

## Staphylococcus warneri ISK-1 (JCM11004) が生産するランチビオテック、nukacin ISK-1 の遺伝生化学的解析

指原, 紀宏  
九州大学農学研究科食糧化学工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3180523>

---

出版情報 : 九州大学, 2000, 博士 (農学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :



*Staphylococcus warneri* ISK-1 (JCM 11004) が生産するランチビオティック、nukacin ISK-1 の遺伝生化学的解析

*Staphylococcus warneri* ISK-1 (JCM 11004) が生産する  
ランチビオティック、nukacin ISK-1 の遺伝生化学的解析

指 原 紀 宏

2001年

①

*Staphylococcus warneri* ISK-1 (JCM 11004) が生産する  
ランチビオテック、nukacin ISK-1 の遺伝生化学的解析

2001 年

指原紀宏

## 目次

	頁
第1章 序論	1
1-1 グラム陽性菌の生産するバクテリオシン	2
1-2 異常アミノ酸を含むランチビオティック	3
1-3 ランチビオティックの作用機作	11
1-4 ランチビオティックの生合成機構	15
1-5 研究目的	20
1-6 参考文献	22
第2章 nukacin ISK-1 の構造遺伝子のクローニングおよびその高次構造の予測	33
2-1 緒言	34
2-2 実験方法	34
2-2-1 使用菌株、培地および培養条件	34
2-2-2 Single-specific-primer-PCR (SSP-PCR)	35
2-2-3 DNA クローニング	37
2-2-4 塩基配列の決定	37
2-2-5 塩基およびアミノ酸配列の解析	38
2-3 結果と考察	38
2-3-1 SSP-PCR 法による nukacin ISK-1 構造遺伝子の増幅	38
2-3-2 nukacin ISK-1 構造遺伝子のクローニング	40
2-3-3 nukacin ISK-1 の推定アミノ酸配列の解析	40
2-4 小括	45
2-5 参考文献	47
第3章 nukacin ISK-1 生合成遺伝子群のクローニングおよびその遺伝子解析	51
3-1 緒言	52
3-1 実験方法	53
3-2 結果と考察	55
3-3-1 生合成遺伝子群のクローニング	55

3-3-2	ORF解析	55
3-3-3	ORF1 下流領域の DNA 断片のクローニング	68
3-3-4	ORF7 下流領域の塩基配列の解析	70
3-3-5	プロモーターおよびターミネーター解析	72
3-4	小括	72
3-5	参考文献	79
第4章 <i>Staphylococcus warneri</i> ISK-1 のプラスミドキュアリング		85
4-1	緒言	86
4-2	実験方法	86
4-2-1	使用菌株、培地および培養条件	86
4-2-2	分析方法	87
4-2-3	プラスミドキュアリング	88
4-2-4	DNA 解析	88
4-3	結果と考察	89
4-3-1	プラスミドキュアリング	89
4-3-2	プラスミドキュアリング株の諸性質	91
4-4	小括	94
4-5	参考文献	96
第5章 <i>nukacin</i> ISK-1 生合成遺伝子のオペロン構造の解析		98
5-1	緒言	99
5-2	実験方法	100
5-2-1	RNA の抽出	100
5-2-2	ノーザンプロットハイブリダイゼーション	100
5-2-3	プライマー伸長法	101
5-3	結果と考察	103
5-3-1	<i>nukacin</i> ISK-1 生合成遺伝子の転写領域の決定	103
5-3-2	<i>nukA</i> , <i>-M</i> および ORF1 の転写領域の決定	105
5-4	小括	108

5-5 参考文献	109
第6章 nukacin ISK-1 の発現	111
6-1 緒言	112
6-2 実験方法	112
6-2-1 使用菌株、培地および培養条件	112
6-2-2 DNA 操作	113
6-2-3 形質転換	113
6-3 結果と考察	114
6-3-1 nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の再構築	114
6-3-2 <i>S. carnosus</i> および <i>L. plantarum</i> への形質導入	117
6-3-3 <i>S. warneri</i> ISK-1 ( $\Delta$ pPI-1) への形質導入	118
6-4 小括	119
6-5 参考文献	120
第7章 総括	121
謝辞	128



## 1-1 グラム陽性菌の生産するバクテリオシン

微生物間の拮抗作用によって他種微生物に対し抑制作用を示す物質が生産されることは Fleming のペニシリンの発見(1929)によって明らかにされた。このような生理活性物質は抗生物質と呼ばれ、ペニシリンの発見が契機となって次々と新しい物質の発見につながり、現在では臨床上や農・畜産業などでなくてはならないものである。抗生物質とは、最初“微生物によって生産される化学物質で、低濃度で細菌やその他の微生物を殺したり、生育を阻害するもの”として、ストレプトマイシン発見者の Waksman により定義された (1)。しかし、抗生物質を生産する生物としては放線菌その他の微生物が大部分を占めるとはいえ、地衣類や高等植物・動物も作ることが明らかになってきた。こうしたことから、近年、抗生物質の定義はさらに拡大され、“主として微生物が生産し、微生物その他の細胞の発育を阻害する物質”とするのが一般的である。今日では報告された抗生物質の数は 4,000 とも 5,000 とも言われており、マクロライド抗生物質、 $\beta$ -ラクタム抗生物質、アミノグリコシド抗生物質、ヌクレオシド抗生物質、脂肪酸関連抗生物質やペプチド抗生物質など、その構造または生物活性の特性により群別されている (2,3)。

ペプチド抗生物質の中で、バクテリオシンは近縁の細菌に対して抗菌作用を示すタンパク質性の物質と定義されており (4)、細菌ではグラム陽性および陰性菌に関わらず生産する菌が広く認められている。しかしながら、これまでに報告されているバクテリオシンは、乳酸菌を中心として *Bacillus* 属や *Staphylococcus* 属などのグラム陽性細菌によるものが主である。この理由として、これらの菌は自然界に広く分布しており、発酵食品中や哺乳動物の皮膚や腸管などにも存在し、極めて私たちの生活と密着した菌であることや、これらの生産するバクテリオシンの中には食中毒の原因にな

るリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等をはじめとするグラム陽性菌全般に広く抗菌作用を示すものも存在することがあげられる (5,6)。また、バクテリオシンはヒトの腸管中で消化酵素により分解されること、その多くは耐熱性であること、特に乳酸菌は古くより食品に利用されていること等の点から、安全で機能的な天然食品保存料として期待されており、学術的な面からも近年注目を集めている (7-10)。実際に、バクテリオシンの代表である、*Lactococcus lactis* により生産される nisin (nisin A) は、バクテリオシンの中で唯一 GRAS (Generally Recognized As Safe) 物質として FDA (Food and Drug Administration) に認可され (11)、また WHO (World Health Organization) や FAO (Food and Agriculture Organization) でも安全な抗菌性物質であることが認められており、欧米を中心に世界 56 ヶ国で缶詰やマヨネーズ等の食品保存料として利用されている (12,13)。

現在では、バクテリオシンは 200 以上も報告されており、乳酸菌が生産するものについては Klaenhammer により、その一次構造から 4 つのクラス (Class I-IV) に分類されることが提案された (14)。その後、その構造や作用機作が明らかになるにつれ、さらに Nesらにより修正が加えられた (15)。しかしながら、この分類は未だ完全ではなく、今後さらに構造や作用機作等の解明により新たに体系化されると思われる (Table 1-1)。また、その他のグラム陽性菌が生産するバクテリオシンの分類は、特に報告されていないが、乳酸菌のバクテリオシンと同様の分類が可能であると思われる。

## 1-2 異常アミノ酸を含むランチビオティック

ランチビオティック (Lantibiotic) とはクラス I に含まれるバクテリオシンで、通常

**Table 1-1. Classification of bacteriocins of lactic acid bacteria.**

Class	Characteristic	Bacteriocins
I	Lantibiotics, small membrane-active peptides (<5 kDa) containing the unusual amino acids such as lanthionine, 3-methylanthionine, and dehydrated residues	nisin A (16), nisin Z (17), lacticin 481 (18), lactocin S (19)
II	Small heat-stable, non-lanthionine containing membrane-active peptides (<10 kDa)	
a:	Listeria-active peptides with a consensus sequence in the N-terminal of -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-	pediocin PA-1 (20), sakacin P (21), divercin V41 (22), leucocin A (23)
b:	Poration complexes consisting of two proteinaceous peptides for activity	lactococcin G (24), plantaricin E/F (25), thermophilin 13 (26), lactacin F (27)
c:	Peptides that depend on the <i>sec</i> pathway for their secretion	acidocin B (28), divergicin A (29)
III	Large heat-labile proteins (>30 kDa)	helveticin J (30), acidophilucine A (31), lacticin A, B (32)
IV	Complex bacteriocins, composed of protein plus one or more chemical moieties (lipid, carbohydrate) required for activity	plantaricin S (33), lactocin 27 (34), leuconocin S (35)

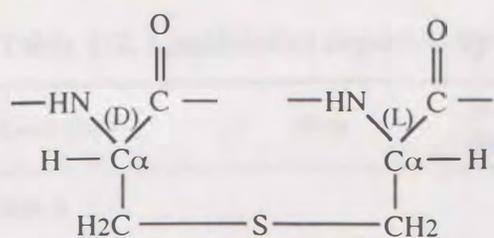
のアミノ酸以外にランチオニン [(2*S*, 6*R*)-lanthionine]、3-メチルランチオニン [(2*S*, 3*S*, 6*R*)-3-methylanthionine]、デヒドロアラニン (2,3-didehydroalanine)、デヒドロブチリン [(*Z*)-2,3-didehydrobutyrine] などの通常のタンパク質では例を見ない異常アミノ酸を含む独特のペプチドである (Fig. 1-1) (36)。これらは耐熱性、耐酸性で、中には酵素阻害活性、抗ウイルス活性、免疫増強作用など多様な生物活性を示すものも存在するため、その特性にランチオニン環構造が果たす役割が注目されている (37)。このようなことからランチビオティックの増殖阻害作用機作のみならず生合成遺伝子の解析と生合成・分泌プロセスの分子機構についても欧米を中心に盛んに研究が行われている (38)。

ランチビオティックは近年新たに多くが発見され (Table 1-2)、核磁気共鳴などによりその構造解析が行われた (Fig. 1-2)。その結果ランチビオティックは大きく2つのタイプに分類されることが Jung により提唱された (37)。

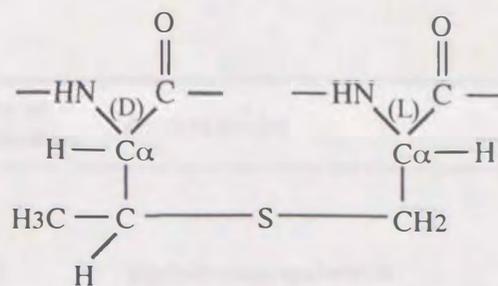
#### Aタイプ

分子量 2100 Da 以上のペプチドで、水溶液中では比較的自由的な構造をとっているが、疎水的な環境では細長いらせん構造をとる (68)。cytolysin を除き、類縁のグラム陽性菌に対し抗菌作用を示す。ランチオニン環の形成では N 末端側はセリンまたはスレオニン、C 末端側はシステイン由来という規則性がみられる。A タイプではさらに一次構造により、nisin タイプ、lacticin 481 タイプ、lactocin S タイプに分類される。

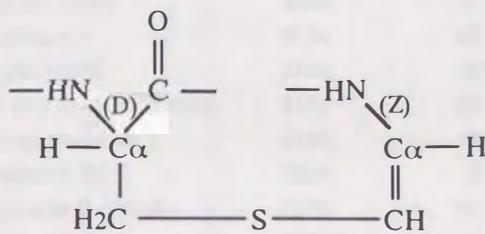
nisin タイプ : nisin (16)、Pep5 (39)、epidermin (43) 等古くより報告され、最も研究が盛んに行われている。リジンなどの塩基性アミノ酸を多く含み、中性から酸性領域において正に荷電している (中性における正味の電荷は+2~+7)。epidermin と gallidermin は C 末端側に S-[(*Z*)-2-aminovinyl]-D-cysteine を含み4つ目の環を形成する。



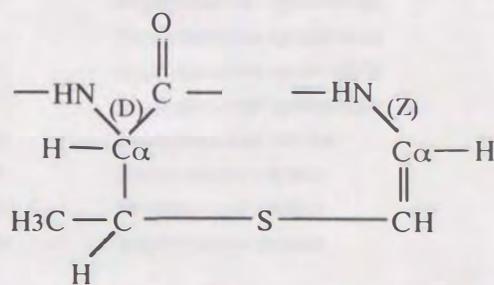
(2*S*, 6*R*)-lanthionine; *meso*-lanthionine; Lan



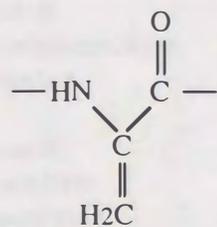
(2*S*, 3*S*, 6*R*)-3-methylanthionine;  
*threo*- $\beta$ -methylanthionine; MeLan



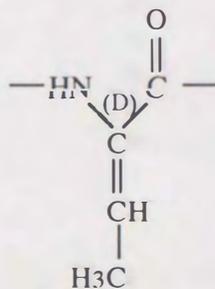
*S*-[(*Z*)-2-aminovinyl]-D-cysteine; AviCys



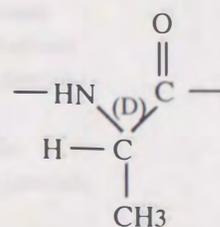
*S*-[(*Z*)-2-aminovinyl]-2-methyl-D-cysteine



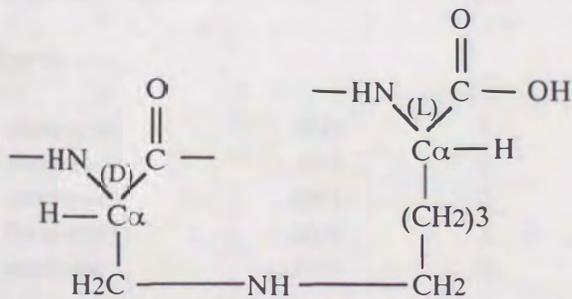
2,3-didehydroalanine; Dha



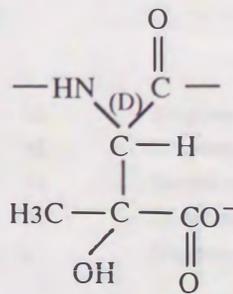
(*Z*)-2,3-didehydrobutyryne; Dhb



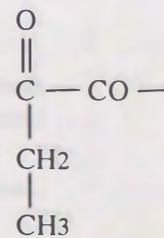
D-alanine



(2*S*, 8*S*)-lysinoalanine



*erythro*-3-hydroxy-L-aspartic acid



2-oxobutyrate

**Fig. 1-1.** The structure of the modified amino acids found in the various lantibiotics.

The isomeric configuration is indicated above the respective  $\alpha$ -carbon atom.

**Table 1-2. Lantibiotics reported by July 2000.**

Lantibiotic	Mass	Net charge	No. of thioethers	Producer species	Ref.
<b>Type A</b>					
Pep5	3488	+7	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(39)
epicidin 280	3133	+5	3a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(40)
nisin A	3353	+3	5	<i>Lactococcus lactis</i>	(16)
nisin Z	3330	+3	5	<i>Lactococcus lactis</i>	(17)
subtilin	3317	+2	5	<i>Bacillus subtilis</i>	(41)
epilancin K7	3032	+5	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(42)
epidermin	2164	+3	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(43)
gallidermin	2164	+3	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(44)
[1Val,6Leu]epidermin	2151	+3	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(45)
staphylococcin T	2166	+3	4b	<i>Staphylococcus aureus</i>	(46)
mutacin III	2266	+3	4b	<i>Streptococcus mutans</i>	(47)
mutacin B-Ny266	2270	+3	4b	<i>Streptococcus mutans</i>	(48)
mutacin 1140	2266	+3	4b	<i>Streptococcus mutans</i>	(49)
lactacin 481	2901	0	3	<i>Lactococcus lactis</i>	(18)
bacteriocin J46	-	0	3c	<i>Lactococcus lactis</i>	(50)
variacin	2658	-1	3c	<i>Micrococcus varians</i>	(51)
streptococcin A-FF22	2795	+1	3c	<i>Streptococcus pyogenes</i>	(52)
streptococcin A-M49	-	+1	3c	<i>Streptococcus pyogenes</i>	(53)
mutacin II	3245	+1	3c	<i>Streptococcus mutans</i>	(54)
butyrivibriocin OR79A	-	0	3c	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	(55)
salivaricin A	2315	0	3c	<i>Streptococcus salivarius</i>	(56)
lactocin S	3764	-1	2	<i>Lactobacillus sake</i>	(19)
carnocin UI49	4635	-	-	<i>Carnobacterium piscicola</i>	(57)
sublancin 168	3878	+3	1	<i>Bacillus subtilis</i>	(58)
plantaricin C	2880	+2	4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(59)
cytolysin L1/L2	4164/2631	0/0	-/-	<i>Enterococcus faecalis</i>	(60)
lactacin 3147	-/-	-/-	-/-	<i>Lactococcus lactis</i>	(61)
staphylococcin C55	-/-	0/1	-/-	<i>Staphylococcus aureus</i>	(62)
<b>Type B</b>					
cinnamycin	2042	0	3d	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	(63)
duramycin A	2014	0	3d	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	(63)
duramycin B	1951	0	3d	<i>Streptoverticillium</i> sp.	(63)
duramycin C	2008	-1	3d	<i>Streptomyces griseoluteus</i>	(63)
ancovenin	1959	0	3	<i>Streptomyces</i> sp.	(64)
mersacidin	1825	0	4	<i>Bacillus</i> sp.	(65)
actagardine	1890	-1	4	<i>Actinoplanes</i> sp.	(66)
Ala(0)-actagardine	1961	-1	4	<i>Actinoplanes liguriae</i>	(67)

-; unknown, a, b, c; The number of thioethers was expected from amino acid sequence similarity with Pep5, epidermin, lactacin 481, respectively. d; The fourth bridge is introduced through lysinoalanine 19→6.

Type A

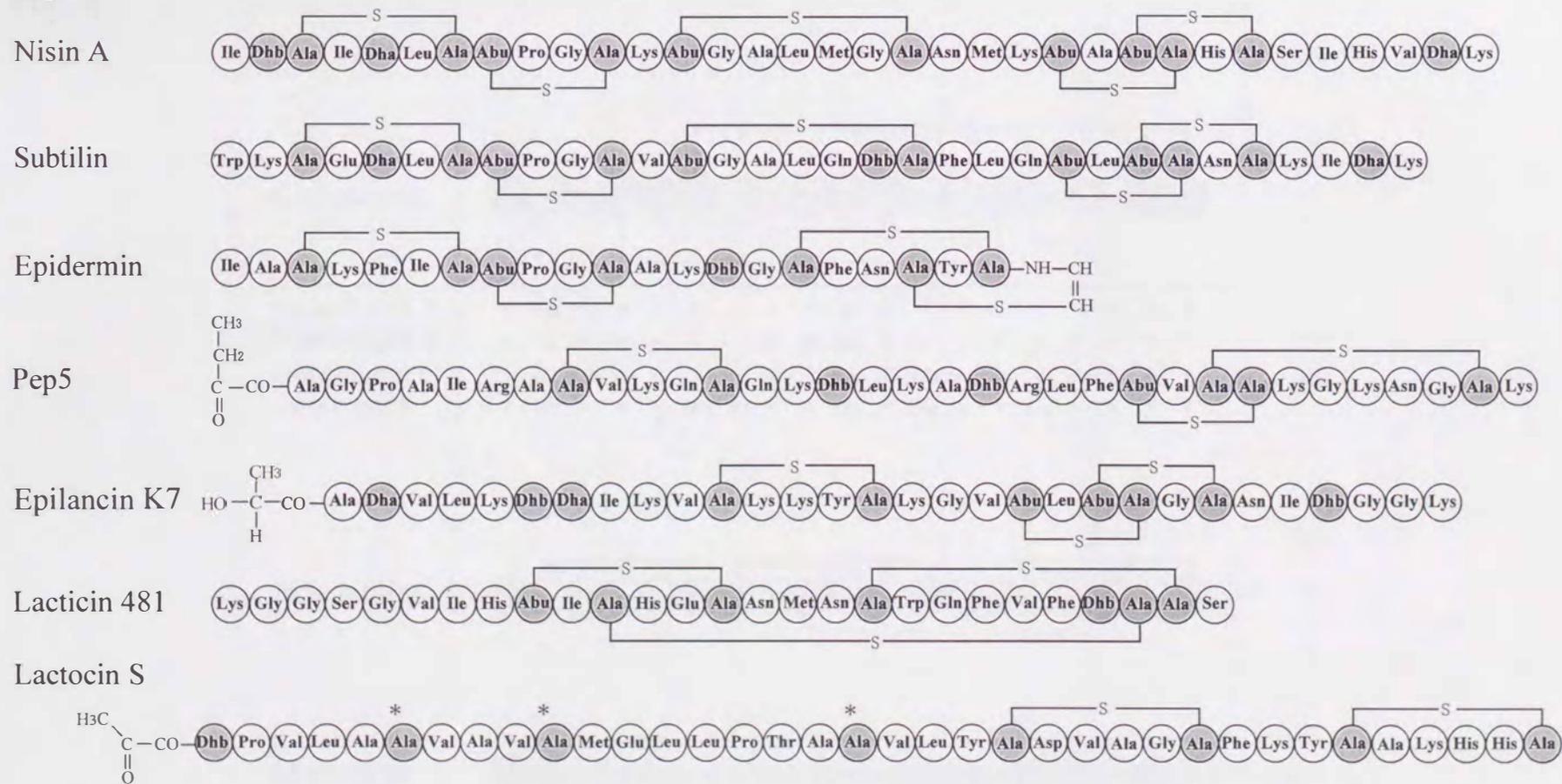
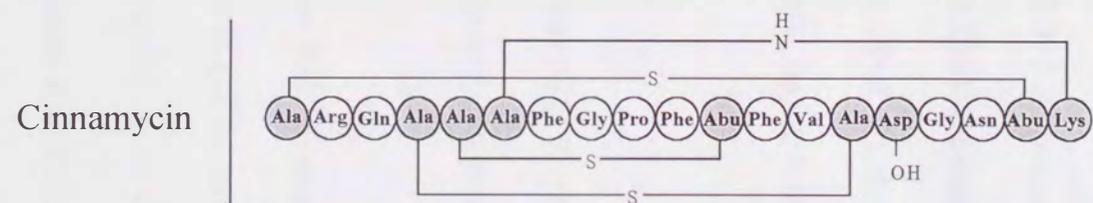


Fig. 1-2. The primary structure of representative lantibiotics.

The shaded residues indicate amino acids which have undergone post-translational modification. Ala-S-Ala, lanthionine; Abu-S-Ala, 3-methylanthionine; Dha, dehydroalanine; Dhb, dehydrobutyrine; Ala-NH-Lys, lysinoalanine; Asp-OH, hydroxyaspartic acid. Ala residues marked with an asteriks are in the D-configuration.

Type B



Duramycin A	* Lys *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
Duramycin B	* Arg *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	Leu	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
Duramycin C	* Ala	Asn	* * *	* * *	Tyr	* * *	* * *	Leu	* Trp	Ser	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
Ancovenin	* Val *	* * *	* * *	Dha	* * *	* * *	* * *	Leu	* Trp	Ser	* Asp	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *

6

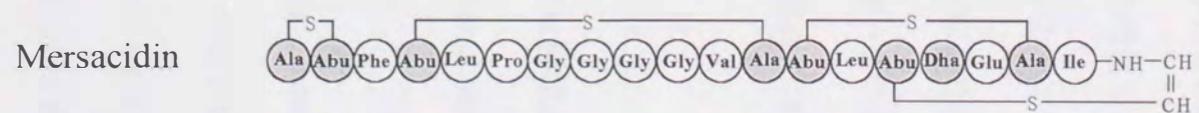
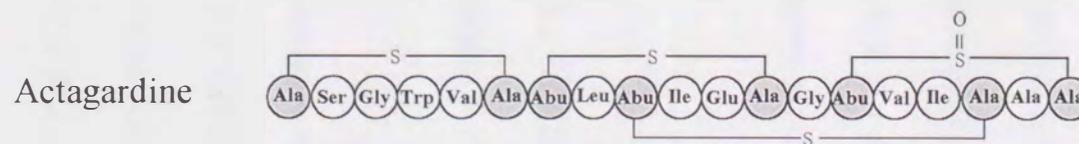


Fig. 1-2-Continued.

N末端側の構造は nisin、subutilin に類似する。

lacticin 481 タイプ : lacticin 481 (18) や variacin (51)、streptococcin A-FF22 (52)、salivaricin A (56) は nisin タイプと異なりほとんど電荷を持たない。ランチオニン環の位置は lacticin 481 のみでしか明らかとなっていないが (69)、構造遺伝子の塩基配列等から明らかにされたペプチドの一次構造は、セリン、スレオニン、システインの位置がほぼ同じであり、類似したランチオニン環構造をとると考えられる。

lactocin S タイプ : lactocin S は原核生物で生産されるペプチドとしては唯一、D-アラニンを含む (19)。cytolysin は腸内細菌 *Enterococcus faecalis* により生産される。本ペプチドはこれまでに報告されているランチビオティックで唯一2つのサブユニット (4164, 2631 Da) から構成される。また抗菌活性のみならず溶血作用も有す (60)。

#### Bタイプ

分子量 2100 Da 以下で球状構造をとっており、抗菌活性と共に酵素阻害活性等も示す (63,64,70-72)。Bタイプではさらに cinnamycin タイプと mersacidin タイプに分けられる。

cinnamycin タイプ : cinnamycin (63)、duramycin A, B, C (63)、ancovenin (64) は *Streptomyces* 属および *Streptoverticillium* 属により生産され、すべてランチオニン環構造は共通であり、Aタイプではみられない erythro-3-hydroxy-L-aspartic acid と (2S, 8S)-lysinoalanine を有す。このタイプのランチビオティックは *Bacillus* 属等に対し弱い抗菌活性を示すが、そのみならず血圧上昇作用の原因となるアンジオテンシン I 変換酵素やホスホリパーゼ A2 等に対し酵素阻害活性を示す (63,64,73)。また cinnamycin は単純ヘルペスウイルス-1 に対し増殖阻害活性を示すなど、多様な生物活性を示す。

mersacidin タイプ : mersacidin (65) と actagardine (66) は cinnamycin 等と構造およ

び生物活性が大きく異なる。mersacidin はランチビオティックの中で最も分子量が小さく (1825 Da)、電荷を持たない (71)。C 末端側は epidermin と同様に S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cysteine を有す (Fig. 1-2 参照)。actagardine は *Actinoplanes* sp. ATCC 31049 により生産される。C 末端側の 3-メチルランチオニンが酸化され、ランチビオティックの中で唯一スルホキシド基を有すが、精製過程で生じるものか未だ不明である (66)。興味深いことに mersacidin の N 末端から 11-18 番目のアミノ酸配列と actagardine の 5-12 番目のアミノ酸配列はほぼ同じであり、両者ともペプチドグリカンの合成を阻害する作用を示すことから、進化過程が共通であると考えられる (74)。

### 1-3 ランチビオティックの作用機作

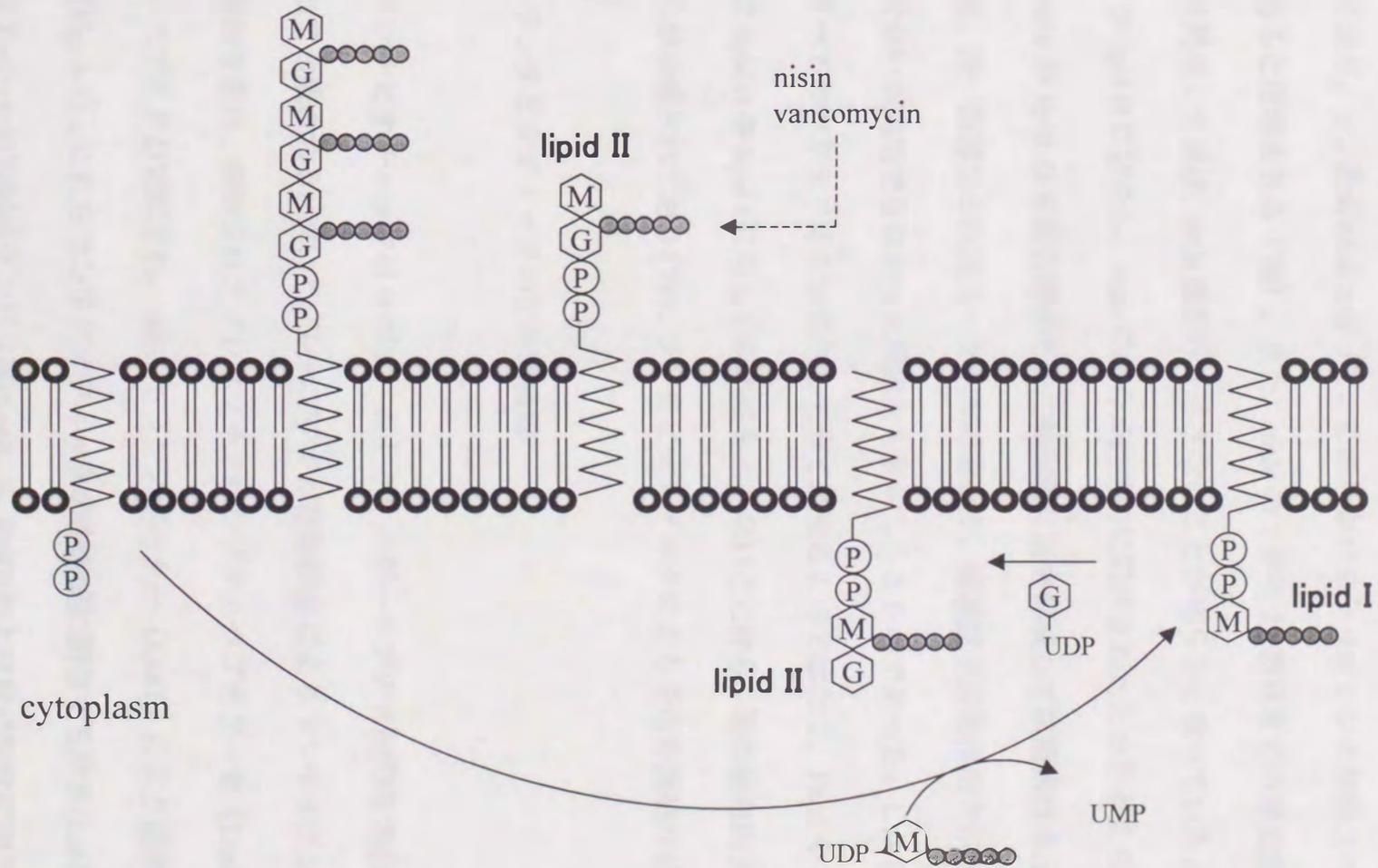
一般に、バクテリオシンは標的細胞の膜に孔を形成して殺菌作用を示す。通常、塩基性アミノ酸に富み、溶液の pH が低くなるに従い活性が増加するが、中性以上では凝集し活性を失う (36,75)。これまでに部位特異的変異法などによって変異体が作製され、構造—活性相関などが詳細に検討されているが、未だ完全な解明には至っていない (76,77)。

nisin の作用機構は、当初 (1970 年代後半) バンコマイシンや mersacidin などと同様に、lipid I および lipid II と呼ばれるペプチドグリカン前駆体に結合して細胞壁合成阻害を引き起こすことが考えられていた。しかしながら、その作用時間が数分と短いことや、細胞壁合成阻害を引き起こす最少濃度が *in vitro* では 10 mM 以上であったのに対し、実際の細胞では nM の濃度で活性を示すことから、細胞壁合成阻害説が疑問視された。その後、黒膜やリポソームなどの人工膜に対して膜に孔を形成し、ATP やアミノ酸等の分子量の低い物質を細胞外に漏出させることが明らかとなり、タンパク質

や糖質などのレセプターなしに、非特異的に膜に孔を形成することが明らかとなった。そのモデル機構は、まず細胞膜中の陰イオン性の細胞膜リン脂質に nisin が結合する (1. 細胞膜への静電的結合)。nisin の立体構造は、水溶液中では自由な構造をとっているが、疎水的な環境では細長いらせん構造をとり、N 末端から 3-19 および 23-28 番目のアミノ酸での二つの堅いドメインと、そのドメインをつなぐ 20-22 番目のヒンジ領域から構成されることが 3D-NMR により明らかにされている (68)。細胞膜に結合した nisin は膜電位( $\Delta\psi$ )や pH 勾配( $\Delta\text{pH}$ )を推進力として、リン脂質頭部に結合したままヒンジ領域で折れ曲がりながら細胞膜に入り込み (2. 細胞膜への浸入)、膜をわん曲させて孔を形成する (3. 孔の形成) (77)。このモデルはくさび型モデルと呼ばれ、現在まで広く受け入れられてきた (Fig. 1-3)。しかしながら、これだけでは同種の菌でも株によりその抗菌スペクトルが異なることは説明できなかった。

近年、*Micrococcus luteus* から抽出した lipid II をリボソームに加えると nisin の活性が 10 倍以上に増加する事が明らかになり、nisin は膜に結合した lipid II と複合体を形成して膜に孔を形成するモデルが新たに提案された。lipid II とは、細胞壁構成成分であるペプチドグリカン前駆体で、細胞膜の細胞質側で活性化アミノ糖であるウリジン-5'-二リン酸 (UDP) -*N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) にペントペプチドが結合したのから、MurNAc ペントペプチドが C55-ポリイソプレイド二リン酸に転移されて合成される (lipid I)。次に、これに UDP-*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) から GlcNAc が転移されて lipid II が形成され、細胞壁側に輸送される (Fig. 1-4)。バンコマイシンは lipid II のペントペプチド中の-D-Ala-D-Ala モチーフに結合することで細胞壁の合成を阻害して抗菌活性を示すが、nisin も同様に細胞壁側に位置する lipid II のペントペプチドに結合することにより抗菌活性を示すことが明らかとなった。一方、バクテ





**Fig. 1-4. Model of peptidoglycan biosynthesis and central role of the precursors lipid I and lipid II.**

M, *N*-acetylmuramic acid; G, *N*-acetylglucosamine; P, phosphate; ●●●●●, pentapeptide chain. The site of action of nisin and vancomycin is depicted by a dashed arrow.

リオシンは黒膜などのリン脂質のみで構成される人工膜に対しても孔形成作用を示すことも事実であり、lipid IIはくさび型モデルによる孔形成の最初の段階で、バクテリオシン結合因子として作用すると思われた。また、lipid II含量は細菌によって異なっており、リン脂質組成と併せて、これらがバクテリオシンの抗菌スペクトルの違いであると推察される(78)。また、nisinの1から12番目までの構造変異体(nisin<sup>1-12</sup>)で前処理した菌は、nisin感受性を示さないことが明らかとなっていたが、これはnisin<sup>1-12</sup>がlipid IIに結合し、nisinの結合が拮抗的に阻害されたためと考えられる(77)。

nisinがlipid IIを結合因子として細胞膜に孔を形成して抗菌活性を示すというモデルは、同一菌種での抗菌スペクトルの違いや、低濃度で殺菌作用を示すといったこれまで長い間説明できなかった現象をも説明しうるものであった。しかし、このモデルはすべてのバクテリオシンに対して当てはまるものではなく、Pep5やepilancin K7などはlipid IIやlipid Iに対して親和性を示さないことから、別の結合因子が存在することが示唆されており(79)、ランチビオティックによりその作用機作は様々である。

#### 1-4 ランチビオティックの生合成機構

ランチビオティックはリボソーム上でリーダーペプチド配列を含むプレペプチドとして合成される。次いでプレペプチドが修飾酵素によりランチオニン環の形成などの修飾を受け、修飾されたプレペプチドはシグナルペプチダーゼ(LanP)によりリーダーペプチドが切断され、ABCトランスポーター(LanT)により菌体外に分泌される(Fig. 1-5)。これらランチビオティックの生合成に関与する酵素(LanB, C, M, P, T および EpiD)や発現制御タンパク質(LanR, K, EpiQ)および自己耐性に関与するタンパク質(LanI, E, F, G)は複数のオペロンより構成される遺伝子群を形成している(Fig. 1-6)

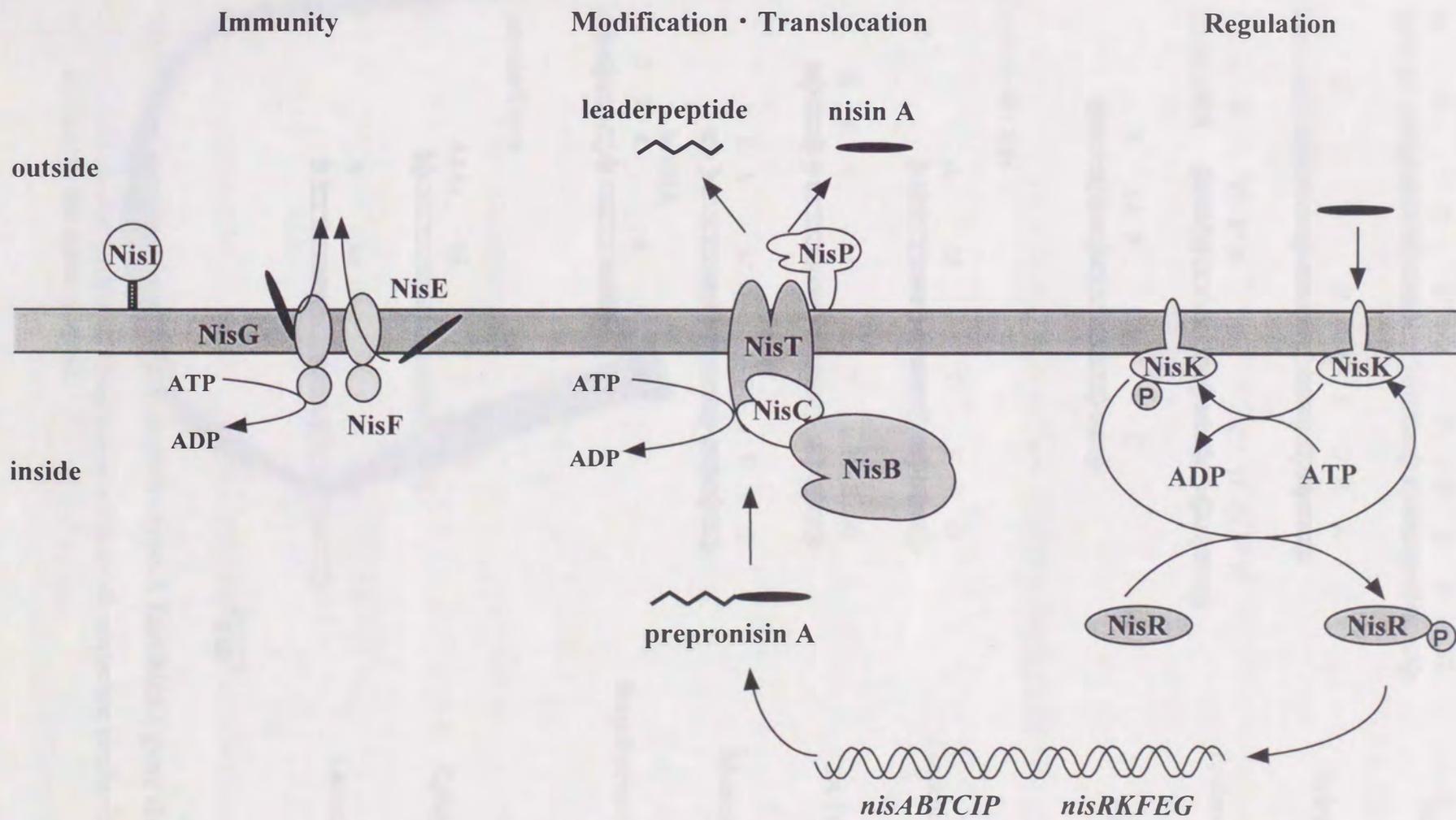
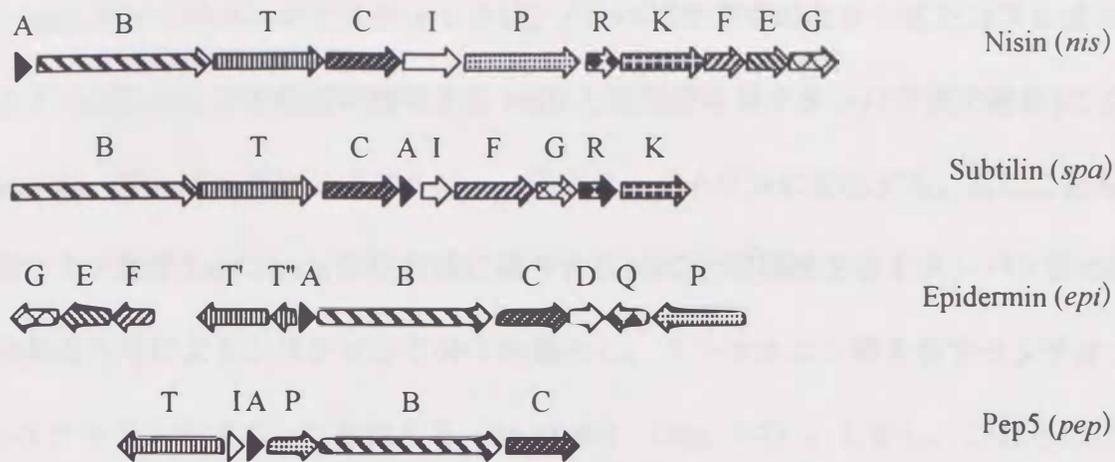


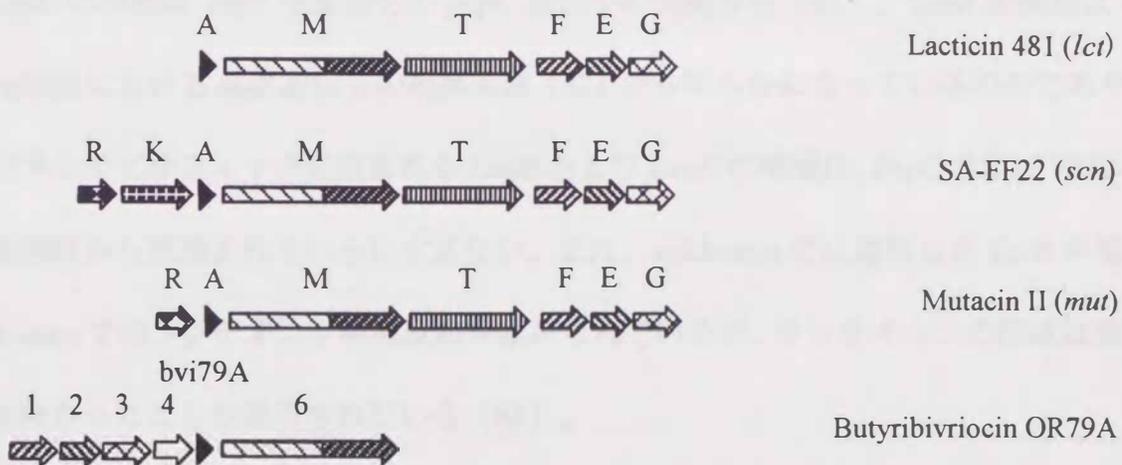
Fig. 1-5. Model for nisin biosynthesis, self-protection (immunity) and regulation.

The mechanism of NisI for the self-protection is not known.

Nisin type



Lactacin-481 type



Lactocin-S type

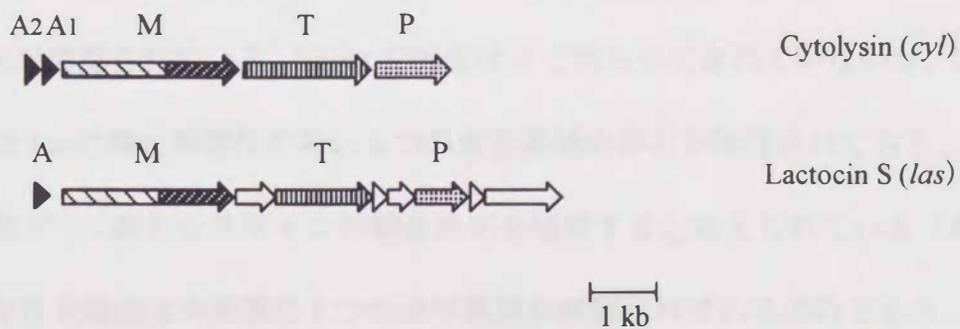


Fig. 1-6. Organization of representative type-A lantibiotic gene clusters.

Genes with similar proposed function or substantial sequence similarity are highlighted in the same manner.

(36,80)。

nisin タイプのランチビオティックは、プレペプチド中のセリンまたはスレオニンがまず LanB(nisin の生合成に関与する NisB と相同性を有すタンパク質の総称)により脱水され、それぞれデヒドロアラニン、デヒドロブチリンに変化する。次にこれら不飽和アミノ酸が LanC(nisin の生合成に関与する NisC と相同性を有すタンパク質の総称)の触媒作用によりシステインと分子内縮合し、ランチオニン環を有すランチオニン、3-メチルランチオニンに変化する (36,38,80) (Fig. 1-7)。しかし、これらのことはすべての nisin タイプのランチビオティックで明らかになっているわけではない。LanC の機能は Pep5 生産菌での *pepC* 遺伝子の欠損から (81)、LanB の機能は nisin 生産菌における *nisB* 遺伝子の相補実験 (82) から明らかになっているのみであり、他のランチビオティックに含まれる LanB および LanC の機能は、PepC および NisB との相同性から推測されているにすぎない。また、epidermin では精製した EpiB を用いて *in vitro* でのランチオニン形成反応が試みられているが、ランチオニンの形成は確認されなかったことが報告されている (83)。

一方、lacticin 481 タイプおよび lactocin S タイプでは LanB, LanC をコードする遺伝子はなく、LanM (lacticin 481 の生合成に関与する LctM と相同性を有すタンパク質の総称) の存在が確認されている。LanM の機能は未だ明らかにされていないが、LanM の C 末端側は LanC 等と相同性の高い 6 つの保存領域の存在が確認されており、この部位が不飽和アミノ酸とシステインの縮合反応を触媒すると考えられている (80)。また LanM の N 末端側は中央部に 1 つの保存領域が確認されているのみであり、これまでに明らかにされたランチビオティック合成酵素と相同性はない。しかしながらこれらの遺伝子群では *lanB* に相当する遺伝子が見つかっておらず、また、*Lactococcus*

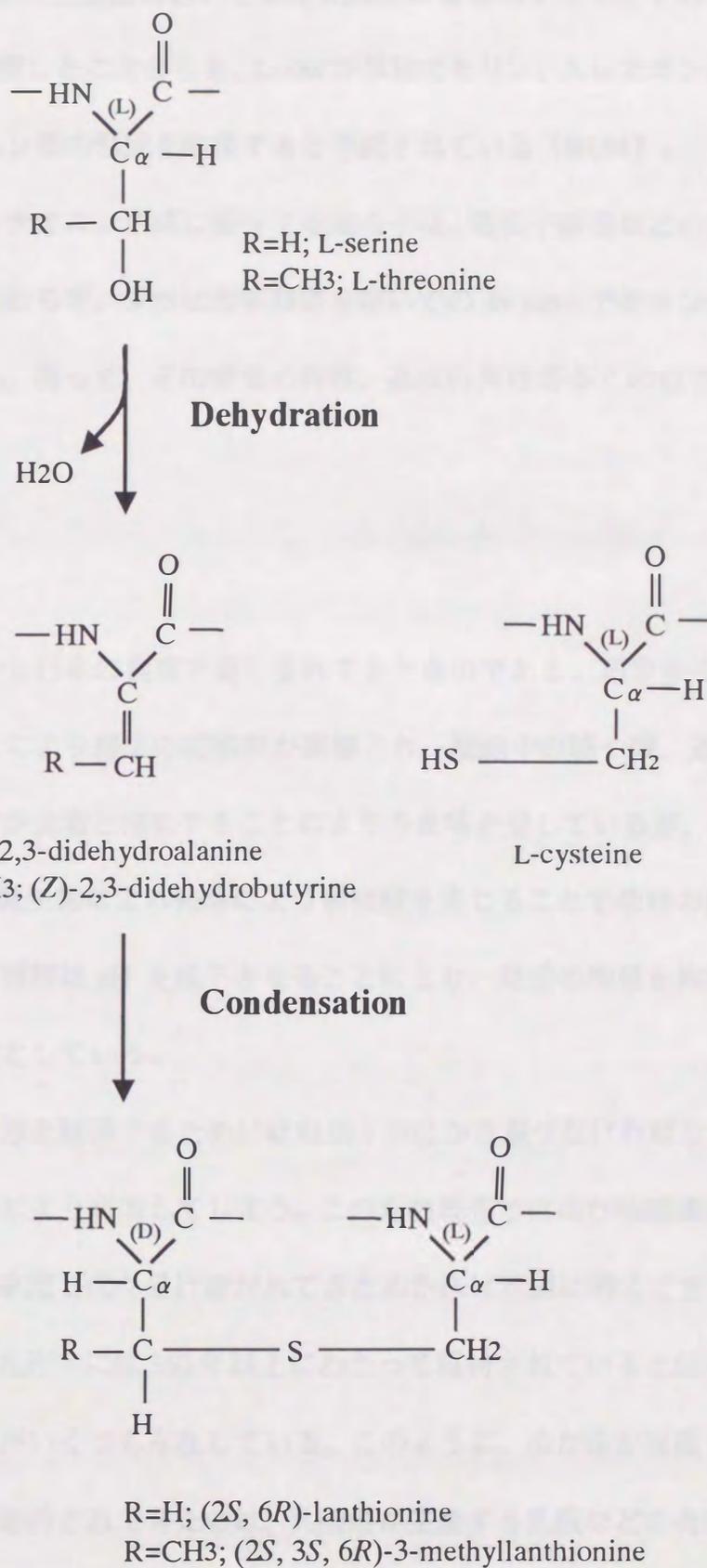


Fig. 1-7. Proposed biosynthesis of unusual amino acids in lantibiotics.

*lactis* の lacticin 481 非生産菌において *lctA*, *lctM*, *lctT* を相補することで活性型の lacticin 481 の生産能が回復したことから、LanM が単独でセリン、スレオニンの脱水反応、およびランチオニン環の形成を触媒すると予測されている (80,84)。

このようにランチオニン形成に関与する遺伝子は、遺伝子破壊などの実験から特定されているにも関わらず、未だに精製酵素を用いての *in vitro* でのランチオニン形成は成功していない。従って、その酵素の特性、基質特異性等多くの点で不明である。

### 1-5 研究目的

漬け物は古来から日本の食卓で親しまれてきたものである。通常多くの漬け物は、食塩などの浸透圧により野菜の細胞膜が破壊され、細胞中の糖や酸、遊離アミノ酸、核酸関連物質などが食塩と混和することによりうま味を呈しているが、それだけではなく、ぬか床中の微生物による発酵により有機酸を生じることで独特の風味を呈している。さらに、有機酸は pH を低下させることにより、雑菌の増殖を抑制し、漬け物の長期保存を可能としている。

ぬか床はよい状態を維持するためには毎日 1 回はかき混ぜなければならず、これを怠ると雑菌の増殖により腐敗してしまう。このため現在ではぬか味噌漬けをつけることは敬遠され、各家庭で代々受け継がれてきたぬか床は次第に消えてきている。ところが、福岡市や北九州市には 360 年以上にわたって維持されていると伝承される小笠原藩伝来のぬか床がいくつも存在している。このように、ぬか床が腐敗することなく長期間にわたって維持されてきたのは、乳酸菌が生産する乳酸などの有機酸の効果だけでなく、ぬか床中に抗菌物質生産菌が存在し、その抗菌物質により雑菌の増殖が抑制され、その結果理想的なマイクロフローラを形成していることが考えられた。

このような背景から、当研究室において、北九州市小倉の佐藤家にある小笠原藩以来360年以上も維持されていると伝承されているぬか床から抗菌物質生産菌の探索を行い、バクテリオシンを生産するグラム陽性菌を単離した(85)。本菌は通性嫌気性の四連球菌で、グルコースからホモ乳酸発酵でDL-乳酸を生産する。また、18%のNaCl存在下で増殖可能なことや、メバロン酸が増殖促進効果を示す(86)ことなどから、当初本菌は *Pediococcus* 属であると思われていた。しかしながら、本菌は真性カタラーゼを有しており(87)、また16S rDNAの塩基配列やDNA-DNAハイブリダイゼーションなど分子遺伝学的解析の結果から、ISK-1株は *Staphylococcus warneri* に属することが明らかとなり、*Staphylococcus warneri* ISK-1 (JCM 11004) と命名された(88)。

本菌が生産するバクテリオシン (nukacin ISK-1) の精製および構造解析等の結果、本バクテリオシンは分子量 2.9 kDa の低分子ペプチドであった。また、nukacin ISK-1 は少なくとも3分子のランチオニンまたは3-メチルランチオニンを含むランチビオティックであり、N末端の7個のアミノ酸配列は lacticin 481 タイプのランチビオティックと相同性を示した。しかしながら、8番目以降はエンドマン分解が停止したため明らかにすることができなかった(89-91)。ランチビオティックはその構造中にモノスルフィド結合を有するため、通常のエドマン分解では、反応がブロックされる。一方、アルカリエタンチオールでペプチドを還元すると、エドマン分解はブロックされないが、デヒドロブチリンやランチオニンなどの異常アミノ酸はS-エチルシステイニルまたはβ-メチル-S-システイニル誘導体に変化し同定ができない(92)。このため、ランチビオティックの構造を明らかにするためには、NMRによるスペクトル解析がもっとも優れた方法である。しかし、<sup>1</sup>H-NMRおよび二次元NMRによるnukacin ISK-1の構造解析では、サンプルの精製度が十分でないか測定条件が最適でなかったため、シ

グナルが重複して解析することができなかった。

本研究では、nukacin ISK-1 の構造解明を目的として、その構造遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定など、遺伝子からのアプローチによる構造決定を行った。さらに、nukacin ISK-1 が lacticin 481 タイプのランチビオティックであれば、その生合成・分泌プロセス、特にランチオニンの形成機構は nisin と異なることが推測される。そこで、nukacin ISK-1 生合成遺伝子群の同定を行い、その機能の解明も試みた。

#### 1-6 参考文献

1. Waksman, E. E. and Woodruff, H. B. (1942) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **49**: 207-213
2. 高橋信孝、丸茂晋吾、大岳望 (1981) 生理活性天然物化学、東京大学出版会
3. 柴田承二 (編) (1978) 生物活性天然物質、医歯薬出版
4. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, **40**: 722-756
5. Hurst, A. (1981) Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, **27**: 85-123
6. Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B. and Nes, I. F. (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3275-3281
7. 園元謙二、木村宏和、松崎弘美、石崎文彬 (1998) 乳酸菌のバクテリオシン、“食品微生物制御技術の進歩”、中央法規出版、p. 129-148
8. 指原紀宏、園元謙二、石崎文彬 (1999) 乳酸菌の生産するバクテリオシンとその応用、乳酸菌学会誌、**10**: 2-18
9. 指原紀宏、園元謙二、石崎文彬 (2000) 乳酸菌の生産するバクテリオシン、化学と生物、**38**: 439-446

10. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 85-106
11. Federal Register, Aplin and Barrett Ltd. (1995) Filling of petition for affirmation of GRAS status. Vol. 60, pp. 64167
12. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. (1996) Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Leeuwenhoek*, **69**: 193-202
13. Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, **44**: 100-117
14. Klaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**: 338-356
15. Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, **70**: 113-128
16. Gross, E. and Morell, J. L. (1971) The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**: 4634-4635
17. Mulders, J. W. M., Boerrigter, I. J. Rollema, H. S., Siezen, R. J. and de Vos, W. M. (1991) Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, **201**: 581-584
18. Piard, J.-C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M. J. and Klaenhammer, T. R. (1992) Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 279-284
19. Skaugen, M., Nissen-Meyrer, J., Jung, G., Stevanovic, S., Sletten, K., Abildgaard, C. I. M. and Nes, I. F. (1994) *In vivo* conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *J. Biol. Chem.*, **269**: 27183-27185
20. Henderson, J. T., Choplo, A. L. and van Wassenaar, P. D. (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem.*

21. Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. (1992) Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lb. sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**: 460-468
22. Métivier, A., Pilet, M.-F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J.-C., Marion, D., Centiempo, Y. and Fremaux, C. (1998) Divercin V41, a new bacteriocin with two disulfide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology*, **144**: 2837-2844
23. Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1991) Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, **173**: 7491-7500
24. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K. and Nes, I. F. (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.*, **174**: 5686-5692
25. Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijssink, V. G. H. 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
26. Marciset, O., Jeronimus-Straingh, M. C., Mollet, B., and Poolman, B. (1997) Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**: 14377-14284
27. Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. (1991) Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.*, **173**: 1779-1788
28. Leer, R. L., van der Vossen, J. M. B. M., van Giezen, M., van Noort, J. M. and Pouwels, P.

- H. (1995) Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, **141**: 1629-1635
29. Worobo, R. W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1995) A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.*, **177**: 3143-3149
30. Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, **167**: 439-446
31. Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T. (1991) Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Lett. Appl. Microbiol.*, **12**: 106-108
32. Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T. (1991) Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **12**: 43-45
33. Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L. and Piard, J.-C. (1993) Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1416-1424
34. Upreti, G. C. and Hinsdill, R. D. (1973) Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **4**: 487-494
35. Lewus, C. B., Sun, S. and Montville, T. J. (1992) Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 143-149
36. Sahl, H.-G., Jack, R. W. and Bierbaum, G. (1995) Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, **230**: 827-853
37. Jung, G. (1991) Lantibiotics-ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridge and  $\alpha,\beta$ -didehydroamino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**:

38. 園元謙二、指原紀宏 (1998) 異常アミノ酸を含む抗菌物質、ランチビオティック、  
酵素工学、**40**: 21-28
39. Kellner, R., Jung, G. and Sahl, H.-G. (1991) Structure elucidation of the tricyclic lantibiotic  
Pep5 containing eight positively charged amino acids. *In* "Nisin and novel lantibiotics", eds.  
Jung, G., and Sahl, H.-G., ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, pp. 141-158
40. Heidrich, C., Pag, U., Josten, M., Metzger, J., Jack, R. W., Bierbaum, G., Jung, G. and Sahl,  
H.-G. (1998) Isolation, characterization, and heterologous expression of the novel  
lantibiotic epicidin 280 and analysis of its biosynthetic gene cluster. *Appl. Environ.  
Microbiol.*, **64**: 3140-3146
41. Gross, E., Kiltz, H. H. and Nebelin, E. (1973) The structure of subtilin. *Hoppe-Seyler's Z.  
Physiol. Chem.*, **354**: 810-812
42. Van de Kamp, M., Horstink, L. M. van den Hooven, H. W., Konings, R. N. H., Hilbers, C.  
W., Frey, A., Sahl, H.-G., Metzger, J. W. and van de Ven, F. J. M. (1995) Sequence analysis  
by NMR spectroscopy of the peptide lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus  
epidermidis* K7. *Eur. J. Biochem.*, **227**: 757-771
43. Allgaier, H., Jung, G., Werner, R. G., Schneider, U. and Zähler, H. (1986) Epidermin:  
sequencing of a heterodet tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. *Eur. J. Biochem.*, **160**:  
9-22
44. Kellner, R., Jung, G., Hörner, T., Zähler, H., Schnell, N., Entian, K.-D. and Götz, F. (1988)  
Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.*, **177**:  
53-59
45. Sahl, H.-G. *et al.*, unpublished.
46. Furmanek, B., Kaczorowski, T., Bugalski, R., Bielawski, K., Bogdanowicz, J. and  
Podhajska, A. J. (1999) Identification, characterization and purification of the lantibiotic

- staphylococcin T, a natural gallidermin variant. *J. Appl. Microbiol.*, **87**: 856-866
47. Qi, F., Chen, P. and Caufield, P. W. (1999) Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3880-3887
48. Mota-Meira, M., Lacroix, C., LaPointe, G. and Lavoie, M. C. (1997) Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett.* **410**: 275-279
49. Hillman, J. D., Novak, J., Sagura, E., Gutierrez, J. A., Brooks, T. A., Crowley, P. J., Hess, M., Azizi, A., Leung, K., Cvitkovitch, D. and Bleiweis, A. S. (1998) Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immunity*, **66**: 2743-2749
50. Huot, E., Meghrous, J., Barrena-Gonzalez, C. and Petitdemange, H. (1996) Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46: isolation and characterization of the protein and its gene. *Anaerobe*, **2**: 137-145
51. Pridmore, D., Rekhif, N., Pittet, A.-C., Suri, B. and Mollet, B. (1996) Variacin, a new lanthionine-containing bacteriocin produced by *Micrococcus varians*: comparison to lacticin 481 of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1799-1802
52. Hynes, W. L., Ferretti, J. J. and Tagg, J. R. (1993) Cloning of the gene encoding streptococcin A-FF22, a novel antibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*, and determination of its nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1969-1971
53. Hynes, W. L., Friend, V. L. and Ferretti, J. J. (1994) Duplication of the lantibiotic structural gene in M-type 49 group A *Streptococcus* strains producing streptococcin A-M49. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 4207-4209
54. Woodruff, W. A., Novak, J. and Caufield, P. W. (1998) Sequence analysis of *mutA* and *mutM* genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene*,

55. Kalmokoff, M. L., Lu, D., Whitford, M. F. and Teather, R. M. (1999) Evidence for production of a new lantibiotic (Butyrivibriocin OR79A) by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* OR79A: characterization of the structural gene encoding butyrivibriocin OR79A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2128-2135
56. Ross, K. F., Ronson, C. W. and Tagg, J. R. (1993) Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *sala* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2014-2021
57. Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I. F. (1992) Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1417-1422
58. Paik, S. H., Chakicherla, A. and Hansen, J. N. (1998) Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* **273**: 23134-23142
59. Turner, D. L., Brennan, L., Meyer, H. E., Lohaus, C., Siethoff, C., Costa, H. S., Gonzalez, B., Santos, H. and Suarez, J. E. (1999) Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic. *Eur. J. Biochem.*, **264**: 833-839
60. Gilmore, M. S., Segarra, R. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R. and Clewell, D. B. (1994) Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.*, **176**: 7335-7344
61. Dougherty, B. A., Hill, C., Weidman, J. F., Richardson, D. R., Venter, J. C. and Ross, R. P. (1998) Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol. Microbiol.*, **29**: 1029-1038
62. Navaratna, M. A., Sahl, H.-G. and Tagg, J. R. (1998) Two-component anti-*Staphylococcus aureus*

- lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4803-4808
63. Fredenhagen, A., Märki, F., Fendrich, G., Märki, W., Gruner, J., van Oostrum, J., Raschdorf, F. and Peter, H. H. (1991) Duramycin B and C, two new lanthionine-containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>, and structural revision of duramycin and cynamycin. In "Nisin and novel lantibiotics", eds. Jung, G., and Sahl, H.-G., ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, pp. 131-140
64. Wakamiya, T., Ueki, Y., Shiba, T., Kido, Y. and Motoki, Y. (1985) The structure of ancovenin, a new peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme. *Tetrahedron Lett.*, **26**: 665-668
65. Kogler, H., Bauch, M., Fehlhaber, H.-W., Griesinger, C., Schubert, W. and Teetz, V. (1991) NMR-spectroscopic investigations on mersacidin. In "Nisin and novel lantibiotics", eds. Jung, G., and Sahl, H.-G., ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, pp. 159-170
66. Zimmermann, N., Metzger, J. W. and Jung, G. (1995) The tetracyclic lantibiotic actagardine. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR assignments and revised primary structure. *Eur. J. Biochem.*, **228**: 786-797
67. Vertesy, L., Aretz, W., Bonnefoy, A., Ehlers, E., Kurz, M., Markus, A., Schiell, M., Vogel, M., Wink, J. and Kogler, H. (1999) Ala(0)-actagardine, a new lantibiotic from cultures of *Actinoplanes liguriae* ATCC 31048. *J. Antibiot.*, **52**: 730-741
68. Van de Ven, F. J. M. and Jung, G (1996) Structures of lantibiotics studied by NMR. *Antonie Leeuwenhoek*, **69**: 99-107
69. Van den Hooven, H. W., Lagerwerf, F. M., Heerma, W., Haverkamp, J., Piard, J.-C., Hilbers, C. W., Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and Rollema, H. S. (1996) The structure of the lantibiotic lactacin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. *FEBS Lett.*, **391**: 317-322

70. Hosoda, K., Ohya, M., Kohno, T., Maeda, T., Endo, S. and Wakamatsu, K. (1996) Structure determination of an immunopotentiator peptide, cinnamycin, complexed with lysophosphatidylethanolamine by  $^1\text{H-NMR}$ . *J. Biochem.*, **119**: 226-230
71. Prasch, T., Naumann, T., Markert, R. L., Sattler, M., Schubert, W., Schaal, S., Bauch, M., Kogler, H. and Griesinger, C. (1997) Constitution and solution conformation of the antibiotic mersacidin determined by NMR and molecular dynamics. *Eur. J. Biochem.*, **244**: 501-512
72. Zimmermann N. and Jung G. (1997) The three-dimensional solution structure of the lantibiotic murein-biosynthesis-inhibitor actagardine determined by NMR. *Eur. J. Biochem.*, **246**: 809-819
73. Naruse, N., Tenmyo, O., Tomita, K., Konishi, M., Miyaki, T., Kawaguchi, H., Fukase, K., Wakamiya, T. and Shiba, T. (1989) Lanthiopeptin, a new peptide antibiotic: production, isolation and properties of lanthiopeptin. *J. Antibiot.*, **42**: 837-845
74. Brötz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P. E. and Sahl, H.-G. (1997) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur. J. Biochem.*, **246**: 193-199
75. Liu, W. and Hansen, J. N. (1990) Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2551-2558
76. Abee, T. (1995) Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organism. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**: 1-10
77. Moll, G. N., Roberts, G. C. K., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. (1996) Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antonie Leeuwenhoek*, **69**: 185-191
78. Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P. Sahl, H.-G. and de Kruijff, B. (1999) Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*,

79. Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G. and Sahl, H.-G. (1998) Role of lipid-bound peptideglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.*, **30**: 317-327
80. Siezen, R. J., Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. (1996) Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie Leeuwenhoek*, **69**: 171-184
81. Meyer, C., Bierbaum, G., Heidrich, C., Reis, M., Süling, J., Iglesias-Wind, M. I., Kempter, C., Molitor, E. and Sahl, H.-G. (1995) Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC. *Eur. J. Biochem.*, **233**: 478-489
82. Karakas, A., Narbad, A., Horn, N., Dodd, H. M., Parr, A. J., Colquhoun, I. and Gasson, M. J. (1999) Post-translational modification of nisin. *Eur. J. Biochem.*, **261**: 524-532
83. Peschel, A., Ottenwälder, B. and Götz, F. (1996) Inducible production and cellular location of the epidermin biosynthetic enzyme EpiB using an improved staphylococcal expression system. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**: 279-284
84. Rince, A., Dufour, A, Le Pogam, S., Thuault, D., Bourgeois, C. M. and Le Penec, J. P. (1994) Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of lactococcin DR, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1652-1657
85. Kimura, H., Nagano, R., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (1997) A bacteriocin of strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from *Nukadoko*, bed of fermented rice bran. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**: 1049-1051
86. Herawati, E. and Ishizaki, A. (1997) Optimization of the culture medium for growth and the kinetics of lactate fermentation by *Pediococcus* sp. ISK-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**: 604-608

87. Mizuno, K., Fukuda, D., Kakihara, Kohno, M., Ha, T. L., M., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000) Purification and gene cloning of catalase from *Staphylococcus warneri* ISK-1. *Food Sci. Technol. Res.*, **6**: 324-329
88. 武瀬恵美 (1999) むか床から分離した新規抗菌物質生産菌 ISK-1 の分子遺伝学的同定 : 修士論文
89. Kimura, H., Matsusaki, H., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (1998) Purification and partial identification of bacteriocin ISK-1, a new lantibiotic produced by *Pediococcus* sp. ISK-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 2341-2345
90. 木村宏和 (1999) *Pediococcus* sp. ISK-1 が生産する新規抗菌ペプチドに関する研究 : 博士論文
91. Sashihara, T., Kimura, H., Higuchi, T., Adachi, A., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000) A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: Cloning of the structural gene and elucidation of the structure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**: 2420-2428
92. Meyer, H. E., Heber, M., Eisermann. B., Korte, H., Metzger, J. W. and Jung, G. (1994) Sequence analysis of lantibiotics: chemical derivatization procedures allow a fast access to complete Edman degradation. *Anal. Biochem.*, **223**: 185-190