

## Study on the biosynthetic mechanism and the mode of action of a circular bacteriocin, leucocyclicin Q

慕, 福芹

<https://hdl.handle.net/2324/1398438>

---

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) | ム<br>慕  | フ<br>福  | キン<br>芹 (中 国) |
| 学位の種類      | 博士(農学)  |         |               |
| 学位記番号      | 生資環博甲第735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     | Study on the biosynthetic mechanism and the mode of action of a circular bacteriocin, leucocyclicin Q (環状バクテリオシン, ロイコサイクリンQの生合成機構と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   | 竹 川 薫   | 准教授 中 山 二 郎   |

## 論 文 内 容 の 要 旨

Leucocyclicin Q (LcyQ), a circular bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401, is active against a unique range of Gram-positive bacteria. LcyQ shares a remarkable sequence identity with lactocyclicin Q (LycQ), a circular bacteriocin from *Lactococcus* sp. strain QU 12. Although circular bacteriocins constitute one of the most attractive groups of inhibitors described to date, their biosynthetic mechanism is still little known. Therefore, the aim of this study is to clarify the biosynthetic mechanisms and the mode of action of LcyQ.

Sequence analysis and database search of the regions flanking the LcyQ structural gene *lcyQ* revealed four open reading frames (*lcyR*, *lcyB*, *lcyC*, and *lcyD*) related to bacteriocin biosynthesis. LcyR shares 43% identity to a TetR family transcriptional regulator, LcyB shows 32% identity to an acyltransferase, and LcyC shows 37% identity to an ATP-binding protein. LcyD shares some similarity to the DUF95 superfamily proteins, often found in the biosynthetic gene clusters of circular bacteriocins. The *lcyD* knockout mutant accumulates active mature LcyQ inside the cells. Heterologous expression of *lcyC* and *lcyD* demonstrated that they confer robust immunity (self-protection) against LcyQ. Peptide release/binding assay revealed that the immunity is attributed to the release of LcyQ to the cell exterior. Thus, the DUF95 superfamily protein, LcyD, has a dual function in the biosynthesis of LcyQ, as an immunity-associated transporter and as a secretion-aiding agent. Accumulation of mature LcyQ inside the cells in the *lcyD* knockout mutant further implied that cyclization of LcyQ occurs within the cell.

The immunity mechanism was further verified by the FITC-LcyQ interaction assay. The results indicated that the main immunity mechanism of LcyQ is conferred by the transporter systems employing immunity protein LcyC and LcyD. Furthermore, carbohydrate fermentation assay showed that immunity proteins LcyC and LcyD might interact with maltose ABC transporters or some proteins that can inhibit the function of maltose ABC transporters.

The mode of action of LcyQ was characterized both *in vitro* and *in vivo*. Calcein leakage and translocation assay verified that LcyQ can bind cell membrane rapidly and significantly, make pores and induce the release of cell solutes such as ATP to the outside, leading the cell death. Calcein leakage assay also showed that the different mode of action between LcyQ and LycQ. The further prediction of second structures indicated that their helix 1 and helix 2 are important for the different modes of action of LcyQ and LycQ. In addition, linear LcyQ-C-His did not show any antimicrobial activity, which indicated that the circular structure is important in the mode of action of LcyQ.

The main immunity mechanism, the important role of a DUF95 superfamily protein in the biosynthesis,

and the mode of action of LcyQ were clarified in this thesis. These will provide a platform for the further understanding the bioengineering of circular bacteriocins, which might have exciting applications in future.

## 論文審査の結果の要旨

ロイコサイクリシン Q (LcyQ) は、高菜漬けから分離された乳酸菌、*Leuconostoc mesenteroides* TK41401 が生産する環状バクテリオシンで、グラム陽性細菌に対して抗菌活性を示す。数種の環状バクテリオシンがこれまでに報告されているが、環化、分泌、自己耐性などの生合成機構、および作用機構の詳細は不明である。本研究は、LcyQ 生合成遺伝子群とその機能の解析、および LcyQ の作用機構の解析を行ったものである。

LcyQ 構造遺伝子近傍に、4 つの ORF (*lcyR*, *lcyB*, *lcyC*, *lcyD*) を見出している。LcyR は TetR ファミリーの転写制御因子と 43%、LcyB は acyltransferase 3 と 32%、LcyC は ATP 結合タンパク質と 37% の相同性を有していた。一方、LcyD は、環状バクテリオシンの生合成遺伝子群に多く見出される DUF95 スーパーファミリーに属するタンパク質と高い相同性を示した。*lcyD* 破壊株が、リーダー配列が切断され環化した成熟型の LcyQ を菌体内に蓄積していることを確認している。また、*lcyC* と *lcyD* の異種発現株は LcyQ に対して耐性を示した。耐性能について、蛍光標識した LcyQ を用いて詳細な解析を行った。その結果、この耐性能は、菌体に吸着して作用する LcyQ を LcyC および LcyD がエネルギー依存的に排出することによってもたらされると推定している。以上より、LcyD が LcyQ の菌体外分泌と、菌体外より菌体に吸着する LcyQ の排出による自己耐性の 2 つの機能を有することを見出している。また、*lcyD* 破壊株において成熟型 LcyQ が菌体内に蓄積していたことから、LcyQ は菌体内で環化されると推定している。

LcyQ が細菌細胞膜を模したリポソームに封入した蛍光物質を流出させ、さらに細菌から ATP などの細胞内容物を流出させたことから、LcyQ が細胞膜への孔形成によって抗菌活性を示すことを見出している。また、直鎖状の LcyQ が抗菌活性を示さなかったことから、環状構造が LcyQ の抗菌作用に重要であることを明らかにしている。

以上要するに、本研究は、環状バクテリオシンである LcyQ とその生合成に関わるタンパク質について、生合成機構および作用機構に関する新規な知見を見出したものであり、分子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。