

研究課題：乳酸菌由来の二成分性抗菌ペプチドにおける GxxxG motif の役割に関する研究

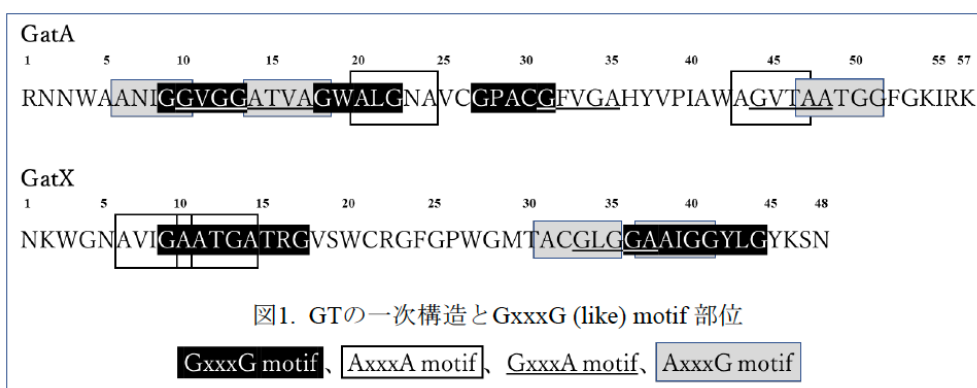
背景・目的

バクテリオシンとは細菌によりリボソームを介して合成される抗菌性のペプチドまたはタンパク質の総称で、乳酸菌由来のバクテリオシンは長年の食経験と熱・pH 安定性に優れ、食品保存剤や抗生物質の代替品としての利用が期待されている。

当研究室では、ヒト腸管由来の乳酸菌 *Lactobacillus paragasseri* (ガセリ菌) から、高い耐熱性、pH 安定性を有し、乳酸菌やグラム陽性食中毒原因菌に対して高い抗菌性を示す二成分性バクテリオシン・ガセリシン T (GT : GatA および GatX) を見出した。

また近年、細胞膜中におけるタンパク質・ペプチド複合体形成は、GxxxG motif (G: Glycine, x: 任意アミノ酸残基) をはじめとする GxxxG like motif {AxxxA, GxxxA, および AxxxG (A: Alanine)} を介することが報告されており、二成分性 GT の GatA および GatX 上にも GxxxG motif が複数

存在している (図 1)。そこで本研究では、各 motif 部位の破壊とその高次構造予測から、活性呈示に必須となる



motif 部位を解明し、GT の相互作用における各 motif の重要性について検証した。

GxxxG motif 改変 GT の抗菌活性試験

GT の活性本体である GatA に 3 箇所、単独では活性が無い GatX に 4 箇所存在する各 GxxxG motif の G 残基について単独または両方を L (Leucine) 残基に置換し、抗菌活性値とその変動について比較検討を行った。

pIL253-P₃₂ に *gatAX* を導入した発現ベクター (pGT-AX) を鋳型とした Transforming PCR により各アミノ酸の変異を導入し、中間宿主 *Lactococcus cremoris* MG1363 へ形質転換した。次いで *Lb. paragasseri* LA158 Δ *gatAX* への形質転換により各 GxxxG motif 改変株を作製し、取得した MRS 培地培養上清中の各指標菌に対する抗菌活性値を寒天拡散法により測定した。

その結果、指標菌 *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002^T pSYE2 に対する全 GatA 改変 GT の抗菌活性値は、GT (*Lb. paragasseri* LA158 Δ *gatAX* pGT-AX, 1,969 AU/mL) と比較して大幅な活性低下が認められた。また、GatX 改変 GT では、N 末端側の連続した GxxxG motif の改変により顕著な活性低下が確認され、C 末端側の連続した GxxxG motif 改変体とは抗菌活性値の減少率に差違が認められた。

AxxxA motif 改変 GT の抗菌活性試験

GatA に 2 箇所、GatX に 2 箇所存在する各 AxxxA motif の A 残基について L 残基単独改変体を作成（計 7 株：GatA 改変株 4 株、GatX 改変株 3 株）し、抗菌活性値を測定した結果、指標菌 JCM 1002^T pSYE2 に対する全 GatA 改変 GT の抗菌活性値は、GatA A43L 改変株を除いて GT と比較して大幅な活性低下が認められ、GatA は N 末端側の AxxxA motif で重要度が高く、C 末端側は低いことが考えられた。また、GatX 改変 GT では、全改変株で抗菌活性値が低下し、GatX 上の全ての AxxxA motif が活性呈示に重要であると考えられた。

GxxxA motif 改変 GT の抗菌活性試験

GatA に 4 箇所、GatX に 1 箇所存在する各 GxxxA motif の G および A 残基について L 残基単独改変体を作成（計 10 株：GatA 改変株 8 株、GatX 改変株 2 株）し、抗菌活性値を測定した結果、指標菌 JCM 1002^T pSYE2 に対する全 GatA 改変 GT の抗菌活性値は、GT と比較して大幅な活性低下が認められた。また、GatX 改変 GT では、全改変株で抗菌活性値が低下し、GatX 上の全ての GxxxA motif が活性呈示に重要であると考えられた。

AxxxG motif 改変 GT の抗菌活性試験

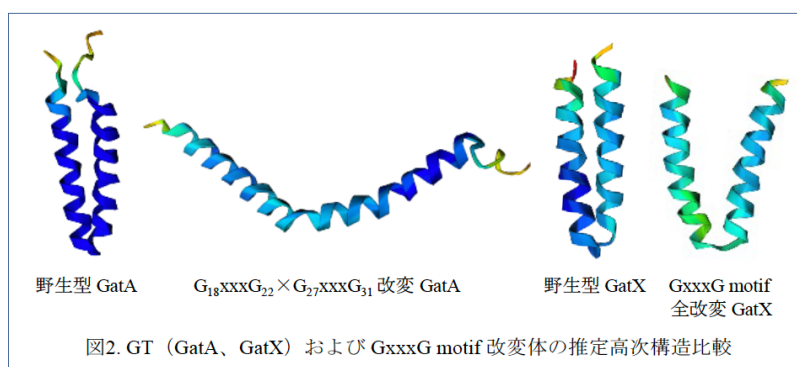
GatA に 4 箇所、GatX に 2 箇所存在する各 AxxxG motif の A および G 残基について L 残基単独改変体を作成（計 10 株：GatA 改変株 6 株、GatX 改変株 4 株）し、抗菌活性値を測定した結果、指標菌 JCM 1002^T pSYE2 に対する全 GatA 改変 GT の抗菌活性値は大幅な低下が認められ、GatA は N 末端側と比較して、C 末端側の AxxxG motif で重要度が高いと考えられた。また、GatX 改変 GT では、全改変株で抗菌活性値が低下し、GatX 上の全ての AxxxG motif が活性呈示に重要であると考えられた。

GxxxG motif 改変 GT の高次構造予測

高次構造予測ソフト（AlphaFold 2）を用いて、GT および作出した改変 GT の高次構造を予測した。その結果、作出した全 GT 改変株において、GatA および GatX とともに V 字構造を形成しており、野生型 GT との大きな構造変化は見られなかった。また、motif 同時破壊 GT の高次構造について、GatA では、

G₁₈XXXG₂₂ × G₂₇XXXG₃₁ の GxxxG motif 同時改変体において V 字構造が維持されず、「く」の字状構造になると推定され、GatA 上の motif が GatX との相互作用だけでなく V 字構造の維持にも関与していることが示唆

された。なお、GatX については全 GxxxG motif を消失しても V 字構造が維持される傾向であり、他の GxxxG like motif の関与が推定された（図 2）。



最後に、本研究を遂行するにあたり、ご支援賜りました一般財団法人杉山産業化学研究所に厚く御礼申し上げます。