直径 6 mm) を用いて試料注入孔を作製し、 2^n (n: 整数) 倍に段階希釈した各試料溶液 65 μL をウェルに注入後、37°C、18 h にて培養した。希釈溶媒には滅菌済み 0.85% PBS を用いた。抗菌活性値は、生育阻止円の認められた最も高い希釈度の逆数と定義し、その単位を Arbitrary Unit (AU) で表した。

2-2-5. 還元脱脂乳培地における *Lb. gasseri* の生育

Lb. gasseri 6 菌株 [JCM 1131^T、JCM 1131、JCM 5343、JCM 8790、JCM 11046 (LA158)、および JCM 11657 (LA39)] の MRS 培地培養菌液 (37°C, 24 h) を 12% RSM 培地に対して 3% (v/v) 量で接種後、37°C で 120 h 培養した。その際、培養 24 h ごとに pH を 3 連で測定した。

2-2-6. *Lb. gasseri* JCM 1131^Tに対する生育促進効果を指標とした最適な食品添加用酵母エキスの選抜

Lb. gasseri JCM 1131^T の MRS 培地培養菌液 (37°C, 24 h) より MRS 培地成分を除去するため、菌体洗浄を行った。*Lb. gasseri* JCM 1131^T の菌液を遠心分離 (8,000×*g*, 10 min, 4°C) 後、上清を捨て、0.85% PBS で菌体を懸濁した。これをもう一度行い、菌体を各 FGM (計 9 種) で懸濁後、同一の FGM に対して 5% (v/v) 量で接種した。

37°C, 24 h の条件で培養後、少なくとも 3 連以上で菌体濁度 (optical density at 620 nm: O.D.₆₂₀; 5 倍希釈値) を測定した。Tukey's test において P<0.05 の場合に有意差ありと判断した。

2-2-7. 選抜 FGM における供試 *Lb. gasseri* および lactobacilli の生育試験

方法 2-2-6 における結果より、5 種類の FGM (FGM-FR、-S、-KOUMI poder、-SA-M、および -KOUMI paste) が選抜された。

供試 *Lb. gasseri* 5 菌株 (JCM 1130、5343、8790、11046、および 11657) および lactobacilli 3 菌種の基準株 (*Lb. acidophilus* JCM 1132^T、*Lb. casei* JCM 1134^T、および *Lb. helveticus* JCM 1120^T)

が 5 種の FGM に対して方法 2-2-6 と同様に接種され、37℃, 24 h の条件で培養後、少なくとも 3 連以上で O.D.₆₂₀ を測定した。

Tukey's test において $P < 0.05$ の場合に有意差ありと判断した。

2-2-8. ガセリシンにおける最適な食品グレード生産条件の検討

ガセリシン A (GA) 生産株の *Lb. gasseri* JCM 11657 (LA39)、およびガセリシン T (GT) 生産株の *Lb. gasseri* JCM 11046 (LA158) を MRS 培地、もしくは異なる濃度の酵母エキス FR (0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, および 2.0%) と Tween 80 (0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, および 0.4%) を含有する FGM-FR で培養 (37℃, 24 h) 後、菌体不含培養上清を取得し、方法 2-2-4 のバクテリオシン活性測定に供した。

バクテリオシン生産量を指標として FGM-FR における二成分 (酵母エキス FR および Tween 80) の最適濃度を決定後、最適化した FGM-FR で各時間培養 (37℃) し、培養上清中のバクテリオシン活性を同様に測定した。

Table 2-1. The strains used in this study.

Bacterial strain	Description	Reference or source
<i>Lb. gasseri</i> LA39 (JCM 11657)	Producer strain of Gassericin A	Laboratory collection
LA158 (JCM 11046)	Producer strain of Gassericin T, plasmid free	Laboratory collection
JCM 1131 ^T (=ATCC33323)	Indicator strain for growth stimulation effect of FGM ^b	JCM ^a
JCM 1130	Indicator strain for growth stimulation effect of FGM ^b	JCM ^a
JCM 5343	Indicator strain for growth stimulation effect of FGM ^b	JCM ^a
JCM 8790	Indicator strain for growth stimulation effect of FGM ^b	JCM ^a
<i>Lb. helveticus</i> JCM 1120 ^T	Indicator strain for growth stimulation effect of FGM ^b	JCM ^a
<i>Lb. acidophilus</i> JCM 1132 ^T	Indicator strain for growth stimulation effect of FGM ^b	JCM ^a
<i>Lb. casei</i> JCM 1134 ^T	Indicator strain for growth stimulation effect of FGM ^b	JCM ^a
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM1002 ^T	Indicator strain for bacteriocin activity assay	JCM ^a

^aJCM, Japan Collection of Microorganisms, Tsukuba, Japan.

^bFGM, food grade medium.

Table 2-2. The composition of MRS broth and food grade media.

Ingredients	Concentration (g/L)
< MRS broth >	
D-glucose	20.0
Peptone	10.0
Lab-Lemco powder (Beef extract)	8.0
Laboratory yeast extract	4.0
Sorbitan mono-oleate (Tween 80)	1.0*
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate 3H ₂ O	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.2
Manganese sulphate 4H ₂ O	0.05
< FGM >	
D-glucose	20.0
Food-grade yeast extract	9.0
Sorbitan mono-oleate (Tween 80)	1.0*
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate 3H ₂ O	5.0
Triammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.2

*: mL/L

第 3 節

結果

2-3-1. 還元脱脂乳培地における *Lb. gasseri* の生育

12%RSM 培地における供試 *Lb. gasseri* の生育試験の結果、全ての菌株が pH 5 を下回るまでに少なくとも 48-72 h の培養 (37°C) を要するという、非常に緩慢な生育が示された (Fig. 2-1)。そのなかでも、JCM 5343 は培養 120 h 後も pH が 5 を上回り、最低の生育を示した。また、JCM 1131^T と JCM 1130 の 2 株のみが pH 4.6 を下回った (それぞれ pH 4.37 および pH 4.47)。

2-3-2. 試作 FGM における *Lb. gasseri* JCM 1131^T の生育

各食品添加用酵母エキスの生育促進効果を比較するため、試作 FGM (9 種) における *Lb. gasseri* JCM 1131^T の生育を試験した。窒素源として用いられた食品添加用酵母エキスによって、*Lb. gasseri* JCM 1131^T の生育 (菌体濁度、5 倍希釈値) は大きく異なった。酵母エキス SA-R が示した最低の O.D._{620 nm} 値が 0.244 であったのに対し、酵母エキス FR は最大の O.D._{620 nm} 値 (P<0.05) となる 0.606 を示し、MRS 培地培養時 (0.886) には及ばなかったが、高い生育促進効果を示した (Fig. 2-2)。

この FR を生育促進効果が最大の酵母エキスとして選抜し、これを用いた FGM を FGM-FR と命名した。

2-3-3. 選抜 FGM における供試 *Lb. gasseri* および lactobacilli の生育

各 FGM における *Lb. gasseri* JCM 1131^T の生育結果により、生育促進効果が最大の FGM-FR に加えて、同効果が高かった 2 種 (FGM-S および FGM-KOUMI powder) と低かった 2 種 (FGM-SA-M および FGM-KOUMI paste) の計 5 種が選抜された。

Fig. 2-3 と Fig. 2-4 はそれぞれ、選抜 FGM における供試 *Lb. gasseri* 株 (JCM 1130, 5343, 8790, 11046 (LA158), および 11657 (LA39)) および供試 lactobacilli 基準株 (*Lb. helveticus* JCM 1120, *Lb. acidophilus* JCM 1132^T, *Lb. casei* JCM 1134^T) の菌体濁度 (5 倍希釈値) を示している。

Lb. helveticus JCM 1120^T と *Lb. casei* JCM 1134^T を除く全ての菌株が *Lb. gasseri* JCM 1131^T と同様に、選抜 FGM 中で FGM-FR, FGM-S, および FGM-KOUMI powder において最大の生育を示した。なかでも、*Lb. gasseri* JCM 1130 以外の菌株は、供試 FGM 中で FGM-FR において最大の O.D._{620 nm} 値を示し、MRS 培地培養時を上回る菌株も存在した。

2-3-4. ガセリシンにおける最適な食品グレード生産条件の検討

はじめに酵母エキス FR の添加量 (初期添加量は 0.9%) について検討を行った結果、GA は 0.9-2.0%、GT では 1.5% 添加において最大の活性 (GA : 246 AU/mL および GT : 15,754 AU/mL) が得られた (Table 2-3)。次いで、Tween 80 の低減 (初期添加量は 0.1% 量) について検討を行った結果、GA では 0.02%、GT の場合には 0.075% まで減量しても初期の活性値 (GA : 246 AU/mL および GT : 15,754 AU/mL) が維持された (Table 2-4)。これらの結果より、GA 生産時

(酵母エキス FR: 0.9% および Tween 80: 0.02%) と GT 生産時 (酵母エキス FR: 1.5% および Tween 80: 0.075%) における FGM-FR の最適な成分濃度が決定された。

続いて、成分濃度を最適化した FGM-FR を用いて、GA および GT 生産時の至適培養時間について検討した結果、GA は培養 24 h で活性値が最大となり、GT では培養 24 h で 15,754 AU/mL に達した後、培養 60 h で最大活性値の 31,508 AU/mL となった (Fig. 2-5)。生産効率を優先した結果、GA と GT 生産時のいずれも 24h が最適な培養時間と考えられ、246 AU/mL および 15,754 AU/mL の食品グレード GA および GT が得られた。

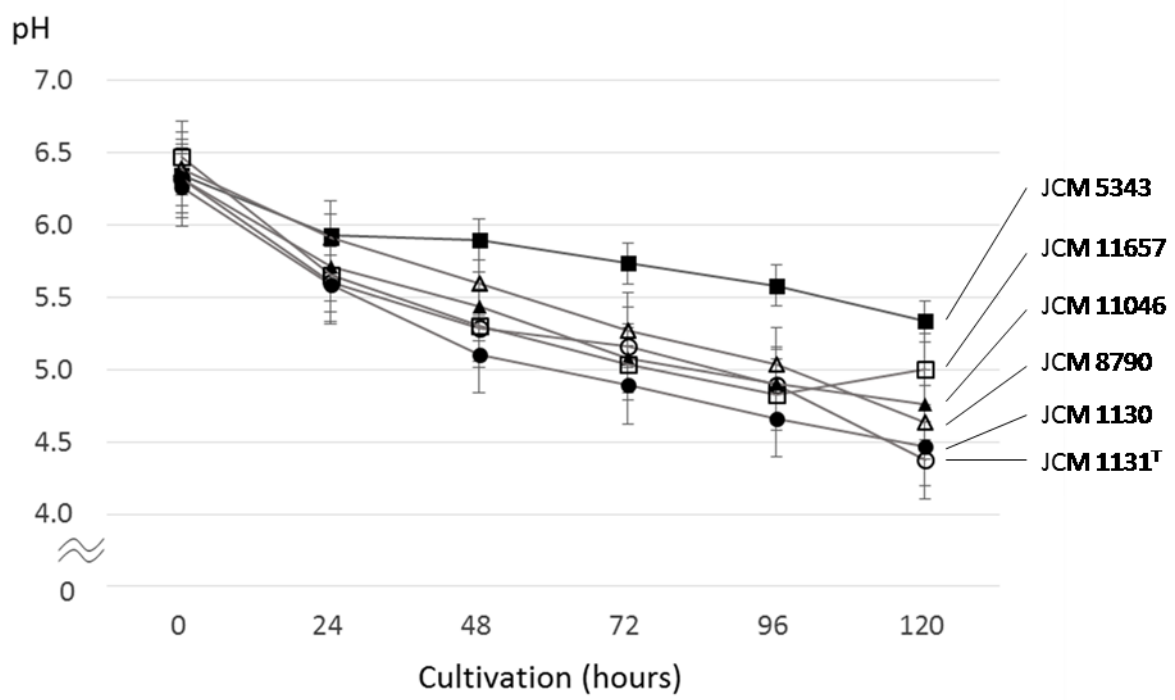


Fig. 2-1. Growth of *Lb. gasseri* JCM strains cultured at 37°C in 12% RSM (pH).

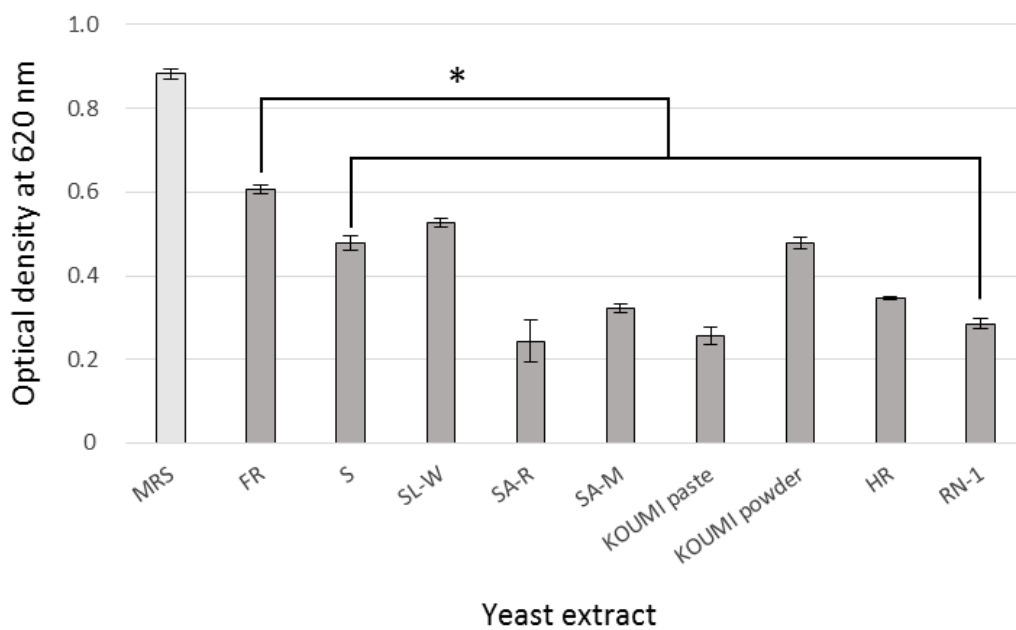


Fig. 2-2. Growth stimulation ability of each food grade yeast extract for *Lb. gasseri* JCM 1131^T (O.D._{620 nm}, value of five-times dilution).

All data indicate the mean value obtained from measurements in triplicate. * Significantly different (P < 0.05, Tukey's test)

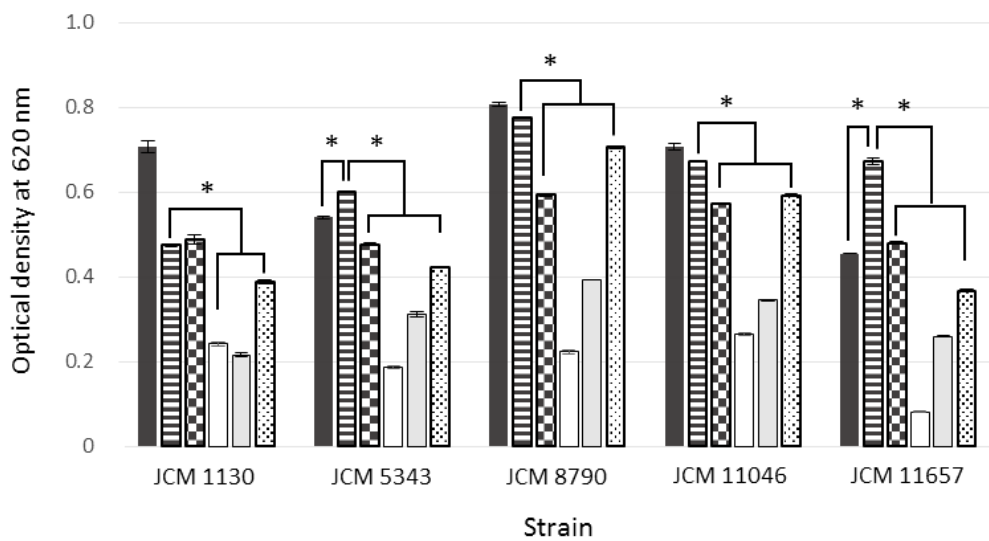


Fig. 2-3. Growth of *Lb. gasseri* JCM strains in selected FGM (O.D._{620 nm}, value of five-times dilution).

MRS (black); FGM-FR (stripe); FGM-S (checker pattern); FGM-SA-M (white); FGM-KOUMI paste (gray); FGM-KOUMI powder (dot pattern).

All data indicate the mean value obtained from measurements in triplicate.

* Significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test)

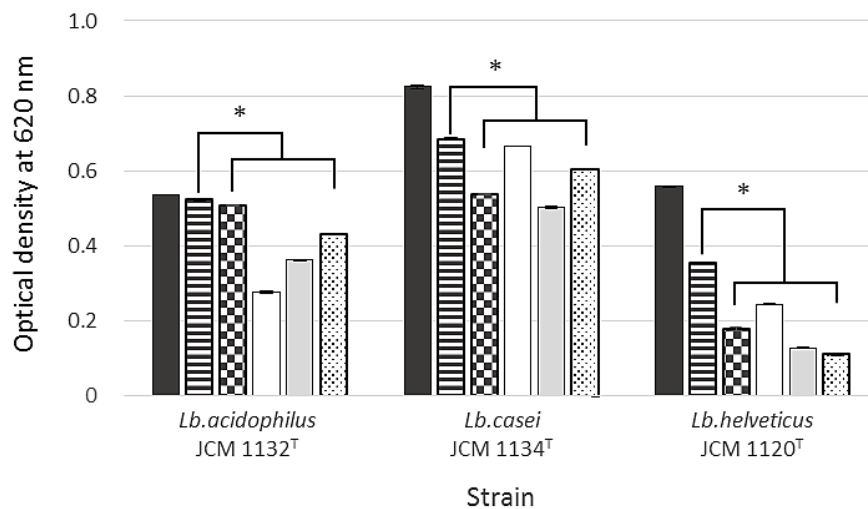


Fig. 2-4. Growth of lactobacilli typestrains in selected FGM (O.D._{620 nm}, value of five-times dilution).

MRS (black); FGM-FR (stripe); FGM-S (checker pattern); FGM-SA-M (white); FGM-KOUMI paste (gray); FGM-KOUMI powder (dot pattern).

All data indicate the mean value obtained from measurements in triplicate.

* Significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test)

Table 2-3. Effect of FR amount in FGM-FR on GA and GT production (cultivation at 37°C, 24 h).

「FR」 content (%)	Bacteriocin activity (AU/mL) ^a	
	GA ^b	GT ^c
0.3	0	123
0.6	123	1,969
0.9	246	3,938
1.5	246	15,754
2.0	246	492

^a Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T

^b GA: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA39

^c GT: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158

Table 2-4. Effect of Tween 80 amount in FGM-FR on GA and GT production (cultivation at 37°C, 24 h).

Tween 80 content (%)	Bacteriocin activity (AU/mL)	
	GA ^a	GT ^b
0.01	0	246
0.02	246	1,969
0.05	246	1,969
0.075	246	3,938
0.10	246	3,938
0.20	492	3,938
0.40	492	3,938

^a Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T

^b GA: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA39

^c GT: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158

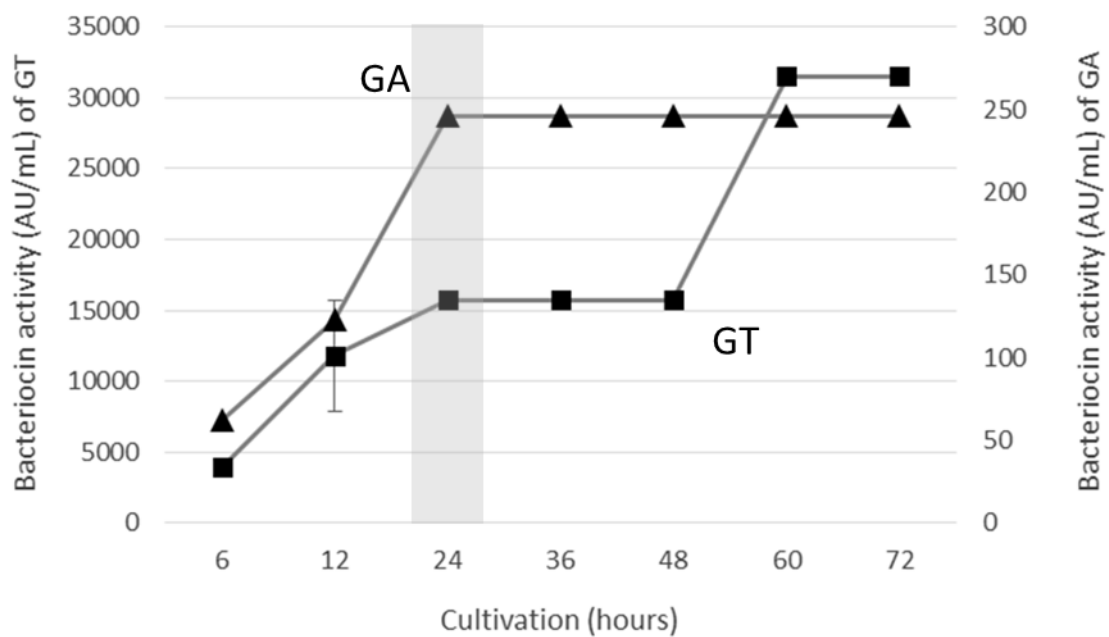


Fig. 2-5. Effect of cultivation time (at 37°C) on GA and GT production in optimized FGM-FR (GA: FR-0.9% and Tween 80-0.02%; GT: FR-1.5% and Tween 80-0.075%).

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T

All data indicating the mean value obtained from triplicates.

第 4 節

考察

当研究室で見出し、報告してきた *Lb. gasseri* 由来のバクテリオシン（ガセリシン）である、ガセリシン A（GA）およびガセリシン T（GT）は、pH 安定性と耐熱性に優れ、乳酸菌およびグラム陽性の食中毒・病原性菌（*Staph. aureus*, *List. monocytogenes*, および *B. cereus*）にも効果を示すなど、特に食品保蔵剤として優れた特性を有している。バクテリオシンを実際に食品へ応用するには、食品グレード生産系の確立が必須となり、そのためには、食品への添加が許可された成分のみで構成される食品グレード培地を用いた生産株の培養が求められる。また、産業的な側面からこの食品グレード培地は安全であると同時に、低コストであることが求められる。

そこで本研究では、バクテリオシンの生産および回収に適している一方で、コストが高く（約 1,800 円/L）、人体に有害な成分を含有する MRS 培地をベースとする低コストな完全食品グレード培地の開発と、それを用いたガセリシンの生産を目指した。

供試 *Lb. gasseri* の 12%還元脱脂乳（RSM）培地における生育を試験した結果、最も高い生育性を示した JCM 1131^T は 37℃、120h という長期間の培養によって pH 4.5 を下回り（Fig. 2-1）、窒素源を添加しなくても生育が可能である可能性が示されたが、接種菌液より持ち込んだ MRS 培地成分の関与も否定できなかった。比較のため、1%量（w/v）の培地用酵母エキス D-3（日本製薬、東京）を添加した脱脂乳培地を用いて JCM 1131^T を培養した結果、37℃、24 h 後に pH が 4.01 まで低下し（data not shown）、窒素源無添加時の生育が非常に緩慢であることが改めて示された。

食品グレード培地 (FGM) の作製に向けた窒素源としての食品添加用酵母エキスを選抜するため、供試酵母エキスの *Lb. gasseri* JCM 1131^T に対する生育促進効果を比較した結果、酵母エキス FR による生育促進効果が最大となり、供試した酵母エキスによって JCM 1131^T の生育が大きく異なった (Fig. 2-2)。Arakawa ら (2015)¹²⁴⁾ は、*Lb. gasseri* が乳中で生育するための窒素源としてタンパク質やアミノ酸ではなくペプチドを要求し、特にエンドペプチダーゼであるペプシンで分解処理した乳培地では極めて生育が高くなることを報告している。また、Gandhi ら (2014)¹³⁸⁾ は乳タンパク質のプロテアーゼ分解産物のうち、比較的に高分子 (>10 kDa) のペプチドを添加した場合に、*Lb. acidophilus* の RSM 培地における生育が改善されることを報告している。したがって、酵母エキス FR が有する *Lb. gasseri* JCM 1131^T に対する高い生育促進には、特に含有されるペプチドの量およびサイズが関係している可能性が考えられる。

この酵母エキス FR を用いて作製した FGM (FGM-FR) は小売価格計算で約 160 円/L と脱脂乳培地 (小売価格計算で約 240 円/L) よりも低コストであり、*Lb. gasseri* 向けの優れた培地であることが期待された。そこで、*Lb. gasseri* の他菌株 (JCM 1131, 5343, 8790, 11046, および 11657) の FGM-FR における生育も試験した結果、全ての株が FGM-FR において十分な生育を示し、MRS 培地における生育を上回る菌株も存在した (Fig. 2-3)。JCM 1130 については、FGM-FR における生育が MRS 培地よりもやや劣っていたが、Oxoid 社の MRS 培地には合計で 2.2% (w/v) 量相当の窒素源成分が含まれていることから、酵母エキス FR の添加量 (0.9%) を増加することによってさらに高い生育促進効果を得られる可能性が考えられた。次いで、*Lb. gasseri* 以外の乳酸桿菌 (*Lb. acidophilus* JCM 1132^T, *Lb.*

casei JCM 1134^T, および *Lb. helveticus* JCM 1120^T) に対しても FGR-FR は十分な生育促進効果を示し (Fig. 2-4)、FGM-FR は lactobacilli 全体に対しても有用な培地である可能性が考えられた。

次に、FGM-FR を用いたガセリシンの最適な食品グレード生産条件を確立するため、食品添加用酵母エキス FR および Tween80 の添加量、そして培養時間の 3 点について検討を行った。酵母エキス FR の最適な添加量について検討した結果、GA 生産時は添加量 0.9 - 2.0%において最大の活性 (246 AU/mL) が得られた。これに対して GT 生産時には、添加量 1.5%において最大活性 (15,754 AU/mL) が得られた一方、過剰な添加 (2.0%) はむしろ生産量の大幅な低下 (492AU/mL) を招いた (Table 2-3)。Arakawa ら (2008) ¹²³⁾ および Guo ら (2014) ¹²⁹⁾ は Mn⁺², Ca⁺², Mg⁺², Fe⁺², および Zn⁺² などの二価金属イオンによる *Lb. gasseri* SBT2055 の GT 生産阻害について報告している。また、MRS 培地を開発した de Man ら (1960) ¹³⁰⁾ は、Mn を lactobacilli の生育に重要で不可欠な成分として言及していたにも関わらず、本研究で供試した全ての乳酸桿菌株が MnSO₄ 無添加の FGM-FR において問題なく生育した。これらの結果は、酵母エキス FR が Mn などの金属イオンを豊富に含有している可能性を示している。

Tween 80 は脂肪酸 (C18:1、オレイン酸) の供給源であり、細菌の生育にとって非常に重要な成分の一つであるが、バクテリオシンとの強固な複合体の形成によってバクテリオシン精製時には障害となることが知られている ^{139,140)}。そこで、Tween 80 のオレイン酸への置換を試みたが、GA および GT を生産することは不可能であった (data not shown)。ついで、Tween 80 (初期添加量 0.1%) の低減化について検討した結果、GA 生産時は 0.02%、そして GT 生産時に

は 0.075%まで減量してもバクテリオシン生産量には影響しないことが明らかとなった (Table 2-4)。

さらに、主要成分濃度を最適化した FGM-FR (GA-酵母エキス FR : 0.9%、Tween 80 : 0.02% ; GT-酵母エキス FR : 1.5%、Tween 80 : 0.075%) を用いて、各ガセリシン生産時における最適な培養時間について検討した結果、GA および GT どちらの生産時にも培養 24 h が最適であると考えられた。GT 生産時については、培養時間の延長 (60 h 以上) によってさらに高い生産量が得られたが (15,754 AU/mL → 31,508 AU/mL、Fig. 2-5)、工業レベルでの生産を考慮した場合には完全な無菌的条件での培養が困難であり、長時間の培養は混入菌による変質のリスクがあるという点、生産効率としては培養 24 h の方が高いという点から、最適な培養時間として 24 h を選択した。これらの検討より、各ガセリシンにおける最適な食品グレード生産の条件を決定した結果、GA (246AU/mL) と GT (15,754 AU/mL) の高い生産量が得られ、これらの活性値は MRS 培地培養時 (GA : 492 AU/mL ; GT : 15,754 AU/mL) と同等であった。GA および GT の生産用に最適化した FGM-FR のコストは、それぞれ約 129 円/L および約 155 円/L (小売価格計算) と MRS 培地 (Oxoid 社製、約 1,800 円/L) の少なくとも 1/10 以下であることを鑑みると、FGM-FR は *Lb. gasseri* とそのバクテリオシンにおける利用性の拡大への貢献が期待された。

さらに、GS についても食品グレード生産を試み、FGM-FR (酵母エキス FR : 0.9%、Tween 80 : 0.1%) によって GS 生産株 (*Lb. gasseri* LA327 Δ gatAX) を培養 (37°C, 24 h) した結果、MRS 培地培養時 (123 AU/mL) よりも高い活性 (985AU/mL) が得られた (data not shown)。GS を含む Class II バクテリオシンは通常、三成分制御系

と呼ばれるクォーラムセンシング機構に関与する遺伝子とその遺伝子クラスター内にコードし、生産を制御している^{141,142)}。しかしながら、GS (二成分性バクテリオシン、class IIb) はその遺伝子クラスターに三成分制御系に関連する遺伝子を一切コードしていないことから (第3章にて説明)、異なる制御機構を有している可能性も考えられる。近年、標的菌体の存在を感知してバクテリオシン生産を制御する、三成分制御系とは異なるクォーラムセンシング機構の存在も提唱されてきており、特に *Lb. plantarum* NC8 が生産する二成分性 (class IIb) バクテリオシンである Plantaricin NC8 は、標的菌の加熱殺菌体の存在によっても生産促進されることが報告されている¹⁴³⁾。MRS 培地における窒素源成分が牛・豚肉エキス主体であることもあり、酵母エキス FR に含まれる酵母菌体成分が GS における上記のような制御系を刺激した結果、FGM-FR における GS 生産量が特異的に高まった可能性があり、今後の検討課題としても重要な事象である。

MRS 培地の改変に関する研究例はあまり多くはないが、Champagne ら (2003)¹⁴⁴⁾ は全ての窒素源成分を酵母エキスのみに置換した MRS 培地によって *Lb. acidophilus* を培養することに成功している。しかしながら、彼らの目的は酵母エキスによる生育促進効果の比較のみであり、 MnSO_4 の除去による食品グレード化は行っていない。したがって、本研究は MRS 培地を完全食品グレード化した初の研究例である。

第 3 章

gas 遺伝子発現株の構築と GS における二成分性および特性の解析

第 1 節

諸言

当研究室では、*Lb. gasei* LA39 より生産される環状バクテリオシンのガセリシン A (GA)、および *Lb. gasei* LA158 によって生産される二成分性バクテリオシンである、ガセリシン T (GT、GatA および GatX) を見出し、報告してきた。二成分性 (class IIb) バクテリオシンは 2 種類のペプチドによって構成されるバクテリオシンであり、これらは基本的に等濃度で組み合わせることで、相乗効果によって最大の活性を示すことが知られている^{145,147)}。*Lc. lactis* subsp. *lactis* LMG2081 より最初の二成分性バクテリオシンである Lactococcin G¹⁴⁸⁾ が発見されて以来、少なくとも 15 種以上の class IIb バクテリオシンが単離および特性解析されてきている¹⁴⁹⁾ (Fig. 3-1)。そして、これらは N 末端側に 15-30 残基のリーダー配列を有した前駆体として生合成された後、ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターによって 2 連続の Gly 残基 (GG モチーフ) のすぐ C 末端側で切断され、菌体外に輸送される^{150,151)}。このリーダー配列は、ABC トランスポーターとの相互作用を強化し、菌体内においてバクテリオシンを不活性の状態に保持する機能を有すると考えられている。前駆体をコードする 2 つの構造遺伝子は、同一のオペロン内で互いに隣り合って存在するとされ^{146,147)}、同一の発現量が予想されることは、二成分の最適な作用比率が 1 : 1 であることにも一致している。そして、これら構造遺伝子のすぐ下流には自己耐性

遺伝子がコードされることが一般的に知られており、バクテリオシンと自己耐性タンパク質の発現は共通の制御を受けていることが予想されている^{152,153}。

Plantaricin E/F, Plantaricin J/K, Lactococcin G, および Lactacin F を含む作用機序を試験された全ての二成分性バクテリオシンが、標的細菌からの低分子物質 (ATP や Na^+ , K^+ , Li^+ , H^+ , および Mg^{+2} などのイオン) の漏出を示している¹⁵⁴⁻¹⁵⁷。実際に、リポソームを用いた実験によって GT は Cl^- を漏出させることが確認されている¹⁰⁸。

また、これまでに同定された全ての二成分性バクテリオシンは、膜貫通タンパク質において普遍的に認められ、helix-helix 間の相互作用を仲介する GxxxG モチーフもしくは類似モチーフ (AxxxA および SxxxS)^{158,159} を有することが分かっている。 α -helix は 4-5 残基で 1 周するため、この GxxxG モチーフにおける両端の Gly 残基が垂直に並ぶことにより、helix 同士の密接な相互作用に向けた平らなサイトを作り出し、ファンデルワールス力を高め、2 つのペプチドにおける会合を補助することが予測されている。

39 残基の LcnG- α と 35 残基の LcnG- β によって構成される Lactococcin G は、最も特性解析の進んだ二成分性バクテリオシンであり、標的細胞膜中における構造モデルと配向性が推定されている^{148,154,155,160,161}。NMR 構造研究により、LcnG- α は DPC ミセルもしくはトリフルオロエタノール (TFE) の存在下でのみ、N/C 両末端 (3-21 および 24-34 残基目) において α -helix を示すことが明らかにされた¹⁶¹。また、LcnG- β の場合は TFE の存在下では N/C 両末端 (11-19 および 23-32 残基目) において α -helix を示したが、DPC ミセルの存在下では N 末端側 (11-19 残基目) しか示さなかった。

さらに、LcnG- α は 2 つ ($G_{7xxx}G_{11}$ および $G_{18xxx}G_{22}$)、そして LcnG- β は 1 つ ($G_{18xxx}G_{22}$) の $G_{xxx}G$ モチーフを有しており (Fig. 3-1)、標的細胞膜において LcnG- α の $G_{7xxx}G_{11}$ と LcnG- β の $G_{18xxx}G_{22}$ が相互作用するモデルが提唱されている (Fig. 3-2)。GT でも推定の $G_{xxx}G$ モチーフが多数存在しており、これらの Gly 残基を Leu 残基に置換した結果、GatX における $G_{40xxx}G_{44}$ を除く全モチーフの改変が GT の抗菌活性を大幅に低下させた (Fig. 3-3 および Table 3-1)¹⁶²⁾。一般的に、二成分性バクテリオシンはシングルペプチドバクテリオシンに比べ、抗菌スペクトルが広いことが知られているが¹⁴⁵⁾、これらのモチーフによって各ペプチド同士の多様な会合パターンが得られる可能性に起因しているかも知れない。

Matijasic ら (1998)⁹⁶⁾ は *Lb. gasseri* LF221 が生産する Acidocin LF221A (Acd LF221A) および Acidocin LF221B (Acd LF221B) について報告し、後者の Acd LF221B は GT の類縁体であったが、前者の Acd LF221A については他に相同性の高いバクテリオシンが存在せず、第 3 のガセリシンであることが明らかとなった。その後、2004 年には Acd LF221A の 3 ORFs によって構成される推定遺伝子クラスター (Fig. 1-6) が特定され、Acd LF221A は二成分性バクテリオシン (Acd 221 α + Acd 221A) である可能性が示された⁹⁷⁾。しかしながら、1 番目のペプチド (Acd 221 α) は N 末端領域における配列が未決定であり、実際に単離精製されたのは 2 番目のペプチド (Acd221A) のみであることから、Acd LF221A が本当に二成分性バクテリオシンであるかは未証明である。さらに、Acd LF221A に関する研究報告は 2004 年以降に途絶え、特性などについては、ほとんど解明されていないのが現状である。また、当研究室で保有する *Lb. gasseri* において各ガセリシン構造遺伝子 (GA: *gaaA*, GT: *gatAX*,

および Acd LF221A: *acd 221A*) の保有状況を確認した結果、ヒト大腸組織由来の *Lb. gasseri* LA327 において GT と Acd LF221A の構造遺伝子が検出され、特に Acd LF221A に関する全長配列の決定と特性解析が期待された。

しかしながら、GT と Acd LF221A には多数の類縁体が報告されているにも関わらず¹⁶³⁻¹⁶⁵、いずれも一方のペプチドのみが単離精製されたに過ぎず、これらが本当に二成分性バクテリオシンであるかの証明も含め、特性の解析は不十分なままである。このように、*Lb. gasseri* 由来の二成分性バクテリオシンにおいて完全精製に成功した例が無い¹⁶³⁻¹⁶⁵ため、*Lb. gasseri* LA327 において検出された推定 Acd LF221A における、従来の精製技術に頼った特性解析は困難であると考えられた。そこで、本章では推定 Acd LF221A (Acd 221 α + Acd 221A) を単独で生産する発現株の構築による、二成分性の証明および食品への応用に向けた諸性質の解明を目指した。

Lactococcin G	LcnG- α	GTWDDI GQGI GRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKH
	LcnG- β	KKWGWLAWVDPAYEFIK GF GKGA IK EGNKDKWKNI
Lactococcin Q	LcnQ α	SIWGD I GQGVGKAAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKH
	LcnQ β	KKWGWLAWVEPAGEFLK GF GKGA IK EGNKDKWKNI
Enterocin 1071	Ent α	ESVFSKI GN AVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH
	Ent β	GPGKWL P WLPAYDFVT GL AK GI KEGNKDKWKNV
Plantaricin E/F	PlnE	FNRG GN FGKSVRHVVD AI GS V AG IR GILKSIR
	PlnF	VFHAYSARGVRRNNYKSAVGPADWVISA VR GF I H G
Plantaricin J/K	PlnJ	GAWKNFWS SL RKGFYDGEAGRAIRR
	PlnK	RRSRKNGI GY A IG YAFCAVERAVLGGSRDY NK
Plantaricin S	Pls α	RNKLAYNM GH YAGKATIFGLAAWALLA
	Pls β	KKKQSWYAAAGDAIVSFGEGFLNAW
Plantaricin NC8	PLNC8 α	DLTKLWSSW GY YL G KKARWNLKHPYVQ F
	PLNC8 β	SVPTSVYTLG IK ILWSAYK HR KT IE KSFNKGFYH
Lactacin F	LafA	RNNWQTN V GGAVGSAM IG AT V GGT IC GPACAVAGAHYLPILWTGVTAATGGFGKIRK
	LafX	NRWGD T VL SA ASGAGT G IKACKSFGPWGMAICGVGAA IG GY F GYTHN
Brochocin-C	BrcA	YSSKDCL K DI G KGIGAGTVAGAAGG LA AG L GAIPGAFVGAHF GV IGG SA AC I G GL LN
	BrcB	KINW GN VGGSCVGGAVIGGALGGLGGAGGGCITGAIGSIWDQW
Thermophilin 13	ThmA	YSGKDCL K DMGGYALAGAGSGALWGAPAG GV GALPGAFVGAHVGA T AG GF ACM GG M I GNKFN
	ThmB	QINW GS VVGH C IGG AI GGAFSGGAAAG V GCLVGS G KAI IN GL
ABP-118	Abp118 α	KRGPNCV GN FLGGLFAGAAAGVPL G PAGIVGGANLGMVGGAL T CL
	Abp118 β	KNGYGGSGNRWVHCGA GI VGGALIG AI GGPWSAVAGG I SG F TSCR
Salivaricin P	Sln1	KRGPNCV GN FLGGLFAGAAAGVPL G PAGIVGGANLGMVGGAL T CL
	Sln2	KNGYGGSGNRWVHCGA GI VGGALIG AI GGPWSAVAGG I SG F ASCH
Mutacin IV	NlmA	KVSGGEAVAAIGICATASAA T GGLAGATLVTPYCVGTWGLIRSH
	NlmB	DKQAAD T FLSAVGGAA S GFTYCASNGVWHYPYILAGCAGVGA V GS V VFP H
Lactocin 705	705 α	GMS GY I Q GI P DFLKG YL H C ISAANKHKKGRLGY
	705 β	GF WGG I GY I AGRVGAAY G HAQASANNHHSP IN G

Fig. 3-1. Amino acid sequences of characterized two-peptide bacteriocins. ¹⁴⁹⁾
The black markers are indicating deduced GxxxG, AxxxA, and SxxxS motif.

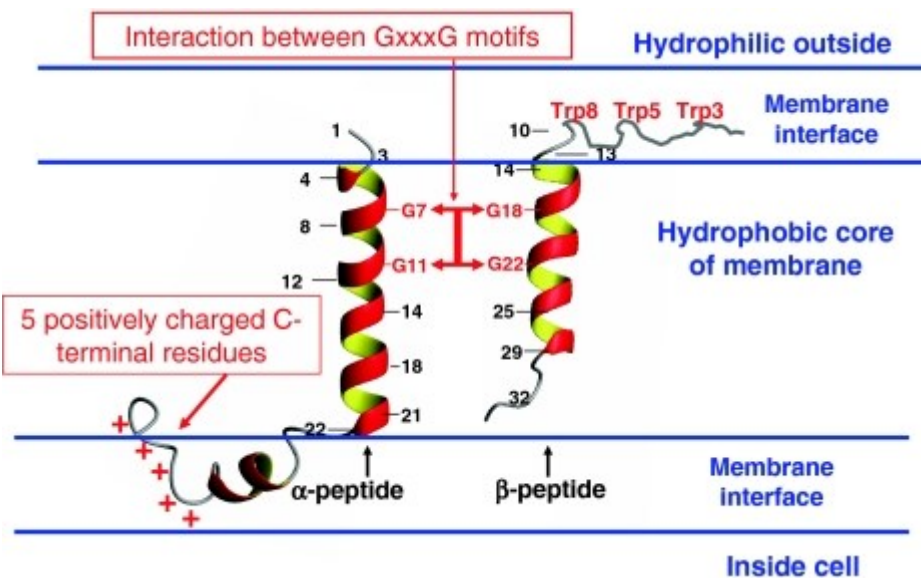


Fig. 3-2. The structural model of Lactococcin G and its orientation in the target cell membranes. ¹⁴⁹⁾

The two peptides interact through the G7xxxG11-motif in the α -peptide and the G18xxxG22-motif in the β -peptide and form a trans-membrane helix-helix structure. The highly positively charged and structurally flexible C-terminal end of the α -peptide is forced through the membrane by the trans-membrane potential (negative inside). The tryptophan residues in the structurally flexible N-terminal region of the β -peptide are in or near the outer membrane interface.

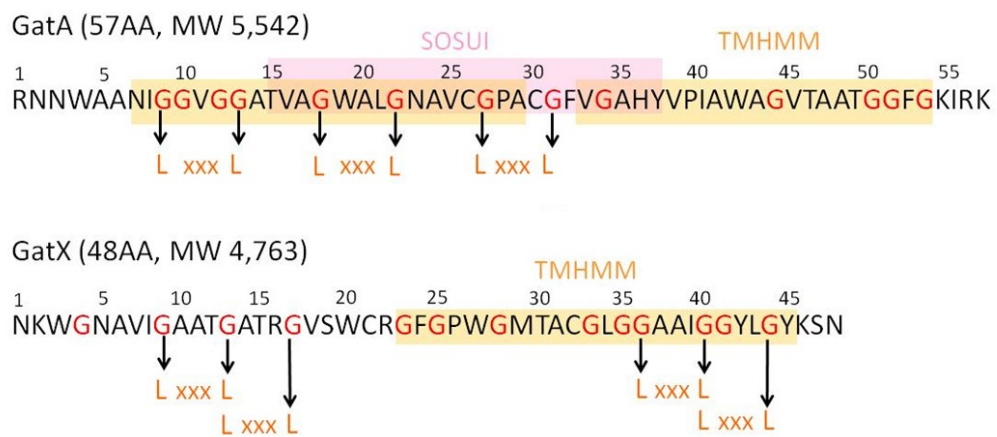


Fig. 3-3. The mutation point of deduced GxxxG motif in GT (GatA and GatX) from *Lb. gasseri* LA158¹⁶²⁾

SOSUI: SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>)
による推定膜貫通領域

TMHMM: TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)
による推定膜貫通領域

Table 3-1. Effect of destruction of deduced GxxxG motif in GatA and GatX on antimicrobial activity of GT from *Lb. gasseri* LA158. ¹⁶²⁾

Target motif	Mutated position	Activity(AU/65 μL)		Activity retention(%)	
		Gly	Leu	Gly	Leu
GatA-G ₉ xxxG ₁₃	GatA-G9, 13L	256	2	100	0.78
GatA-G ₁₈ xxxG ₂₂	GatA-G18, 22L	256	0	100	0
GatA-G ₂₇ xxxG ₃₁	GatA-G31L	256	1	100	0.39
GatX-G ₉ xxxG ₁₃	Not obtained	256	ND	100	ND
GatX-G ₁₃ xxxG ₁₇	GatX-G13, 17L	256	0	100	0
GatX-G ₃₆ xxxG ₄₀	GatX-G36, 40L	256	4	100	1.56
GatX-G ₄₀ xxxG ₄₄	GatX-G40, 44L	256	1,024	100	400

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

ND: Not done

第 2 節

材料および方法

3-2-1. 試薬

本実験において、特に断りのない限り、和光純薬工業株式会社（大阪）の特級試薬または一級試薬を用いた。

3-2-2. 器具、培地および試薬類の滅菌

本実験において使用する器具、培地および試薬類の滅菌処理は、特に断りのない限りオートクレーブ滅菌機（SDL-320、TOMY、東京）を用い、121℃、15 min の条件で行った。

3-2-3. 使用菌株、培地および培養条件

本実験で供された菌株とプラスミドを Table 3-2 にまとめた。ガセリシン A (Gassericin A, GA) 生産菌株はヒト乳児（4 ヶ月齢、男）糞便より分離した *Lb. gasseri* LA39 (JCM 11657)、ガセリシン T (Gassericin T, GT) 生産菌株はヒト乳児（6 ヶ月齢、女）糞便から単離した *Lb. gasseri* LA158 (JCM11046)、ガセリシン S (Gassericin S, GS) の生産菌株は、ヒト成人の大腸組織切片から単離した *Lb. gasseri* LA327 をそれぞれ用いた。バクテリオシン活性測定用の指標菌は、株式会社明治（研究本部、食機能科学研究所）より譲渡されたエリスロマイシン (Em) 耐性株 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2) を用いた。Lactobacilli は Difco Lactobacilli MRS 培地 (Becton, Dickinson and company, Detroit, MI, USA) に適宜エリスロマイシン (Erythromycin, Em, 5mg/mL, 50%エタノー

ルに溶解, -20℃保存) を添加し、37℃, 18-24 h の継代培養 (2-10% (v/v) 接種) を 2 回行なった後に各試験に供した。

プラスミド導入の中間宿主として、フローニンゲン大学 (MolGen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands) より譲渡された *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 および IL1403 を使用した。同株は GM17 培地 [0.5% (w/v) Glucose 添加 M17 培地 (BD)] にて適宜 Em を添加し、30℃, 18-24 h にて静置培養した。

3-2-4. バクテリオシン活性測定

バクテリオシン抗菌活性は寒天拡散法 (agar-well diffusion method) により、Tagg と McGiven の方法¹³⁶⁾ を改良した Toba らの方法¹³⁷⁾ に従って、以下の通りに測定した。

指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2) の 18-24 h 培養液を MRS 培地で 10 倍希釈し、そのうち 250 μL を、105℃, 5 min にて加熱溶解後 55℃ で恒温保持した MRS 軟寒天培地 [0.75% (w/v) 寒天、AGAR BACTERIOLOGICAL, Oxoid, UK] 10 mL に混合した後、MRS 寒天平板培地 [1.5% (w/v) 寒天、Oxoid] に重層して固化させた。次いで、コルクボーラー No.2 (直径 6 mm) を用いて試料注入孔を作製し、2ⁿ (n: 整数) 倍に段階希釈した各試料溶液 65 μL をウェルに注入後、37℃, 18 h にて培養した。希釈溶媒には滅菌済み 0.85% PBS を用いた。指標菌液の希釈に用いた MRS 液体培地、MRS 寒天平板培地および MRS 軟寒天培地には Em を適宜添加 (終濃度 5 μg/mL) した。抗菌活性値は、生育阻止円の認められた最も高い希釈度の逆数と定義し、その単位を Arbitrary Unit (AU) で表した。

3-2-5. primer 設計

PCR 用 primer の設計および Tm 値の計算は、主にオンライン PCR プライマー設計補助用ツールである、Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)¹⁶⁶⁾ を用いて行った。

gatA, *X*, *AX*, *T* のノックアウト用 primer の設計では、*gat* オペロンの 5'側 - 削除対象遺伝子の 5'側、および削除対象遺伝子の 3'側 - *gat* オペロンの 3'側の 2 か所で primer pair を作製した。この際、削除対象遺伝子 5'側の reverse primer と 3'側の forward primer は互いの領域をハイブリッド化した相補的配列とすることで、削除対象遺伝子の両端における 2 つ産物を結合するのりしろとした。

続いて、*gas* 遺伝子発現株の構築におけるリコンビナント DNA 作製用 primer の設計では、発現 vector (pIL253-P₃₂) に各 *gas* 遺伝子 (*gasA*, *gasX*, *gasI*, *gasAX*, and *gasAXI*) を挿入するため、LA327 株の Chromosomal DNA の遺伝子配列情報を基に各実験系に必要な配列を適宜付加して設計を行った。

また、変異株の選抜のため、vector に導入した *gas* 遺伝子を増幅する確認 PCR 用の primer を設計した。

さらに、*gas* 遺伝子 (*gasA*, *gasX*) のノックアウトのため、LA327 株の Chromosomal DNA の遺伝子配列における *gasA*, *gasX* の前後領域の配列情報を基に、各遺伝子を避ける位置で、必要な配列を適宜付加した改変用 primer を設計した。

作製した primer の配列は Table 3-3 に示した。primer の化学合成は、ユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。各 primer (50 μ M) は -20 $^{\circ}$ C にて保存し、使用時には融解後、TE buffer (株式会社ニッ

ポンジーン、東京) にて 25 μ M の濃度に調製し、4 $^{\circ}$ C で保存した。

3-2-6. 染色体 DNA の抽出

Luchansky ら (1991) の方法¹⁶⁷⁾ に従い、*Lb. gasseri* LA158 および LA327 から染色体 DNA を抽出した。*Lb. gasseri* 両株の MRS 培地培養菌液 (37 $^{\circ}$ C、18 h) を 2 mL ずつ分注して遠心分離 (8,000 rpm, 5 min, Room Temperature : RT) 後、上清を除去した。1 mL の滅菌水を加えて懸濁後、遠心分離 (8,000 rpm, 5 min, RT) してから上清を除去し、菌体を洗浄した。菌体へ Solution A (10 mg/mL Lysozyme 添加、Table 3-4) を 500 μ L 加えて懸濁後、55 $^{\circ}$ C、15 min のインキュベーション (水浴) を行った。プロテイナーゼ K 溶液 (Wako 分子生物学用) 20 μ L 加えて転倒混和後、10% (w/v) SDS 溶液を 25 μ L 加えて転倒混和した。60 $^{\circ}$ C、60 min のインキュベーション (水浴) 後、滅菌水 250 μ L とフェノール/クロロホルム溶液 (ニッポンジーン) 500 μ L を加えて転倒混和した。15,000 rpm, 5 min, RT の遠心分離後、上層 (水層) を回収した。再度フェノール/クロロホルム溶液を 500 μ L 加えて転倒混和後、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, RT) して水層を回収した。クロロホルム (Wako HPLC 用) を 500 μ L 加えて転倒混和後、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, RT) した。水層を 500 μ L 回収し、3M Na-Acetate 溶液 (pH 5.2) を 50 μ L、2-プロパノールを 500 μ L 加えて転倒混和した。遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, RT) 後に上清を捨て、70% エタノールを 200 μ L 加えてすぐに除去し、ペレットを洗浄後、自然乾燥させた。滅菌水 200 μ L でペレットを溶解後、Ribonuclease A (20mg/mL, Worthington Biochemical Corporation, New jersey, USA) 1 μ L を添加し、37 $^{\circ}$ C、15 min (水浴) にてインキュベートした (保存は 4 $^{\circ}$ C)。

3-2-7. プラスミド DNA の抽出（アルカリ SDS 法）

以下の実験操作で使用した試薬の組成は Table 3-4 に示した。プラスミド DNA (pIL253-P₃₂、Fig. 3-4) または改変プラスミド DNA を有する、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 の 18-24 h 培養液 2 mL を、2 mL 容遠心チューブに採取し、5,000 rpm, 10 min, RT にて遠心分離した。培養上清を除去し、Solution A (10 mg/mL Lysozyme 添加) を 200 μ L 加え、菌体を懸濁した。55°C, 10 min (水浴) にてインキュベートした後、Solution B を 400 μ L 添加し、緩やかに転倒混和した。次いで、Solution C を 300 μ L 添加して緩やかに転倒混和した。15,000 rpm, 5 min, 20°C にて遠心分離し、上層を回収した後、室温にてフェノール/クロロホルム溶液 (ニッポンジーン) を等量添加し、タッチミキサーで攪拌した。本溶液を 15,000 rpm, 5 min, 20°C にて遠心分離し、中間層が混入しないように上層を回収した後、等量の 99.5% エタノール (RT) を添加し、緩やかに転倒混和した。次いで 15,000 rpm, 10 min, 20°C にて遠心分離し、アスピレータを用いてエタノールを除去した。生じたペレットは 70% エタノール (RT) を用いて洗浄し、自然乾燥にてチューブ内の残存エタノールを除去して滅菌水 4 or 40 μ L (形質転換用は 4 μ L、PCR 用は 40 μ L の滅菌水を加えた) に溶解後、適宜 (基本的には PCR を用いる場合のみ) Ribonuclease A を 1 μ L 添加し、37°C, 15 min (水浴) にてインキュベートした (保存は 4°C)。

3-2-8. アガロースゲル電気泳動および DNA 量の測定

各 DNA フラグメントの電気泳動は、0.8% (w/v) 濃度のアガロース (Agarose S、ニッポンジーン) ゲルを用いて行った。泳動 buffer

には 1×TAE buffer (40 mM Tris および 10 mM EDTA 2Na、氷酢酸で pH 7.5 に調整)、マーカーには 1 kb DNA Ladder または 500 bp DNA Ladder (TaKaRa, 滋賀) をそれぞれ用いた。泳動装置には Mupid®-II plus (ADVANCE, 東京) を用い、100V の定電圧で 30-35 min にて泳動を行った。泳動後のゲルは、0.5 µg/mL エチジウムブロマイド (臭化エチジウム, Wako 生化学用) 水溶液に 15 min 浸潤することで染色を行った。

また、溶液中における DNA 濃度の測定には NanoVue Plus (GE Healthcare Japan, 東京) を用いた。

3-2-9. DNA のフェノール/クロロホルム抽出

DNA の精製および溶液中の酵素の不活化のために、必要に応じてフェノール/クロロホルム抽出を行った。詳細は以下の通りである。

DNA 溶液に対してフェノール/クロロホルム溶液 (RT) を等量添加し、激しく転倒混和した。15,000 rpm, 1 min, RT にて遠心分離し、中間層が混入しないように上層を回収した。

3-2-10. DNA のエタノール沈殿

DNA 溶液の buffer 置換を行うために、必要に応じてエタノール沈殿を行った。詳細は以下の通りである。

DNA 溶液 90 µL 当たり、3M Na-Acetate 溶液 9 µL、glycogen® (Roche Applied Science, Tokyo, Japan) 1 µL (固定量) および 99.5% エタノール (-20°C) 250 µL を混合し、-80°C, 20 min にてインキュベート後、15,000 rpm, 30 min, 2°C にて遠心分離を行った。アスピレータを用いてエタノールを除去し、生じたペレットは 70%エタノ

ール (RT) を用いて洗浄した後、自然乾燥にてチューブ内の残存エタノールを完全に除去した。得られたペレットは滅菌水に溶解し、各種試験に用いた。

3-2-11. アガロースゲルからの DNA 精製

アガロースゲル電気泳動後のバンドから純粋な DNA を得るため、必要に応じてバンドを切り出し、DNA 断片精製キット

(MagExtractor®, TOYOBO, 大阪) を用いた精製操作を行った。操作内容は以下の通りである。

カッターナイフで目的のバンド (0.3g 以下) を切り出し、細かくスライスしてから 1.5 mL 容マイクロチューブへ入れた後、400 μ L の吸着液を加え、時々攪拌しながらゲルを完全に溶解した。30 μ L の磁性ビーズを加え、時々攪拌しながら RT で 2 min 静置後、6,000 rpm, 5 sec, RT の遠心分離を行い、ピペットで上清を除去した。600 μ L の洗浄液を加えてタッチミキサーで 10 秒間攪拌後、同様に遠心分離して上清を除去した。1 mL の 75% エタノールを加えて同様に洗浄後、ヒートブロック [e-Thermo Bucket (ETB), TAITEC, 埼玉] を用いて 55°C で加温し、上清を完全に除去した。30-100 μ L の滅菌水を加えてタッチミキサーで 10 秒間攪拌後、RT で 2 分間静置し、遠心分離 (6,000 rpm, 5 sec, RT) 後に上清を回収した。

3-2-12. DNA における 5'末端のリン酸化 (カイネーション)

主に PCR 産物のライゲーションのため、5'末端のリン酸化を行った。kinase には T4 polynucleotide kinase (TaKaRa)、酵素基質としては ATP (adenosine triphosphate, TaKaRa) を使用した。

精製した DNA 溶液に対して Table 3-5 に示した溶液を混合し、37°C, 2 h (水浴) の条件にてインキュベートし、カイネーションを行った。

3-2-13. DNA のライゲーション

4 μ L の DNA 溶液に対して Table 3-6 に示した溶液を混合後、4°C, overnight (水浴) の条件でインキュベーションし、ライゲーションを行った。

3-2-14. コンピテントセルの調製 - *Lc. lactis* subsp. *cremoris* -

以下の実験操作で使用した試薬の組成は Table 3-7 および 3-8 に示した。MG1363 株の GM17 培養液を、SGGM17 培地 10 mL に 1% (v/v) で植菌し、30°C, 18 h で前培養した。本培養液の全量を SGGM17 培地 (Glycine 量が MG1363 株は 1.0% (w/v) だが、IL1403 株の場合は 0.4% (w/v) と異なる) 90 mL に植菌し、OD₆₀₀=0.2 前後となるまで 30°C にて静置培養し (通常は 2.5 h)、50 mL 容遠沈管 2 本に分注後、氷冷した。

以降の操作は氷上にて行い、buffer はあらかじめ氷冷して用いた。得られた培養液を 7,000 rpm, 5 min, 4°C で遠心分離して集菌し、上清を除去した。wash buffer 25 mL を用いて菌体を懸濁し、1 本の遠沈管に統合した後、7,000 rpm, 5 min, 4°C にて遠心分離して上清を除去した (菌体洗浄)。

同様の菌体洗浄をさらに 2 回行ってから、得られた菌体を 1 mL の wash buffer に懸濁し、0.5 mL 容マイクロチューブに 45 μ L ずつ分注後、使用するまで -80°C にて保存した。

3-2-15. コンピテントセルの調製 - *Lb. gasseri* -

以下の実験操作で使用した試薬の組成は Table 3-9 および 3-10 に示した。*Lb. gasseri* 各株を MRS 培地にて 37°C, 18 h の条件で前培養した。本培養液から MRS+1% (w/v) Glycine 培地 (pH 4.5, HCl によって調整) 50 mL に 0.5% (v/v) 量で植菌し、37°C, 18 h にて培養した。

以降の操作は氷上にて行い、buffer はあらかじめ氷冷して用いた。得られた培養液を 6,000 rpm, 5 min, 4°C にて遠心分離し、上清を除去した後、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 10 mL で菌体を懸濁した。6,000 rpm, 5 min, 4°C にて遠心分離し、上清を除去した。再度 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 10 mL で菌体を懸濁し、懸濁液のうち 100 μ L を 10 倍希釈して OD₆₆₀ を測定した。その後、同様に遠心分離と菌体洗浄を再度行い、上清を除去した後、EB 5 mL にて菌体を懸濁した。遠心分離 (6,000 rpm, 5 min, 4°C) 後に上清を除去した。得られた菌体は先に測定した OD₆₆₀ の値から、最終濁度が OD₆₆₀=50 となる量の EB を用いて懸濁後、1.5 mL 容遠心チューブに 80 μ L ずつ分注して、使用するまで -80°C にて保存した。

3-2-16. エレクトロポレーション法による形質転換 -*Lc. lactis* subsp. *cremoris* -

以下の操作は全て氷上にて行った。また、使用した試薬の組成は全て Table 3-7 および 3-8 に示した。3 μ L 以下の DNA 溶液を 0.2 cm エレクトロポレーションキュベット (BioRad, California, USA) の内壁面にプロットし、氷上で溶解した *Lc. lactis* subsp. *cremoris* のコンピテントセル 40 μ L を注入した後、エレクトロポレーション装

置 (Gene Pulser®, BioRad) を用いて Voltage 2.25 kV, Capacitance 25 μ F, Resistance 200 Ω の条件で電気パルスを加した。また、ポジティブコントロールとして空ベクター溶液、ネガティブコントロールとして滅菌水を供し、同様に電気パルスを加した。1 mL の SGM17MC 培地 (終濃度 50 ng/mL Em, RT) をキュベットに注入して菌体ごと 2 mL 容マイクロチューブへ回収し、30 $^{\circ}$ C, 2 h (水浴) の expression 培養を行った。本培養液 (1 mL) を Em 添加 (終濃度 25 μ g/mL) SGM17 寒天平板培地に 330 μ L ずつ塗抹し、30 $^{\circ}$ C にてコロニーが出現するまで (通常 24-48 h 程度) 培養した。

得られたコロニーより方法 3-2-7 にてリコンビナントプラスミド DNA を抽出後、クローニングサイトの周辺領域を PCR にて増幅し、方法 3-2-8 のアガロースゲル電気泳動時のバンドサイズより、遺伝子の導入を診断した (pIL check、詳しい条件は Table 3-11 参照)。理論値通りのバンドが得られたコロニーを Em 添加 (終濃度 5 μ g/mL) GM-17 液体培地へ植菌して 37 $^{\circ}$ C, 16-24 h の条件で 1-2 回培養後、同培地で 37 $^{\circ}$ C, 12-16 h にて培養した菌液を 60% (w/v) グリセロール溶液と 1:1 で混合し、- 80 $^{\circ}$ C にて保存した。

3-2-17. エレクトロポレーション法による形質転換 -*Lb. gasseri*-

以下の操作は全て氷上にて行った。また、使用した試薬の組成は全て Table 3-9 および 3-10 に示した。*Lb. gasseri* のコンピテントセルを 37 $^{\circ}$ C (水浴) にて迅速かつ完全に溶解し、直ちに氷冷した。48 $^{\circ}$ C, 10 min (水浴) にて加熱してから 10,000 rpm, 1 min, 4 $^{\circ}$ C にて遠心分離後、上清をピペットで除去し、EB 200 μ L で菌体を懸濁した。再度遠心分離を行って上清を除去し、EB 75 μ L で菌体を懸濁したも

のをエレクトロポレーションに用いた。

各リコンビナントプラスミド DNA 溶液 (3 μL 以下) を熱処理および洗浄済みのコンピテントセルへ添加後、混和して 0.2 cm エレクトロポレーションキュベット (BioRad) へ全量移した後、エレクトロポレーション装置 (BioRad) を用いて Voltage 1.5 kV, Capacitance 25 μF , Resistance 200 Ω の条件で電気パルスを付加した。また、ポジティブコントロールとして空ベクター溶液、ネガティブコントロールとして滅菌水を供し、同様に電気パルスを付加した。

EXBG 培地 (終濃度 50 ng/mL Em、RT) 1 mL をキュベットに注入して菌体ごと 2 mL 容マイクロチューブへ回収し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h (水浴) にて expression 培養した。本培養液を Em 添加 (終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) MRS 寒天平板培地に 330 μL ずつ塗抹後、AnaeroPackTM (MGC, 東京) を使用し、37 $^{\circ}\text{C}$ にてコロニーが出現するまで (通常 24-48 h) 嫌気培養した。

得られたコロニーは、釣菌後に Em 添加 (終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) MRS 液体培地へ植菌して 37 $^{\circ}\text{C}$ 、16-24 h の条件で 1-2 回培養後、同培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、12-16 h にて培養した菌液を 60% (w/v) グリセロール溶液と 1:1 で混合し、- 80 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

3-2-18. *Lb. gasseri* LA327 におけるバクテリオシン遺伝子クラスターの DNA シークエンシングおよびホモロジー検索

方法 3-2-6 によって抽出した LA327 株の染色体 DNA をテンプレートとする primer walking によって、同株における GT および Acd LF221A と推定されるバクテリオシンの遺伝子クラスターにおける DNA 配列を同定した。その DNA シークエンシングは、PRISM 3100

Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA) および BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた dideoxy chain termination 法によって行なわれ、詳しい方法は試薬キットに付属する取扱説明書のプロトコールに従った。

GENETYX-MAC software (GENETYX Corporation, 東京) とオンラインゲネティック分析サイト SoftBerry (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fdp.htm&no_menu=on) を用いて、決定した DNA 配列上における open reading frames (ORFs)、プロモーター、ターミネーターが推定された。

次いで、これらの DNA 配列によってコードされるペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列が DDBJ database (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)の BLAST¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾ プログラムを用いたホモロジー検索にかけられた。さらに、2つのオンラインプログラム TMHMM¹⁷¹⁾ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) と SOSUI¹⁷²⁾ engine ver 1.11 (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) によって各ペプチドおよびタンパク質の菌体局在性および膜貫通領域が推定された。

3-2-19. *Lb. gasseri* における GT 構造遺伝子 (*gatAX*) および ABC-トランスポーター遺伝子 (*gatT*) ノックアウト株の作製

pTERM13⁸⁶⁾ は pWVO1¹⁷³⁾ と完全に相同な複製タンパク質遺伝子 (*repA*) を pSY1 (GenBank Accession No. E05087) へ導入することで構築された発現ベクターである。pG⁺ host4¹⁷⁴⁾ の *repA* において知られる温度感受性変異を導入することで、新規の温度感受性

ベクター (pTERM09) が構築され、本実験におけるノックアウト用ベクターとして用いた。 *Lb. gasseri* LA158 と LA327 より GT 構造遺伝子 (*gatAX*)、 *Lb. gasseri* LA327 より ABC-トランスポーター遺伝子 (*gatT*) をノックアウトするため、double-cross-over (DCO) 置換が用いられた。

gatAX の 5'-flanking (763 bp) および 3'-flanking (770 bp) 配列、そして *gatT* の 5'-flanking (792 bp) および 3'-flanking (791 bp) 配列が、各 primer pair ($\triangle gatAX$ pr1 - $\triangle gatAX$ pr2、 $\triangle gatAX$ pr3 - $\triangle gatAX$ pr4、 $\triangle gatT$ pr1 - $\triangle gatT$ pr2、および $\triangle gatT$ pr3 - $\triangle gatT$ pr4) を用いた splice-overlap extension PCR 法によって増幅および結合された。 *gatA* の 5'-flanking (763 bp) および 3'-flanking (767 bp) 配列、そして *gatX* の 5'-flanking (770 bp) および 3'-flanking (770 bp) 配列についても、各 primer pair ($\triangle gatA$ pr1 - $\triangle gatA$ pr2、 $\triangle gatA$ pr3 - $\triangle gatA$ pr4、 $\triangle gatX$ pr1 - $\triangle gatX$ pr2、および $\triangle gatX$ pr3 - $\triangle gatX$ pr4) を用いて同様に増幅および結合された。この PCR には DNA polymerase として Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs Japan, Tokyo, Japan) を用いた。本実験で用いられた primer の詳細は Table 3-3 に記載した。

各結合断片を pTERM09 の *Sma*I サイトに導入し、*gatA*、*gatX*、*gatAX*、および *gatT* のノックアウトリコンビナント (pLG $\triangle gatA$ 、pLG $\triangle gatX$ 、pLG $\triangle gatAX$ 、および pLG $\triangle gatT$) を作製した。これらのリコンビナントを方法 3-2-17 によって *Lb. gasseri* LA158 および LA327 へ導入後、形質転換体は Em を含有する (終濃度 25 μ g/mL) MRS 寒天平板培地において許容温度である 32°C で選抜された。39°C 培養によって *Lb. gasseri* LA158 および LA327 の染色体 DNA 上における *gat* 遺伝子座に対する各リコンビナントの導入を誘導し、Em

不含の MRS 寒天平板培地における 32°C 培養によって、染色体における各リコンビナントの DCO 解離を誘導した。

各 primer pair ($\triangle gatA$ pr1 - $\triangle gatA$ pr4、 $\triangle gatX$ pr1 - $\triangle gatX$ pr4、 $\triangle gatAX$ pr1 - $\triangle gatAX$ pr4、および $\triangle gatT$ pr1 - $\triangle gatT$ pr4) を用いたコロニーダイレクト PCR によって陽性株を選抜し、それぞれ LA158 $\triangle gatA$ 、LA158 $\triangle gatX$ 、LA158 $\triangle gatAX$ 、LA327 $\triangle gatAX$ 、および LA327 $\triangle gatT$ と命名した。

3-2-20. GS 生産改変株の構築

Sambrook と Russell (2001) の標準的な方法¹⁷⁵⁾に従い、クローニングを行った。方法 3-2-6 によって抽出した LA327 株の染色体 DNA を Template とし、*gas* 遺伝子増幅用 primer (Table 3-3) とサーマルサイクラー (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad)、および DNA polymerase (Ex Taq, TaKaRa) を用いて PCR を行った。各 primer pair (*gasA*-*Sal* Fw - *gasX*-*Xba* Rv、*gasA*-*Sal* Fw - *gasI*-*Xba* Rv、および *gasI*-*Sal* Fw - *gasI*-*Xba* Rv) を用いて *gasAX*、*gasAXI*、および *gasI* を Table 3-12 に示した条件で増幅後、産物 50 μ L に対して 200 μ L の滅菌ミリ Q 水を加え、方法 3-2-9 のフェノール/クロロホルム抽出を行った。方法 3-2-10 のエタノール沈殿後、30 μ L の滅菌ミリ Q 水で溶解し、10 μ L の *Xba* I (TaKaRa) と 5 μ L の *Sal* I (TaKaRa)、および 5 μ L の 10×H buffer (TaKaRa) を加えて 37°C、overnight (水浴) のインキュベーションによって double digestion した。

方法 3-2-7 により抽出した発現ベクター (pIL253-P₃₂) 30 μ L に対し、31 μ L の滅菌水、14 μ L の *Xba* I、6 μ L の *Sal* I、および 9 μ L

の 10×H buffer を添加し、37°C, over night (水浴) のインキュベーションにて double digestion を行った。gas 遺伝子と pIL253-P₃₂ の double digestion 産物に対してそれぞれ 100 μL および 250 μL の滅菌ミリ Q 水を加え、方法 3-2-9 のフェノール/クロロホルム抽出と方法 3-2-10 のエタノール沈殿によって精製した。

各精製 DNA 溶液の DNA 量を比色定量後、その測定値を基準に線状化 vector : insert DNA = 1 : 2 となるように全量 90 μL で混合し、方法 3-2-9 と方法 3-2-10 を行った。得られたペレットを 4 μL の滅菌水に溶解し、Table 3-6 に示した溶液を混合後、4°C, overnight (水浴) にてライゲーションを行った。本反応液に滅菌水を添加して全量を 90 μL とし、方法 3-2-9 と方法 3-2-10 によって再び精製した。得られたペレットを滅菌水 10 μL に溶解し、使用するまで 4°C で保存した。

各ライゲーション産物 (pGS-AX および pGS-AXI) を方法 3-2-16 によって *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のコンピテントセル (方法 3-2-14 で作製) へ導入後、方法 3-2-7 によって再抽出し、方法 3-2-17 によって *Lb. gasseri* LA158 Δ gatAX のコンピテントセル (方法 3-2-15 で作製) へ導入した。

3-2-21. Inverse PCR を用いた GasA、GasX 単独生産株の作製

方法 3-2-20 で作製した pGS-AX および pGS-AXI を inverse PCR における template として供し、gasA および gasX を除去した。primer pair として、gasA の除去に pGS Δ A Fw – pGS Δ A Rv、そして gasX の除去には pGS Δ X Fw – pGS Δ X Rv を用いた。DNA polymerase には Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (New England

BioLabs Japan, Tokyo, Japan) を用いた。PCR の反応条件については Table 3-13 に示した。

次いで、改変 PCR 産物の一部を方法 3-2-8 のアガロースゲル電気泳動へ供し、理論値 (pGS-AX Δ A : 5,347bp, pGS-AX Δ X : 5,481bp, pGS-AXI Δ A : 5,606bp, pGS-AXI Δ X : 5,740bp) 通りのバンドが得られていることを確認した。次いで、各レーンに十分な DNA 量の改変 PCR 産物を充填し、アガロースゲル電気泳動を再度行い (EtBr による染色なし)、Gel Indicator Solution (BioDynamics Laboratory Inc. Tokyo, Japan) 0.1% (v/v) 溶液でゲルを 2 時間振とう染色して可視光線下でバンドを確認した。方法 3-2-11 によってアガロースゲルから DNA を精製し、30 μ L の滅菌水に溶解した。

方法 3-2-12 でカイネーション後、方法 3-2-13 によるライゲーション産物を方法 3-2-16 に従い、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のコンピテントセル (方法 3-2-14 で作製) への導入後、方法 3-2-17 によって *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* のコンピテントセル (方法 3-2-15 で作製) へ導入し、GasA および GasX の単独生産株を作製した。本手順の概要を Fig. 3-5 に示した。

3-2-22. GS の生産機序に関する検証

方法 3-2-19 で作製した *Lb. gasseri* LA327 Δ *gatAX* および *Lb. gasseri* LA327 Δ *gatT* より培養上清を取得後、方法 3-2-4 によってバクテリオシン活性を測定した。

3-2-23. GS 生産改変株における活性発現の確認

方法 3-2-20 で作製した GasAX および GasAXI 生産株 (*Lb. gasseri*

LA158 Δ *gatAX*(pGS-AX) および (pGS-AXI))より培養上清を取得後、方法 3-2-4 によってバクテリオシン活性を測定した。

3-2-24. GS および GT における二成分性の証明

GasA 生産株 : *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ X)、LA158 Δ *gatAX*(pGS-AXI Δ X) と GasX 生産株 : *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ A)、LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI Δ A) の培養上清を調製後、方法 3-2-4 によって JCM 1002^T (pSYE2) に対するバクテリオシン活性を測定した。さらに、GasA および GasX 生産株の培養上清を 1 : 1 で混合し、相乗効果の有無について確認した。

GT の二成分性についても、GatA および GatX の単独生産株 (LA158 Δ *gatX* および LA158 Δ *gatA*) を用いて同様に試験した。

3-2-25. GasA、GasX の作用比率に関する検討

Lb. gasseri LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ X) より GasA 含有培養上清、*Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ A) より GasX 含有培養上清、および LA158 Δ *gatAX* よりバクテリオシン不含培養上清を取得した。GasA および GasX 含有培養上清をバクテリオシン不含培養上清で 1、1/2、1/4 倍に希釈後、原液の GasX もしくは GasA 含有培養上清 (カウンター上清) と 1 : 1 で混合し、方法 3-2-4 によってバクテリオシン活性を測定した。比較のため、GasA と GasX を事前に 1 : 1 で混合後、バクテリオシン不含培養上清で希釈した場合の活性も同様に測定した。

3-2-26. GS および GT の相互作用に関する検討

Lb. gasseri LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ X) より GasA 含有培養上清、*Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ A) より GasX 含有培養上清、*Lb. gasseri* LA158 Δ *gatX* より GatA 含有含有上清、および *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatA* より GatX 含有培養上清をそれぞれ取得した。

これら 4 種の培養上清を単独、2 種混合 (等量)、および 4 種混合 (等量) で方法 3-2-4 へ供し、バクテリオシン活性を測定した。

3-2-27. *in situ* activity assay による GS の検出と挙動分子量推定

GS 含有培養上清濃縮物をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で泳動後、*in situ* activity assay へ供し、生育阻止帯の検出から GS の検出とその挙動分子量の推定を試みた。GS 含有上清は *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI) 株より調製し、濃縮には遠心分画フィルター (Amicon® Ultra-0.5 mL (100K), Merck Millipore) を用いた。泳動槽には、AE-6530M/P ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (アトー株式会社、東京) を用いた。

SDS-PAGE は Leammli の方法¹⁷⁶⁾ に準じて行った。20 μ L の濃縮 GS 試料と 10 μ L の溶解液 ($\times 3$) [6% (v/v) 0.5M Tris-HCl (pH 6.8), 0.02% (w/v) bromophenol blue (BPB), 3% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 60% (w/v) glycerol, 3% (v/v) 2-mercaptoethanol (ME)] を混合して 50°C, 5 min にて SDS 化し、分子量マーカー (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker-Low Range (3,500-40,000 Da), GE Healthcare Japan) と共に 20%ポリアクリルアミドゲルにアプライして 30 mA の定電流で泳動を行った。

in situ activity assay は Daba らの方法¹⁷⁷⁾ に準じて行った。泳動後のゲルはプラスチックシャーレ（直径 90 mm）に入るサイズに切り、固定液[20% (v/v) メタノール、10% (v/v) 酢酸]で 30 min 振とうして固定を行った。次いで、頻繁に蒸留水を交換し、振とうにより十分（60 min 以上）にゲルを洗浄後、余分な水分や空気が入らないように、滅菌済みのプラスチックシャーレに置いた。指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2) の 18-24 h 培養液を Em（終濃度 5 µg/mL）添加 MRS 培地で 10 倍希釈し、そのうち 500 µL を 55°C で保持しておいた MRS 軟寒天培地[0.75% (w/v) 寒天]20 mL に混合後、ゲルの上から重層して固化させた。本プレートは 37°C、18 h にて培養後、生育阻止帯の検出により GS の存在を確認した。次いで、分子量マーカーの分子量サイズと泳動距離との検量線を作成し、これに生育阻止帯の泳動距離を代入して GS の挙動分子量を推定した。

また、本実験操作の概要を Fig. 3-6 に示した。

3-2-28. GS の pH 安定性試験

Lb. gasseri LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI) より調製した GS 含有培養上清を 1N HCl および 1N NaOH にて pH 2, 4, 7, および 10 に調整して静置（室温, 1 h）後、方法 3-2-4 のバクテリオシン活性測定へ供した。さらに、LA158 Δ *gatAX* より調製したバクテリオシン不含培養上清を同様に pH 2, 4, 7, および 10 に調整および静置後、ネガティブコントロールとして供した。

3-2-29. GS の熱安定性試験

Lb. gasseri LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI) より調製した GS 含有培養上清を 0.2 mL 容 PCR チューブへ 100 μ L ずつ分注し、オートクレーブ滅菌機 (TOMMY) で 121°C, 15 min、もしくはサーマルサイクラー (Bio-Rad) にて 95°C, 5 min および 70°C, 1 h の条件で加熱後、方法 3-2-4 によって残存活性を測定し、GS の熱安定性を試験した。オートクレーブ (121°C, 15 min) の際は、PCR チューブをアルミホイルで包んで加熱した。また、GS 含有培養上清を 4°C および 37°C で 1 か月間保持し、残存活性から保存性の確認を行った。

3-2-30. GS のプロテアーゼ耐性試験

ペプシン (Pepsin, 7.0-15.0 U/mg) を 0.2 M HCl-KCl 緩衝液 (pH 2) へ、トリプシン (Trypsin, Wako 生化学用, ブタ肝臓由来, 4200 U/mg)、キモトリプシン (α -CHYMOTRYPSIN, MP Biomedicals, Illkirch, France, 40-50 U/mg protein)、およびプロテイナーゼ K (Proteinase K, Wako 分子生化学用, 550 U/mL) を 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8) に対して 0.2% (w/v) 量添加し、プロテアーゼ試験溶液とした。*Lb. gasseri* LA39 (GA 生産株)、*Lb. gasseri* LA158 (GT 生産株)、*Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI) (GS 生産株)、および *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (バクテリオシン非生産株) より培養上清を調製後、各プロテアーゼ試験溶液と等量で混合し (プロテアーゼ終濃度 1 mg/mL)、37°C, 5 h (水浴) にてインキュベーション後、方法 3-2-4 に従って残存活性を測定した。

3-2-31. GS の抗菌性に関する検証

Lb. gasseri LA158 Δ *gatAX* (バクテリオシン非生産株) および *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX*(pGS-AXI) (GS 生産株) の MRS 培地培養上清 (Δ *gatAX* 上清および GS 上清) を取得した。

各培養上清の原液もしくは 10 倍濃縮液 (Amicon® Ultra-15 (100K), Merck Millipore を用いた限外ろ過によって濃縮) をそのまま、もしくは 10 倍量の MRS 培地と混合し、計 8 パターンで上清サンプルを作製した。

指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2) の MRS 培地培養液 1 mL 分の菌体を取得後、各上清サンプルで懸濁および 10^{-3} 倍まで希釈し、37°C 感作直後 (0 h) および 8 h 時点で生菌数を測定および比較した。

3-2-32. 静菌的条件下の菌体に対する GS の抗菌性に関する検証

方法 3-2-32 と同様に Δ *gatAX* 上清および GS 上清の 10 倍濃縮液を調製後、10 倍量の MRS 培地を混合した。本試験ではこれら 2 種の上清サンプルのみを供した。

静菌的条件としては、低温感作 (4°C) と静菌剤添加 (37°C) の 2 つの実験系を設定した。

1) 低温感作

指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2) の MRS 培地培養液 1 mL 分の菌体を取得後、各上清サンプルで懸濁および 10^{-3} 倍まで希釈し、4°C 感作直後 (0 h) および 8 h 時点で生菌数を測定および比較した。

2) 静菌剤添加

指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (Em 感受性株) の MRS 培地培養液 1 mL 分の菌体を取得後、各上清サンプル (終濃度 5 µg/mL の Em を添加) で懸濁および 10⁻³ 倍まで希釈し、4°C 感作直後 (0 h) および 8 h 時点で生菌数を測定および比較した。

Table 3-2. The strains and plasmids used in this study.

Strain and plasmid	Description ^a	Reference and source
Strains		
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
LA39 (JCM 11657)	Producer strain of Gassericin A	Laboratory collection
LA158 (JCM 11046)	Producer strain of Gassericin T, plasmid free	Laboratory collection
LA327	Producer strain of Gassericin T and Gassericin S, plasmid free	Laboratory collection
LA158 \triangle <i>gatAX</i>	Host strain for recombinant plasmids, plasmid free, derivative of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA158 lacking the operon <i>gatAX</i>	This study
LA158 \triangle <i>gatX</i>	GatA producer strain, plasmid free, derivative of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA158 lacking the operon <i>gatX</i>	This study
LA158 \triangle <i>gatA</i>	GatX producer strain, <i>Lactobacillus gasseri</i> LA158 lacking the operon <i>gatA</i>	This study
LA327 \triangle <i>gatAX</i>	Producer strain of Gassericin S, plasmid free, derivative of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327 lacking the operon <i>gatAX</i>	This study
LA327 \triangle <i>gatT</i>	Plasmid free, derivative of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327 lacking the operon <i>gatT</i>	This study
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM1002 ^T	Indicator strain for bacteriocin activity assay	JCM ^b
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	Intermediate host strain for recombinant plasmids, plasmid free, derivative of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 712	Gasson J.M. <i>et al.</i> (1983) ¹⁷⁸⁾
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	Intermediate host strain for recombinant plasmids, plasmid free	Chopin A. <i>et al.</i> (1984) ¹⁷⁹⁾
Plasmids		
pSYE2	Em ^r ; pSY1 derivative with Erythromycin resistance gene (<i>emrA</i>) of pAM61 from <i>Enterococcus faecalis</i>	Satoh <i>et al.</i> (1997) ¹⁸⁰⁾
pIL253-P ₃₂	Em ^r ; pIL253 derivative with P ₃₂ promoter	Kemperman <i>et al.</i> (2003) ¹⁸¹⁾
pTERM09	Em ^r ; pSY1 derivative with temperature-sensitive mutation in the <i>repA</i>	Ito <i>et al.</i> (2009) ⁸⁶⁾ and Biswas <i>et al.</i> (1993) ¹⁷⁴⁾
pGS-AX	Em ^r ; pIL253-P ₃₂ derivative carrying <i>gasAX</i>	This study
pGS-AXI	Em ^r ; pIL253-P ₃₂ derivative carrying <i>gasAXI</i>	This study
pGS-I	Em ^r ; pIL253-P ₃₂ derivative carrying <i>gasI</i>	This study
pGS-AX \triangle A	Em ^r ; pGS-AX derivative eliminated <i>gasA</i>	This study
pGS-AX \triangle X	Em ^r ; pGS-AX derivative eliminated <i>gasX</i>	This study
pGS-AXI \triangle A	Em ^r ; pGS-AXI derivative eliminated <i>gasA</i>	This study
pGS-AXI \triangle X	Em ^r ; pGS-AXI derivative eliminated <i>gasX</i>	This study

^aEm^r, Erythromycin resistance.

^bJCM, Japan Collection of Microorganisms, Tsukuba, Japan.

Table 3-3. The primers used in this study.

primer	Sequence (5' - 3')	Purpose
pILF4	CGGTTACTTTGGATTTTTGTGAG	Confirming PCR
pILR4	TGCACTGATTGGTGTATCATTTTC	Confirming PCR
△ <i>gatA</i> pr1	AGTACAGTCTCTTCGGTTGG	Removing the <i>gatA</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatA</i> pr2	AGCCATATTAATTCCAATAAAGACCTCCTA	Removing the <i>gatA</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatA</i> pr3	TAGGAGGTCTTTATTGGAATTAATATGGCT	Removing the <i>gatA</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatA</i> pr4	CTTAATTTCTGAGTTTTTCC	Removing the <i>gatA</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatX</i> pr1	AAACTTTTCTGTACCTACAG	Removing the <i>gatX</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatX</i> pr2	AAATCTCTATATAAAAATTAATTCCTACTT	Removing the <i>gatX</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatX</i> pr3	AAGTAGGGAATTAATTTTATATAGAGATTT	Removing the <i>gatX</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatX</i> pr4	CATATTTCTGAGGTGATACA	Removing the <i>gatX</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatAX</i> pr2	AAATCTCTATATAAAAATAAAGACCTCCTA	Removing the <i>gatAX</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatAX</i> pr3	TAGGAGGTCTTTATTTTTATATAGAGATTT	Removing the <i>gatAX</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatT</i> pr1	AAAAAGCAAGATCCAAATGCACA	Removing the <i>gatT</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatT</i> pr2	CTTCACTAAGTCATAATATTGAATACTATT	Removing the <i>gatT</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatT</i> pr3	AATAGTATTCAATATTATGACTTAGTGAAG	Removing the <i>gatT</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
△ <i>gatT</i> pr4	AGTTTCAGGCAATTTAAATCC	Removing the <i>gatT</i> from the chromosome of <i>Lb. gasseri</i> LA158 and LA327
<i>gasA</i> - <i>Sal</i> Fw	ACGCGTCGACCTAAATTAGTCACTTTTCCTCTTAAG	Amplifying the <i>gasA</i> encoded in the chromosome of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327
<i>gasA</i> - <i>Xba</i> Rv	GCTCTAGATTTTCGATCATTATCTTCCACCTC	Amplifying the <i>gasA</i> encoded in the chromosome of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327
<i>gasX</i> - <i>Sal</i> Fw	ACGCGTCGACGAGGTGGAAGATAATGATCGAAA	Amplifying the <i>gasX</i> encoded in the chromosome of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327
<i>gasX</i> - <i>Xba</i> Rv	GCTCTAGACTATCCATATTCGTCATATAC	Amplifying the <i>gasX</i> encoded in the chromosome of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327
<i>gasI</i> - <i>Sal</i> Fw	ACGCGTCGACTTGGTTCTACAACTACTAGTGG	Amplifying the <i>gasI</i> encoded in the chromosome of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327
<i>gasI</i> - <i>Xba</i> Rv	GCTCTAGAGATTATTACCAAATTGAACCTAAGAAC	Amplifying the <i>gasI</i> encoded in the chromosome of <i>Lactobacillus gasseri</i> LA327
pGS△ <i>A</i> Fw	GAGGTGGAAGATAATGATCG	Inverse PCR (Elimination of <i>gasA</i>)
pGS△ <i>A</i> Rv	CTTAAGAGGAAAAGTGAATAATTTAG	Inverse PCR (Elimination of <i>gasA</i>)
pGS△ <i>X</i> Fw	TTGGTTCTACAACTACTAGTGG	Inverse PCR (Elimination of <i>gasX</i>)
pGS△ <i>X</i> Rv	TTTCGATCATTATCTTCCACCTC	Inverse PCR (Elimination of <i>gasX</i>)

各プライマー（50 μM）は TE buffer（ニッポンジーン）を用いて 25 μM 濃度に調製後、4℃で保存した。

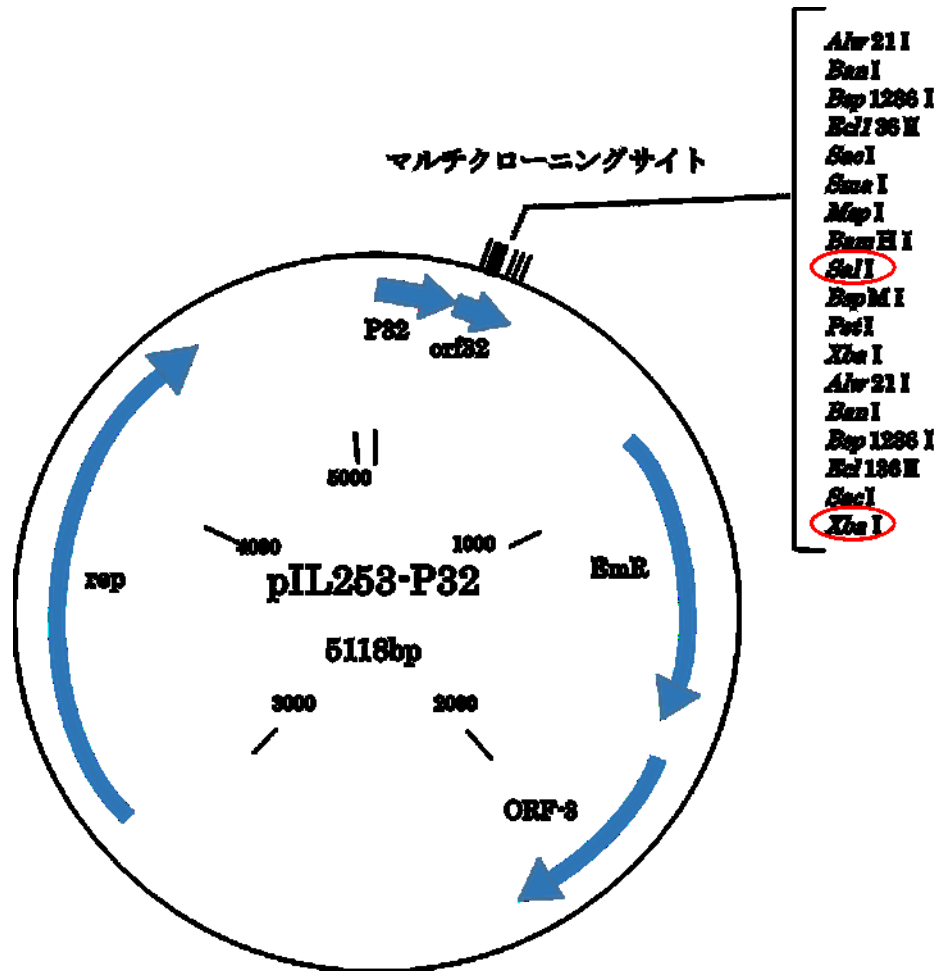


Fig. 3-4. The plasmid map of expression vector : pIL253-P₃₂.

P32 : the lactococcal constitutive promotor、
 EmR : the Erythromycin resistance gene、
 rep : the replication gene

Table 3-4. The composition of reagents used in plasmid extraction
(alkaline-SDA method).

Solution A	
20% (w/v) sucrose	
10 mM Tris-HCl (pH 8.1)	
10 mM EDTA	
50 mM NaCl	
Addition immediately before use	
Lysozyme	10 mg/mL

Solution B	
0.2N NaOH	
1% SDS	

Solution C	
5 M K-acetate	60 mL
Acetic acid	11.5 mL
H₂O	28.5 mL

Table 3-5. The composition of reaction solution for phosphorylation of DNA samples.

T4 polynucleotide kinase (TaKaRa)	1 μ L
10 \times polynucleotide kinase buffer	5 μ L
100 mM ATP (TaKaRa)	0.5 μ L
Purified PCR product solution	< 40 μ L
Sterilized water (milliQ)	fill up to 50 μ L
Total volume	50 μ L

Table 3-6. The composition of reaction solution for DNA ligation.

T4 DNA Ligase (TaKaRa)	0.5 μL
10 \times Ligation buffer	0.5 μL
DNA mixture solution	4 μL
Total volume	5 μL

Table 3-7. The composition of reagents and medium used for preparation and transformation of competent cells (1).

-*Lc. lactis* subsp. *cremoris* -

Wash buffer	
0.5 M sucrose	171.15 g/L
10% glycerol	100 g/L

GM17	
Oxoid M17	37.25 g/L
0.5% glucose	5 g/L

SGGM17	
Oxoid M17	37.25 g/L
0.5 M sucrose	171.15 g/L
0.5% glucose	5 g/L
1% glycine	10 g/L

Table 3-8. The composition of reagents and medium used for preparation and transformation of competent cells (2).

-*Lc. lactis* subsp. *cremoris* -

SGM17MC	
Oxoid M17	37.25 g/L
0.5 M sucrose	171.15 g/L
0.5% glucose	5 g/L
(Addition immediately before use)	
50 mM CaCl ₂ (sterilized by filtration)	40 mL/L
250 mM MgCl ₂ (sterilized by filtration)	80 mL/L
10 µg/mL Erythromycin (50% EtOH sol.)	5 µL/mL
SGM17 agar	
Oxoid M17	37.25 g/L
0.5 M sucrose	171.15 g/L
0.5% glucose	5 g/L
1.5% agar (agar No.1, Oxoid)	15 g/L
(Addition immediately before use)	
5 mg/mL Erythromycin (50% EtOH sol.)	1 mL/L

Table 3-9. The composition of reagents and medium used for preparation and transformation of competent cells (1).

-*Lb. gasseri* -

MRS + 1% glycine (pH 4.5)	
Difco MRS broth	55 g/L
1% glycine	10 g/L

EB	
0.3 M Raffinose	178.4 g/L
2 mM KH ₂ PO ₄	0.272 g/L
(Addition immediately before use)	
250 mM MgCl ₂	Final 1 mM, 4 mL/L

MRS agar	
Difco MRS broth	55 g/L
1.5% agar (agar No.1 Oxoid)	15 g/L
(Addition immediately before use)	
5 mg/mL Erythromycin (50% EtOH sol.)	1 mL/L

Table 3-10. The composition of reagents and medium used for preparation and transformation of competent cells (2).

-Lb. gasseri -

EXBG-A	
0.3 M Raffinose	178.4 g/L
2% casamino acid (BD)	20 g/L
0.1% yeast extract (BD)	1.0 g/L

EXBG-B	
10% skim milk	100 g/L
0.1% yeast extract (BD)	1.0 g/L

EXBG-C	
2.5 M MgCl ₂ (sterilized by filtration)	

EXBG	
EXBG-A	1 mL
EXBG-B	1 mL
EXBG-C	20 μL
(Addition immediately before use)	
10 μg/mL Erythromycin (50% EtOH sol.)	5 μL/mL

Table 3-11. The composition of solution and program for PCR reaction (pIL check).

Composition of reaction solution	
TaKaRa Ex Taq	0.5 μ L
10 \times Ex Taq buffer	5 μ L
2.5 mM dNTP mix	4 μ L
Template DNA (< 500 ng)	X μ L
Forward primer (pIL F4, 25 μ M)	1 μ L
Reverse primer (pIL R4, 25 μ M)	1 μ L
Sterilized water (milliQ)	fill up to 50 μ L
Total volume	50 μL

PCR program (cool start)	
94.0 $^{\circ}$ C	5 min
94.0 $^{\circ}$ C	30 sec
52.0 $^{\circ}$ C	30 sec
72.0 $^{\circ}$ C	(1min/kbp)
72.0 $^{\circ}$ C	10 min
15.0 $^{\circ}$ C	Infinity hold

} 35 cycles

Table 3-12. The composition of solution and program for PCR reaction (amplification of GS genes).

Composition of reaction solution	
TaKaRa Ex Taq	0.5 μ L
10 \times Ex Taq buffer	5 μ L
2.5 mM dNTP mix	4 μ L
Template DNA (< 500 ng)	X μ L
Forward primer (25 μ M)	1 μ L
Reverse primer (25 μ M)	1 μ L
Sterilized water (milliQ)	fill up to 50 μ L
Total volume	50 μL

PCR program (normal start)	
94.0 $^{\circ}$ C	30 sec
94.0 $^{\circ}$ C	30 sec
52.0-62.0 $^{\circ}$ C *	30 sec
72.0 $^{\circ}$ C	(1min/kbp)
72.0 $^{\circ}$ C	10 min
15.0 $^{\circ}$ C	Infinity hold

} 35 cycles

* 2-11 cycles \rightarrow +1 $^{\circ}$ C/cycle

12-35 cycles \rightarrow fixed 62 $^{\circ}$ C

Table 3-13. The composition of solution and program for PCR reaction (Inverse PCR).

Composition of reaction solution	
5×HF buffer	10 μL
2.5 mM dNTP mix	4 μL
template DNA (< 250 ng)	X μL
Forward primer (25 μM)	1 μL
Reverse primer (25 μM)	1 μL
Sterilized water (milliQ)	fill up to 50 μL
Phusion® DNA Polymerase*	0.5 μL
Total volume	50 μL

* Added after mixing all other reagents and heated (98°C) on reaction block.

PCR program (hot start)	
98.0°C	30 sec
98.0°C	10 sec
54.0°C	30 sec
72.0°C	3 min
72.0°C	10 min
15.0°C	Infinity hold

} 35 cycles

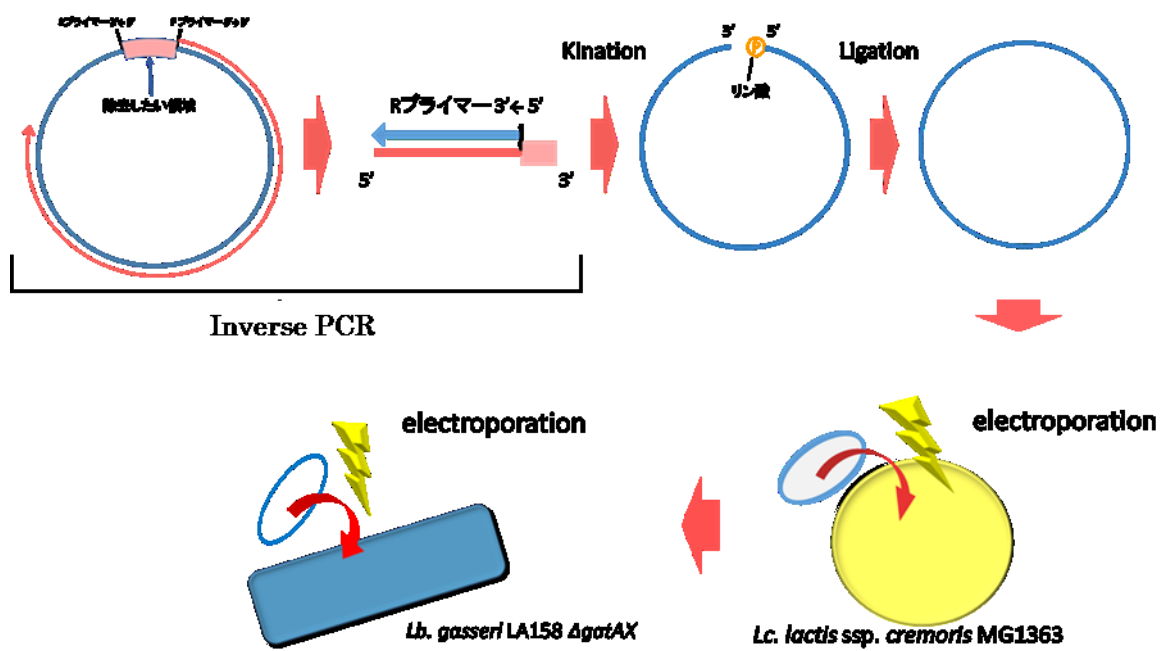


Fig. 3-5. The procedure for construction of GasA and GasX producer strains by inverse-PCR.

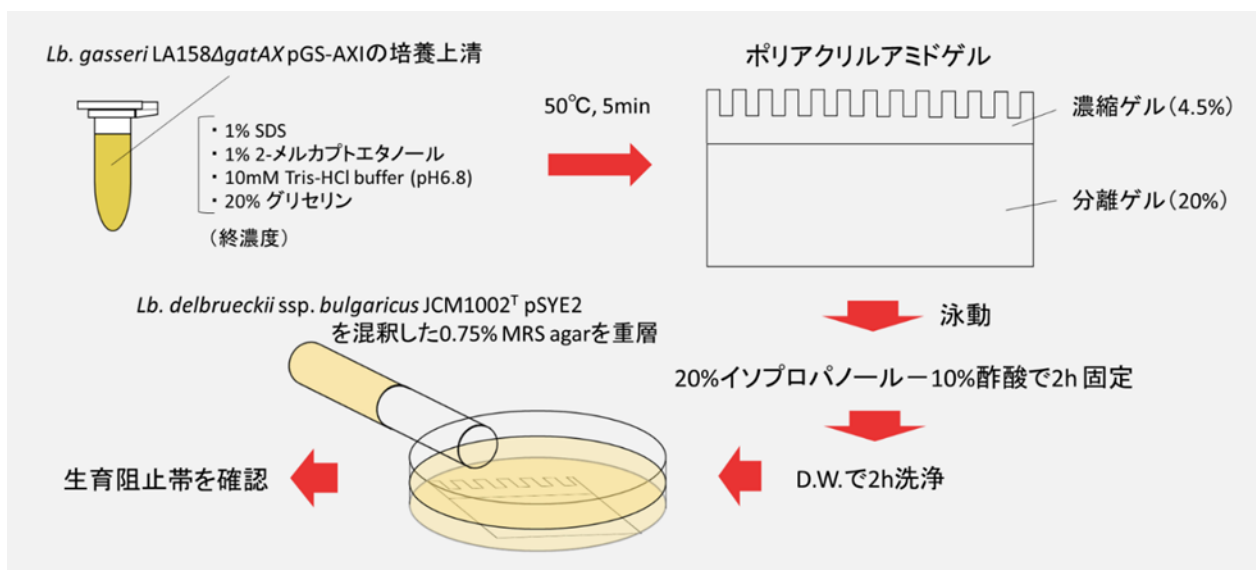


Fig. 3-6. The procedure for molecular weight estimation of GS by *in situ* activity assay.

第 3 節

結果

3-3-1. DNA シーケンシングおよび遺伝学的分析

Lb. gasseri LA327 の染色体 DNA 上にコードされた *gatAX* (GT 構造遺伝子) と *acd 221A* (Acd LF221A 構造遺伝子) の周辺領域におけるヌクレオチドシーケンシングは、9 ORFs および 3 ORFs を内包する、それぞれ 6,935 bp および 1,143 bp の DNA 配列を明らかにした (DDBJ accession No. LC389592 および LC389591)。

各 ORF によってコードされるペプチドおよびタンパク質における推定のアミノ酸配列を用いたホモロジー検索の結果、GT 遺伝子クラスターにおける 9 つの産物は GatK (168 番目のアミノ酸が LA158 の場合は Ala であるのに対し、LA327 では Val である : data not shown) を除き、*Lb. gasseri* LA158 における同産物 (GenBank Accession No. AB710328) と完全に一致した。

さらに、GT の ORFs は Acidocin LF221B (Acd LF221B) および Gassericin K7B のそれらと類似し、Acd LF221A の ORFs は Acidocin Gassericin K7A に対して高い相同性を示した (Table 3-14 および 3-15)。しかしながら、*Lb. gasseri* LA327 において Acd LF221A および GT と推定されたバクテリオシンの配列は、*Lb. gasseri* LF221 における Acd LF221A (GenBank Accession No. AY295874.1) および Acd LF221B (GenBank Accession No. AY297947.1) とは一部が (0-2 アミノ酸残基) 異なったことから (Fig. 3-7 および 3-8)、特に Acd LF221A の類縁体を新規の二成分性バクテリオシンと推定し、ガセリシン S (GasA および GasX) と命名した。

3-3-2. GS の生産機序に関する検討

Lb. gasseri LA158 における GT 活性 (15,754 AU/mL) は、染色体 DNA 上における GT 構造遺伝子 (*gatAX*) の除去 (LA158 Δ *gatAX*) によって完全に消失したが、*Lb. gasseri* LA327 から同遺伝子を除去した場合 (LA327 Δ *gatAX*) には活性が維持され、むしろ上昇した (16 AU/mL \rightarrow 64 AU/mL : data not shown)。

次いで、LA327 の染色体 DNA より GT の推定 ABC-トランスポーター遺伝子 (*gatT*) をノックアウトした (LA327 Δ *gatT*) 結果、培養上清中におけるバクテリオシン活性が完全に消失した。これは、GS が GatT を介して分泌されるバクテリオシンであることを示している。

3-3-3. GS 生産改変株における活性発現の確認

バクテリオシン非生産株 (*Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX*) の *gasAXI* および *gasAX* 導入株の培養上清においてバクテリオシン活性が得られ (Table 3-16)、GS はバクテリオシンであることが実証された。

また、*gasAXI* 導入株の活性値 (123 AU/mL) が *gasAX* 導入株 (62 AU/mL) よりも高値となった一方で、*gasI* 導入株では活性が得られなかった。

3-3-4. GS および GT における二成分性の証明

GasA および GasX の単独生産株より培養上清を取得後、バクテリオシン活性測定へ供した結果、GasA (GasAI) および GasX (GasXI) 単独では活性を示さなかった (約 40 倍に濃縮した場合でも) が、組

み合わせ（培養上清容量比＝1：1）によって活性（＝相乗効果）を示した（Table 3-17）。

次いで、GatA および GatX の単独生産株を用いて同様に試験した結果、GatA のみが微弱な活性（31 AU/mL）を示し、GatX（約 40 倍に濃縮しても活性なし）との混合（培養上清容量比＝1：1）時には活性が大幅に上昇した（985 AU/mL：Table 3-18）。

3-3-5. GasA、GasX の作用比率に関する検討

GasA と GasX のどちらを 2ⁿ 倍段階希釈後、それぞれ無希釈の相補的ペプチド含有上清と混合した場合も、希釈段階依存的に活性が低下した（Fig. 3-9 および 3-10）。さらに、GasA と GasX の含有上清を混合後（1：1）に段階希釈した場合も同様に活性が低下し（Fig. 3-11）、GS の活性は GasA と GasX のより濃度が低い方によって決定され、両者の最適な作用比率は 1：1（培養上清の容量比として）であることが明らかとなった。

3-3-6. GS および GT の相互作用に関する検討

GasA、GasX、GatA、および GatX 生産株の培養上清を 2 種ずつ組み合わせた結果、GS および GT 本来の組み合わせ（GasA+GasX および GatA+GatX）以外では注目すべき活性の上昇は認められなかった（Table 3-19）。さらに、4 種全てを混合した結果、理論値通りの活性値（GS: 123 AU/mL + GT: 1,969 AU/mL / 2 → 985 AU/mL）となり、GS と GT の間に相乗効果は存在しないことが明らかとなった。

3-3-7. *in situ* activity assay による GS の検出と挙動分子量推定

GS 含有培養上清の濃縮物（100k 非透過画分）を SDS-PAGE に供し、ゲルへ指標菌 [*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)] を混釈した Em 含有 MRS 軟寒天培地（0.75%寒天）20 mL を重層後、30°C, 18h にて培養した結果、泳動距離で約 4.6 cm の位置に GS による生育阻止帯が確認された（Fig. 3-12）。次いで、各分子量マーカーの分子量サイズ（kDa）と泳動距離（cm）との検量線を作成後、生育阻止帯の泳動距離（約 4.6 cm）を代入した結果、GS の挙動分子量は約 5,400 となり、理論値（GasA：M.W. 6,061 および GasX：M.W. 5,481）と近似し、活性値以外で GS の存在を確認することが出来た。

3-3-8. GS の pH 安定性試験

GasAXI 含有培養上清を pH 2, 4, 7, および 10 に調整して静置（室温, 1 h）後、活性を測定した結果、いずれの pH に調整した場合も活性値が一定（123 AU/mL）であり、GS は pH 2-10 において安定である可能性が示唆された（Table 3-20）

3-3-9. GS の熱安定性試験

GS 含有培養上清を各温度条件（121°C, 15 min、95°C, 5 min、および 70°C, 1 h）で処理後、残存活性を測定した結果、最も過酷な加熱条件である 121°C, 15 min 後も活性が 25%（31 AU/mL）残存し、GS は熱に安定であることが明らかとなった（Table 3-21）。また、4°C および 37°C で長期間（1 mth）保持した場合、4°C では活性が完全に

保持されたのに対し、37℃の場合では 25% (31 AU/mL) 量まで低下し、37℃における保存性は低いと考えられた。

3-3-10. GS のプロテアーゼ耐性試験

GS、GT、および GA 含有培養上清を各種プロテアーゼ (ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、およびプロティナーゼ K) で処理後、残存活性を測定した結果、全てのガセリシンがプロティナーゼ K 処理によって完全に失活したが、GA は他の供試プロテアーゼ (3 種) へ抵抗性を示し、プロテアーゼ抵抗性の高いバクテリオシンであると考えられた。また、GT はペプシンのみへ僅かな抵抗性を示し、GS は全ての供試プロテアーゼ処理によって完全に失活した (Table 3-22)。

3-3-11. GS の抗菌性に関する検証

原液の $\Delta gatAX$ 上清と GS 上清 (バクテリオシン非生産株と GS 生産株の培養上清) をそのまま感作した場合には、どちらも抗菌性が確認できなかった (Fig. 3-13)。これに対して、10 倍量の MRS 培地を混合して感作した場合には、 $\Delta gatAX$ 上清を感作した菌体が増殖したのに対し、GS 上清を感作した菌体は菌数がほぼ一定となり、GS による静菌的作用が示された (Fig. 3-14)。

次いで、約 10 倍に濃縮した両上清をそのまま感作した結果、原液と同様にどちらも抗菌性が確認できなかった (Fig. 3-15)。そして、それぞれの濃縮上清に 10 倍量の MRS 培地を混合して感作した場合には、 $\Delta gatAX$ 上清を感作した菌体が増殖したのに対し、GS 上清を感作した菌体は菌数が大幅に減少し、GS による殺菌的作用が示され

た (Fig. 3-16)。

これらの結果より、GS の抗菌性は濃度によって殺菌的もしくは静菌的に変化する可能性が示された。同時に、GS の濃度自体は低下しているにも関わらず、10 倍量の MRS 培地を混合した場合にのみ殺菌的な作用が示されたことから、GS は増殖する菌体のみを殺菌する可能性が考えられた。

3-3-12. 静菌的条件下の菌体に対する GS の抗菌性に関する検証

MRS 培地混合 $\Delta gatAX$ 上清を感作した菌体は、4°C 保持によって増殖が完全に阻害されていることが明らかとなった (Fig. 3-17)。GS 上清でも、MRS 培地を混合しているにも関わらず 4°C 感作時には殺菌的作用が阻害された (Fig. 3-18)。したがって、GS は MRS 培地成分の有無に関わらず、増殖の停止した菌体は殺菌しないことが示唆された。

次いで、Em を添加した MRS 培地混合 $\Delta gatAX$ 上清を感作 (37°C) した菌体は、増殖が完全に阻害されていた (Fig. 3-19)。そして、Em 添加 MRS 培地混合 GS 上清を感作 (37°C) した場合には、菌数の減少が認められたが、その減少度 (1.8×10^5 CFU/mL \rightarrow 3.2×10^4 CFU/mL) は Em 非添加時 (1.8×10^5 CFU/mL \rightarrow 1.3×10^2 CFU/mL) に比べて緩慢であった (Fig. 3-20)。したがって、GS は感作温度に関係なく、増殖の停止した菌体は殺菌しないことが示唆された。

Table 3-14. Deduced peptides and proteins encoded in *gat* operon of *Lb. gasseri* LA327 (DDBJ accession No. LC389592).

ORF	Length (amino acid)	MW	pI	Function	Homology search ^a (identities: residual ratio, %)	Localization (TMS no.) ^b
<i>gatP</i>	50	5852	9.83	inducer peptide precursor	Lactacin F inducer peptide precursor <i>Lb. gasseri</i> K7 (50/50,100%)	soluble (none)
<i>gatK</i>	435	50444	5.2	histidine kinase	histidine kinase <i>Lb. gasseri</i> K7 (430/435,99%)	membrane (6)
<i>gatR</i>	265	30280	5.36	response regulator	chemotaxis protein CheY <i>Lb. gasseri</i> K7 (265/265,100%)	soluble (none)
<i>gatT</i>	719	81054	7.71	ABC transporter permease component	peptide ABC transporter ATP-binding protein <i>Lb. gasseri</i> K7 (718/719,99%)	membrane (6)
<i>gatC</i>	197	21938	10.13	putative accessory protein	putative Gassericin K7 B accessory protein (196/197,99%)	membrane (1)
<i>gatZ</i>	33	3924	7.57	putative uncharacterized protein	unknown <i>Lb. gasseri</i> LF221 (33/33,100%)	soluble (none)
<i>gatA</i>	75	7480	10.02	GatA precursor	putative complement factor Acd221b <i>Lb. gasseri</i> LF221 (75/75,100%)	membrane (1)
<i>gatX</i>	65	6673	10.11	GatX precursor	Acidocin LF221B Acd221B <i>Lb. gasseri</i> LF221 (64/65,98%)	soluble (none)
<i>gatI</i>	112	13343	9.81	immunity protein	putative immunity protein Aci221B <i>Lb. gasseri</i> LF221 (112/112,100%)	membrane (4)

^a Homology search was demonstrated with BLAST program¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>).

^b Deduced using the TMHMM program¹⁷¹ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Table 3-15. Deduced peptides and proteins encoded in *gas* operon of *Lb. gasseri* LA327 (DDBJ accession No. LC389591).

ORF	Length (amino acid)	MW	pI	Function	Homology search ^a (identities: residual ratio, %)	Localization (TMS no.) ^b
<i>gasA</i>	79	7662	10.27	GasA precursor	Gassericin K7 A complemental factor (78/79,99%)	membrane (1) ^c
<i>gasX</i>	69	7287	10.00	GasX precursor	Acidocin LF221A Acd221A (67/69,97%)	membrane (1) ^c
<i>gasI</i>	90	10789	7.42	putative immunity protein	Gassericin K7 A immunity protein (90/90,100%)	membrane (2)

^a Homology search was demonstrated with BLAST program¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾
(<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>).

^b Deduced using the TMHMM program¹⁷¹⁾
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

^c With putative mature peptide.

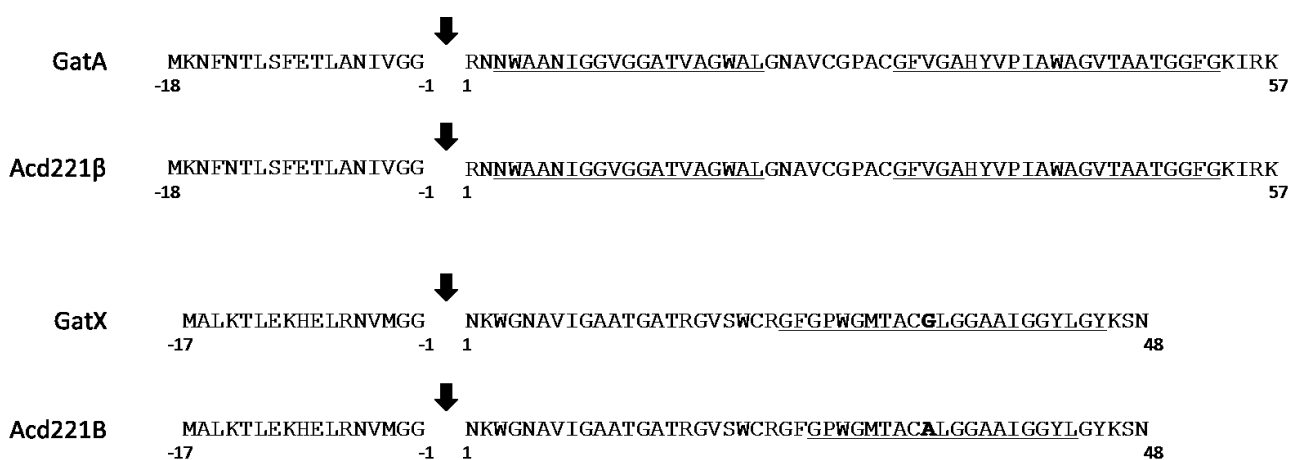


Fig. 3-8. The deduced amino acid sequences for GT (GatA and GatX) and Acd LF221B (Acd221β and Acd221B).

Arrows, underlines, and bolds indicate predicted cleavage sites, putative transmembrane domains, and different amino acid residues between GT and Acd LF221B, respectively.

Table 3-16. Antibiotic activities obtained in GS expression strains.

Culture supernatant ^a	Bacteriocin activity (AU/mL)
GasAXI	123
GasAX	62
GasI	ND

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a GasAXI : *Lb. gasserii* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI)

^a GasAX : *Lb. gasserii* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX)

^a GasI : *Lb. gasserii* LA158 Δ *gatAX* (pGS-I)

Table 3-17. Antimicrobial activities of culture supernatants containing GS component peptides in alone and combination.

Culture Supernatant ^a	Bacteriocin activity (AU/mL)
GasA	ND ^b
GasX	ND ^b
GasAI	ND ^b
GasXI	ND ^b
GasA+GasX (1:1)	62
GasA+GasXI (1:1)	31
GasAI+GasX (1:1)	62
GasAI+GasXI (1:1)	31

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

^a GasA: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ X).

^a GasX: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ A).

^a GasAI: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI Δ X).

^a GasXI: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI Δ A).

^a GasAX: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX).

^a GasAXI: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI).

^b ND: Not detected, approximately forty-fold concentrated supernatants were subjected.

Table 3-18. Antimicrobial activities of culture supernatants containing GT component peptides in alone and combination.

Culture Supernatant ^a	Bacteriocin activity (AU/mL)
GatA	62
GatX	ND ^b
GatA+GatX (1:1)	1,969

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

^a GatA: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 $\triangle gatX$

^a GatX: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 $\triangle gatA$

^b ND: Not detected, approximately forty-fold concentrated supernatant was subjected.

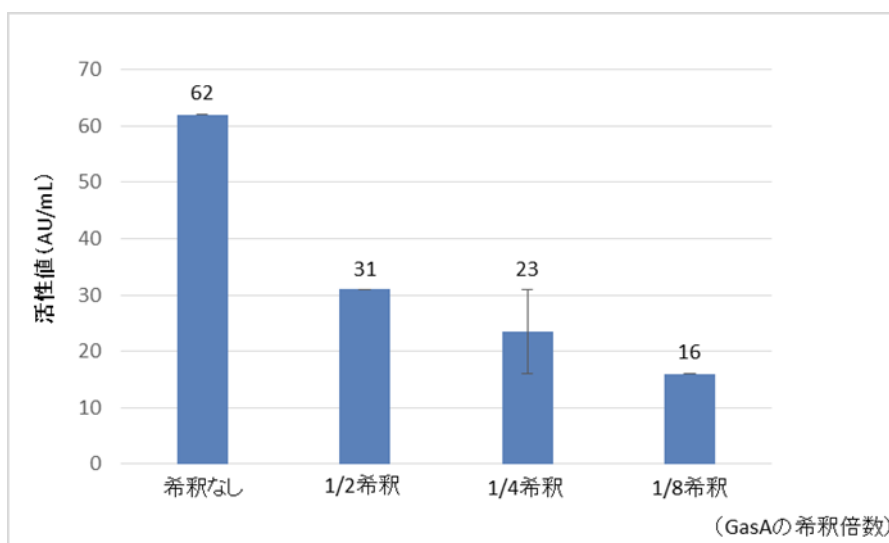


Fig. 3-9. Effect of the dilution of culture supernatant containing GasA on antimicrobial activity of GS.

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

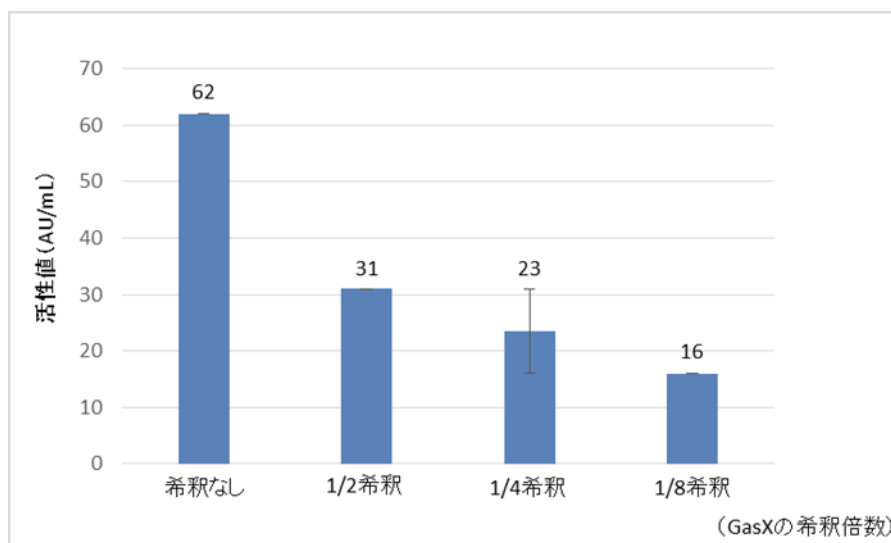


Fig. 3-10. Effect of the dilution of culture supernatant containing GasX on antimicrobial activity of GS.

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

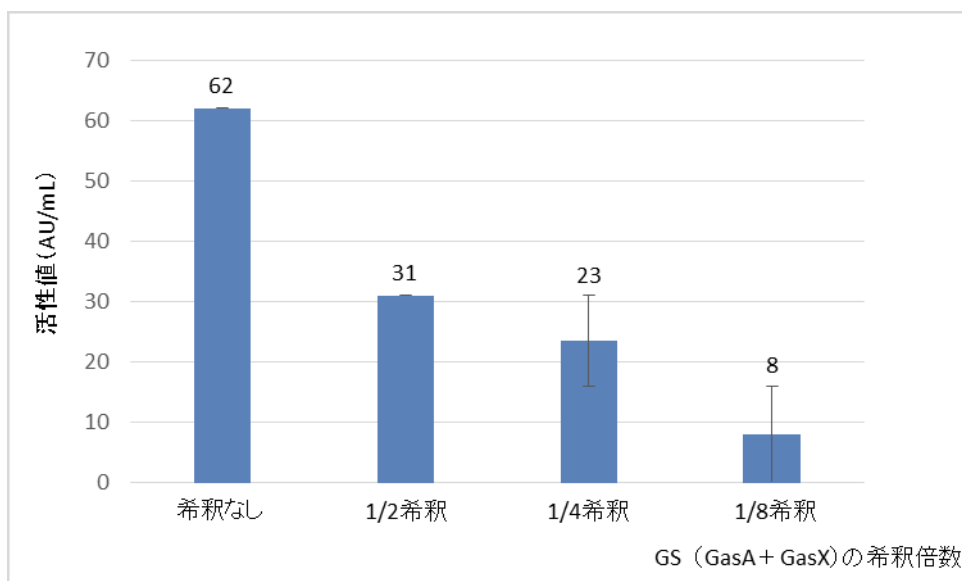


Fig. 3-11. Effect of the dilution of culture supernatant containing GS (GasA + GasX) on its antimicrobial activity.

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

Table 3-19. Effect of the combination of culture supernatants containing GS and GT component peptides on its antimicrobial activity.

Culture supernatant ^a	Theoretical activity (AU/mL)	Actual activity (AU/mL)
GasA + GatA ^b	(ND ^c +62)/2	31
GasA + GatX ^b	(ND ^c + ND ^c)/2	ND ^c
GasX + GatA ^b	(ND ^c +62)/2	31
GasX + GatX ^b	(ND ^c +ND ^c)/2	ND ^c
GasA + GasX + GatA + GatX ^b	(123+1969)/2	985

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

^a GasA: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI Δ X).

^a GasX: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AX Δ A).

^a GatA: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatX*.

^a GatX: The culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatA*.

^b Each supernatant was mixed with equal amount.

^c ND: Not detected.

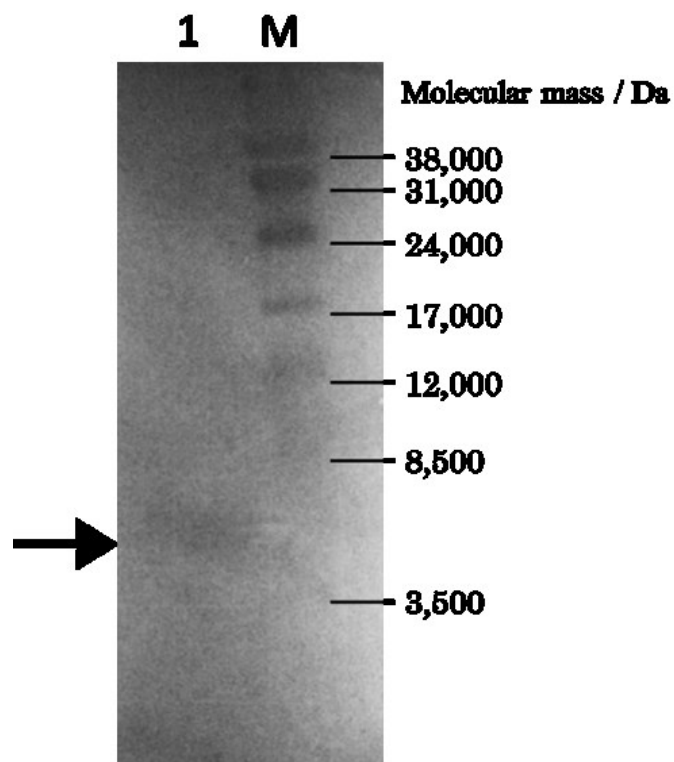


Fig. 3-12. Molecular weight estimation of GS by *in situ* activity assay.

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

Lane M, molecular weight markers; lane 1, semi-purified GS.

Arrow indicates the clear zone of GS.

Table 3-20. pH stability of GS.

Culture supernatant	pH	Bacteriocin activity (AU/mL)
<i>Lb. gasseri</i> LA158 Δ <i>gatAX</i> (control)	2	ND ^a
	4	ND ^a
	7	ND ^a
	10	ND ^a
<i>Lb. gasseri</i> LA158 Δ <i>gatAX</i> (pGS-AXI) (GS supernatant)	2	123
	4	123
	7	123
	10	123

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T.

^a ND: Not detected.

Table 3-21. Heat stability of GS.

Culture supernatant	Condition	Bacteriocin activity (AU/mL, residual rate)
<i>Lb. gasseri</i> LA158 Δ <i>gatAX</i> (pGS-AXI) (GS supernatant)	121°C, 15 min	31 (25%)
	95°C, 5 min	62 (50%)
	70°C, 1 h	62 (50%)
	37°C, 1 mth	31 (25%)
	4°C, 1 mth	123 (100%)

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

Table 3-22. Proteolysis sensitivity of bacteriocins produced by *Lb. gasseri*.

Protease	Residual activity of bacteriocins (AU/mL, rate)		
	GA ^a	GT ^b	GS ^c
untreated	985	31,508	246
pepsin	492 (50%)	492 (1.6%)	ND ^d
trypsin	62 (6.3%)	ND ^d	ND ^d
alpha-chymotrypsin	246 (25%)	ND ^d	ND ^d
proteinase K	ND ^d	ND ^d	ND ^d

Indicator: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2).

^a GA: the culture supernatant of *Lb. gasseri* LA39

^b GT: the culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158

^c GS: the culture supernatant of *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI)

^d ND: Not detected.

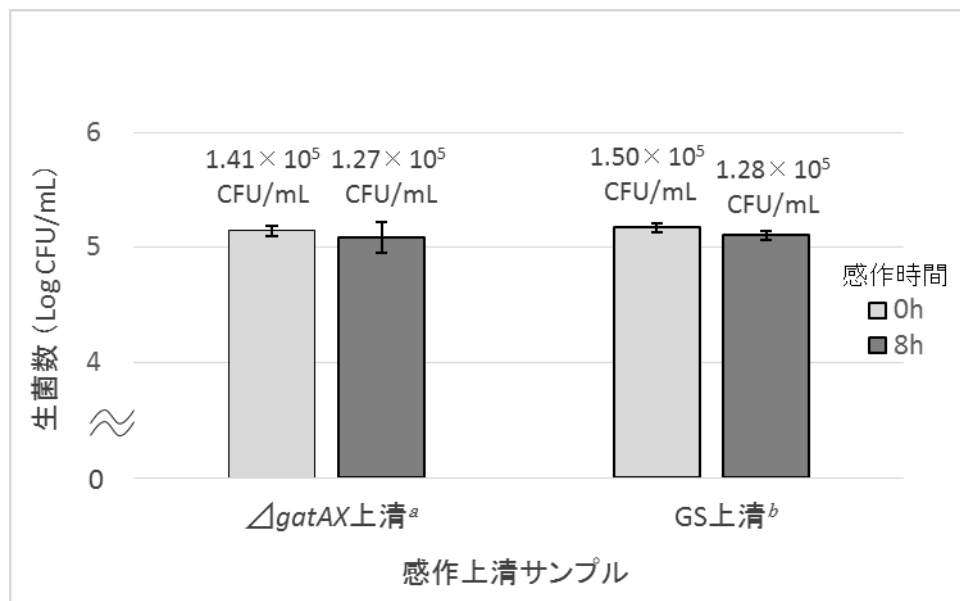


Fig. 3-13. Antimicrobial activity of culture supernatant containing GS.

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a ΔgatAX上清 : *Lb. gasseri* LA158 ΔgatAX (バクテリオシン非生産株) の培養上清

^b GS上清 : *Lb. gasseri* LA158 ΔgatAX (pGS-AXI) (GS生産株) の培養上清

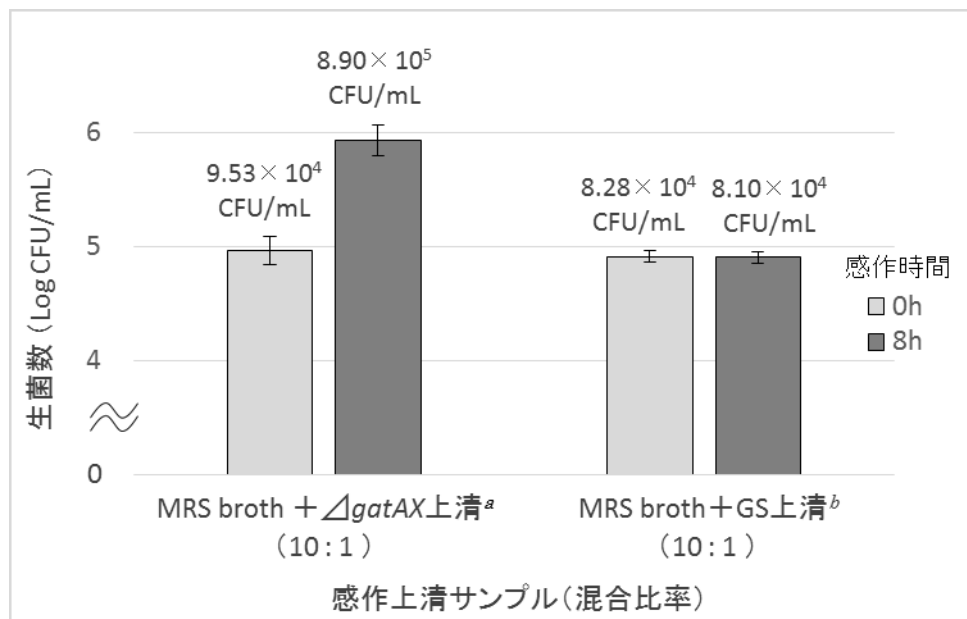


Fig. 3-14. Antimicrobial activity of mixture of MRS broth + culture supernatant containing GS (10:1, volume ratio).

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a $\Delta gatAX$ 上清 : *Lb. gasseri* LA158 $\Delta gatAX$ (バクテリオシン非生産株) の培養上清

^b GS上清 : *Lb. gasseri* LA158 $\Delta gatAX$ (pGS-AXI) (GS生産株) の培養上清

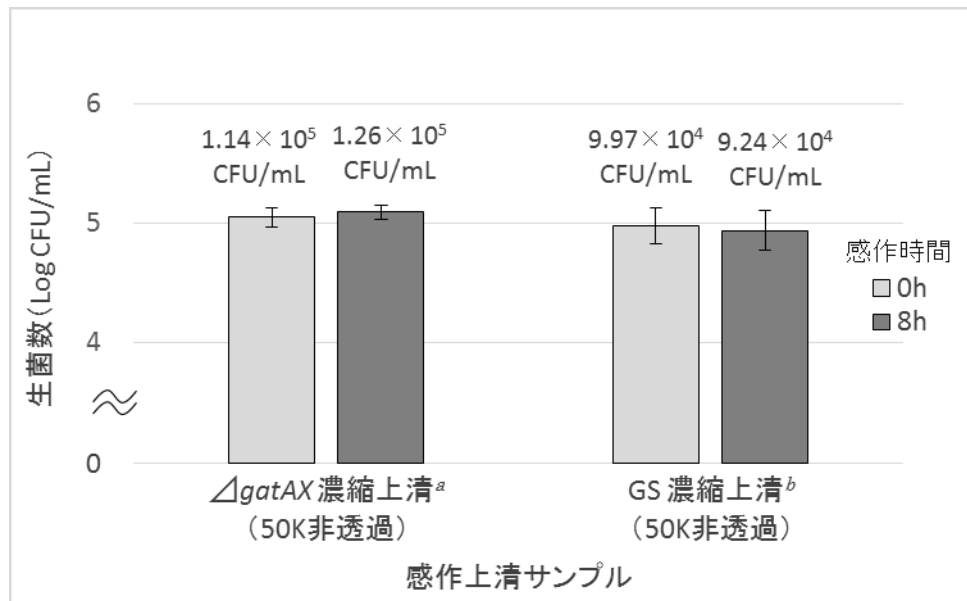


Fig. 3-15. Antimicrobial activity of concentrated culture supernatant containing GS.

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a △gatAX 上清 : *Lb. gasseri* LA158△gatAX (バクテリオシン非生産株) の培養上清

^b GS 上清 : *Lb. gasseri* LA158△gatAX (pGS-AXI) (GS 生産株) の培養上清

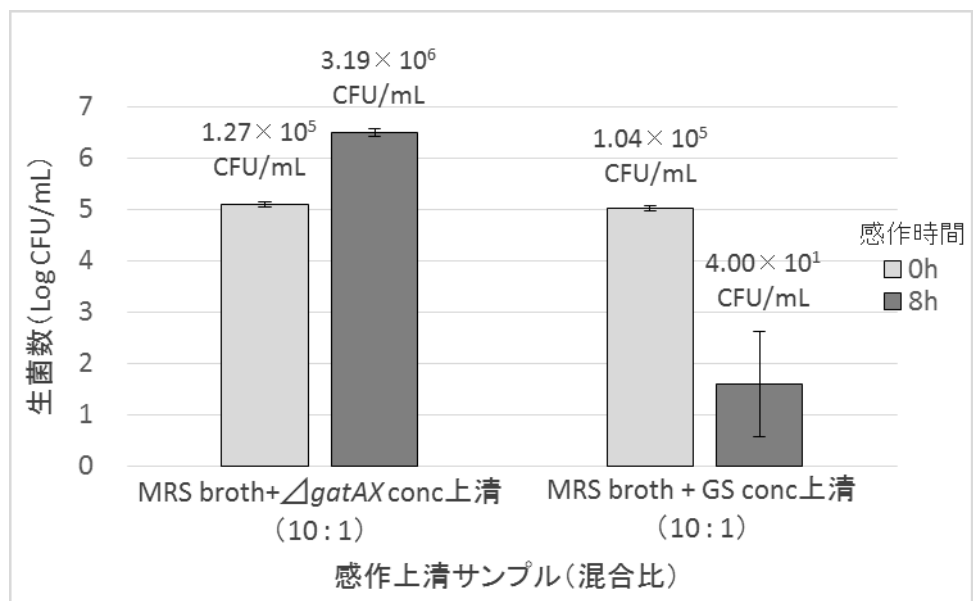


Fig. 3-16. Antimicrobial activity of mixture of MRS broth + concentrated culture supernatant containing GS (10:1, volume ratio).

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a $\Delta gatAX$ 上清 : *Lb. gasseri* LA158 $\Delta gatAX$ (バクテリオシン非生産株) の培養上清

^b GS 上清 : *Lb. gasseri* LA158 $\Delta gatAX$ (pGS-AXI) (GS 生産株) の培養上清

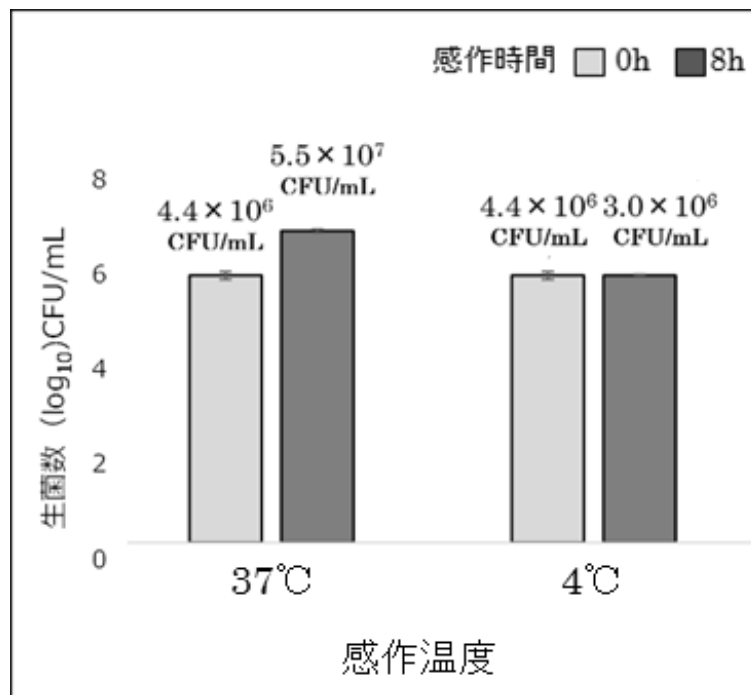


Fig. 3-17. Effect of the sensitization temperature on antimicrobial activity of mixture of MRS broth + concentrated $\Delta gatAX$ supernatant^a (10:1, volume ratio).

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a $\Delta gatAX$ 上清 : *Lb. gasseri* LA158 $\Delta gatAX$ (バクテリオシン非生産株) の培養上清

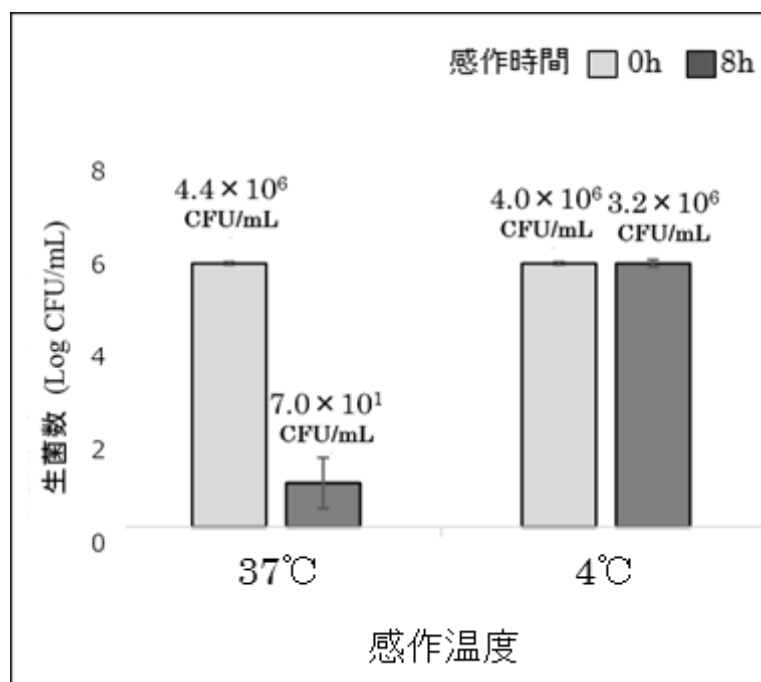


Fig. 3-18. Effect of the sensitization temperature on antimicrobial activity of mixture of MRS broth + concentrated GS supernatant^a (10:1, volume ratio).

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a GS 上清 : *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI) (GS 生産株) の培養上清

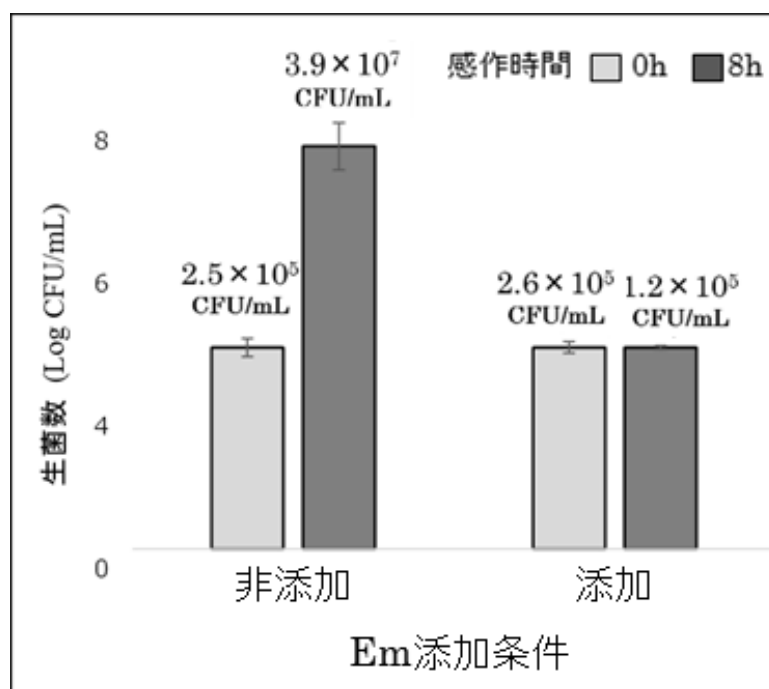


Fig. 3-19. Effect of erythromycin addition on antimicrobial activity of mixture of MRS broth + concentrated $\Delta gatAX$ supernatant^a (10:1, volume ratio).

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (Em 感受性株)

^a $\Delta gatAX$ 上清 : *Lb. gasserii* LA158 $\Delta gatAX$ (バクテリオシン非生産株) の培養上清

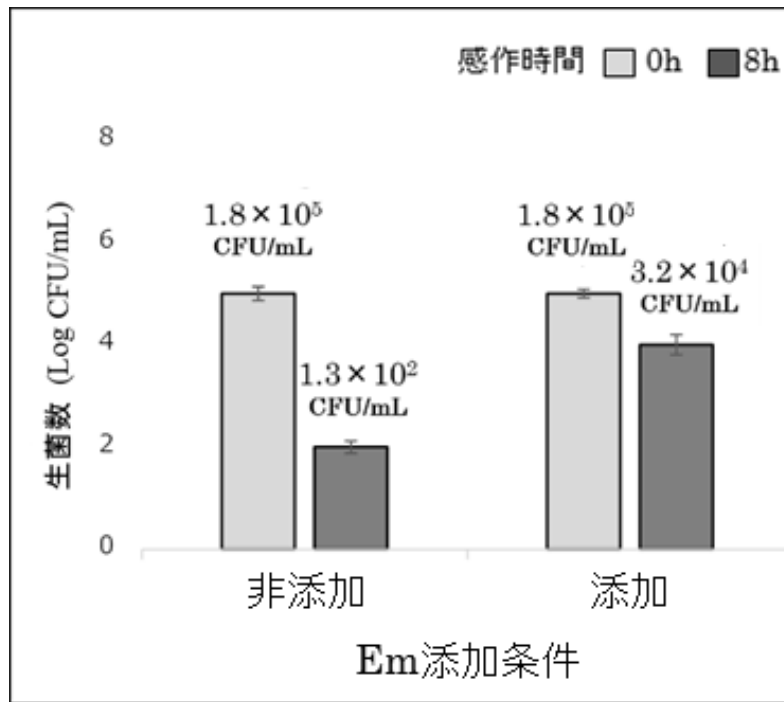


Fig. 3-20. Effect of erythromycin addition on antimicrobial activity of mixture of MRS broth + concentrated GS supernatant^a (10:1, volume ratio).

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (Em 感受性株)

^a GS 上清 : *Lb. gasserii* LA158 Δ *gatAX* (pGS-AXI) (GS 生産株) の培養上清

第 4 節

考察

当研究室では、*Lb. gasseri*が生産する初めてのバクテリオシン (GA) の精製 (1994 年)⁸¹⁾ とクローニング (1998 年)⁸²⁾ に成功し、2000 年には第二のガセリシン (GT) の部分精製 (GatA) と両構造遺伝子 (*gatA*, *gatX*) および周辺の塩基配列を報告⁸⁹⁾ した。Matijasićらは、1998 年に *Lb. gasseri* LF221 が生産する 2 種類のバクテリオシン (Acd LF221A および Acd LF221B) の精製と N 末端アミノ酸配列の解析を行い⁹⁶⁾、ホモロジー解析から Acd LF221B は GT の類縁体であったが、Acd LF221A については相同性の高いバクテリオシンは見出されず、*Lb. gasseri* における第三のガセリシンである可能性を示唆した。その後、Acd LF221A の少なくとも 3 ORFs から構成される遺伝子クラスター (推定構造遺伝子: *acd 221aA*; 推定自己耐性遺伝子: *aci 221A*) が 2004 年に決定され⁹⁷⁾、Acd LF221A は二成分性バクテリオシン (Acd 221α + Acd 221A) である可能性が考えられた。しかしながら、Acd 221α については N 末端領域の配列が未決定であり、実際に単離精製されたのは 2 番目のペプチド (Acd 221A) のみであるため、実際に Acd LF221A が二成分性バクテリオシンであるのかは未証明であり、諸性質などについても一切明らかにされてこなかった。

最近、当研究室でヒト成人の大腸組織より単離した *Lb. gasseri* LA327 のゲノム DNA 中に、GT 遺伝子クラスターに加えて Acd LF221A の遺伝子クラスターと相同性の高い遺伝子配列を見出した。本研究においてプライマーウォーキング法を用いた配列決定の結果、両遺伝子クラスター (GT: 6,935 bp および Acd LF221A: 1,143 bp)

の全配列を決定するに至った。ホモロジー解析の結果、後者の遺伝子クラスター (1,143 bp) にコードされている構造遺伝子の推定アミノ酸配列が、Acd LF221A (Acd 221 α + Acd 221A) とは少なくとも 1-2 残基異なっていることが判明し (Fig. 3-7)、新規の二成分性バクテリオシン(class IIb)として、ガセリシン S(GS, GasA + GasX) と命名した。本章では、GS における二成分性の証明、および諸性質について説明を試みた。

これまでに、*Lb. gasseri* 由来の二成分性 (class IIb) バクテリオシンとして、GT と Acd LF221A 以外に、*Lb. gasseri* LF221 株が生産する Acd LF221B (Acd 221 β + Acd 221B, GT 類縁体)、*Lb. gasseri* K7 株が生産する Gassericin K7A (GasK7A α + GasK7A β , Acd LF221A 類縁体) および Gassericin K7B (GasK7B α + GasK7B β , GT 類縁体)、そして *Lb. gasseri* EV1461 が生産する Gassericin E (GaeA + GaeX) などが報告されているが^{96, 163-165}、実際には片方のペプチドのみが単離精製されたのに過ぎず、完全精製に成功した例は存在しない。したがって、従来の単離精製技術を用いた GS の特性解析は困難であると考え、本章では GS (GasA および GasX) を単独で生産する発現株の構築を試みた。

GS の発現株構築に向け、GS における生産機序に関する検討を行った。GS 遺伝子クラスター (1,143 bp, DDBJ accession No. LC389591) は構造遺伝子の *gasAX* および推定の自己耐性遺伝子である *gasI* のわずか 3 ORFs のみで構成され、生産制御や菌体外輸送に関与する遺伝子の存在が周辺領域を含めて確認されなかった。そのため、生合成された GS におけるリーダー配列の除去および排出を担う遺伝子群は未決定であり、GS の生産機序および実際に生産されているのかさえ不明であった。そこで、*Lb. gasseri* LA327 株の GT

遺伝子クラスター（6,935 bp、DDBJ accession No. LC389592）より、構造遺伝子（*gatAX*）をノックアウトした結果、バクテリオシン活性が残存したことから、GS は実際に生産されている可能性が高いと考えられた。次いで、GT の ABC トランスポーター遺伝子（*gatT*）をノックアウトした結果、バクテリオシン活性が完全に消失し、GatT は GT に加えて GS の生産も担う multiple-transporter であることが明らかとなった。multiple-transporter については、実際に特徴づけられた例がほとんど存在せず、*Ent. feacium* NKR-5-3 が生産する 3 種のエンテロシン（Ent53AZ、Ent53C、および Ent53D）の生産に対応する ABC トランスポーターである EnkT¹⁸²⁾ が唯一の報告例となる。したがって、GatT は multiple-transporter として 2 例目の報告となり、非常に稀な存在であることが明らかとなった。これと同時に、GS 生産株の構築には宿主として GT 生産株を用いることが必須となった。

GT 生産株（*Lb. gasseri* LA158）より GT 構造遺伝子をノックアウトした LA158 Δ *gatAX* を作製後、これを宿主として GS 遺伝子（*gasAXI*）を導入した結果、バクテリオシン活性が得られ、GS はバクテリオシンであることが証明された（Table 3-16）。さらに、活性値が GasAX 生産株 < GasAXI 生産株となったことから GasI も抗菌ペプチドである可能性が考えられたが、GasI 生産株の培養上清からは活性が得られず、GasAX 生産株の培養上清と混合しても活性の上昇は認められなかった（data not shown）。一般的に、class II バクテリオシンにおける構造遺伝子のすぐ下流には自己耐性遺伝子がコードされることが多いとされている¹⁴¹⁾。さらに、Ra ら（1991）¹⁸³⁾ は Nisin A における自己耐性遺伝子として知られる *nisI* を生産株より除去することで、Nisin A 生産量が低下することを報告している。したがって、*gasI* は自己耐性遺伝子である可能性が高く、自己耐性能の付与によって、

間接的に GS の生産を補助している可能性が考えられた。

GS (GasA および GasX) と GT (GatA および GatX) における各構成ペプチドの単独生産株を構築した結果、GatA のみが単独で微弱な活性 (31 AU/mL) を示したのに対し、混合時 (GS : GasA + GasX および GT : GatA + GatX) には特異的に高い活性 (123 AU/mL および 985 AU/mL) が認められ、GS と GT は二成分性バクテリオシンであることが初めて証明された (Table 3-17 および 3-18)。その際、GasI による生産補助について考慮し、GasA と GasX に加えて GasAI および GasXI 生産株も作製したが、活性の増強は認められず、抗菌活性を持たない GasA と GasX の生産において自己耐性能は不要である可能性が考えられた。

Majhenic ら (2004)⁹⁷⁾ は、*Lb. gasseri* LF221 より単離精製された Acd 221A および Acd 221B (本研究では不活性であった GasX と GatX の 2 および 1 残基変異体) が、それぞれ単独で *Lb. sakei* NCDO271 の生育を阻害したことを報告している。本研究で用いた指標菌 (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T) の違いに起因する可能性も考えられたが、これらの変異残基が関与している可能性がより高いと考えられた。実際に、Enterocin C と Enterocin 1017 の二番目のペプチドにおいて、たった 1 残基のアミノ酸変異がそれらの抗菌スペクトルへ大きな影響を及ぼすことが報告されている¹⁸⁴⁾。しかしながら、*Lb. gasseri* K7 が生産する Gas K7_B (GatX の 100% 相同体) が、単独で *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMG 6901^T (= JCM 1002^T) の生育を阻害することが報告されている¹⁶⁴⁾。二成分性 (class IIb) バクテリオシンである Carnobacteriocin XY (CbnX + CbnY) は水溶条件下において二次構造を一切に示さなかったが、トリフルオロエタノールを含む溶液中では CbnX と CbnY

のどちらも高い α -ヘリックス含量を示すことが報告されている¹⁸⁵⁾。さらに、以前に当研究室で *Lb. gasseri* LA158 の培養上清から GatA と GatX の単離を試みたが、培地中の界面活性剤 (Tween 80) と HPLC 精製の最終段階で使用した 60% 2-プロパノールによって両ペプチドを含む重合体が生成され、単離・精製は出来なかった⁹²⁾。このように、バクテリオシン精製に用いられた有機溶媒が、GatX およびその類縁体によって示された抗菌活性に関与している可能性がある。これとは対照的に、*Lb. gasseri* EV1461 によって生産される Gassericin E の構成ペプチドである GaeA (GatA の 1 残基変異体) が単独で抗菌活性を示すことが報告されており¹⁶⁵⁾、本研究で得られた GatA 単独での活性はこれを支持した。

また、GasA と GasX の最適な作用比率について検証した結果、GasA と GasX 含有培養上清のどちらを希釈した場合も、希釈度依存的に活性値が低下したことから (Fig. 3-9、3-10、および 3-11)、GasA と GasX 培養上清の最適な作用比率は容量比で 1 : 1 であることが示された。本研究で用いた発現ベクターの pIL253-P₃₂ では、導入遺伝子に関わらず mRNA の発現量は一定であることが過去の研究によって明らかとなっているため (data not shown)、ペプチドレベル (mol 濃度) でも GatA と GatX の作用比率は 1 : 1 が最適と考えられる。実際に、GasA と GasX 生産株の培養上清を 1 : 1 で混合した活性値 (62 AU/mL) が、GasAXI 生産株の活性値 (123 AU/mL) のちょうど 1/2 となっていることがこれを支持している。

*Lb. plantarum*¹⁸⁶⁾ や enterococci^{187,188)} のように 1 つの菌株から複数のバクテリオシンが生産される例はさほど稀なことではないが、その利点については不明な点が多い。そこで、GS と GT 間における相乗効果について試験した結果、両バクテリオシンの構成ペプチド

における交差的な組み合わせ、さらに全4ペプチドの混合時において特異的な活性の上昇は認められず (Table 3-19)、GSおよびGT間において相乗効果はなかった。同様に、Plantaricin JK および EF 間においても相乗効果はないことが報告されている¹⁸¹⁾ 一方で、Lactococcin G における片方のペプチドは Enterocin 1017 および Lactococcin Q の相補的ペプチドと混合時に高い活性を示すことが報告されている^{147,189,190)}。

BLAST¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によってそれぞれの相同率 (%) を計算した結果、Lactococcin G と Enterocin 1017/Enterocin Q 間における相同率 (それぞれ約 88% および約 57%) に比べて、GS と GT 間における相同率 (約 26%) が低かったことから、これが相乗効果の有無に関与している可能性が高いと考えられる。

In situ activity assay による分子量推定の結果、分子量約 5,400 の位置に生育阻止帯が確認され (Fig. 3-12)、理論値 (GasA : M.W. 6,061 および GasX : M.W. 5,481) に近似していたことから、活性値以外の指標によって GS の存在が確認された。また、GT の *In situ activity assay* における挙動分子量も約 5,400 であることが報告されているため⁸⁹⁾、SDS-PAGE に関連した手法による GS と GT の区別および単離は困難と考えられた。

GS を食品に応用することを考慮すると、様々な食品の pH や製造工程における加熱処理に安定であることが非常に重要となる。そこで、GS の食品応用に向けた諸性質の解析を行った。GS の pH 安定性を試験した結果、試験した全ての pH (2, 4, 7, および 10) において活性が一定となり (Table 3-20)、GS は pH 2-10 に安定であることが明らかとなった。実際に多くの食品へ応用されている Nisin A

は、酸性領域では優れた抗菌性を発揮する一方で、中性—アルカリ性領域においては不溶化（pH 2 に比べて、pH 8 では溶解度が 1/228 に低下することが報告されている）⁷¹⁾により、活性が大幅に低下、もしくは完全に消失するという欠点が知られている^{72,73)}。したがって、GS は Nisin A の欠点を補える可能性が期待できる。次いで、耐熱性を試験した結果、121°C, 15 min の加熱後も 25%量の活性を残存し、GA および GT（それぞれ 3%および 9%）¹⁹¹⁾以上に高い耐熱性を示した（Table 3-21）。また、保存性について試験した結果、4°C では 1 か月間後も活性を完全に維持したのに対し、37°C で保持した場合は 1 か月後に 25%量まで低下した。これと同様に、*Lb. gasseri* LA158 が生産する GT についても 37°C での保存性が低く、培養上清を事前に加熱処理（99°C, 10 min）することで、この活性低下が緩慢になることが分かっている（data not shown）。GS 発現株の宿主には *Lb. gasseri* LA158 の GT 構造遺伝子ノックアウト株を用いているため、LA158 由来の菌体外プロテアーゼ活性が 37°C における保存性の低下要因である可能性が考えられる。さらに、プロテアーゼ耐性について試験した結果、GS は供試した全てのプロテアーゼ処理によって完全に失活し、ガセリシンのなかでも特にプロテアーゼの感受性が高かった（Table 3-22）。

次いで、GS の抗菌特性について試験した結果、GS 上清をそのまま指標菌に感作した場合には、GS の濃度に関係なく抗菌性は認められなかったが、MRS 培地を混合した場合には、低濃度の GS で静菌的作用が示され、高濃度の GS によって殺菌的作用が示された（Fig. 3-13, 3-14, 3-15, および 3-16）。GS の濃度は低下しているにも関わらず、GS 上清の 10 倍量で MRS 培地を混合した場合のみ殺菌性が示されたことから、GS は増殖する菌体を特異的に殺菌する可能性が

示された。次いで、静菌的条件下（4℃保持および静菌剤である Em の添加）の菌体に対する GS 抗菌性の抗菌性について試験した結果、GS は増殖の停止した菌体は殺菌しなかった（Fig. 3-17, 3-18, 3-19, および 3-20）。

静菌的作用を示すバクテリオシンについてはいくつかの報告例があるが¹⁹²⁻¹⁹⁴、増殖する菌体のみを特異的に攻撃するバクテリオシンについては報告例がほとんど無いことから、GS は増殖する菌体の特異的に殺菌するバクテリオシンとして初めての報告例となる可能性がある。しかしながら、どのような機構で増殖する菌体のみを選択的に殺菌しているかについては不明である。*Ent. faecalis* YI714 が生産する Bacteriocin 41 を構成する 2 つの菌体外タンパク質のうち、BacL1（ペプチダーゼ型、595 AA, 64.5 kDa）が増殖する菌体のペプチドグリカンにおける L-Ala-L-Ala 交差架橋部分に特異的に結合し、静菌的活性を示すことが報告されている¹⁹⁵。しかし、GS の分子量（GasA：64 AA、6.1 kDa；GasX：53 AA、5.5 kDa）が BacL1 に比べて明らかに低いことを鑑みると、GS が酵素活性型の作用機構を有するとは考えにくく、別の部位を攻撃している可能性が高い。したがって、GS の作用機構を解明するには、レセプターの解明が必須と考えられる。*Lc. lactis* subsp. *lactis* が生産する Lactococcin G は最初に報告された二成分性バクテリオシンであり¹⁵⁴、標的菌の UppP（細胞壁合成酵素）をレセプターとして認識していることが報告されている¹⁹⁶。さらに、*Lb. plantarum* が生産する Plantaricin JK は、アミノ酸、ポリアミン、および有機陽イオンの特異的なトランスポータータンパク質である、Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC) Family¹⁹⁷ をレセプターとして認識することが報告されている^{198,199}。UppP と APC Family

のいずれも生育および増殖との関連性が強いことから、指標菌の生育状況に応じてこれらタンパク質の発現を確認することで、GSによる選択的殺菌の機構について解明できる可能性が考えられる。

さらに、GSはGTよりも多くの推定GxxxG (AxxxA)モチーフを有していることから (Fig. 3-21)、GSは広い抗菌スペクトルを有している可能性が示唆されている。

以上の結果より、GSは二成分バクテリオシンであり、高いpH安定性と耐熱性を有することから食品加工時の処理条件には安定である一方、高いプロテアーゼ感受性を有することから消化管内で容易に分解される、安全性の高いバクテリオシンであると考えられた。また、増殖する菌体のみを殺菌し、増殖の停止した菌体には作用しないことから、選択的殺菌剤としての応用も期待される。今後、GSの抗菌スペクトルにおけるさらなる解析や、選択的殺菌機構の解明に向けたレセプターの特性が課題として挙げられる。

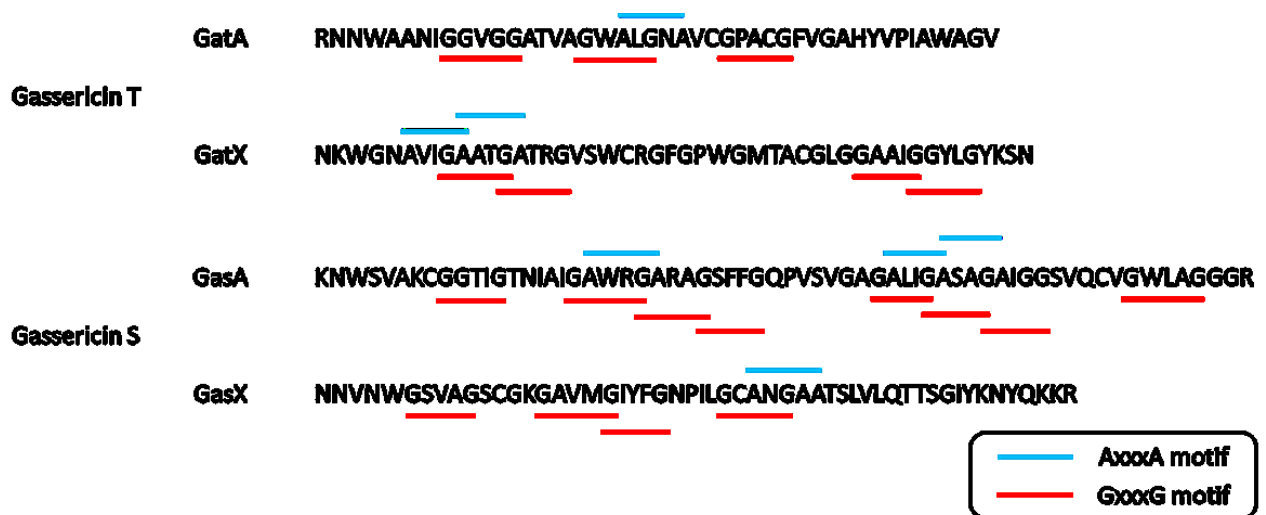


Fig. 3-21. Deduced GxxxG and AxxxA motif in GT and GS.

第 4 章

GS 遺伝子が GT 生産に及ぼす影響に関する検討

第 1 節

諸言

第 3 章において、*Lb. gasseri* LA327 から検出された Acd LF221A 遺伝子について、プライマーウォーキング法による全長配列決定を行った結果、Acd LF221A とは少なくとも 1 残基以上が異なっていることが明らかとなり、ガセリシン S (GS ; GasA + GasX) と命名した。さらに、GS は二成分性バクテリオシンであることが証明され、生産には GT の ABC-トランスポーター遺伝子 (*gatT*) を含む GT 遺伝子が必須であることが明らかとなった。したがって、GS のみを生産する野生株は存在しないと考えられた。

これまで、*Lb. gasseri* の企業より委託された株や、少数の研究室単離株において各ガセリシン (GA、GT、および Acd LF221A) 構造遺伝子の保有状況を確認し、GT 生産株が優勢である (バクテリオシン生産株のうち、約 6 割が GT 構造遺伝子を保有) 可能性が確認されている。しかしながら、我が国における公的機関株である JCM (Japan Collection of Microorganisms) 株においてはガセリシン遺伝子の保有状況を確認していなかった。そこで、最近になって *Lb. gasseri* JCM 株 (計 15 菌株) において、新規のガセリシンを生産する株のスクリーニングを期待して、各ガセリシン (GA、GT、および GS) 構造遺伝子の保有状況および培養上清中のバクテリオシン活性について試験した結果、9 株が GT 構造遺伝子を保有し、そのうち 5 株が GS/GT 両構造遺伝子を保有していた (Table 4-1) (田中 2015

卒論)²⁰⁰⁾。さらに、JCM 1017、1019、および 5814 の 3 株についてはどのガセリシン構造遺伝子も検出されなかったにも関わらず、培養上清中にバクテリオシン活性が確認され、新規のガセリシンを生産する可能性が示唆された。これらのバクテリオシン様の抗菌物質 (BLIS) については、現在、同定および特性解析を試みている。

さらに、JCM 株におけるバクテリオシン遺伝子保有状況の試験は、別の興味深い事象を浮き彫りにした。GT 構造遺伝子のみを保有する株に比べて、GS/GT 両構造遺伝子を保有する株では培養上清中のバクテリオシン活性が明らかに低くなっており、GS と GT が互いに生産を阻害している可能性が考えられた。

また、LA39 株は全てのガセリシン構造遺伝子を保有しているが、精製を試みた際の逆相 HPLC において単一のピークが確認され⁸¹⁾、SDS-PAGE でも GA のバンドしか検出されなかったことから⁸⁴⁾、GA のみを生産していると考えられており、前述の生産阻害は GS-GT 間のみで起こっている可能性が高い。加えて、第 3 章における試験の結果、GS と GT は同一のトランスポーター (GatT) によって生産および活性発現されていることが明らかとなっている。したがって、GatT の競合および GS 遺伝子関連の mRNA 発現が、GT の発現もしくは生産を阻害している可能性が考えられた。

本章では、GT 生産株である *Lb. gasseri* LA158 に対して GS 遺伝子 (*gasAXI*) を全ての組み合わせ (7 通り) で導入後、バクテリオシン活性を比較することにより、GS 遺伝子の導入が GT 生産量へ及ぼす影響について検証を試みた。

Table 4-1. Revealed retention status of each gassericin structural gene and antimicrobial activities in the supernatants of *Lb. gasserii* JCM strains.²⁰⁰⁾

菌株	由来	構造遺伝子の保有 ^a			バクテリオシン活性 ^b
		GA	GT	GS	
JCM 1017	不明	×	×	×	7,877 AU/mL
JCM 1019	不明	×	×	×	31,508 AU/mL
JCM 1025	ヒト腸管	×	×	×	ND ^c
JCM 1026	不明	×	×	×	ND ^c
JCM 1031	ヒト糞便	×	○	○	ND ^c
JCM 1130	不明	×	○	○	ND ^c
JCM 1131 ^T	ヒト腸管	×	×	×	ND ^c
JCM 5343	不明	×	○	○	ND ^c
JCM 5344	ヒト膣	×	○	○	246 AU/mL
JCM 5813	乳児糞便	×	○	○	ND ^c
JCM 5814	鳥糞便	×	×	×	7,877 AU/mL
JCM 8787	ヒト糞便	×	○	×	3,938 AU/mL
JCM 8788	ヒト糞便	×	○	×	3,938 AU/mL
JCM 8789	ヒト糞便	×	○	×	3,938 AU/mL
JCM 8790	ヒト糞便	×	○	×	3,938 AU/mL
LA39 (GA 生産)	乳児糞便	○	○	○	985 AU/mL
LA158 (GT 生産)	乳児糞便	×	○	×	15,754 AU/mL
LA327 (GT/GS 生産)	ヒト大腸	×	○	○	16 AU/mL

^a ○ : PCR による遺伝子の検出あり

× : PCR による遺伝子の検出なし

Primer pair

GA : Fw AGGAAGATACTATGGTTACTAAG

Rv AAGCTTTATAAACTAGGCTGCAG

GT : Fw ACATTGGCTAACATAGTTGGTGG

Rv ATATCCCAGATATCCTCCAATTG

GS : Fw TAAACGAGTGTCAACTACAAACC

Rv TTCCACTAGTAGTTTGTAGAACC

^b Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T

^c ND : Not detected

第 2 節

材料および方法

4-2-1. 試薬

本実験において、特に断りのない限り、和光純薬工業株式会社（大阪）の特級試薬または一級試薬を用いた。

4-2-2. 器具、培地および試薬類の滅菌

本実験において使用する器具、培地および試薬類の滅菌処理は、特に断りのない限りオートクレーブ滅菌機（SDL-320、TOMY、Tokyo、Japan）を用い、121℃、15 min の条件で行った。

4-2-3. 使用菌株、培地および培養条件

本実験で用いた菌株およびプラスミドは Table 4-2 にまとめた。ガセリシン T（Gassericin T, GT）生産菌株として、ヒト乳児（6 ヶ月齢、女）糞便から単離した *Lb. gasseri* LA158（JCM11046）、および JCM（理研）より入手した *Lb. gasseri* JCM 8787, 8788, 8789, および 8790 を用いた。バクテリオシン活性測定用の指標菌は、株式会社明治（研究本部、食機能科学研究所）より譲渡された Em 耐性株 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T（pSYE2）を用いた。Lactobacilli は Difco Lactobacilli MRS 培地（BD）に適宜 Em（5mg/mL, 50%エタノールに溶解, -20℃保存）を添加し、37℃, 18-24 h の継代培養（2-10%（v/v）接種）を 2 回行なった後に各試験に供した。

発現ベクター（pIL253-P₃₂）の保存株およびプラスミド導入の中

間宿主として、フローニンゲン大学より譲渡された *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 を使用した。同株は適宜 Em を添加した GM17 培地 [0.5% (w/v) Glucose 添加 M17 培地 (BD)]により、30°C, 18-24 h で静置培養した。

4-2-4. バクテリオシン活性測定

バクテリオシン抗菌活性は寒天拡散法 (agar-well diffusion method) により、Tagg と McGiven の方法¹³⁶⁾ を改良した Toba らの方法¹³⁷⁾ に従って、以下の通りに測定した。

指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2) の 18-24 h 培養液を MRS 培地で 10 倍希釈し、そのうち 250 μ L を、105°C, 5 min にて加熱溶解後 55°C で恒温保持した MRS 軟寒天培地 [0.75% (w/v) 寒天、AGAR BACTERIOLOGICAL, Oxoid, UK] 10 mL に混合した後、MRS 寒天平板培地 [1.5% (w/v) 寒天、Oxoid] に重層して固化させた。次いで、コルクボーラー No.2 (直径 6 mm) を用いて試料注入孔を作製し、2ⁿ (n: 整数) 倍に段階希釈した各試料溶液 65 μ L をウェルに注入後、37°C, 18 h にて培養した。希釈溶媒には滅菌済み 0.85% PBS を用いた。指標菌液の希釈に用いた MRS 液体培地、MRS 寒天平板培地および MRS 軟寒天培地には Em を適宜添加 (終濃度 5 μ g/mL) した。抗菌活性値は、生育阻止円の認められた最も高い希釈度の逆数と定義し、その単位を Arbitrary Unit (AU) で表した。

4-2-5. プラスミド DNA の抽出 (アルカリ SDS 法)

以下の実験操作で使用した試薬の組成は Table 3-4 に示した。プラ

スミド DNA (pIL253-P₃₂, Fig. 3-4) または改変プラスミド DNA を有する、*Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 の 18-24 h 培養液 2 mL を、2 mL 容遠心チューブに採取し、5,000 rpm, 10 min, RT にて遠心分離した。培養上清を除去し、Solution A (10 mg/mL Lysozyme 添加) を 200 μ L 加え、菌体を懸濁した。55°C, 10 min (水浴) にてインキュベートした後、Solution B を 400 μ L 添加し、緩やかに転倒混和した。次いで、Solution C を 300 μ L 添加して緩やかに転倒混和した。15,000 rpm, 5 min, 20°C にて遠心分離し、上層を回収した後、室温にてフェノール/クロロホルム溶液 (ニッポンジーン) を等量添加し、タッチミキサーで攪拌した。本溶液を 15,000 rpm, 5 min, 20°C にて遠心分離し、中間層が混入しないように上層を回収した後、等量の 99.5% エタノール (RT) を添加し、緩やかに転倒混和した。次いで 15,000 rpm, 10 min, 20°C にて遠心分離し、アスピレータを用いてエタノールを除去した。生じたペレットは 70% エタノール (RT) を用いて洗浄し、自然乾燥にてチューブ内の残存エタノールを除去して滅菌水 4 or 40 μ L (形質転換用は 4 μ L、PCR 用は 40 μ L の滅菌水を加えた) に溶解後、適宜 (基本的には PCR を用いる場合のみ) Ribonuclease A を 1 μ L 添加し、37°C, 15 min (水浴) にてインキュベートした (保存は 4°C)。

4-2-6. アガロースゲル電気泳動および DNA 量の測定

各 DNA フラグメントの電気泳動は、0.8% (w/v) 濃度のアガロース (Agarose S、ニッポンジーン) ゲルを用いて行った。泳動 buffer には 1×TAE buffer (40 mM Tris および 10 mM EDTA 2Na、氷酢酸で pH 7.5 に調整)、マーカーには 1 kb DNA Ladder または 500 bp

DNA Ladder (TaKaRa, Shiga, Japan) をそれぞれ用いた。泳動装置には Mupid®-II plus (ADVANCE, Tokyo, Japan) を用い、100V の定電圧で 30-35 min にて泳動を行った。泳動後のゲルは、0.5 µg/mL エチジウムブロマイド (臭化エチジウム, Wako 生化学用) 溶液に 15 min 浸潤することで染色を行った。

また、溶液中における DNA 濃度の測定には NanoVue Plus (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いた。

4-2-7. コンピテントセルの調製 - *Lb. gasseri* -

以下の実験操作で使用した試薬の組成は Table 3-9 および 3-10 に示した。*Lb. gasseri* 各株を MRS 培地にて 37°C, 18 h の条件で前培養した。本培養液から MRS+1% (w/v) Glycine 培地 (pH 4.5, HCl により調整) 50 mL に 0.5% (v/v) 量で植菌し、37°C, 18 h にて培養した。

以降の操作は氷上にて行い、buffer はあらかじめ氷冷して用いた。得られた培養液を 6,000 rpm, 5 min, 4°C にて遠心分離し、上清を除去した後、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 10 mL で菌体を懸濁した。6,000 rpm, 5 min, 4°C にて遠心分離し、上清を除去した。再度 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 10 mL で菌体を懸濁し、懸濁液のうち 100 µL を 10 倍希釈して OD₆₆₀ を測定した。その後、同様に遠心分離と菌体洗浄を再度行い、上清を除去した後、EB 5 mL にて菌体を懸濁した。遠心分離 (6,000 rpm, 5 min, 4°C) 後に上清を除去した。得られた菌体は先に測定した OD₆₆₀ の値から、最終濁度が OD₆₆₀=50 となる量の EB を用いて懸濁後、1.5 mL 容遠心チューブに 80 µL ずつ分注して、使用するまで -80°C にて保存した。

4-2-8. エレクトロポレーション法による形質転換 -*Lb. gasseri*-

以下の操作は全て氷上にて行った。また、使用した試薬の組成は全て Table 3-9 および 3-10 に示した。*Lb. gasseri* のコンピテントセルを 37°C (水浴) にて迅速かつ完全に溶解し、直ちに氷冷した。48°C, 10 min (水浴) にて加熱してから 10,000 rpm, 1 min, 4°C にて遠心分離後、上清をピペットで除去し、EB 200 μ L で菌体を懸濁した。再度遠心分離を行って上清を除去し、EB 75 μ L で菌体を懸濁したものをエレクトロポレーションに用いた。

各リコンビナントプラスミド DNA 溶液 (3 μ L 以下) を熱処理および洗浄済みのコンピテントセルへ添加後、混和して 0.2 cm エレクトロポレーションキュベット (BioRad) へ全量移した後、エレクトロポレーション装置 (BioRad) を用いて Voltage 1.5 kV, Capacitance 25 μ F, Resistance 200 Ω の条件で電気パルスを付加した。また、ポジティブコントロールとして空ベクター溶液、ネガティブコントロールとして滅菌水を供し、同様に電気パルスを付加した。

EXBG 培地 (終濃度 50 ng/mL Em、RT) 1 mL をキュベットに注入して菌体ごと 2 mL 容マイクロチューブへ回収し、37°C, 2 h (水浴) にて expression 培養した。本培養液を Em 添加 (終濃度 25 μ g/mL) MRS 寒天平板培地に 330 μ L ずつ塗抹後、AnaeroPack™ (MGC, Tokyo, Japan) を使用し、37°C にてコロニーが出現するまで (通常 24-48 h) 嫌気培養した。

得られたコロニーは、釣菌後に Em 添加 (終濃度 5 μ g/mL) MRS 液体培地へ植菌して 37°C, 16-24 h の条件で 1-2 回培養後、同培地で 37°C, 12-16 h にて培養した菌液を 60% (w/v) グリセロール溶液と 1:1 で混合し、- 80°C にて保存した。

4-2-9. *Lb. gasseri* LA158 に対する各 GS 遺伝子の導入がその GT 生産へ及ぼす影響に関する検討

第 3 章で作製した *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 の各 GS 遺伝子導入株より、方法 4-2-5 によって各 GS 遺伝子リコンビナントプラスミド DNA (pGS-A, X, I, AI, XI, AX, および AXI) を抽出した。

各 pGS および空ベクター (pIL253-P₃₂) を *Lb. gasseri* LA158 のコンピテントセル (方法 4-2-7 で作製) に対して導入し (方法 4-2-8 によって)、LA158 の各 GS 遺伝子導入株を作製した。

作製した各 GS 遺伝子および pIL253-P₃₂ 導入株の MRS 培地培養上清を取得後、方法 4-2-4 へ供し、バクテリオシン活性値を測定した。

4-2-10. GT 低生産株に対する GS 遺伝子 (*gasAXI*) の導入がその GT 生産へ及ぼす影響に関する検討

第 3 章で作製した *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 の各 GS 遺伝子 (*gasAXI*) 導入株より、方法 4-2-5 によって GS 遺伝子リコンビナントプラスミド DNA (pGS-AXI) を抽出した。

pGS-AXI および空ベクター (pIL253-P₃₂) を *Lb. gasseri* JCM 8787, 8788, 8789, および 8789 のコンピテントセル (方法 4-2-7 で作製) に対して導入し (方法 4-2-8 によって)、各 *gasAXI* 導入株を作製した。

作製した *gasAXI* および pIL253-P₃₂ 導入株の MRS 培地培養上清を取得後、方法 4-2-4 へ供し、バクテリオシン活性値を測定した。

Table 4-2 . The strains and plasmids used in this study.

Strain and plasmid	Description ^a	Reference and source
Strains		
<i>Lactobacillus gasseri</i>		
LA158 (JCM 11046)	Producer strain of Gassericin T, plasmid free	Laboratory collection
JCM 8787	Producer strain of Gassericin T (lower activity), plasmid free	JCM ^b
JCM 8788	Producer strain of Gassericin T (lower activity), plasmid free	JCM ^b
JCM 8789	Producer strain of Gassericin T (lower activity), plasmid free	JCM ^b
JCM 8790	Producer strain of Gassericin T (lower activity), plasmid free	JCM ^b
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM1002 ^T		
	Indicator strain for bacteriocin activity assay	JCM ^b
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363		
	Intermediate host strain for recombinant plasmids, plasmid free, derivative of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 712	Gasson J.M. <i>et al.</i> (1983) ¹⁷⁸⁾
Plasmids		
pSYE2	Em ^r ; pSY1 derivative with Erythromycin resistance gene (<i>emrA</i>) of pAM81 from <i>Enterococcus faecalis</i>	Satoh <i>et al.</i> (1997) ¹⁸⁰⁾
pIL253-P ₃₂	Em ^r ; pIL253 derivative with P ₃₂ promotor	Kemperman <i>et al.</i> (2003) ¹⁸¹⁾
pGS-AX	Em ^r ; pIL253-P ₃₂ derivative carrying <i>gasAX</i>	This study
pGS-AXI	Em ^r ; pIL253-P ₃₂ derivative carrying <i>gasAXI</i>	This study
pGS-I	Em ^r ; pIL253-P ₃₂ derivative carrying <i>gasI</i>	This study
pGS-AXΔA	Em ^r ; pGS-AX derivative eliminated <i>gasA</i>	This study
pGS-AXΔX	Em ^r ; pGS-AX derivative eliminated <i>gasX</i>	This study
pGS-AXIΔA	Em ^r ; pGS-AXI derivative eliminated <i>gasA</i>	This study
pGS-AXIΔX	Em ^r ; pGS-AXI derivative eliminated <i>gasX</i>	This study

^aEm^r, Erythromycin resistance.

^bJCM, Japan Collection of Microorganisms, Tsukuba, Japan.

第 3 節

結果

4-3-1. *Lb. gasseri* LA158 に対する各 GS 遺伝子の導入がその GT 生産へ及ぼす影響に関する検討

Lb. gasseri LA158 に対して、GS 遺伝子 (*gasAXI*) を全ての組み合わせ (計 7 パターン) で導入した結果、空ベクター (pIL253-P₃₂) 導入株と比較し、全ての GS 遺伝子導入株においてバクテリオシン活性はむしろ上昇する傾向が示され (有意差なし、Fig. 4-1)、GS 遺伝子の導入による GT の生産阻害は認められなかった。

4-3-2. GT 低生産株に対する GS 遺伝子 (*gasAXI*) の導入がその GT 生産へ及ぼす影響に関する検討

Lb. gasseri LA158 に比べて GT の生産量が低い、*Lb. gasseri* JCM 8787, 8788, 8789, および 8790 の 4 株に対して GS 遺伝子 (*gasAXI*) を導入した結果、LA158 株と同様に、空ベクター (pIL253-P₃₂) 導入株と比較して *gasAXI* 導入株では、バクテリオシン活性の上昇する傾向が示された (有意差なし、Fig. 4-2)。

本結果から、バクテリオシン発現量のベースラインが低い GT 生産株においても、GS 遺伝子の導入はその GT 生産に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

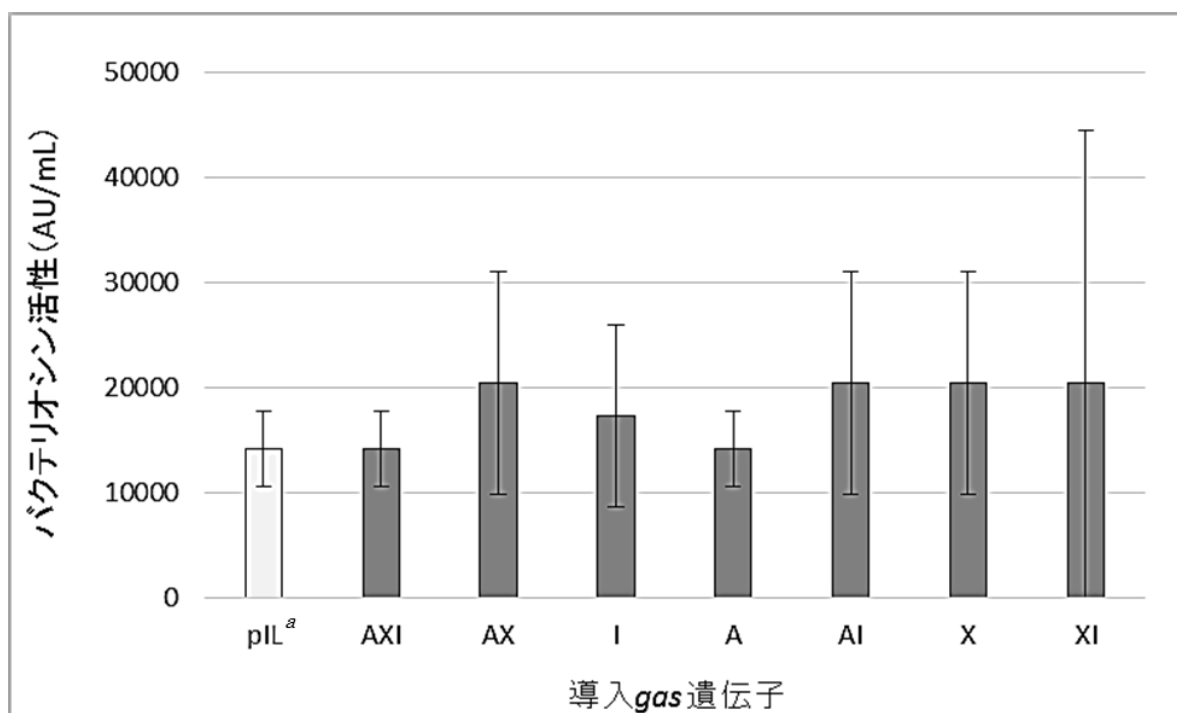


Fig. 4-1. Effect of GS genes insertion on GT production of *Lb. gasseri* LA158.

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a pIL : pIL253-P₃₂ (空ベクター導入株、ネガティブコントロール)

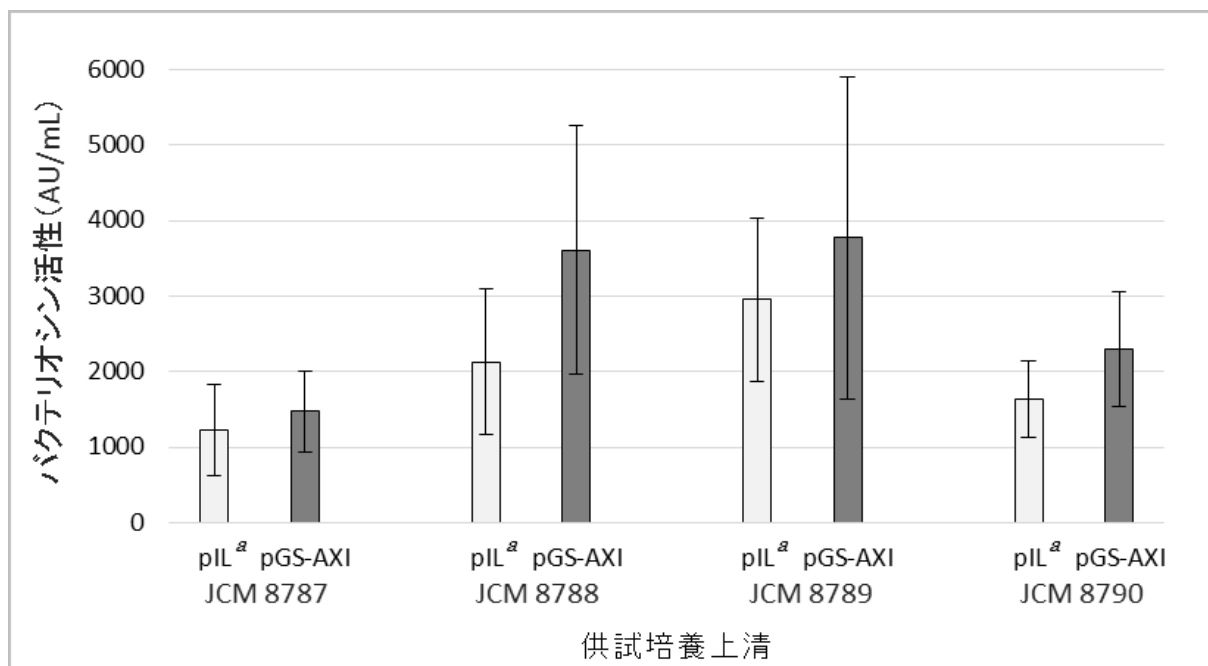


Fig. 4-2. Effect of *gasAXI* genes insertion on GT production of *Lb. gasseri* JCM 8787, 8788, 8789, and 8790.

Indicator : *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T (pSYE2)

^a pIL : pIL253-P₃₂ (空ベクター導入株、ネガティブコントロール)

第 4 節

考察

先行研究より、*Lb. gasseri* JCM 株において各ガセリシン構造遺伝子の保有状況と培養上清中のバクテリオシン活性について試験した結果、GS と GT 両遺伝子を保有する株では、GT 遺伝子のみを保有する株に比べて明らかにバクテリオシン活性が低くなっていた²⁰⁰⁾ (Table 4-1)。

Lb. plantarum C11 は 5 種の Plantaricin を生産し、*Ent. faecium* ATB 197a は 2 種、および *Ent. faecium* L50 は 3 種の Enterocin を生産することが報告されているが^{186,201,202)}、このように複数のバクテリオシンを生産する株において、Plantaricin および Enterocin の生産量は非常に少ないことが知られている。実際に、これら Plantaricin と Enterocin を個々で異種発現することによってバクテリオシン収量が大幅に上昇することが報告されている²⁰³⁻²⁰⁷⁾。さらに、*Lb. gasseri* LA327 (GS および GT 遺伝子保有株) はバクテリオシン活性が 0 - 62 AU/mL と低く、不安定であるのに対し、GT 構造遺伝子 (*gatAX*) をノックアウトした *Lb. gasseri* LA327 Δ *gatAX* では 62 - 123 AU/mL と高値で安定していた (data not shown)。加えて、第三章における試験の結果、GS と GT はどちらも同じ ABC-トランスポーター (GatT) によって菌体外に輸送されていることが分かっている。したがって、GS と GT は、トランスポーター (GatT) の競合によってお互いの生産を阻害している可能性が考えられた。

Lb. gasseri LA158 へ GS 遺伝子 (*gasAXI*) を全ての組み合わせで導入した結果、バクテリオシン活性の有意な低下は確認されず、GT の生産は阻害されなかった (Fig. 4-1)。第三章において LA158 Δ

*gatAX*へGS遺伝子を導入した結果、GatTを介してGSが実際に生産されることを確認している。そのため、今回作製したLA158のGS遺伝子導入株でもGatTの競合が起こっている可能性は高いにも関わらず、バクテリオシン活性は低下するどころか、むしろ上昇傾向 ($P > 0.05$ 、有意差なし) にあった。

しかしながら、LA158はGT発現量のベースライン(15,754 AU/mL)が高いため、GS遺伝子による生産阻害効果が確認できない可能性も考えられた。そこで、先行研究で得られたデータ (Table 4-1) より、LA158と比較してGT発現量の低い4株(JCM 8787, 8788, 8789, および8790; いずれも3,938 AU/mL) をピックアップし、GS遺伝子 (*gasAXI*) を導入した。しかしながら、LA158と同様にバクテリオシン活性は低下せず、むしろ上昇傾向が認められたことから (Fig. 4-2)、GS関連遺伝子のmRNA発現およびGatTの競合はGT生産を阻害しないことが明らかとなった。

Lb. gasseri JCM株におけるバクテリオシン生産株のうち、JCM 1130, JCM 5343, およびJCM 5344の3株についてはデータベースにおいて完全ゲノム配列が登録されている (GenBank: BEXH00000000.1)。これらの3株は、いずれもGSとGT両方の遺伝子を保有しており、特にGT遺伝子について注目した結果、GTの生産制御系 (三成分制御系) を構成するタンパク質の一つであるGatKにおいて、1-5残基の変異が認められた。このGatKにおける変異がGT生産の低下要因である可能性が考えられるため、*Lb. gasseri* JCMのGT遺伝子を保有する全ての株において、GatKの配列比較が求められる。さらに、バクテリオシン関連遺伝子以外における差異が、GT生産を低下させている可能性も否定できないことから、LA158およびLA327間での全ゲノム比較解析によるGT生産低

下要因の解明が期待される。

第 5 章

総括

Lactobacillus gasei はヒト腸管より検出される lactobacilli（乳酸桿菌）における最優勢種とされ、整腸作用をはじめ、免疫賦活、アレルギー症状の軽減、細菌およびウイルスの感染予防、ピロリ菌の低減、内臓脂肪の低減など、宿主に対する様々な生理学的効果が報告されている。実際に、これらの生理効果を付与する目的で *Lb. gasei* を添加した発酵乳製品やサプリメントなどが、我が国の市場において多く出回っている。

さらに、*Lb. gasei* の一部においてバクテリオシンと呼ばれる抗菌性のペプチドを生産する株が確認されている。バクテリオシンは細菌のゲノム DNA 上にコードされた構造遺伝子より、リボソームを介して生合成される抗菌性ペプチド・タンパク質であり、熱に比較的安定で、無味無臭であり、抗生物質よりも微量で高い抗菌活性を示すことが知られている。また、食品の風味を損なわず、プロテアーゼによって容易に分解され、ヒトの健康に影響するリスクが低いという特徴から、優れたバイオプリザバティブの候補である。当研究室では *Lb. gasei* が生産するバクテリオシン（ガセリシン）に注目し、環状バクテリオシンのガセリシン A（GA）、そして 2 種のペプチド（GatA および GatX）によって構成される二成分性バクテリオシンであるガセリシン T（GT）の 2 種を見出し、報告してきた。両ガセリシンは、乳酸菌をはじめ *Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*、および *Bacillus cereus* を含むグラム陽性の食中毒・病原性細菌に対して効果があり、高い耐熱性と pH 安定性から、有用なバイオプリザバティブとして期待されている。しかしながら、

これらガセリシンの食品グレード生産系は確立されていないため、現状のままでは GA と GT を食品へ応用することは困難である。

さらに、GA と GT 以外のガセリシンも報告されている。Matijasić ら (1998) は *Lb. gasseri* LF221 が生産するバクテリオシンとして、Acd LF221A および Acd LF221B の 2 種類を報告し、後者は GT の類縁体であったが、前者については新規のガセリシンであった。その後、Majhenič ら (2004) は少なくとも 3 ORFs (推定構造遺伝子 : *acd 221aA*、および推定自己耐性遺伝子 : *aci 221A*) から構成される Acd LF221A の遺伝子クラスターを解析し、2 種の抗菌ペプチド (Acd 221a と Acd 221A) をコードしている可能性が示唆されたことから、Acd LF221A は二成分性バクテリオシンであると考えられた。しかしながら、1 番目のペプチド (Acd 221a) は N 末端領域における配列が未決定であり、実際に単離精製されたのは 2 番目のペプチド (Acd 221A) のみであるため、Acd LF221A が二成分性バクテリオシンであるのかは未証明であり、特性についてもほとんど解明されていないのが現状である。また、*Lb. gasseri* 由来の二成分性バクテリオシンが他にもいくつか報告されているが、いずれも一方のペプチドのみが単離精製されたに過ぎず、完全精製の成功例は存在しない。

本研究では、ガセリシン (特に GA および GT) における食品グレード生産系の確立と、*Lb. gasseri* LA327 より検出された Acd LF221A と推定される遺伝子の全長配列決定、および Acd LF221A 発現株の構築による特性の解明を目指した。

Lb. gasseri は、一般的な乳酸菌における代表的な食品グレード培地である脱脂乳培地では生育が緩慢であり、酵母エキスなどの添加によって生育の改善は可能であるが、乳成分はバクテリオシンの回

収を困難にし、GTについては生産自体が阻害される。その一方で、乳酸桿菌用の人工合成培地として知られるMRS培地は、バクテリオシンの生産と回収には向いているが、コストが高く(約1800円/L)、人体に有害な成分も含有するため、食品への応用には不向きである。そこで、MRS培地の組成をベースとし、人体に有害なMnSO₄の除去および窒素源成分を安価で安全な食品添加用酵母エキスのみで置換することで、乳成分を含まない低コストな完全食品グレード培地の開発を試みた。

Lb. gasseri JCM 1131^Tに対する生育促進能力を指標とし、添加する食品添加用酵母エキスの選抜を試みた結果、酵母エキスFRの生育促進効果が最大であった。この酵母エキスFRを用いた培地を食品グレード培地FR(FGM-FR)と命名し、他の*Lb. gasseri*および*lactobacilli*の数株に対する生育促進能力も試験した結果、全ての株において十分な生育が得られた。これにより、約160円/Lと脱脂乳培地(約240円/L)よりも低コストでありながら、*Lb. gasseri*の生育に効果的な完全食品グレード培地の開発に成功した。さらに、FGM-FRを用いたガセリシンの食品グレード生産を試みた。*Lb. gasseri* LA39(GA生産株)および*Lb. gasseri* LA158(GT生産株)のFGM-FRを用いた最適培養条件(酵母エキスFRとTween 80の添加濃度、および培養時間)を決定した結果、MRS培地培養時の半量および等量に当たるGAおよびGTの活性が得られ、両ガセリシンにおける食品グレード生産系が確立された。

次いで、*Lb. gasseri* LA327において検出された、推定Acd LF221A遺伝子の全長配列をプライマーウォーキング法によって解析した結果、どちらのペプチドもAcd LF221Aとは少なくとも1-2残基異なっていたことから、新規の二成分性バクテリオシンであることが明

らかとなり、ガセリシン S (GasA および GasX) と命名した。

GS 発現株の構築に向けて生産機序に関する検証を行った結果、GS の生産には少なくとも ABC トランスポーター遺伝子 (*gatT*) を初めとする GT 遺伝子が必要であることが明らかとなった。そこで、GT 生産株の *Lb. gasseri* LA158 より GT 構造遺伝子 (*gatAX*) をノックアウトした *Lb. gasseri* LA158 Δ *gatAX* を作製し、これを宿主として GS 発現株を作製した結果、GasAX および GasAXI 生産株においてバクテリオシン活性 (62 AU/mL および 123 AU/mL) が得られ、GS の生産系が構築された。また、GasAXI 発現株においてバクテリオシン活性がより高値となったことから、GasI は自己耐性能によって GS の生産を補助している可能性が考えられた。次いで、単独では活性が得られなかった GasA および GasX 含有培養上清を組み合わせた結果、活性 (62 AU/mL) が得られ、GS は二成分性バクテリオシンであることが初めて証明された。また、GasA と GasX の最適な作用比率は 1:1 であり、GS と GT 間では相乗効果が存在しなかった。

次いで、GS の食品応用に向けた諸性質の解析を行った結果、高い pH 安定性、耐熱性、およびプロテアーゼ感受性が示され、GS は様々な食品の加工処理条件には安定である一方、ヒトの腸管内では速やかに分解される可能性が高く、安全性の高いバイオプリザバティブであることが期待された。また、抗菌特性に関する検証の結果、GS の抗菌性はその濃度と感作菌体の生育状況によって変化し、低濃度の場合は静菌的に働き、高濃度の場合では増殖する菌体のみを殺菌する可能性が示され、生育する菌体のみを殺菌する選択的殺菌剤としての応用が期待された。例えば、冷蔵を前提とする食品へ GS を添加することにより、低温下で増殖するリステリア菌などの低温細菌群のみを殺菌できる可能性が考えられる。

また、*Lb. gasseri* JCM 株において GS/GT の両構造遺伝子を保有する株は、GT 構造遺伝子のみを保有する株に比べてバクテリオシン活性値が明らかに低く、GS と GT はお互いの生産を阻害している可能性が考えられた。そこで、GT 生産株の *Lb. gasseri* LA158 へ GS 遺伝子 (*gasAXI*) を全ての組み合わせ (全 7 通り) で導入した結果、GT 生産量の低下が認められず、GS の生産に伴う ABC トランスポーターの競合および GS 関連の mRNA 発現は GT 生産を阻害しない可能性が考えられた。

以上、本研究ではガセリシンの食品グレード生産系の確立から、GS の生産系構築および特性解析を行った。

本研究において開発した FGM-FR は、ガセリシンのみならず *Lb. gasseri* 自体の利用性拡大にも貢献できる可能性が期待される。

また、本研究では *Lb. gasseri* 由来の二成分性バクテリオシンとして初めて、GS が二成分性バクテリオシンであることを証明した。二成分性バクテリオシンは一般的に抗菌スペクトルが広いことが知られており、本研究で得られた GS の作用機序に関する情報が、その原因解明の一端を担うことが期待される。

続いて、GS の食品応用に向けた諸性質について解析した結果、高い pH 安定性と耐熱性、およびプロテアーゼ感受性が明らかになり、GS の安全性に優れた食品保蔵剤としての利用性が示唆された。今後、GS の抗菌スペクトルに関する検証が急がれる。

さらに、GS は増殖する菌体の特異的に殺菌する可能性が示され、この事象はバクテリオシンにおいて報告例が無く、その機構の解明に向けた GS レセプターの特異性が課題として挙げられる。

本研究で得られた研究基盤や知見が、以後のさらなる研究発展に繋がることを期待して、本論文の結びとしたい。

謝辞

本論文は筆者が日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜ると共に、研究面以外においても数々のご支援を頂いた日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻の増田哲也教授に拝謝申し上げます。本研究の技術的な知識やご助言を頂き、また公私に渡ってご指導頂きました同専攻の川井泰准教授に深謝申し上げます。

そして、お忙しい中、本研究論文の副査をお引き受け頂き、査読等の労をとられました同専攻の高橋令二教授および同専攻の松宮政弘教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究にて、貴重な遺伝子改変株と情報をご提供頂いた元・株式会社明治食機能科学研究所の伊藤喜之博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、幾度となく研究内容について親身にご指導を頂いた諸先輩方、学生生活において苦楽を共にし、日々充実した毎日を共有させていただきました後輩方の皆様に深く感謝申し上げます。

ミルク科学研究室 春日 元気

(平成 30 年 12 月 記)

参考文献

1. Dack GM. 1956. Food poisoning. 3rd Ed. The University of Chicago Press.
2. 高橋梯二. 2009. アメリカの食品事故と最近の食品安全対策.
<http://www.ab.auone-net.jp/~ttt/foodborndiseaseusa.html>.
3. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JF, Shapiro C, Griffin PM, and Tauxe RV. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect Dis* 5: 607-625.
4. 河端俊治、春田三佐夫 編. 1992. HACCP これからの食品工場の自主衛生管理. 太洋社.
5. 厚生省 HP. 2010. 病原物質別食中毒の統計.
http://kensaku.mhlw.go.jp/search?q=%90H%92%86%93%C5%81@%8C%B4%88%F6%95%A8%8E%BF%95%CA&btnG=%8C%9F%8D%F5&client=mhlw_frontend_J&proxystylesheet=mhlw_frontend_J&output=xml_no_dtd&oe=Shift_JIS&ie=Shift_JIS&inlang=zh-TW&ulang=ja&sort=date%3AD%3AL%3Ad1&entqr=3&entqrm=0&wc=200&wc_mc=1&ud=1&site=mhlw_collection
6. Buzby JC and Roberts T. 1997. Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World Health Stat Q* 50: 57-66.
7. Salgado CD, Farr BM, and Calfee DP. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 36: 131-139.

8. 谷本弘一、池康 嘉. 2007. 基礎・臨床の両面からみた耐性菌の現状と対策 4: バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) . モダンメディア 53: 140-147.
9. 前崎繁文. 2007. 多剤耐性緑膿菌感染症の検査と治療. 日医新報 4336: 89.
10. 青木 眞、上原由紀、奥住捷子、松本哲哉、熊谷一成. 2011. 多剤耐性菌の現状と今後の課題. モダンメディア 58: 1-24.
11. O'Neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance.
12. Avorn JL, Barrett JF, Davey PG, McEwen SA, O'Brien TF, and Levy SB. 2001. Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. World Health Organization. URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.10.pdf.
13. Belongia EA, Knobloch MJ, Kieke BA, Davis JP, Janette C, and Besser RE. 2005. Impact of statewide program to promote appropriate antimicrobial drug use. Emerg Infect Dis 11(6): 912-920.
14. 厚生労働省. 2018. 中央社会保険医療協議会 総会 (第 389 回) 議事次第 総-1: 324.
15. Food and Drug Administration Department of Health and Human Services. 2014. Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. URL: <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/Animal>

DrugUserFeeActADUFA/UCM338170.pdf.

16. Garofalo C, Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Bordoni D, Osimani A, Clementi F, and Biavasco F. 2007. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *Int J Food Microbiol.* 113: 75–83.
17. Cui S, Ge B, Zheng J, and Meng J. 2005. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl Environ Microbiol* 71: 4108–4111.
18. Gundogan N, Citak S, Yucel N, and Devren A. 2005. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Sci* 69: 807–810.
19. Parveen S, Taabodi M, Schwarz JG, Oscar TP, and Harter-Dennis J. 2007. White DG. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. *J Food Prot* 70: 2466–2472.
20. Kim SH, Wei CI, Tzou YM, and An H. 2005. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. *J Food Prot* 68: 2022–2029.
21. Ramchandani M, Manges AR, DebRoy C, Smith SP, Johnson JR, and Riley LW. 2005. Possible animal origin of human-associated multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 40: 251–257.
22. Antibiotic Resistance from the Farm to the Table. 2014.

- URL: <http://www.cdc.gov/foodsafety/from-farm-to-table.html>.
23. Animal Health Institute (AHI). The antibiotic ban in denmark: A case study on politically driven bans. URL: <https://www.ahi.org/issues-advocacy/animal-antibiotics/the-antibiotic-ban-in-denmark-a-case-study-on-politically-driven-bans/>.
 24. 食品ロスの現状について. 農林水産省 HP. URL: http://www.maff.go.jp/j/study/syoku_loss/01/pdf/data2.pdf.
 25. 食品ロスの削減に向けて. 農林水産省 HP. URL: http://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syoku_loss/pdf/0902shokurosu.pdf - 2014-07-25.
 26. 森地敏樹、松田敏生 編. 1999. バイオプリザベーションー乳酸菌による食品微生物制御ー. 幸書房.
 27. Bosund I. 1962. The action of benzoic and salicylic acids on the metabolism of microorganisms. In *Advances in Food Research* eds Chichester, C.O., Mraz, EM and Stewart GF. New York Academic Press: pp. 331-353.
 28. Melnick D, Vehlteich HW, and Hackett A. 1956. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods XI. Effectiveness of sorbic acid in protecting cakes. *Food Res* 21(133): 133-146.
 29. Whitaker JR. 1959. Inhibition of sulfhydryl enzymes with sorbic acid. *Food Res* 24: 37.
 30. York GK and Vaughn RH. 1964. Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid. *J Bacteriol* 88: 411-417.
 31. 加藤博通、倉田忠夫 編. 1991. 食品保蔵学. 文永堂出版.
 32. 藤井建夫 編. 2001. 食品微生物Ⅱー制御編 食品の保全と微生物

物. 幸書房.

33. Leistner L. 1987. Water activity : theory and applications to foods, Rockland LB and Bauchat LR eds., Marcel Dekker.
34. Ray B and Daeschel M. 1992. Food Biopreservation of Microbial Origin. CRC Press.
35. 荒川健佑、川井 泰、齋藤忠夫. 2013. *Lactobacillus gasseri* の生産するバクテリオシンを用いた食品保蔵: ショートレビュー. *Milk Sci* 62(3): 131-137.
36. 細野明義. 2002. 発酵乳の科学-乳酸菌の機能と保健効果-. アイ・ケイコーポレーション.
37. 松田敏夫. 1997. *HACCP* 3(1): 70-76, 99-106.
38. Mckay LL and Baldwin KA. 1990. Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbial letter* 87: 3-14.
39. M. Zasloff. 2006. Inducing endogenous antimicrobial peptides to battle infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8913-8914.
40. Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12: 39-85.
41. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, and Kuipers OP. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 2939-2951.
42. Bruno ME and Montville TJ. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic Acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 59(9): 3003-3010.
43. Chung HJ, Montville TJ, and Chikindas ML. 2000. Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacteria. *Lett*

- Appl Microbiol 31(6): 416-420.
44. Chikindas ML, García-Garcerá MJ, Driessen AJ, Ledebøer AM, Nissen-Meyer J, Nes IF, Abee T, Konings WN, and Venema G. 1993. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Appl Environ Microbiol 59: 3577–3584.
 45. Christensen DP and Hutkin RW. 1992. Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Appl Environ Microbiol 58: 3312–3315.
 46. Okereke A and Montville TJ. 1992. Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. Appl Environ Microbiol 58: 2463–2467.
 47. Hancock RE and Rozek A. 2006. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. FEMS Microbiol Lett 206: 143–149.
 48. Gratia A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. Nat Rev Biol 93: 1040-1041.
 49. Lazdunski CJ. 1988. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. Biochimie 70: 1291-1296.
 50. Cascales E, Buchanan SK, Duche D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Riley M, Slatin S, and Cavard D. 2007. Colicin biology. Microbiol Mol Biol Rev 71: 158–229.

51. Dathe M and Wieprecht T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1462: 71–87.
52. Toke OL and Schaefer JC. 2006. Peptide antibiotics in action: investigation of polypeptide chains in insoluble environments by rotational-echo double resonance. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1314-1329.
53. Moll GN, Konings WN, and Driessen AJ. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185-198.
54. Whitehead HR. 1933. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *J Biochem* 27: 1793–1800.
55. Buchman GW, Banerjee S, and Hansen JN. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem* 31: 16260-16266.
56. Jones E, Salin V, and Williams GW. 2005. Nisin and The market for commercial bacteriocins. TAMRC Consumer and Product Research Report No. CP-01-05.
57. Avik K, Khanh DV, Bernard R, and Monique L. 2015. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *Food Sci Technol* 61(1): 124–129.
58. Mulders JW, Boerrigter IJ, Rollema HS, Siezen RJ, and de

- Vos WM. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur J Biochem* 201(3): 581-584.
59. Zendo T, Fukao M, Ueda K, Higuchi T, Nakayama J, and Sonomoto K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(7): 1616-1619.
60. de Kwaadsteniet MT and Dicks LM. 2007. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl Environ Microbiol* 74(2): 547-549.
61. O'Connor PM, O'Shea EF, Guinane CM, O'Sullivan O, Cotter PD, Ross RP, and Hill C. 2015. Nisin H is a new nisin variant produced by the gut-derived strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. *Appl Environ Microbiol* 81(12): 3953-3960.
62. Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW, and Tagg JR. 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol* 72(2): 1148-1156.
63. Hatziioanou D, Gherghisan-Filip C, Saalbach G, Horn N, Wegmann U, Duncan SH, Flint HJ, Mayer MJ, and Narbad A. 2017. Discovery of a novel lantibiotic nisin O from *Blautia obeum* A2-162, isolated from the human gastrointestinal

- tract. *Microbiology* 163(9): 1292-1305.
64. ナイシンの食品添加物の指定に関する添加物部会報告書. 厚生労働省 HP. URL:
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2008/09/dl/s0924-15n.pdf>.
 65. Ferreira MA and Lund BM. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Lett Appl Microbiol* 22: 433-438.
 66. Wandling LR, Sheldon BW, and Foegeding PM. 1999. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. *J Food Prot* 62: 492-498.
 67. Davies EA, Milne CF, Bevis HE, Potter RW, Harris JM, Williams GC, Thomas LV, and Delves-Broughton J. 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *J Food Prot* 62: 1004-1010.
 68. Choi MH and Park YH. 2000. Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin. *Lett Appl Microbiol* 30: 173-177.
 69. Montville TJ and Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl Microbiol Biotechnol* 50(5): 511-519.
 70. Rodríguez JM, Martínez MI, and Kok J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Rev Crit Food Sci Nutr* 42(2): 91-121.
 71. Liu W and Hansen JN. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 56: 2551-2558.

72. Abee T, Krockel L, and Hill C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol* 28: 169–185.
73. Rayman MK, Aris B, and Hurst A. 1981. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl Environ Microbiol* 41: 375-380.
74. Reuter G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol* 2: 43-53.
75. Selle K and Klaenhammer TR. 2013. Genetic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *Rev. FEMS Microbiol* 37: 915-935.
76. Dall Bello F and Hertel C. 2006. Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Syst Appl Microbiol* 29: 69-76.
77. Martin R, Langa S, Reviriego C, Jimine E, Marin ML, Xaus J, Fernandez L, and Rodriguez JM. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143: 754-758.
78. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, chaiworapongsa T, Kusanovic JP, and Romero R. 2011. The vaginal microbiome : New information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 118: 533-549.
79. Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, and Kato H. 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn in

- fants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infec Chemoth* 8: 43-49.
80. Toba T, Yoshioka E, and Itoh T. 1991b. Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. *Lett Appl Microbiol* 12: 228-231.
 81. Kawai Y, Saito T, Toba T, Samant SK, and Itoh T. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1218-1221.
 82. Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, and Itoh T. 1998. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 2438-2440.
 83. Arakawa K, Kawai Y, Ito Y, Nakamura K, Chujo T, Nishimura J, Kitazawa H, and Saito T. 2010. HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gassericin A and reutericin 6. : *Lett. Appl. Microbiol.*, 50, 406-411, 2010.
 84. Kawai Y, Ishii Y, Arakawa K, Uemura K, Saitoh B, Nishimura J, Kitazawa H, Yamazaki Y, Tateno Y, Itoh T, and Saito T. 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 70: 2906-2911.
 85. Arakawa K, Uchida H, Nishimura J, Kitazawa H, and Saito T. 2009. DNA sequencing and homologous expression of a small peptide conferring immunity to gassericin A, a circular

- bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. Appl Environ Microbiol 75: 1324-1330.
86. Ito Y, Kawai Y, Honme Y, Arakawa K, Sasaki T, and Saito T. 2009. Conjugative plasmid from *Lactobacillus gasseri* LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A. Appl Environ Microbiol 75: 6340-6351.
87. K. Arakawa, Y. Kawai, H. Iioka, M. Tanioka, J. Nishimura, Kitazawa H, Tsurumi K, and Saito T. 2009. Effects of gassericin A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. J Dairy Sci 92: 2365-2372.
88. Kawai Y, Saito T, Uemura J, and Itoh T. 1997. Rapid detection method for bacteriocin and distribution of bacteriocin-producing strains in *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria isolated from human feces. Biosci Biotechnol Biochem 61: 179-182.
89. Kawai Y, Saito B, Takahashi O, Kitazawa H, Saito T, Nakajima H, and Itoh T. 2000. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. Biosci Biotechnol Biochem 64: 2201-2208.
90. 川井 泰、高橋涼子、荒川健佑、齋藤忠夫. 2006. ヒト腸管系乳酸菌が生産するガセリシン A/T の構造と機能特性. J Lactic Acid Bact 17: 32-39.
91. 郭曉艷. 2012. 東北大学大学院農学研究科修士論文.

92. Yasuta N, Arakawa K, Kawai Y, Chujo T, Nakamura K, Suzuki H, Ito Y, Nishimura J, Makino Y, Shigenobu S, and Saito T. 2014. Genetic and biochemical evidence for gassericin T production from *Lactobacillus gasserii* LA158. *Milk Science* 63:9-17.
93. K. Nakamura, K. Arakawa, Y. Kawai, N. Yasuta, T. Chujo, Watanabe M, Iioka H, Tanioka M, Nishimura J, Kitazawa H, Tsurumi K, and Saito T. 2013. Food preservative potential of gassericin A-containing concentrate prepared from a cheese whey culture supernatant from *Lactobacillus gasserii* LA39. *J Anim Sci* 84: 144-149.
94. Johnson JL, Phelps CF, Cummins CS, London J, and Gasser F. 1980. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int J Syst Bacteriol* 30: 53-68.
95. Fujisawa T, Benno Y, Yaeshima T, and Mitsuoka T. 1992. Taxonomic study of *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. & *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson *et al.* 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int J Syst Bacteriol* 32: 487-491.
96. Matijašić BB, Rogelj I, Nes IF, and Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 606-612.
97. Majhenič AC, Venema K, Allison GE, Matijašić BB, Rogelj I, Klaenhammer TR. 2004. DNA analysis of the genes encoding

- acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Appl Microbiol Biotechnol* 63(6): 705-714.
98. Evans TC and Xu M. 2011. Heterologous Gene Expression in *E.coli* Methods and Protocols. Human press.
99. Murasugi A. 2011. Secretory expression of human proteins in *Pichia pastoris* : Production of midkine, pleiotrophin, and bile salt-stimulated lipase in controlled fermentor. *生物工学会誌* 89(10): 570-583.
100. Patrick SM, Mariana L, McNeil FB, and Harvey LM. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. John Wiley & Sons Ltd.
101. Nahri LO, Hua QX, Arakawa T, Fox GM, Tsai L, Rosenfield R, Holst P, Miller JA, and Weiss AM. 1993. *Biochemi* 32: 5214-5221.
102. Sturrock ED, Yu XC, Wu Z, Biemann K, and Riordan JF. 1996. Assignment of free and disulfide-bonded cysteine residues in testis angiotensin-converting enzyme: functional implications. *Biochemi* 35: 9560-9566.
103. 谷生道一、河野俊之 編著. 2009. Brevibacillus Expression System を用いた組換えタンパク質分泌生産. *タカラバイオ株式会社情報誌 BIO VIEW* 57: 32-35.
104. Montalbán-López M, Martínez-Bueno M, Valdivia E, and Maqueda M. 2010. Expression of linear permutated variants from circular enterocin AS-48. *Biochimie* 93(3): 549-555.
105. McCormick JK, Poon A, Sailer M, Gao Y, Roy KL, McMullen

- LM, Vederas JC, Stiles ME, and Van Belkum MJ. 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC43754. Appl Environ Microbiol 64(12): 4757-4766.
106. Storrs SB *et al.* 1991. Protein Folding - American Chemical Society Symposium Series 470, Chapter 15: 197-204.
107. 戸田年総、平野久、中村和行 編. 2005. タンパク質研究なるほど Q&A. 羊土社.
108. 齊藤 睦. 1991. 東北大学大学院農学研究科修士論文.
109. Axelsson L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Publisher: Marcel Dekker Inc/CRC Press 139: 1-66.
110. Tannock GW. 2002. The Bifidobacterial and Lactobacillus Microflora of Humans. Clinical Reviews in Allergy and Immunology. Humana Press Inc 22: 231-253.
111. Marin ML, Arroyo R, Jimenez E, Gomez A, Fernandez L, and Rodriguez JM. 2009. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. J Pediatric Gastroenterol Nutri 49: 343-348.
112. Ghadimi D, Folster-Holst R, de Vrese M, Winkler P, Heller KJ, and Schrezenmeir J. 2008. Effect of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. Immunobiology 213: 677-692.
113. Kassaa IA, Hober D, Hamze M, Caloone D, Dewilde A, Chihib

- NE, and Drider D. 2015. Vaginal *Lactobacillus gasseri* CMUL57 can inhibit herpes simplex type 2 but not Coxsackievirus B4E2. Archives of Microbiology 197: 657-664.
114. Miyazaki K, Kwase M, Kubota A, Yoda K, Harata G, Hosoda M, and He F. 2015. Heat-killed *Lactobacillus gasseri* can enhance immunity in the elderly in a double-blind, placebo-controlled clinical study. Beneficial Microbes 6: 441-449.
115. Motevaseli E, Shirzad M, Akrami SM, Mousavi AS, Mirsalehian A, and Modarressi MH. 2013. Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. J Med Microbiol 62: 1065-1072.
116. Nishiyama K, Seto Y, Yoshida K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, and Mukai T. 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. PLOS One 29, 9(9).
117. Ogawa A, Kobayashi T, Sakai F, Kadooka Y, and Kawasaki Y. 2015. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 suppresses fatty acid release through enlargement of fat emulsion size in vitro and promotes fecal fat excretion in healthy Japanese subjects. Lipid Health Dise 14: 20-29.
118. Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T, and Saito T. 1995. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. Lett Appl Microbiol 21: 137-141.
119. Lauer E, Helming C, and Kandler O. 1980. Heterogeneity of

- the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. Zbl Bakt Hyg Labt Orig C 1: 150-168.
120. Law BA, Sezgin E, and Sharpe ME. 1976. Amino acid nutrition of some commercial cheese starters in relation to their growth in peptone-supplemented whey media. J Dairy Res 43: 291-300.
121. Loubière P, Novak L, Coccagn-Bousquet M, and Lindley ND. 1996. Besoins nutritionnels des bacteries lactiques: interactions entre flux de carbone et d'azote. Lait 76: 5-12.
122. Ellia M, Zink R, Renier R, and Morelli L. 1999. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk. Int Dairy J 9: 507-513.
123. Arakawa K, Kawai Y, Fujitani K, Nishimura J, Kitazawa H, Komine K, Kai K, and Saito T. 2008. Bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from human feces in milk-based media. Anim Sci J 79: 634-640.
124. Arakawa K, Matsunaga K, Takihiro S, Moritoki A, Ryuto S, Kawai Y, Masuda T, and Miyamoto T. 2015. *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. J Dairy Sci: 1593-1603.
125. Gomes AM and Malcata FX. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. J Dairy Sci 81: 1492-1507.
126. Masuda T, Taguchi R, Kabuki T, Nakajima H. and Itoh T.

2003. Improvement of the growth of *Lactobacillus acidophilus* in milk by addition of enzymatically digested casein. *Milchwissenschaft* 58: 124-127.
127. Oliveira MN, Sodini I, Remeuf F, and Corrieu G. 2001. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *Int Dairy J* 11: 935-942.
128. Giraffa G, Neviani E, and Tarelli GT. 1994. Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution in Taleggio, an Italian soft cheese. *J Dairy Sci* 77: 1176-1182.
129. Guo X, Uenishi H, Kawai Y, Yasuta N, Kasuga G, Takezawa S, Seto Y, Nishimura J, Kitazawa H, and Saito T. 2014. Effect of divalent metal cations on production of gassericin T by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Milk Science* 63: 129-135.
130. de Man JC, Rogosa M, and Sharpe ME. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Microbiol* 23: 130-135.
131. Nagatomo S, Umehara F, Hanada K, Nobuhara Y, Takenaga S, and Arimura K. 1999. Manganese intoxication during total parenteral nutrition: Report of two cases and review of the literature. *J Neurol Sci* 162: 102-105.
132. Ikeda S, Yamaguchi Y, Sera Y, Ohshiro H, Uchino S, and Yamashita Y. Manganese deposition in the globus pallidus in patients with biliary atresia. *Transplantation* 69: 2339-2343.
133. Mirowitz SA, Westrich TJ, and Hirsch JD. 1991.

- Hyperintense basal ganglia on T1-weighted MR images in patients receiving parenteral nutrition. *Radiology* 181: 117-120.
134. Pal PK, Samii A, and Calne DB. 1999. Manganese neurotoxicity: A review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20: 227-238.
135. Spahr L, Butterworth RF, Fontaine S, Bui L, Therrien G, and Milette PC. 1996. Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms. *Hepatology* 24: 1116-1120.
136. Tagg JR and McGiven AR. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol* 21(5): 943.
137. Toba T, Toshioka E, and Itoh T. 1991a. Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett Appl Microbiol* 12: 43-45.
138. Gandhi A and Shah NP. 2014. Cell growth and proteolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus* in milk as affected by supplementation with peptide fractions. *Int J Food Sci Nutr* 65: 937-941.
139. Aroutcheva AA, Simoes JA, and Faro S. 2001. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 9: 33-39.

140. Contreras BG, de Vuyst L, Devreese B, Busanyova K, Raymaeckers J, Bosman F, Sablon E, and Vandamme EJ. 1997. Isolation, purification, and amino acid sequence of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl Environ Microbiol* 63: 13-20.
141. Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, and Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70(2-4): 113-28.
142. Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, and de Vos WM. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24: 895-904.
143. Maldonado A, Jiménez-Díaz R, and Ruiz-Barba JL. 2004. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J Bacteriol* 186(5): 1556-1564.
144. Champagne CP, Gaudreau H, and Conway J. 2003. Effect of the production or use of mixtures of bakers or brewer's yeast extracts on their ability to promote growth of lactobacilli and pediococci. *Electronic J Biotechnol* 6: 185-197.
145. Garneau S, Martin NI, and Vederas JC. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577-592.
146. Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegård C, Haugen HS, and Kristiansen PE. 2009. Structure-function relationships of the

- non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 10: 19-37.
147. Oppegård C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, and Nissen-Meyer J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13: 210-219.
148. Nissen-Meyer J, Holo H, Håvarstein LS, Sletten K, and Nes IF. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol* 174: 5686-5692.
149. Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, and Kristiansen PE. 2010. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2: 52–60.
150. Håvarstein LS, Holo H, and Nes IF. 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* 140: 2383-2389.
151. Håvarstein LS, Diep DB, and Nes IF. 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* 16: 229-240.
152. van Belkum MJ, Hayema BJ, Jeeninga RE, Kok J, and Venema G. 1991. Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl Environ Microbiol*

57: 492–498.

153. Cotter PD, Ross RP, and Hill C. 2013. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11: 95–105.
154. Moll G, Ubbink-Kok T, Hildeng-Hauge H, Nissen-Meyer J, Nes IF, Konings WN, and Driessen AJ. 1996. Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *J Bacteriol* 178: 600-605.
155. Moll G, Hildeng-Hauge H, Nissen-Meyer J, Nes IF, Konings WN, and Driessen AJ. 1998. Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. *J Bacteriol* 180: 96-99.
156. Moll GN, van den Akker E, Hauge HH, Nissen-Meyer J, Nes IF, Konings WN, and Driessen AJ. 1999. Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J Bacteriol* 181: 4848-4852.
157. Abee T, Klaenhammer TR, and Letellier L. 1994. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl Environ Microbiol* 60: 1006-1013.
158. Senes A, Gerstein M, and Engelman DM. 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 296(3): 921-936.
159. Senes A, Engel DE, and DeGrado WF. 2004. Folding of helical

- membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14(4): 465-479.
160. Hauge HH, Nissen-Meyer J, Nes IF, and Eijsink VG. 1998. Amphiphilic alpha-helices are important structural motifs in the alpha and beta peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G--enhancement of helix formation upon alpha-beta interaction. *Eur J Biochem* 251: 565-572.
161. Oppegård C, Schmidt J, Kristiansen PE, and Nissen-Meyer J. 2008. Mutational analysis of putative helix-helix interacting GxxxG-motifs and tryptophan residues in the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Biochemistry* 47: 5242-5249.
162. 安田成美. 2011. 東北大学大学院農学研究科修士論文.
163. Zorič-Peternel M, Čanžek-Majhenič A, Holo H, Nes IF, Salehian Z, Berlec A, and Rogelj I. 2010. Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2(4): 233-240.
164. Mavrič A, Tompa G, Trmčić A, Rogelj I, and Matijašić BB. 2014. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* K7 – Monitoring of gassericin K7 A and B genes' expression and isolation of an active component. *Process Biochem* 49: 1251-1259.
165. Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Martín V, Ruiz-Barba JL, and Rodríguez JM. 2016. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC Microbiology* 16: 37.

166. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, and Rozen SG. 2012. *Nucleic Acids Res* 40(15): 115.
167. Luchansky JB, Tennant MC, and Klaenhammer TR. 1991. Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *J Daily Sci* 74: 3293-3302.
168. Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, and Schäffer AA. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 15: 1757-1764.
169. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, and Madden TL. 2008. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421.
170. Boratyn GM, Schäffer AA, Agarwala R, Altschul SF, Lipman DJ, and Madden TL. 2012. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol Direct* 7: 12.
171. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, and Sonnhammer ELL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3): 567-580.
172. Gomi M, Sonoyama M, and Mitaku S. 2004. High performance system for signal peptide prediction: SOSUisignal. *Chem-Bio Info J* 4: 142-147.
173. Leenhouts, KJ, Tolner B, Bron S, Kok J, Venema G, and Seegers JF. 1991. Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1. *Plasmid* 26: 55-66.

174. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, and Maguin E. 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 175: 3628-3635.
175. Sambrook JF and Russell DW, ed., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Vols 1,2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
176. Leammli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
177. Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, and Lacroix C. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microbiol* 57: 3450-3455.
178. Gasson JM. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* 154: 1-9.
179. Chopin A, Chopin MC, Moillo-Batt A, and Langella P. 1984. Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid* 11: 260-263.
180. Satoh E, Ito Y, Sasaki Y, and Sasaki T. 1997. Application of the extracellular α -amylase gene from *Streptococcus bovis* 148 to construction of a secretion vector for yogurt starter strains. *Appl Environ Microbiol* 63: 4593-4596.
181. Kemperman R, Jonker M, Nauta A, Kuipers OP, and Kok J. 2003. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium*

- beijerinckii* ATCC 25752. Appl Environ Microbiol 69: 5839-5848.
182. Ishibashi N, Himeno K, Masuda Y, Perez RH, Iwatani S, Zendo T, Wilaipun P, Leelawatcharamas V, Nakayama J, and Sonomoto K. 2014. Gene cluster responsible for secretion of and immunity to multiple bacteriocins, the NKR-5-3 enterocins. Appl Environ Microbiol 80: 6647-6655.
183. Ra R, Beerthuyzenf MM, de Vos WM, Saris PE, and Kuipers OP. 1991. Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. Microbiology 145: 1227-1233.
184. Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Jiménez E, Jiménez-Díaz R, Ruiz-Barba JL, and Rodríguez JM. 2009. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. Int J Food Microbiol 133:105–112.
185. Acedo JZ, Towle KM, Lohans CT, Miskolzie M, McKay RT, Doerksen TA, Vederas JC, and Martin-Visscher LA. 2017. Identification and three-dimensional structure of carnobacteriocin XY, a class IIb bacteriocin produced by *Carnobacteria*. FEBS Lett 591:1349-1359.
186. Anderssen EL, Diep DB, Nes IF, Eijsink VG, and Nissen-Meyer J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Appl Environ Microbiol 64: 2269-2272.

187. Izquierdo E1, Marchioni E, Aoude-Werner D, Hasselmann C, and Ennahar S. 2009. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 26: 16-20.
188. Hanchi H, Hammami R, Fernandez B, Kourda R, Ben Hamida J, and Fliss I. 2016. Simultaneous Production of Formylated and Nonformylated Enterocins L50A and L50B as well as 61A, a New Glycosylated Durancin, by *Enterococcus durans* 61A, a Strain Isolated from Artisanal Fermented Milk in Tunisia. *J Agric Food Chem* 64: 3584-3590.
189. Oppegaard C, Fimland G, Thorbaek L, and Nissen-Meyer J. 2007. Analysis of the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 73: 2931–2938.
190. Zendo T, Koga S, Shigeri Y, Nakayama J, and Sonomoto K. 2006. Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. *Appl Environ Microbiol* 72(5): 3383–3389.
191. 高橋礼美. 2016. 日本大学生物資源科学部卒業論文.
192. Upreti GC and Hinsdill RD. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob Agents Chemother* 7: 139-145.
193. Ivanova I, Miteva V, Stefanova Ts, Pantev A, Budakov I, Danova S, Moncheva P, Nikolova I, Dousset X, and Boyaval P. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int J Food Microbiol* 42:

- 147-158.
194. Zommiti M, Almohammed H, and Ferchichi M. 2016. Purification and Characterization of a Novel Anti-Campylobacter Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* DN317. *Probiotics Antimicrob Proteins* 8: 191-201.
195. Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, and Tomita H. 2015. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala2-cross-bridged peptidoglycan. *J Bacteriol* 197: 286-295.
196. Kjos M, Oppegård C, Diep DB, Nes IF, Veening JW, Nissen-Meyer J, and Kristensen T. 2014. Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol Microbiol* 92: 1177-1187.
197. Jack DL, Paulsen IT, and Saier MH. 2000. The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146: 1797-814.
198. Oppegård C, Kjos M, Veening JW, Nissen-Meyer J, and Kristensen T. 2016. A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Microbiologyopen* 5: 700-708.
199. Ekblad B, Nissen-Meyer J, and Kristensen T. 2017. Whole-genome sequencing of mutants with increased resistance against the two-peptide bacteriocin plantaricin JK

- reveals a putative receptor and potential docking site. PLoS One 12: e0185279.
200. 田中 勝. 2015. 日本大学生物資源科学部卒業論文.
201. Klocke M, Mundt K, Idler F, Jung S, and Backhausen JE. 2005. Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria*. Appl Microbiol Biotechnol 67(4): 532-538.
202. Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF, and Håvarstein LS. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to *staphylococcal hemolysins*. J Bacteriol 180: 1988-1994.
203. Fimland N, Rogne P, Fimland G, Nissen-Meyer J, and Kristiansen PE. 2008. Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. Biochim Biophys Acta 1784: 1711-1719.
204. Rogne P, Haugen C, Fimland G, Nissen-Meyer J, and Kristiansen PE. 2009. Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. Peptides 30: 1613-21.
205. Basanta A, Gómez-Sala B, Sánchez J, Diep DB, Herranz C, Hernández PE, and Cintas LM. 2010. Use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B) bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50. Appl Environ Microbiol 76: 3314-24.

206. Kusdianawati K, Mustopa AZ, Suharsono S, Budiarto BR, Fatimah, and Danuri H. 2015. Construction, expression and purification of recombinant pre-mature peptide of plantaricin F from *Lactobacillus plantarum* S34 in *Escherichia coli*. *Indones J Agric Sci* 16: 31–38.
207. Mustopa AZ, Mariyah S, Fatimah, Budiarti S, Murtiyaningsih H, and Alfisyahrin WN. 2018. Construction, heterologous expression, partial purification, and in vitro cytotoxicity of the recombinant plantaricin E produced by *Lactococcus lactis* against Enteropathogenic *Escherichia coli* K.1.1 and human cervical carcinoma (HeLa) cells. *Mol Biol Rep* 45: 1235-1244.