

配列空間適応歩行技術の展開に関する研究

—新規抗菌ペプチドの開発—

〈受託事業名〉	地域結集型共同研究事業
〈委託元〉	独立行政法人 科学技術振興機構
〈研究期間〉	平成 15 年度～平成 19 年度
〈採択テーマ名〉	高速分子進化による高機能バイオ分子の創出
〈担当部室／担当者〉	北部研究所 生物工学部／富永達矢
〈共同研究者〉	埼玉県中小企業振興公社
〈概要〉	

1 はじめに

人工的に定向進化させる技術は、分子改良技術として非常に有望である¹⁾が、大規模な変異体ライブラリーのスクリーニングが必要であるため、多大な労力・コスト・時間を要した。一方、近年、複数の有為変異体の変異部位を 1 分子上に集める分子改良手法(Biased Mutation Assembling :BMA 法)が開発された²⁾。この手法は、スクリーニング規模を最小限にとどめながら、有効な分子を取得することが可能な技術である。

そこで、本研究では、抗菌ペプチドの 1 つであるペディオシンに BMA 法を適用し、ライブラリーの規模が小さいスクリーニングでも、効率よく所定の抗菌活性を向上させた分子を取得する方法について検討した。

2 研究内容

2.1. ペディオシンの合成

ペディオシンは 44 残基のアミノ酸から構成されるペプチドである³⁾。ペディオシンをコードする DNA を数断片に分割したオリゴヌクレオチドを合成し、PCR にて連結して野生型ペディオシン遺伝子を調製した。

2.2. 1 アミノ酸変異体ライブラリーの作製

ペディオシンの 1 番～44 番のアミノ酸が、1 つずつランダムなアミノ酸に置換されるように設計されたプライマーを 44 種類合成した。本プライマーを用いて、野生型ペディオシンを鋳型に PCR を行い、約 1200 種類で構成される 1 アミノ

酸変異体ライブラリーを調製した。

2.3. 抗菌活性の評価方法

発現ベクターを有する漏出性 *Escherichia coli* (以下、*E. coli*) をアンピシリンが添加された培地で一晚培養した。滅菌移植棒を用いて、*E. coli* コロニーを、LB 寒天培地上に移植し、37°C にて 4 時間培養した。その上層に、一晚培養した被検菌培養液と IPTG を加えた MRS 軟寒天培地を重層した。寒天が固化したのち、軟寒天培地をさらに重層し、30°C で一晚培養した。*E. coli* のコロニー周辺の生育阻止円ができるか否か、またその直径の大きさにより、その被検菌に対するペプチドの抗菌活性を評価した。

2.4. 有為な 1 アミノ酸変異体のスクリーニング

酸敗食品から分離された酸産生菌(*Leuconostoc lactis* YK 株)を被検菌として、本菌に活性を示す 1 アミノ酸変異体をスクリーニングした(図 1)。野生型ペディオシンは本菌に活性を示さなかったが、1200 種類の変異体のうち 6 個体では、野生型よりも高い活性を示した(図 2)。

2.5. 複数の変異を有するペディオシンの作製と活性評価

さらに活性が向上した変異体を取得するために、上記スクリーニングによって得られた 6 種類の 1 アミノ酸置換体について、全ての組み合わせの変異を集めた分子を作製した。すなわち、6 種類の変異のうち、任意の 2 変異を有する 2 置換体 (12 種類)、任意の 3 変異を有する 3 置換体 (10

種類)、4種類全ての変異を有する4置換体(3種類)の合計25分子を作製し、その活性を調べた。

2置換体(A2)は、1置換体のうちで最も活性が高いF1よりも、顕著に高い活性を示した(図2)。

2.6. 抗菌スペクトルの評価

L. lactis YK株の生育阻止円は、野生型ペディオシンでは全く検出されないが、1アミノ酸置換体では1~4mmの生育阻止円が形成され、2アミノ酸置換体では5mm程度の阻止円が形成された。本傾向が、ほかの*L. lactis*株に対しても観察されるか調べた。その結果、*L. lactis* JCM 6123^T株、NBRC 12455株、JCM 11052株に対しても同様の結果が確認された。また、*L. lactis*種以外の*Leuconostoc*属細菌や*Lactobacillus*属・*Pediococcus*属・*Carnobacterium*属細菌を被検菌として、抗菌活性を調べた。*L. lactis*種に対する効果と異なり、野生型ペディオシンの方が変異体よりも活性が高い場合や、1アミノ酸置換体が最も抗菌活性が高い場合などの結果が得られた。

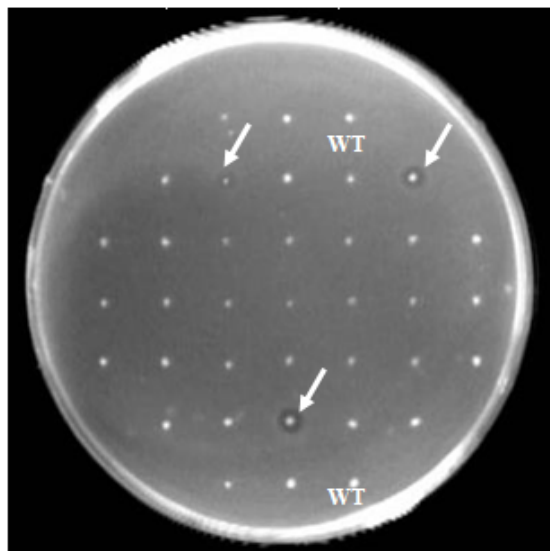


図1 変異体のスクリーニング例
WT：野生型。矢印の変異体で活性が確認できる。

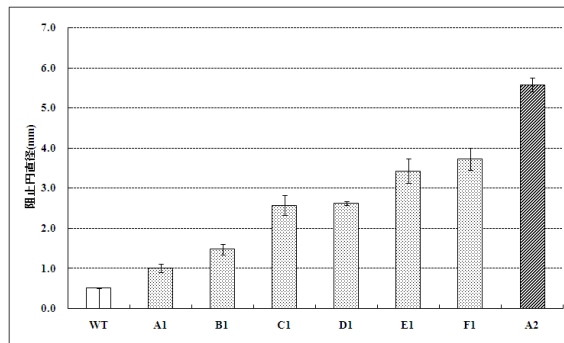


図2 変異体の活性

WT:野生型、A1~F1:1置換体、A2:2置換体。

3 まとめと展望

ペディオシンの分子改良にBMA法を用いることにより、酸敗の原因菌である*L. lactis* YK株に対する活性が飛躍的に上昇した抗菌ペプチドを効率的に取得できた。*L. lactis*種以外の酸産生菌に対しては、*L. lactis*種と同様の効果は得られなかった。しかし、これらの菌を対象として新たにスクリーニングを行えば、その被検菌の抑制に適した新たな抗菌ペプチドが得られる可能性がある。酸敗により、食品業界は大きな損害を被っている。今回取得に成功したペプチドは、こうした問題を解決するために利用できる。

参考文献

- 1) Neylon, C. Nucleic Acids Res.: Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution., **32**(2004)1448.
- 2) Aita, T., Hamamatsu, N., Nomiya, Y., Uchiyama, H., Shibana, Y. and Husimi, Y.: Surveying a local fitness landscape of a protein with epistatic sites for the study of directed evolution., *Biopolymers* **64**(2002)95.
- 3) Rodriguez, J. M., Martínez, M. I. and Kok, J.: Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria., *Critic. Rev. in Food Sci. Nutr.* **42**(2002)91.