

Studies on secretory mechanism of EnkT, a bacteriocin ABC transporter of *Enterococcus faecium* NKR-5-3

須志田, 浩稔

<https://hdl.handle.net/2324/1931974>

出版情報：九州大学, 2017, 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 : 須志田 浩稔

論文題名 : Studies on secretory mechanism of EnkT, a bacteriocin ABC transporter of *Enterococcus faecium* NKR-5-3
(*Enterococcus faecium* NKR-5-3 が有するバクテリオシン ABC トランスポーター EnkT の分子機構に関する研究)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

Enterococcus faecium NKR-5-3 は、構造の異なる 5 種のバクテリオシン (抗菌ペプチド) enterocin NKR-5-3A, B, C, D, Z (Ent53A, B, C, D, Z) を生産する多成分バクテリオシン生産乳酸菌である。このうち Ent53A, C, D, Z は、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター EnkT により菌体外へ分泌される。4 種ものバクテリオシンを同時に分泌可能なトランスポーターの報告例はなく、分子機構に関する知見は皆無である。そこで本研究では、EnkT によるバクテリオシン分泌機構の解明を目的とした。

一般に、バクテリオシンは N 末端にリーダーペプチド (LP) を有する前駆体として合成され、LP はトランスポーターによる認識部位と考えられている。そこで、LP の重要性の評価に向け、Ent53C を解析モデルとし、Ent53C リーダーペプチド (Lc) 変異株ライブラリを構築した。EnkT と Lc 変異型 Ent53C、および Ent53C 自己耐性タンパク質 EnkIc の共発現株を構築し、各変異が Ent53C 分泌量に与える影響を調査した。その結果、Lc 中の保存配列への変異、および他のバクテリオシンの LP との置換を行った全ての株において Ent53C による抗菌活性、すなわち Ent53C の分泌が観察された。また、Lc の C 末端領域に位置する切断部位に変異を導入した G2A 株では Ent53C の分泌量が 4 倍に増加した。また、Lc 中の推定 α -ヘリックス領域長と Ent53C 分泌量との相関が示唆された。

続いて、異なる活性型ペプチド (コアペプチド、CP) に対する EnkT の分泌能を調査した。ここでは、NKR-5-3 株が本来生産しないバクテリオシンである enterocin A (EntA)、lactococcin Q (LaqQ)、pediocin PA-1 (PedA)、lactococcin A (LcnA)、lacticin Q (LnqQ) を CP のモデルとして用いた。EnkT と各バクテリオシン、およびその自己耐性タンパク質の共発現株を構築し、抗菌活性試験を行ったところ、LnqQ を除く 4 種の分泌が確認された。次に、各バクテリオシン固有の LP を Lc、および Lc 変異株ライブラリにおいて Ent53C 分泌量が増加した変異型 Lc に置換し、各 CP 分泌量への影響を評価した。その結果、Lc 置換により EntA、PedA、LcnA の分泌量はそれぞれ 32 倍、2 倍、4 倍に増加した。また、変異型 Lc 株の分泌量は全て非変異型 Lc 株以下となった。一方、LnqQ は全ての株で分泌が確認されなかったため、Lc 領域の伸長による分泌能の改善を検討した。EnkT が分泌可能な CP の N 末端領域におけるアミノ酸存在バイアスの推定と Ent53C 前駆体の立体構造予測から、Lc と LnqQ の接続領域に対し、LP の切断に関与すると推測された 3 種の配列 (ATY, KY, K) を挿入した株を構築し、EnkT による分泌試験を行った。しかしながら、いずれの株でも LnqQ の分泌が検出されなかったことから、EnkT は本来リーダーペプチドを伴わずに分泌される LnqQ を基質として認識できないものと判断した。

トランスポーターによるバクテリオシン前駆体のプロセッシングは、前駆体の認識、LP の切断、CP の分泌という 3 つの機構を含むと予想される。上述の *in vivo* における評価系では、Lc 変異に

よる Ent53C 分泌量変化がいずれの機構に対する影響に起因するかの判断が困難である。そこで、プロセッシング経路中で LP 切断に関与する EnkT の N 末端側のペプチダーゼドメイン (PD) に着目した。PD は LP との結合領域としても機能すると推測され、EnkT の基質寛容性への寄与が予想される。そこで、PD と Lc 変異型 Ent53C 前駆体を用いたタンパク質相互作用解析による、*in vitro* での LP の重要性の評価を試みた。大腸菌での発現後、Ent53C 前駆体は精製が困難であったが、Glutathione S-transferase (GST) タグを用いて粗精製を行った GST-PD は *in vitro* での酵素活性が確認された。

以上の結果から、EnkT は LP のアミノ酸配列とその残基数に対し、非常に高い寛容性を有することが明らかとなった。また、EnkT は本来分泌する Ent53A, C, D, Z に加え、異種バクテリオシンである EntA, LaqQ, PedA, LcnA の分泌が可能であったことから、EnkT は CP 領域に対しても極めて高い寛容性を有することが示された。このように、高い寛容性により、EnkT はある種のバクテリオシン (リーダー配列を伴うクラス II バクテリオシン) および類似のペプチドを広く分泌可能と考えられた。