

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07357

研究課題名(和文)大腸菌のスペルミジン異化経路の解明～バイオフィルム制御とポリアミン生産に向けて

研究課題名(英文)Studies on catabolic pathway of spermidine in E. coli

研究代表者

鈴木 秀之 (SUZUKI, Hideyuki)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：10202136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌のノックアウトライブラリーを高濃度のスペルミジンを添加したM9-0.5%グルコース培地で培養し、菌体外のアセチルスペルミジン濃度が減少した14株を選抜した。しかし、アセチルスペルミジン排出にクリティカルなトランスポーターは見出せなかった。その過程で、プトレッシンを菌体外に排出する新規トランスポーターSapBCDFを見出した。

高濃度のスペルミジンを添加し、かつプトレッシンを含まない最少培地で培養したプトレッシンの生合成と異化経路を欠失させた菌体ならびにその培養上澄からプトレッシンを検出できなかったことから、少なくとも本研究条件下ではスペルミジンオキシダーゼ見出せなかった。

研究成果の概要(英文)：The E. coli knockout library was cultured in M9-0.5% glucose medium supplemented with high concentrations of spermidine and 14 strains with decreased acetylspermidine concentration outside the cells were found. However, transporters critical to acetylspermidine efflux could not be found. During this study, a novel transporter SapBCDF which releases putrescine was found.

E. coli deficient in the biosynthetic and catabolic pathways of putrescine was cultured in minimal medium containing high concentration of spermidine but not containing putrescine. Since putrescine was not detected from the culture supernatant nor from the cells, spermidine oxidase was not found under the condition used.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリアミン スペルミジン アセチルスペルミジン

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは、アミノ基を複数持つ脂肪族炭化水素で、転写や翻訳段階の調節に関与し、細胞増殖に重要な役割を演じている。真核生物の翻訳開始因子 5A (eIF5A)の前駆体は、その特定のリジン残基がスペルミジンをういたハイプシン化により活性化される必要があるため、真核生物にとってポリアミンは増殖に必須である(Park, J. Biochem. 139:161-169, 2006)。大腸菌は、ポリアミン生合成系を完全に失っても、ポリアミンを含まない培地で増殖できるが、増殖速度は極端に遅くなる(Chattopadhyay ら, J. Bacteriol. 191: 5549-5552, 2009)。さらに、腸内細菌の合成するポリアミンの濃度を適度に高く維持することが健康寿命に重要であり(Matsumoto ら, PLoS ONE 6: e23652, 2011)、加齢によって低下する腸管内のポリアミンの濃度を維持する技術の開発に成功していた(Kibe ら, Sci. Rep. 4: 4548, 2014)。病原性細菌には、バイオフィルムを形成することにより抗生物質や生体の免疫機構から免れ、難治性感染症を引き起こすものがある。代表者は、スペルミジンが大腸菌のバイオフィルム形成に必須であることを明確に示すことに成功していた(投稿準備中)。これとは逆にバイオフィルムの有効利用として、メンブレンの表面にバイオフィルムを形成させることにより、バイオリクターを作る試みも行われている。さらに、プトレッシンやカダペリンは、ナイロンの合成中間体となるため、大腸菌に生産させたこれらのポリアミンをバイオオリエンティッドな化成品合成中間体として利用しようとする試みも行われている(Qian ら, Biotechnol. Bioeng. 104:651-662, 2009; 108:93-103, 2011)。また、植物から抽出した高ポリアミン含有物は、機能性食品原料や化粧品素材としての実用化が始まっている。菌体内のポリアミン濃度は、生合成、分解、菌体外からの取り込みと排出の各段階で厳密に調節されている。バイオフィルム形成を抑制したり、促進したり、あるいはポリアミンを細菌に生産させる場合に重要なことは、細菌のポリアミン代謝経路とその調節メカニズムを理解することである。代表者らは、2005年にそれまで知られていなかったプトレッシンの異化経路を大腸菌で発見して以来(Kurihara, J. Biol. Chem. 283: 19981-19990, 2008)、ポリアミンの代謝経路の解明を行ってきた。プトレッシンを生合成できない大腸菌の変異株も、菌体外から取り込んだプトレッシンからスペルミジンを合成するか、あるいは菌体外から直接スペルミジンを取り込む。菌体内でスペルミジン濃度が高くなり過ぎた場合に異化によりスペルミジン濃度を低下させる酵素の一つとして、真核生物にも広く知られているスペルミジンアセチルトランスフェラーゼ(SpeG)を持っており、スペルミジンはアセチルスペルミジンに変換され、スペルミジンとしての生理機能を失う。スペルミジン添加培地で SpeG 欠損株を培養すると無添加培地で培養した場合に比べて高濃度のスペルミジンが菌体内に蓄積するが、野生株では菌体内の

スペルミジン濃度に大きな影響はなく、アセチルスペルミジン蓄積の報告もないことから、何らかの経路でアセチルスペルミジンは代謝されると考えられた。真核生物では、アセチルスペルミジンは細胞外に排出され、ポリアミンオキシダーゼ(真核生物ではスペルミジンとスペルミンを基質とするためこの名称になっている)によりプトレッシンに戻されることが分かっていた。

一方、スペルミジン添加培地で野生株を培養すると菌体外にアセチルスペルミジンを検出したが、どのトランスポーターがアセチルスペルミジンを排出しているか不明であった。

2. 研究の目的

ポリアミンは細胞増殖に重要な役割を演じているため、細胞内のポリアミン濃度は、生合成、分解、菌体外からの取り込みと排出の各段階で厳密に調節されている。本研究は、他のポリアミンに比べて微量で菌の増殖などに影響を及ぼし、バイオフィルム形成に必須であるスペルミジンの大腸菌における異化経路を解明し、菌体内のスペルミジン濃度の調節への関与を解明することにより、バイオフィルム形成の調節やポリアミンの微生物生産法の改良に役立てることを目的としている。これまでにスペルミジンがアセチルスペルミジンになることは知られていたが、その後どうなるかは不明であった。アセチルスペルミジンの形で菌体外に排出される場合は、そのトランスポーターはどれか。大腸菌はアセチルスペルミジンオキシダーゼをもっていて、プトレッシンに変換して再利用するのか、これらを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)大腸菌の遺伝子ノックアウトライブラリーのうち「efflux, export, amine transport, amino acid transport」に関係する遺伝子欠損株 159 株を高濃度のスペルミジンを添加した M9-0.5%グルコース培地で培養し、菌体外のアセチルスペルミジン濃度が、親株に比べて極端に減少する菌株をスクリーニングした。

(2)アセチルスペルミジンオキシダーゼはアセチルスペルミジンをプトレッシンにする。そこで、プトレッシンの生合成に関与する *speA, B, C, F* のすべてを欠失させた株を作成し、このプトレッシン生合成欠損株を高濃度のスペルミジンを添加し、かつプトレッシンを含まない最少培地で培養した。ポリアミンパックカラムを装着した HPLC で菌体と培養上澄中のポリアミン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1)ノックアウトライブラリーの「efflux, export, amine transport, amino acid transport」のキーワードに合致した 159 株について、高濃度のスペルミジンを添加した M9-0.5%グルコース培地で

培養し、菌体外のアセチルスペルミジン濃度(つまり排出された量)が、親株の1/2以下になった14株を選抜した。しかし、アセチルスペルミジンの排出にクリティカルなものは見いだせなかった。本研究の条件下では、野生株では、スペルミジンは菌体内に見られたが、菌体外には検出できなかった。一方、アセチルスペルミジンは菌体内外のいずれにも見いだせた。このことは、スペルミジンは、アセチルスペルミジンになって、菌体外に排出されることを示している。

(2)ノックアウトライブラリーをスクリーニングする過程でSapBCDFがプトレッシンを菌体外に排出するトランスポーターであることを見いだした。

(3)高濃度のスペルミジンを添加し、かつプトレッシンを含まない最少培地で培養したプトレッシン合成に關与する全遺伝子を欠失させた菌体ならびに培養上澄からプトレッシンを検出できなかった。さらに、プトレッシン合成経路に加えて、2つのプトレッシン異化経路の最初の酵素である PatA と PuaA を欠損させた株を作成して同じ実験を行ったが、菌体ならびに培養上澄からプトレッシンを検出できなかった。これらのことは、少なくとも本研究で用いた実験条件下ではスペルミジンオキシダーゼの存在を確認できなかった。

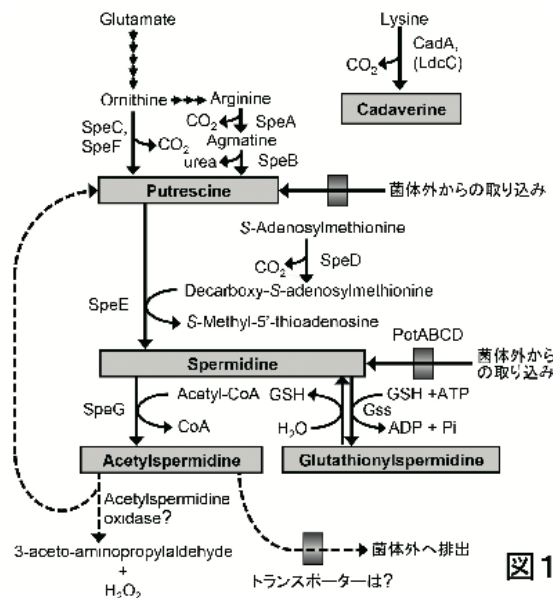


図 1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Y. Sugiyama, A. Nakamura, M. Matsumoto, A. Kanbe, H. Suzuki, M. Sakanaka, K. Higashi, K. Igarashi, T. Katayama, and S. Kurihara. A novel putrescine exporter SapBCDF of *Escherichia coli*. **Journal of Biological**

Chemistry, 291(51), 26343-26351 (2016). 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M116.762450

〔学会発表〕(計 6 件)

松岡利奈、鈴木秀之. 大腸菌を用いたアミノプロピルカダベリンの生産. 日本ポリアミン学会第 7 回年会. (2015)

入江加奈子、鈴木秀之. SpeAB 経路を増強した大腸菌を用いたプトレッシンの生産. 日本ポリアミン学会第 7 回年会. (2015)

入江加奈子、鈴木秀之. 改変大腸菌によるプトレッシンの生産. 2016 年度日本農芸化学会大会.(2016)

杉山友太、中村篤央、松本光晴、神戸亜也香、阪中幹祥、東恭平、五十嵐一衛、片山高嶺、鈴木秀之、栗原新. 大腸菌の新規プトレッシン排出タンパク SapBCDF の同定. 2017 年度日本農芸化学会大会. (2017)

松岡利奈、中村篤央、松本光晴、鈴木秀之. 大腸菌によるアミノプロピルカダベリンの生産. 2017 年度日本農芸化学会大会. (2017)

杉山友太、中村篤央、松本光晴、神戸亜也香、阪中幹祥、東恭平、五十嵐一衛、片山高嶺、鈴木秀之、栗原新. 大腸菌の新規プトレッシンエクスポーター SapBCDF の同定. トランスポーター研究会. (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 秀之 (SUZUKI, Hideyuki)
京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授
研究者番号：10202136

(2) 共同研究者

なし