

<令和4年度助成>

伝統的発酵保存食品から分離した乳酸菌の 多成分バクテリオシン生産機構の解明

松崎 弘美

(熊本県立大学 環境共生学部 環境共生学科 食健康環境学専攻)

背景と目的

乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンは、その安全性の高さから天然の食品保存料として期待されている。現在実用化されている nisin A は、酸性領域でのみ安定であることから使用用途が制限される。そのため、多種多様なバクテリオシンの探索が行われている。各地方には伝統的発酵食品が存在し、乳酸菌がその保存性に大きく寄与する。加えて、乳酸菌の健康機能性も注目されている。熊本県球磨地方で 800 年以上食されてきた伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」からバクテリオシン生産乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 を分離・同定・命名した。PUK6 株は多成分バクテリオシンを生産するのみならず、胃酸および胆汁酸に耐えて生きて腸内に到達し、コレステロール低下作用が期待されるプロバイオティクス候補株でもあった¹⁾。このように PUK6 株は健康機能性をも有するバクテリオシン生産菌であり、この菌株の能力を明らかにすることは、味噌漬け豆腐の価値を高めるのみならず、PUK6 株を他の発酵食品のスターターカルチャーとして使用することで食品保存性と健康機能性を有する付加価値を高めた発酵食品の製造を可能とする。

我々は PUK6 株が新規物質を含む 4 種類のバクテリオシン (plantaricin) を生産することを明らかにし、それらの構造遺伝子を含む約 22 kb からなる合成関連遺伝子群 (*pln* locus) を決定した (図 1)²⁾。これまでに *L. plantarum* の多成分バクテリオシン合成に関する報告はいくつかあるが³⁾、4 種類もの plantaricin (A, EF, NC8 および PUK6) を生産することを明らかにしたのは我々が初めてである。さら

に、*pln* locus 上の遺伝子の機能を推測したが、機能不明遺伝子も未だ多い。PUK6 株の *pln* locus には複数のバクテリオシン構造遺伝子が存在するが、バクテリオシンの輸送・分泌に関わると推定され、同じクラスター上に存在するのは *plnGH* 遺伝子 (PlnG は ABC トランスポーター、PlnH は PlnG のアクセサリタンパク質と推定) のみである。そこで、バクテリオシン生産機構の全容解明を目指し、PUK6 株の PlnG/H の機能解析を行い、PUK6 株の多成分バクテリオシン輸送機構を解明することを目的とした。

方法

1) *L. plantarum* PUK6 の推定バクテリオシン輸送タンパク質遺伝子 *plnG* 破壊株の作製

PUK6 株のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、*ApaI* および *XhoI* 部位を付加した *plnIFEGH* 遺伝子を含む増幅産物を pUC118 ベクターへクローニングしてプラスミド pUCAX54 を構築した。次に、pUCAX54 をテンプレートとし、*plnG* 遺伝子上流と下流の配列に特異的な逆向きのプライマーを設計し、これを用いた inverse PCR およびセルフライゲーションにより *plnG* 遺伝子を欠失させた pUCAX54 Δ G を構築した。続いて、このプラスミドの 3.6-kb *ApaI-XhoI* 断片を温度感受性ベクター pG+HOST9 (Em^r) の *ApaI* および *XhoI* 部位に挿入し、*plnG* 遺伝子破壊株作製用プラスミド pGAX54 Δ G を構築した。なお、このプラスミドは、28℃では複製可能であるが、37℃以上では複製できない。

pGAX54 Δ G を PUK6 株へエレクトロポレーション (7.5 kV/cm) にて導入した。次に、エリスロマ

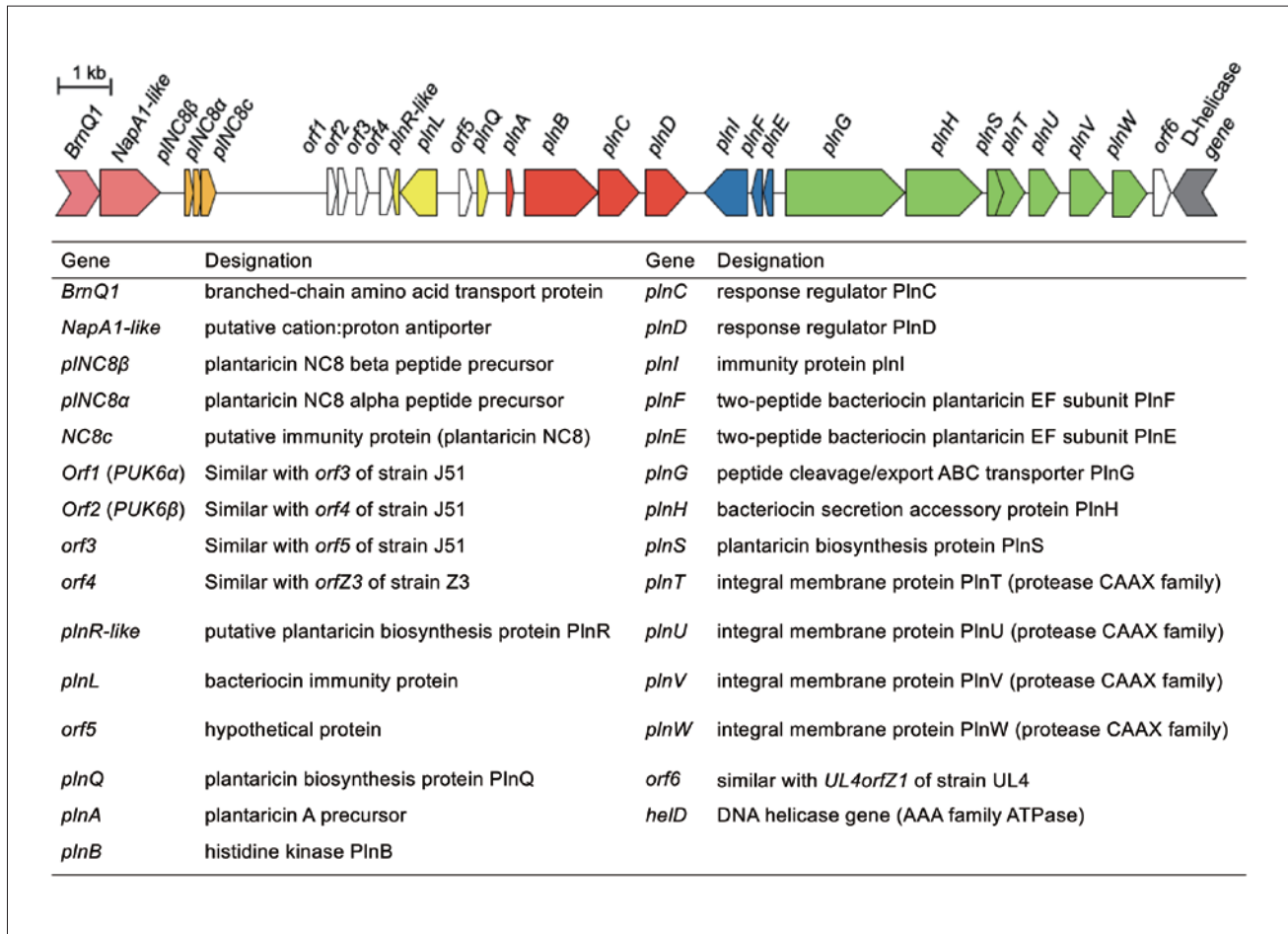


図1 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の *pln* locus 上の遺伝子とそれらの推定機能²⁾

イシン (Em) 含有 MRS 培地にて、PUK6 株が生育でき、プラスミドが複製できない 42℃で培養することで、Em 耐性遺伝子を有するプラスミドを PUK6 株のゲノム中へ相同組換えにより挿入した (1st crossover)。次に、Em 耐性を示した株をプラスミドが複製可能な 28℃で培養した。培養液を新しい MRS 培地に 1% (v/v) 接種して 24 時間培養した。この操作を 3 回繰り返した (約 100 世代)。継代培養を行うことで、染色体に挿入されたプラスミド部分を切り出した。培養液を MRS 寒天平板培地に単コロニーを形成するように画線接種し、42℃で培養することでプラスミドを完全に脱落させた (2nd crossover)。最後に、Em 感受性を示したコロニーについて、コロニー PCR を行って *plnG* 遺伝子破壊株 (PUK6Δ*plnG*) を選抜・取得した。

2) *L. plantarum* PUK6Δ*plnG* の抗菌活性試験

PUK6 株および PUK6Δ*plnG* 株を MRS 寒天平板培地に穿刺接種して 30℃で一晩培養したコロニーの上に指標菌を重層するバイオアッセイを行った。指標菌には *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T、*Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T および *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* JCM 1164^T の 3 種類を用いた。これら指標菌を最適温度で一晩培養した培養液を 1.2% 寒天を含む MRS 培地 5 mL に 1% (v/v) 接種し (事前に溶解し、50℃程度に冷ましてから接種)、懸濁後、全量を MRS 寒天平板培地上のコロニーの上に流し込んだ。重層した寒天培地が固化した後、30℃で一晩培養し、コロニー周辺の指標菌の生育阻止円を観察し、抗菌活性を調べた。

3) *plnGH* 遺伝子とバクテリオシン遺伝子の共発現株の作製

PUK6 株の *PlnGH* と 4 種類のバクテリオシンの輸送と特異性を解明するため、PUK6 株のバクテリオシン遺伝子とその免疫タンパク質遺伝子および *plnGH* 遺伝子を異種発現用の宿主に導入した共発現株の作製を試みた。*plnGH* 遺伝子を乳酸菌用ベクター pMG36e (Em^r) に挿入した pMG36e-*plnGH* を構築した。次に、*PlnG* が *in vitro* 実験によって 2 分子ペプチドバクテリオシンの plantaricin EF の preplantaricin E のリーダーペプチドを切断することが報告されていることから⁴⁾、plantaricin EF の免疫タンパク質遺伝子 (*plnI*) を含む *plnEFI* 遺伝子を pMG36e とは複製領域が異なる乳酸菌用発現ベクター pNZ7021 に挿入したプラスミドの構築を試みた。まず、pUCAX54 をテンプレートとして、*plnEFI* 遺伝子を含む DNA 領域を PCR で増幅し、それを pUC118 ベクターにクローニングし、プラスミド pUC-*plnEFI* を構築した。次に、pUC-*plnEFI* の 1.2-kb *SacI*-*KpnI* 断片を pNZ7021 の *SacI* および *KpnI* 部位に挿入して pNZ7021-*plnEFI* の構築を試みた。

結果および考察

1) *plnG* 遺伝子破壊株の作製

図 2 に PUK6 株のバクテリオシンの菌体外への輸送 (分泌) に関わると推定されている *pln* locus 上の推定 ABC トランスポーター遺伝子 *plnG* を破壊した株の作製手順の概略を示した。PUK6 株に pGAX54Δ*G* を導入し、Em 含有の MRS 寒天平板培地にてプラスミドが複製できない 42℃ で培養することにより、1 回目の相同組換えを行った。次に、Em 耐性を示した株をプラスミドが複製できる 28℃ で抗生物質を含まない MRS 液体培地で 24 時間振とう培養した。その培養液を接種量 1% (v/v) で新しい MRS 培地に接種して 28℃ で 24 時間培養した。これを 3 回繰り返すことで (約 100 世代) 2 回目の相同組換えを誘発させ、染色体 DNA からのベクターの切り出しを行った (2nd crossover)。その培養液を抗生物質

を含まない MRS 寒天平板培地に単コロニーになるように画線接種し 42℃ で培養した。そして、形成されたコロニーのレプリカを Em 含有 MRS 寒天平板培地に作製した。Em 感受性を示した株のコロニー PCR を行ったところ、*plnG* 遺伝子破壊株の候補が 4 株得られた。しかし、コロニー PCR 後の電気泳動において、PUK6 野生株と同じ大きさの増幅産物も確認されたため、復帰株と *plnG* 遺伝子破壊株が混在していることが考えられた。そこで、候補株を MRS 寒天平板培地に画線接種して単コロニーとし、これを Em 含有の寒天平板培地にも接種した (レプリカ)。その結果、3 株が Em 感受性を示したため、これらのコロニーについて、組み合わせの異なる 3 種類のプライマーを用いて再度コロニー PCR を行った。その結果、*plnG* 遺伝子が破壊されたと考えられる株が 1 株得られ、DNA シークエンシングによって *plnG* 遺伝子の破壊を確認した。これを PUK6Δ*plnG* 株と命名した。

2) *L. plantarum* PUK6Δ*plnG* の抗菌活性

PUK6 株および PUK6Δ*plnG* 株を MRS 寒天平板培地に穿刺接種して生育したコロニーの上に指標菌を重層するバイオアッセイを行った。その結果、PUK6 株と PUK6Δ*plnG* において、いずれも生育阻止円の大きさにほとんど違いがみられなかった (図 3)。また、PUK6Δ*plnG* 株を培養した培養液上清は *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T に対して抗菌活性を示し、野生株 (PUK6) の抗菌活性とほぼ同じであった。*PlnG* は ABC トランスポーターと推定され、2 分子ペプチドバクテリオシン plantaricin EF のサブユニット *PlnE* のプレペプチドのプロセッシングに *PlnG* が関与するとの *in vitro* 試験の結果が報告されている⁴⁾。したがって、多成分バクテリオシンのうち少なくとも plantaricin EF は *PlnGH* (*PlnH* は *PlnG* のアクセサリタンパク質) によってプロセッシング (リーダーペプチドの切断) を受けて菌体外へ輸送されると推定されるが、本実験結果からは、PUK6Δ*plnG* 株はバクテリオシン生産能を失っていない可能性が考えられ、PUK6 株の多成分バクテリオシンの輸送・

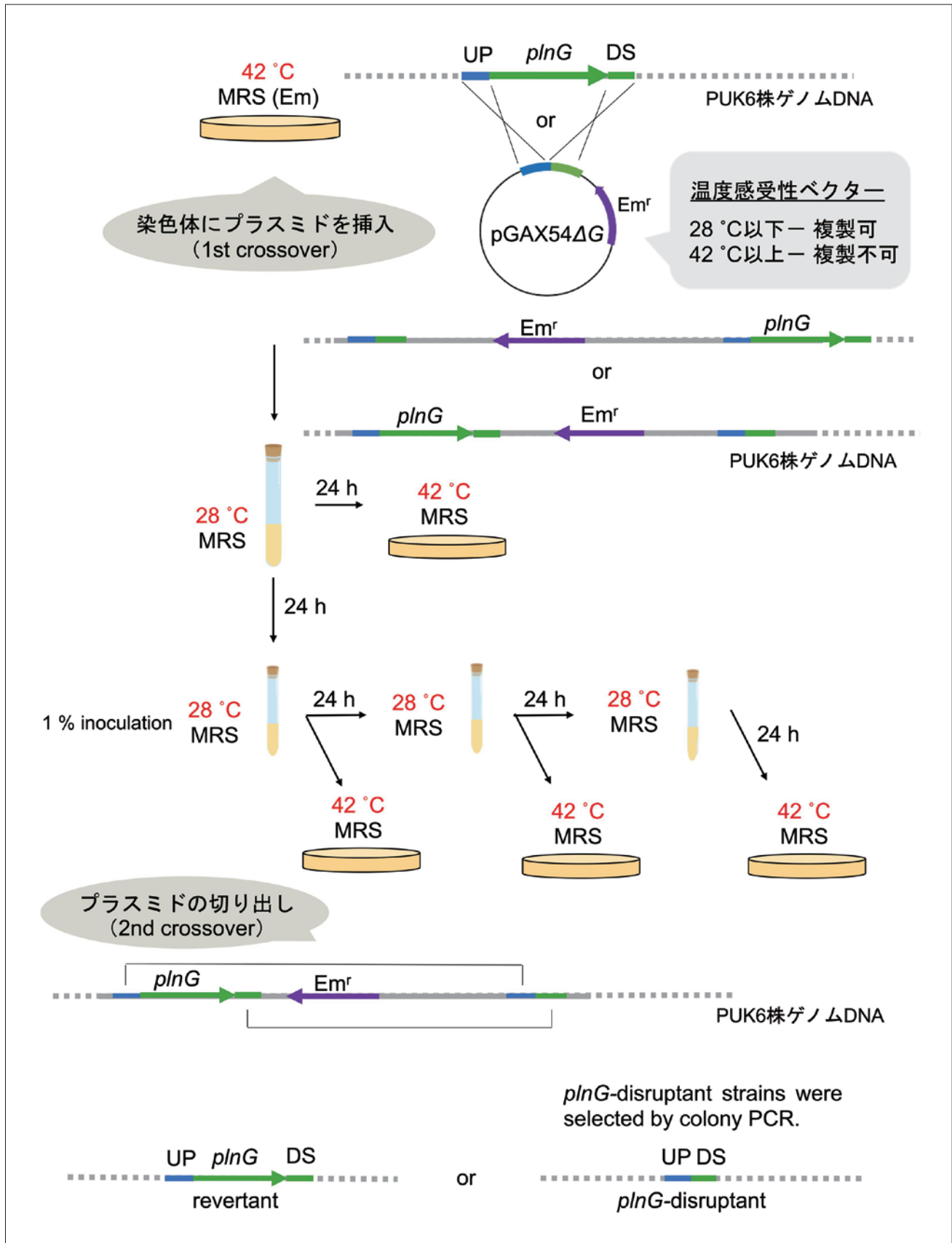


図2 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 の *plnG* 遺伝子破壊株の作製手順

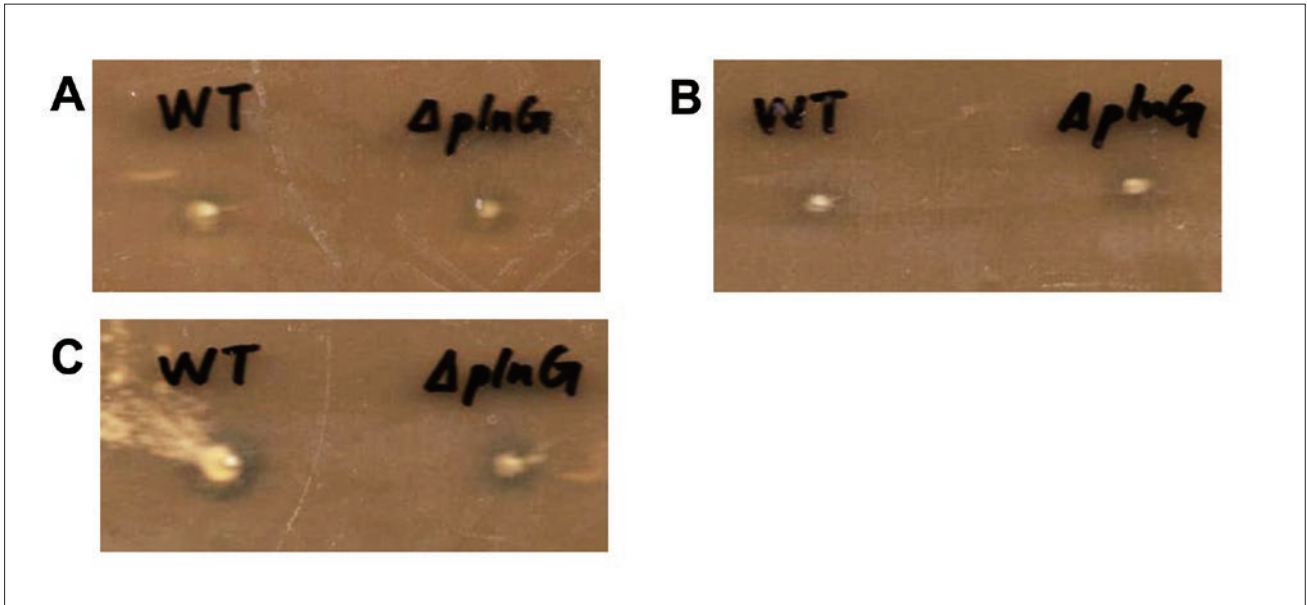


図3 *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 Δ plnG の抗菌活性試験

PUK6 株と PUK6 Δ plnG のコロニーの上に指標菌として *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T (A)、*Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T (B) および *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* JCM 1164^T (C) の懸濁液（寒天含有）を重層した。

生産には PlnGH 以外の他の輸送タンパク質も関与することも否定できなかった。今後は PUK6 Δ plnG 株が生産するバクテリオシンを精製・同定することで PlnG/H の特異性を明らかにする必要がある。

3) plnGH 遺伝子とバクテリオシン遺伝子の共発現株の作製

plnG 遺伝子破壊株 (PUK6 Δ plnG) の培養液上清は抗菌活性を有していると考えられたことから、PUK6 株の 4 種類のバクテリオシンのすべてが PlnGH を介して生産されるわけではないとも考えられた。そこで、PlnGH の特異性を明らかにするため、PlnGH と各バクテリオシン遺伝子の異種宿主による共発現を試みた。plnGH 遺伝子を pMG36e (Em^r) ベクターに挿入した pMG36e-plnGH を構築した。続いて、*in vitro* 試験により PlnG が preplantaricin E のリーダーペプチドを切断することが報告されていたことから、まずは plantaricin EF 発現株の作製に着手した。plantaricin EF の免疫タンパク質遺伝子 (plnI) を含む plnEFI 遺伝子を pNZ7021 (Cm^r) に挿入したプラスミド pNZ7021-plnEFI の構築を試みた。現在までに plnEFI 遺伝子を pUC118 ベクターに挿入したプラスミド pUC-plnEFI を構築したが、

pUC-plnEFI の 1.2-kb SacI-KpnI 断片を pNZ7021 の SacI および KpnI 部位に挿入した pNZ7021-plnEFI の構築には至っていない。これはプラスミド構築の宿主に用いる大腸菌に発現したタンパク質が毒性を示すと考えられた。そこで、低温 (25℃) での培養やディレクショナルクローニングも試みたが、構築には至らなかった。

まとめ

本研究では、*L. plantarum* PUK6 の多成分バクテリオシン (plantaricins A、EF、NC8 および PUK6) の生産機構を解明することを目指して、バクテリオシン合成遺伝子クラスター (pln locus) 上に位置する推定 ABC トランスポーター PlnG の機能を検討した。pln locus 上に見出されるトランスポーター遺伝子は plnG しかないが、その遺伝子破壊株の培養液上清は抗菌活性を有していると考えられ、PlnG の他にもバクテリオシンの輸送を担うタンパク質の存在も予想された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Kawahara, A., Murakami, R., Zendo, T. and Matsusaki H.: Characterization of multiple bacteriocin-producing *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 isolated from *misozuke-tofu*. *Food Sci. Technol. Res.*, 28, 195-205 (2022).
- 2) Kawahara, A., Zendo, T. and Matsusaki H.: Identification and characterization of bacteriocin biosynthetic gene clusters found in multiple bacteriocins producing *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6. *J. Biosci. Bioeng.*, 133, 444-451 (2022).
- 3) Tai, H.F., Foo, H.L., Rahim, R.A., Loh, T.C., Abdullah, M.P. and Kimura, Y.: Molecular characterisation of new organisation of *plnEF* and *plw* loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb. Cell Fact.*, 14, 1-13 (2015).
- 4) Pal, G. and Srivastava, S.: In vitro activity of a recombinant ABC transporter protein in the processing of plantaricin E pre-peptide. *Arch. Microbiol.*, 197, 843-849 (2015).

Production mechanism of multiple bacteriocins of the lactic acid bacterium isolated from traditionally fermented and preserved foods

Hiromi MATSUSAKI

*Division of Food and Health Environmental Sciences,
Department of Environmental and Symbiotic Sciences,
Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences,
Prefectural University of Kumamoto*

Bacteriocins, which are antibacterial peptides produced by lactic acid bacteria, are expected to serve as natural food preservatives in the food industry due to their high safety. *Lactiplantibacillus plantarum* PUK6 isolated from *misozuke-tofu* (tofu pickled in miso), which is made in the Kuma district of Kumamoto Prefecture in Japan, produces multiple bacteriocins (plantaricins A, EF, NC8, and PUK6). In previous studies, the *pln* locus (ca. 22 kb) containing the plantaricin structural genes was determined, and a biosynthetic mechanism was proposed. The aim of this study was to determine the mechanism of production of multiple bacteriocins in the PUK6 strain. A database web analysis indicated that the *plnG* gene on the *pln* locus in the PUK6 strain most likely encodes the transporter that exports bacteriocins extracellularly, while the *plnH* gene encodes its accessory protein. In this study, we prepared the *plnG*-knockout strain (PUK6 Δ *plnG*) to elucidate the function of PlnG. The antimicrobial activities of the PUK6 Δ *plnG* strain against three target strains (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T, *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, and *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* JCM 1164^T) were nearly the same as those of the PUK6 strain. This result suggests that any of the four bacteriocins produced by the PUK6 strain may be exported extracellularly via transporters other than PlnGH.