

## Studies on a new antimicrobial mechanism of lacticin Q

李, 夢琦

<https://hdl.handle.net/2324/1398436>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏名・(本籍・国籍)	リ 李	ム 夢	キ 琦 (中 国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)		
学 位 記 番 号	生資環博甲第733号		
学位授与の日付	平成25年9月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生物資源環境科学府 生物産業創成専攻		
学 位 論 文 題 目	Studies on a new antimicrobial mechanism of lacticin Q (ラクティシンQの新たな作用機構に関する研究)		
論 文 調 査 委 員	(主 査) 教 授 園 元 謙 二 (副 査) 教 授 宮 本 敬 久 准教授 中 山 二 郎		

## 論 文 内 容 の 要 旨

Bacteriocins are ribosomally synthesized bacterial antimicrobial peptides or proteins. Bacteriocins produced by gram-positive bacteria are of particular interest due to the industrial use of some strains that belong to lactic acid bacteria (LAB). Nisin A is the most extensively studied LAB bacteriocin, and applied as a food preservative so far. However, the low stability at neutral and alkaline pH conditions limits the range of usage of nisin A. This circumstance gives rise to the need for novel bacteriocins superior to nisin A. A novel LAB bacteriocin, lacticin Q has a wide activity spectrum against gram-positive bacteria. In addition, lacticin Q is highly stable under a wide range of pH and heat treatment. It is expected to be utilized in various areas such as a safe food preservative as nisin A.

The antimicrobial mechanism model of lacticin Q was designated as the huge toroidal pore (HTPs) model. However, the intensity of the activity of lacticin Q against gram-positive bacteria is varied by species, and in some cases, even by strains. Although this selective antimicrobial activity phenomenon is also observed in most of bacteriocins, the reasons still remain unknown. For the practical use of lacticin Q, the mechanism of the selective antimicrobial activity is necessary to be clarified. Since bacteriocins do not always show antimicrobial activity on a single mechanism, new antimicrobial mechanisms would involve in the selective antimicrobial activity other than the HTPs formation. Therefore, the selective antimicrobial activity and a new antimicrobial mechanism were investigated in this thesis.

First, some possible influence factors were investigated for the selective antimicrobial activity of lacticin Q *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, significant relationship was not observed between membrane lipid compositions and the pore formation by lacticin Q. *In vivo*, no direct relationship was also identified between the pore formation and survival ability of indicator strains suffered by lacticin Q. These results implied that the selective antimicrobial activity of lacticin Q depends not only on the membrane lipid compositions, but also on characteristics of the indicator strains against pore formation induced by lacticin Q.

Recently, considerable interest has focused on the accumulation of reactive oxygen species (ROSs), which play an important role in bactericidal antibiotic-induced bacterial cell death. So, it was investigated whether the accumulation of deleterious hydroxyl radicals (a kind of ROSs) is induced by lacticin Q as a contributing factor to cell death. When the minimum bactericidal concentrations (MBCs) of lacticin Q were added to the indicator cultures, hydroxyl radical accumulations were detected in all the indicator strains

tested. The rescue of indicator strains by radical scavengers, and accumulation of hydrogen peroxide in the indicator cultures further suggested that lacticin Q exerts activity involving accumulation of hydroxyl radical by the Fenton reaction. The different patterns of accumulation of hydroxyl radical by the minimum inhibitory concentrations (MICs) of lacticin Q suggested that hydroxyl radical accumulation depends on the potentials of indicator strains to scavenge the deleterious hydroxyl radicals. Consequently, these results suggest that the final antimicrobial mechanism of lacticin Q is the accumulation of hydroxyl radicals, which varies by strains, resulting in the selective antimicrobial activity.

It was further investigated whether other LAB bacteriocins share the antimicrobial activity mechanism involving hydroxyl radical accumulation as lacticin Q. Nisin A, enterocin W and leucocyclicin Q were also found to accumulate hydroxyl radical even though they have different structures and patterns of pore formation activity on bacterial membrane.

In this thesis, a new antimicrobial activity mechanism of lacticin Q involving the accumulation of hydroxyl radicals was identified, which is shared with at least 3 kinds of other LAB bacteriocins. These findings would provide a helpful reference for other LAB bacteriocins and have significant implications for the practical use of lacticin Q and other LAB bacteriocins.

## 論文審査の結果の要旨

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、食品保存をはじめとする様々な用途への利用が期待されている。最も代表的なバクテリオシンであるナイシン A は強力な抗菌活性と広い抗菌スペクトルを有し、食品保存料として実用化されているが、中性域での低い安定性などの欠点もあり、ナイシン A に続くバクテリオシンが探索されている。新奇乳酸菌バクテリオシン、ラクティシン Q (LnqQ) はナイシン A に匹敵する強い抗菌活性と広い抗菌スペクトルを持ち、かつ中性域での高い安定性を有した有力なバクテリオシンである。LnqQ は標的細菌の細胞膜に孔を形成することで抗菌活性を示すが、その活性は標的細菌によって大きな差が認められる。本研究は、LnqQ に選択的抗菌活性をもたらす新規な作用機構について解析を行ったものである。

LnqQ の選択的抗菌活性に影響を与える要因として、まず、標的細菌の細胞膜および孔形成に着目している。種々のグラム陽性細菌から抽出した脂質を用いてリポソームを調製し、LnqQ の孔形成能を検討した結果、LnqQ による各細菌に対する抗菌活性と孔形成には相関が認められなかった。また、細菌からの ATP 流出と抗菌活性を示す LnqQ 濃度についても一定の傾向を見出し得なかった。

殺菌的抗生物質の作用機構への関与が報告されているヒドロキシルラジカルの蓄積について、LnqQ の作用機構への関与を解析している。種々のグラム陽性細菌に、LnqQ を最小殺菌濃度あるいは最小生育阻止濃度となるように添加したところ、ヒドロキシルラジカルの顕著な蓄積を認めている。その蓄積量は、標的細菌にかかわらず、最小殺菌濃度あるいは最小生育阻止濃度においてそれぞれ同程度であることを見出している。また、ラジカル消去剤を添加した場合は、LnqQ によるヒドロキシルラジカルの蓄積が軽減され、最小殺菌濃度の上昇を認めている。以上より、LnqQ の添加によって生じるヒドロキシルラジカルの蓄積が LnqQ の新規な作用機構と推定している。また、標的細菌におけるヒドロキシルラジカルおよびその前駆体の除去能の違いによって、選択的抗菌活性が生じていると推察している。さらに、構造や孔形成能の異なるナイシン A などの他の乳酸菌バクテリオシンについて、ヒドロキシルラジカルの蓄積が抗菌活性に関与し

ていることも明らかにしている。

以上要するに、本研究は、LnqQ および種々の乳酸菌バクテリオシンの抗菌作用について、新たな作用機構の関与を見出したものであり、応用微生物学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位に値すると認める。