

令和元年6月1日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18082

研究課題名(和文)細菌における非標準的D-アミノ酸合成酵素の同定及び生理機能の解明

研究課題名(英文) Identification and physiological functions of non-canonical D-amino acid synthetic enzymes in bacteria

研究代表者

宮本 哲也 (Miyamoto, Tetsuya)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：10739238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の細胞壁ペプチドグリカンには通常D-アラニンとD-グルタミン酸が含まれるが、それ以外の様々なD-アミノ酸(非標準的D-アミノ酸)も含まれており、これらはペプチドグリカンのリモデリングやバイオフィルムの形成抑制及び解体に関与していることが明らかとなっている。従って、非標準的D-アミノ酸は細菌の環境適応において重要な役割があるが、これらの生合成経路に関する知見は乏しい。そこで、大腸菌及び枯草菌から非標準的D-アミノ酸を合成する酵素(YgeA, MetC, MalY, RacX)を同定し、機能を解析した。さらに、YgeAは大腸菌の生育やバイオフィルム形成に影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌が合成する多様なD-アミノ酸は、細菌自身に対してだけでなく、ヒトの自然免疫応答や腸内細菌叢を介して腸内環境の正常化にも影響を与えることが明らかとなってきている。従って、本研究を通じて発見された細菌の非標準的D-アミノ酸合成酵素の機能および生理的役割を理解することは、細菌と共生している我々にとって健康の維持や増進に繋がるとともに、D-アミノ酸を利用した病原性細菌に対する感染抑制や薬剤耐性の克服にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The peptidoglycan of the bacterial cell wall typically contains D-alanine and D-glutamate, and also various non-canonical D-amino acids that have been related to peptidoglycan remodeling, inhibition of biofilm formation, and triggering of biofilm disassembly. Although non-canonical D-amino acids play important roles in adaptation to environmental changes, the biosynthetic pathways of non-canonical D-amino acids remain poorly understood. We identified and characterized novel amino acid racemases (YgeA, MetC, MalY, RacX) from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* that produce non-canonical D-amino acids. Additionally, this study suggests that YgeA from *E. coli* is involved in the bacterial growth and biofilm formation.

研究分野：生化学

キーワード：D-アミノ酸 アミノ酸ラセマーゼ シスタチオニン -リアーゼ セリンデヒドラターゼ バイオフィルム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌の細胞壁に含まれるペプチドグリカンには、一般的なペプチドやタンパク質には存在しない D-アミノ酸がその構成成分として含まれている。通常は、D-アラニン (D-Ala) と D-グルタミン酸 (D-Glu) が含まれているが、実際にはその他の様々な D-アミノ酸 (非標準的 D-アミノ酸) も含まれていることが明らかとなっている。これらの非標準的 D-アミノ酸は、ペプチドグリカンのリモデリングを引き起こし、細菌の環境適応に関与していることが示唆されている。さらに、非標準的 D-アミノ酸は、種々の細菌においてバイオフィルムの形成抑制や解体に関与していることが明らかとなっており、この現象も非標準的 D-アミノ酸の取り込みによるペプチドグリカン構造の変化が一因であることが示唆されている。つまり、細菌は D-アミノ酸を変化する環境に対応し、生存するための生理的機能分子として利用していると考えられる。

一方、細菌において D-アミノ酸は、主にアミノ酸ラセマーゼによってそれぞれ対応する L-アミノ酸から生合成される。ペプチドグリカンの構成成分となる D-アミノ酸は、細菌が有するそれぞれのアミノ酸ラセマーゼによって合成されている。しかしながら、非標準的 D-アミノ酸の生合成経路については、ほとんど明らかとなっていない。以前、我々は最少培地で培養した大腸菌細胞内から、ペプチドグリカン構成分子である D-Ala と D-Glu 以外にいくつかの非標準的 D-アミノ酸を見出し、これは非標準的 D-アミノ酸も生合成されていることを意味している。コレラ菌 (*Vibrio cholera*) においては、種々の D-アミノ酸を合成することができる幅広い基質特異性を有するアミノ酸ラセマーゼが同定されている。このアミノ酸ラセマーゼを欠損したコレラ菌では、ペプチドグリカン構造が変化し、浸透圧に対する抵抗性を失うという報告がある。このことから非標準的 D-アミノ酸の導入によるペプチドグリカンのリモデリングが、細菌の環境適応にとって非常に重要であることが伺える。したがって、非標準的 D-アミノ酸の生合成経路を明らかにすることは、細菌の環境適応戦略を解明するための基盤的研究になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌における非標準的 D-アミノ酸の合成酵素およびその生理機能を明らかにすることである。そこで、グラム陰性細菌の大腸菌 (*Escherichia coli*) とグラム陽性細菌の枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を対象とし、具体的には以下について明らかとする。

- (1) 大腸菌および枯草菌における非標準的 D-アミノ酸の生合成経路を網羅的に明らかとするため、D-アミノ酸合成能を有すると推定されたタンパク質を探索し、それらの組換え体を用いて、実際に各種アミノ酸に対する D-アミノ酸合成能を評価する。
- (2) (1) で同定した非標準的 D-アミノ酸合成酵素が生理的にどのような役割を有しているかを検証するため、大腸菌の野生株および該当の合成酵素を欠損させた株を用いて各種表現系を比較し、合成酵素の生理的な影響を検証する。

3. 研究の方法

(1) 非標準的 D-アミノ酸合成能を有する酵素の探索・同定

非標準的 D-アミノ酸の合成酵素を同定するために、大腸菌および枯草菌のゲノムから数種類の推定アミノ酸ラセマーゼ遺伝子および D-アミノ酸合成能を有すると予想された遺伝子を抽出した。これらの遺伝子を大腸菌発現用ベクターにクローニングし、発現用の大腸菌に導入後、タンパク質を高発現させた。高発現させたタンパク質を抽出後、ニッケルカラムを用いて精製を行い、組み換え体を取得した。精製した各酵素と様々な D-または L-アミノ酸とを反応させた後、生成した L-または D-アミノ酸を蛍光誘導体化した。これらを ODS カラムを備えた HPLC を用いて、L 体と D 体に分離・検出することでラセマーゼ活性を測定した。セリン (Ser) デヒドラターゼ活性は、反応生成物であるピルビン酸をヒドラジンをを用いた比色定量法により測定した。さらに、目的の活性が確認された酵素について、詳細な酵素学的機能解析を行なった。

(2) 新規非標準的 D-アミノ酸合成酵素の生理的役割の解明

本研究では、大腸菌の新規アミノ酸ラセマーゼである YgeA に注目して、下記の解析を行なった。

ygeA 遺伝子の発現解析

大腸菌野生株を M9 最少培地で対数増殖期まで培養し、RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて逆転写し、cDNA を得た。この cDNA を用いて、ygeA 遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム PCR により検出した。

ygeA 遺伝子欠損株の表現系の解析

大腸菌野生株および ygeA 遺伝子欠損株を用いて、生育、バイオフィルム形成能、浸透圧耐性に与える影響を比較し、検証した。生育への影響は、M9 最少培地、あるいはこれに D-または L-ホモセリンを添加した培地で培養し、濁度 (OD) を継時的に測定することで調べた。バイオフィルム形成能については、96 ウェルプレートにて大腸菌を培養した後、クリスタルバイオレットを用いて形成されたバイオフィルムを染色することで定量した。浸透圧耐性への影響は、異なる NaCl 濃度で培養した後、固体培地に形成されたコロニーをカウントすることで評価した。

大腸菌細胞内の D-アミノ酸の解析

大腸菌野生株および *ygeA* 遺伝子欠損株を M9 最少培地、あるいはこれに D-ホモセリンを添加した培地で対数増殖期まで培養し、細胞内抽出液を回収した。得られた抽出液に含まれるアミノ酸を蛍光誘導体化し、HPLC を用いて各アミノ酸ごとに L 体と D 体に分離し、定量した。

4. 研究成果

(1) 非標準的 D-アミノ酸合成能を有する酵素の探索・同定

大腸菌および枯草菌を対象に非標準的 D-アミノ酸合成能を有する酵素の探索を行った。以前、我々は各細菌において非標準的 D-アミノ酸合成能を有する YgeA および RacX をそれぞれ見出していた。そこで、これら酵素については詳細な酵素学的機能解析を行った。大腸菌由来の YgeA は、15 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を示し、中でもタンパク質構成アミノ酸ではないホモセリンに対して最も高い活性を示した。また、枯草菌由来の RacX では、16 種類のアミノ酸に対して活性を示し、リジン、アルギニン、オルニチンといった塩基性アミノ酸に対してラセマーゼ活性が高いことが明らかとなった。両酵素における至適 pH、至適温度およびホモ二量体といった高次構造についてはよく似ていた。また、両酵素ともにピリドキサルリン酸 (PLP) に依存しない酵素であることが明らかとなった。両酵素のラセマーゼ活性における動力学定数を解析すると、既知のアミノ酸ラセマーゼと比較して低レベルであることが明らかとなった。細菌において高濃度の D-アミノ酸は、タンパク質合成阻害を引き起こすため、生育などに悪影響を与えることが知られている。そのため、細菌は種々の非標準的 D-アミノ酸の細胞内レベルを低く保っている可能性が考えられた。

また、大腸菌の有する 2 つのシスタチオニンβ-リアーゼ (MetC, MalY) が、様々なアミノ酸に対してラセマーゼ活性を有することを明らかにした。両酵素は Ala に対するラセマーゼ活性が最も高かったが、その他に MetC は 13 種類、MalY は 12 種類のアミノ酸に対してラセマーゼ活性を有することが明らかとなった。MetC の Ala に対する触媒活性は、MalY の活性より約 300 倍高かった。MetC においては、2-アミノ酪酸や Ser に対しても比較的高いラセマーゼ活性を有していたが、両酵素の基質特異性は比較的似ていることが明らかとなった。

シスタチオニンβ-リアーゼは、細菌の L-メチオニン生合成経路においてシスタチオニンをホモシステイン、ピルビン酸およびアンモニアへと分解する反応を触媒する酵素であるが、我々は本酵素がさらに Ser を分解する活性 (デヒドラターゼ活性) を有していることを新たに見出した。MetC は、D-Ser および L-Ser に対して活性を有していたが、MalY は L-Ser に対してのみ微弱な活性を有していた。MetC の L-Ser に対する触媒活性は、D-Ser に対するものと比べて、10 倍以上高かった。スレオニンやホモセリンに対しては、活性を示さなかった。MetC のラセマーゼ活性、Ser デヒドラターゼ活性およびシステインリアーゼ活性における触媒活性を比較すると、3 つの活性はほぼ同程度であることが明らかとなった。したがって、シスタチオニンβ-リアーゼは、異なる 3 つの活性を有する多機能型酵素であり、L-メチオニンの生合成に関わっているだけでなく、種々の D-アミノ酸の生合成や D-Ser および L-Ser 代謝にも関与している可能性が示唆された。

(2) 新規非標準的 D-アミノ酸合成酵素の生理的役割の解明

(1) で同定した酵素のうち、大腸菌の新規アミノ酸ラセマーゼである YgeA の生理的役割を明らかにするために、下記の解析を行なった。なお、YgeA はホモセリンに対して最も高いラセマーゼ活性を有していることが明らかとなったため、各解析において D-または L-ホモセリン存在下における影響についても検証した。

ygeA 遺伝子の発現解析

最少培地で対数増殖期まで培養した大腸菌野生株において、*ygeA* 遺伝子の mRNA が発現していることを確認した。同様に、定常期においても mRNA が発現しているかどうかを確認する必要がある。

ygeA 遺伝子欠損株の表現系の解析

最少培地で培養した大腸菌野生株と *ygeA* 欠損株の間に生育の違いは確認できなかった。D-または L-ホモセリンを含む培地においては、野生株の生育は阻害される傾向があったが、*ygeA* 欠損株においては、L-ホモセリンによる生育阻害がわずかに抑制される傾向が確認された。よって、YgeA はホモセリン存在下では、大腸菌の生育に影響を与える可能性があると考えられた。バイオフィーム形成能について野生株と *ygeA* 欠損株を比較すると、*ygeA* 欠損株ではバイオフィーム形成能が有意に上昇していた。したがって、YgeA はバイオフィーム形成を抑制すると考えられた。また、D-あるいは L-ホモセリンの添加は、バイオフィーム形成に影響を与えないことが確認された。浸透圧に対する抵抗性については、NaCl 非存在下あるいは高濃度の NaCl 存在下のどちらにおいても、野生株と *ygeA* 欠損株の間に有意な差は認められなかった。したがって、YgeA は浸透圧耐性には影響を与えないことが明らかとなった。

大腸菌細胞内の D-アミノ酸の解析

本研究では、YgeA の最も良い基質であるホモセリンに注目して解析を行なった。D-および L-ホモセリンがともに単一のピークとして得られるように HPLC の分析条件を確立し、最少培地で培養した大腸菌野生株から得られた抽出液中のアミノ酸を解析したが、D-および L-ホモセリンは検出されなかった。一方で、D-ホモセリンを添加した培地で培養した大腸菌野生株からは D-ホモセリンが検出された。そこで、*ygeA* 欠損株についてもこの条件で培養し、D-ホモセリ

ン量に変化が認められるかどうかを解析する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Miyamoto T., Katane M., Saitoh Y., Sekine M., Homma H. Elucidation of the D-lysine biosynthetic pathway in the hyperthermophile *Thermotoga maritima*, *FEBS J.*, 査読有, 2019, **286**, 601-614.
DOI: 10.1111/febs.14720

Miyamoto T., Katane M., Saitoh Y., Sekine M., Homma H. Cystathionine β -lyase is involved in D-amino acid metabolism, *Biochem. J.*, 査読有, 2018, **475**, 1397-1410.
DOI: 10.1042/BCJ20180039

宮本哲也, 本間 浩 D-アミノ酸残基を含むペプチドおよびタンパク質:新規精密検出法の開発, *化学と生物*, 査読有, 2018, **56**, 18-25.
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.56.18

Miyamoto T., Homma H. Detection and quantification of D-amino acid residues in peptides and proteins using acid hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, 査読有, 2018, **1866**, 775-782.
DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.12.010

Miyamoto T., Katane, M., Saitoh, Y., Sekine, M., Homma, H. Identification and characterization of novel broad-spectrum amino acid racemases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *Amino Acids*, 査読有, 2017, **49**, 1885-1894.
DOI: 10.1007/s00726-017-2486-2

〔学会発表〕(計 32 件)

宮本哲也, 松浦美帆, 吉田真梨愛, 齋藤康昭, 関根正恵, 片根真澄, 本間 浩 「超好熱菌由来シスタチオニン β -リアーゼの D-アミノ酸代謝能の解析」 日本農芸化学会 2019 年度大会 2019.3.24

宮本哲也, 北本颯希, 高崎理子, 片根真澄, 齋藤康昭, 関根正恵, 本間 浩 「細菌 PBP の非標準的 D-アミノ酸含有ペプチドグリカン代謝能の解析」 日本薬学会第 139 年会 2019.3.23

宮本哲也, 齋藤康昭, 関根正恵, 片根真澄, 本間 浩 「超好熱菌 *Thermotoga maritima* における D-リジン生合成経路」 第 41 回白金シンポジウム 2018.12.18

宮本哲也, 北本颯希, 高崎理子, 齋藤康昭, 関根正恵, 片根真澄, 本間 浩 「細菌 PBP の非標準的 D-アミノ酸含有ペプチドグリカン代謝への関与」 第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.29

宮本哲也, 齋藤康昭, 関根正恵, 片根真澄, 本間 浩 「細菌における多様な D-アミノ酸の生合成経路の解明」 東京薬科大学生命科学部 25 周年記念シンポジウム 2018.10.20

宮本哲也, 丸山玲奈, 齋藤康昭, 関根正恵, 片根真澄, 本間 浩 「超好熱菌 *Thermotoga maritima* における D-リジン合成経路の解明」 第 91 回日本生化学会大会 2018.9.26

宮本哲也 「細菌における多様な D-アミノ酸の生合成」 第 14 回 D-アミノ酸学会学術講演会 2018.9.6 (D-アミノ酸学会 第 7 回奨励賞受賞)

宮本哲也, 丸山玲奈, 齋藤康昭, 関根正恵, 片根真澄, 本間 浩 「超好熱菌 *Thermotoga maritima* における新規 Lys ラセマーゼの同定および機能解析」 第 14 回 D-アミノ酸学会学術講演会 2018.9.5

宮本哲也, 小里拓也, 和田大樹, 片根真澄, 齋藤康昭, 関根正恵, 本間 浩 「細菌における非標準的 D-アミノ酸生合成に関与する酵素の同定」 日本薬学会第 138 年会 2018.3.26

宮本哲也, 齋藤康昭, 関根正恵, 片根真澄, 本間 浩 「細菌における非標準的 D-アミノ酸合成酵素の探索」 第 39 回白金シンポジウム 2017.12.19

宮本哲也, 小里拓也, 和田大樹, 片根真澄, 齋藤康昭, 関根正恵, 本間 浩 「細菌における非標準的 D-アミノ酸合成酵素の同定及び機能解析」 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.8

Miyamoto Tetsuya, Katane Masumi, Saitoh Yasuaki, Sekine Masae, Homma Hiroshi 「Identification and characterization of novel broad-spectrum amino acid racemases in bacteria」 3rd International Conference of D-Amino Acid Research IDAR2017 2017.7.11

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/ac/SeitaiHP/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。