

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05412

研究課題名(和文) 乳酸菌におけるD-分岐鎖アミノ酸(D-BCAA)の新規機能の解明に関する研究

研究課題名(英文) Studies on novel functions of D-branched-chain amino acids (D-BCAA) in lactic acid bacteria

研究代表者

牟田口 祐太 (Mutaguchi, Yuta)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30724314

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)：本研究では、*Lentilactobacillus buchneri* JCM 1115においてのみ報告されていた新規酵素イソロイシン2-エピメラーゼ(Ile 2-E)が種々の乳酸菌にも存在することを示し、D-分岐鎖アミノ酸生産に関与している可能性を示した。また、*L. buchneri* JCM 1115ゲノム上のIle 2-E遺伝子に隣接する推定アミノ酸トランスポーター遺伝子の発現タンパク質が、L-及びD-分岐鎖アミノ酸の細胞内への取込み活性を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト常在乳酸菌や食品関連乳酸菌にイソロイシン2-エピメラーゼの存在を確認したことで、本酵素によって生産されると考えられるD-分岐鎖アミノ酸の乳酸菌における生理的意義を解明することができれば、その成果が医療や食品分野に応用できる可能性が示唆された。また、D-分岐鎖アミノ酸の細胞内への取込み活性をもつ膜タンパク質は、これまでに報告例がなく、本研究成果は乳酸菌に限らず、微生物研究全体においても学術的に新規性の高いものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was revealed that the lactic acid bacteria, isolated from human body and foods, have a novel enzyme "isoleucine 2-epimerase" gene in their genome. Therefore, it is suggested that the observation of the physiological functions of D-branched-chain amino acids produced by this enzyme in lactic acid bacteria would be applied to the medical and food fields. In addition, we revealed that the expressed protein from the putative amino acid transporter gene, adjacent to isoleucine 2-epimerase gene on *Lentilactobacillus buchneri* JCM 1115 genome, has L- and D-branched-chain amino acids uptake activity. This is the first example of amino acid transporter that shows the activity against D-branched-chain amino acids, not only for lactic acid bacteria, but also whole microbial research.

研究分野：酵素化学

キーワード：D-amino acid BCAA lactic acid bacteria racemase epimerase transporter permease

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質を構成する 20 種類の α -アミノ酸には、グリシンを除いて鏡像異性体である L 体と D 体が存在する。生物は主に L-アミノ酸を利用して生命活動を維持しており、多くの生物において D-アミノ酸は極微量しか検出されない。一方、真正細菌はその細胞壁中ペプチドグリカン層に D-アミノ酸構造を有している事が古くから知られている。また、一部の細菌が生産する数種のペプチド系抗生物質に D-アミノ酸構造を有するものが知られている。このように、他の生物と異なり細菌が D-アミノ酸を利用することは広く知られているが、その例は "細胞壁の構成成分" と "抗生物質の構成成分" に限定されたものであった。

研究代表者は、乳酸菌 *Lentilactobacillus buchneri* JCM 1115 が D-ロイシン(D-Leu)、D-アロイソロイシン(D-allo-Ile)、D-バリン(D-Val)といった D-分岐鎖アミノ酸(D-BCAA)を遊離状態で生産し、これらの D-BCAA が培養液中に蓄積することを見出していた。また、同菌から D-BCAA の生成活性を特異的に示す新規酵素イソロイシン 2-エピメラーゼ (Ile 2-E)を同定し、Ile 2-E の相同遺伝子を有する乳酸菌の多くが D-BCAA を生産することを明らかにした。しかしながら、乳酸菌の細胞壁や抗菌ペプチドに D-BCAA 構造が見出された例はなく、乳酸菌における遊離型 D-BCAA の生理機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、D-BCAA が乳酸菌のどのような生命活動に影響を与えているかを解明することを目的とし、(1) 乳酸菌の Ile 2-E 遺伝子の破壊による発現遺伝子の変化の網羅的解析、及び(2) ゲノム上の Ile 2-E 遺伝子に隣接するアミノ酸膜輸送体遺伝子の機能解析を計画した。

3. 研究の方法

(1) 種々の乳酸菌がもつ推定 Ile 2-E の酵素活性の検討

研究開始当初には、*L. buchneri* JCM 1115 中の Ile 2-E を相同組換え法により破壊する予定だった。しかし、同菌株細胞への遺伝子導入が困難であることが分かったため、他の D-BCAA 生産乳酸菌株を対象として、Ile 2-E 遺伝子破壊株の獲得を目指すこととした。そこで、D-BCAA 生産乳酸菌のゲノム中に保存されている推定 Ile 2-E 遺伝子の組換えタンパク質を、大腸菌を宿主とした発現系で調製し、その酵素活性を確認した。*Lentilactobacillus* 属 1 株、*Limosilactobacillus* 属 3 株、*Leuconostoc* 属 3 株、*Weissella* 属 1 株の D-分岐鎖アミノ酸生産乳酸菌由来の推定 Ile 2-E 遺伝子 (表 1) を pCold ProS2 にそれぞれクローニングし、発現用ベクターを構築した。これらの発現用ベクターを *Escherichia coli* BL21(DE3) に導入後、各組換えタンパク質の発現を誘導した。Ni キレートカラムを用いて各組換えタンパク質を精製し、トロンピン処理によって組換えタンパク質の Tag 領域を除去した。以上の操作により得られた 8 種の推定 Ile 2-E の精製タンパク質を用いて酵素学的な機能を解析した。

表 1. 酵素活性を確認した推定 Ile 2-E

乳酸菌	Ile 2-E と推定 Ile 2-E			タンパク質 の表記
	Locus tag ^a	アミノ酸 残基数	類似性 (%) ^b	
<i>Lentilactobacillus buchneri</i> JCM 1115		451	100	Lbu_ilep
<i>Lentilactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	Ga0036890_10662	451	97	Lot_ilep
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> NBRC 3956	LAF_1619	451	56	Lfe_ilep
<i>Limosilactobacillus vaginalis</i> JCM 9505	HMPREF0549_0024	446	60	Lva_ilep
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> JCM 1112	LAR_0189	457	56	Lre_ilep
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124	LEUM_0555	445	59	Lme_ilep
<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> JCM 12535	EY9DRAFT_02771	445	58	Lge_ilep
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> JCM 9696	LEGAS_1339	445	56	Lps_ilep
<i>Weissella paramesenteroides</i> JCM 9890	HMPREF0877_0835	450	53	Wpa_ilep

^a Locus tag の情報はゲノムデータベース Integrated Microbial Genomes and Microbiomes (IMG/M) から引用した。

^b アミノ酸配列に基づいた *L. buchneri* の Ile 2-E に対する類似性を示した。

(2) ゲノム上の Ile 2-E 遺伝子に隣接するアミノ酸膜輸送体(トランスポーター)遺伝子の機能解析

研究開始当初、*L. buchneri* JCM 1115 のゲノム上の Ile 2-E 遺伝子周辺の DNA 塩基配列解析から、Ile 2-E 遺伝子上流にアミノ酸トランスポーター(AT)と推定されるアミノ酸配列をコードする遺伝子が隣接することを見出していた。Ile 2-E 遺伝子に隣接する推定 AT 遺伝子の発現タンパク質は、D-BCAA または L-BCAA の細胞内外への膜輸送に関与することが予測され、乳酸菌の D-BCAA の生理機能を理解する上で、その詳細な機能を解明することが重要だと考えた。そこで本研究では、乳酸菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 を発現宿主としたタンパク質発現系である NICE system を用いて、推定 AT の異種発現を試みた。*L. lactis* NZ9000 用の市販ベクター-pNZ8148 をベースに推定 AT の N 末端または C 末端に His-tag を付加するよう設計した 2 種の発現ベクターを構築した。これらのベクターを導入した宿主を栄養培地で対数増殖期まで培養し、抗菌ペプチドのナイシンを添加することで推定 AT の発現を誘導した。発現誘導操作を施した菌体の膜画分と可溶性画分をウェスタンブロッティングに供し、目的タンパク質の発現を確認した。

続いて、His-tag 無しの推定 AT を発現させた *L. lactis* を用いて、D 及び L-BCAA の細胞内への取込み活性を検討した。推定 AT の発現を誘導した菌体を、アミノ酸を欠いた半合成培地で洗浄・懸濁した。その後、菌液に終濃度 1 mM の各アミノ酸溶液を加えて取込み反応を開始し、一定時間の後に氷冷した LiCl 溶液を加え、反応を停止した。菌体を洗浄・破碎後、その上清を回収し、D, L-BCAA 濃度とタンパク質濃度を測定した。そして、菌体破碎液の D, L-BCAA 濃度をタンパク質濃度で割ることで補正した値を、細胞内 D または L-BCAA 量として定義し、推定 AT 発現宿主と空ベクターを用いた Control との間で比較した。

4. 研究成果

(1) 種々の乳酸菌がもつ推定 Ile 2-E の酵素活性の検討

まず、各精製タンパク質の酵素活性を検討したところ、8 種全てにおいて *L. buchneri* 由来 Ile 2-E と同様に Ile 2-E 活性、及びロイシンラセマーゼ活性、バリンラセマーゼ活性を検出した(図 1)。続いて、各ホモログタンパク質の Ile 2-E 活性における反応速度論解析から触媒効率の指標となる k_{cat}/K_m 値を算出した。その結果、8 種のホモログタンパク質の k_{cat}/K_m 値はいずれも、*L. buchneri* 由来 Ile 2-E よりも高かった(表 2)。以上の結果から、8 株の D-分岐鎖アミノ酸生産乳酸菌がもつ Ile 2-E ホモログタンパク質は、*L. buchneri* 由来 Ile 2-E と同様に各乳酸菌の D-分岐鎖アミノ酸生産に関与していることが強く示唆された。

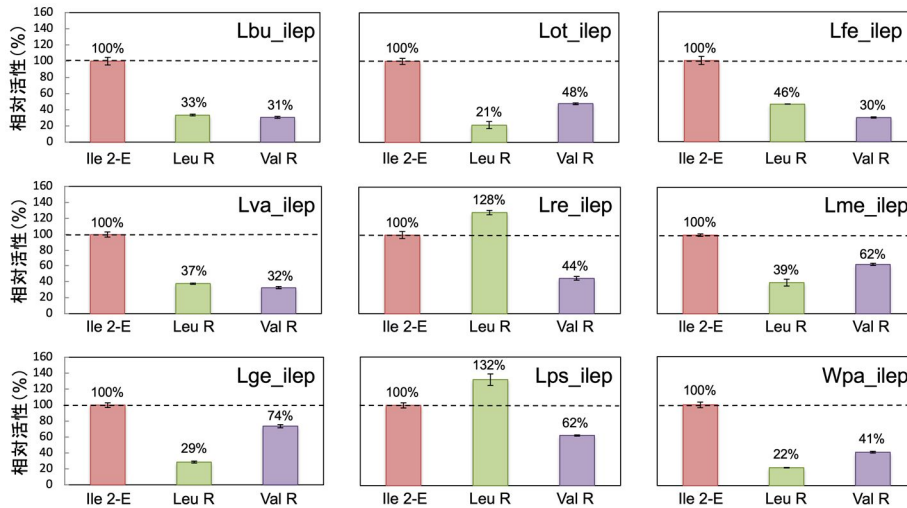


図 1. 推定 Ile 2-E の酵素活性

表 2. 反応速度論解析

酵素	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
Lbu_ilep	22.8 ± 0.3	144 ± 13	6.30 ± 0.50
Lot_ilep	4.07 ± 0.21	79.9 ± 1.8	19.7 ± 1.5
Lfe_ilep	11 ± 1	150 ± 10	14 ± 0
Lva_ilep	11 ± 0	300 ± 8	26 ± 0
Lre_ilep	8.2 ± 0.5	68 ± 5	8.3 ± 0.4
Lme_ilep	5.55 ± 0.14	262 ± 11	47.3 ± 1.0
Lge_ilep	6.38 ± 0.22	137 ± 5.6	21.5 ± 1.0
Lps_ilep	8.13 ± 0.57	65.7 ± 1.9	8.10 ± 0.45
Wpa_ilep	5.71 ± 0.53	437 ± 14	77.0 ± 7.7

研究開始当初、*L. buchneri* においてのみ Ile 2-E が見出されていたが、ヒト常在乳酸菌や食品関連乳酸菌といった幅広い乳酸菌が Ile 2-E を有していること初めてが示された。その後、上記 8 株の乳酸菌のうち、エレクトロポレーション法を用いた場合の遺伝子導入効率が高かった *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124、及び D-BCAA 高生産株 *L. fermentum* NBRC 3956 を対象に、相同組換え法による Ile 2-E 遺伝子破壊を試みたが、遺伝子破壊株の獲得に至っていない。しかし、依然として乳酸菌における D-BCAA の生理機能の解明は学術的に重要な研究課題であるため、令和 5 年度より開始した基盤研究(C)「NCDAAs が乳酸菌のバイオフィーム形成及び細胞壁リモデリングに与える影響の解析」において、引き続き研究に取り組んでいる。

(2) ゲノム上の Ile 2-E 遺伝子に隣接するアミノ酸膜輸送体(トランスポーター)遺伝子の機能解析

乳酸菌 *L. lactis* NZ9000 を発現宿主としたタンパク質発現系で推定 AT の異種発現を試み、目的タンパク質の発現をウェスタンブロットングで確認した。その結果、推定 AT を発現させた膜画分において、約 37 kDa のバンドを検出した(図 2)。しかし、この検出されたバンドのサイズは、推定 AT の予測質量である 51.7 kDa より小さいものだった。膜タンパク質の SDS-PAGE では、タンパク質の移動度がその質量を反映しない例が報告されている。よって、推定 AT は膜画分に発現したものの、予測質量よりも小さいバンドとして検出されたと考えられた。

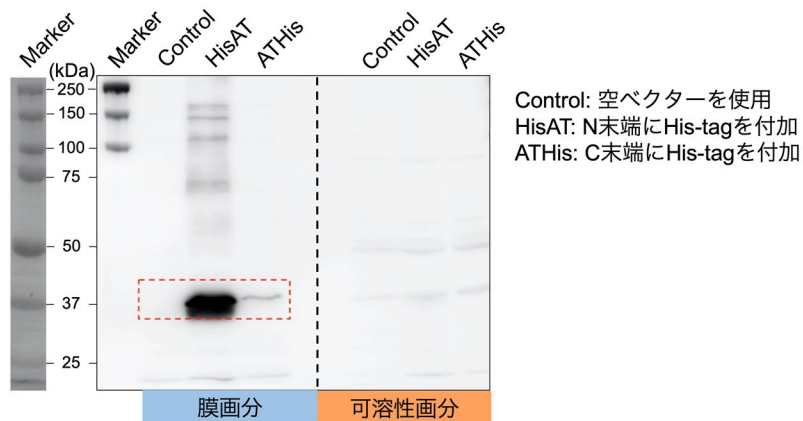


図 2. 推定 AT の発現確認 (ウェスタンブロットング)

続いて、His-tag 無しの推定 AT を発現させた *L. lactis* を用いて、D-Val の取込み活性を検討した。その結果、細胞内 D-Val 量が時間経過に従って増加し、いずれの反応時間においても、推定 TP 発現宿主の方が Control (空ベクター導入宿主) よりも D-Val 量が高かった(図 3)。このことから、推定 AT が D-Val 取込み活性を有することが示された。次に、D-Leu、D-*allo*-Ile を含む他の D-アミノ酸の取込み活性を 10 分の反応時間で検討した。その結果、推定 AT は D-Val、D-Leu、D-*allo*-Ile といった D-BCAA に加え、D-Met、D-Phe の取込み活性を有することが示された(図 4)。

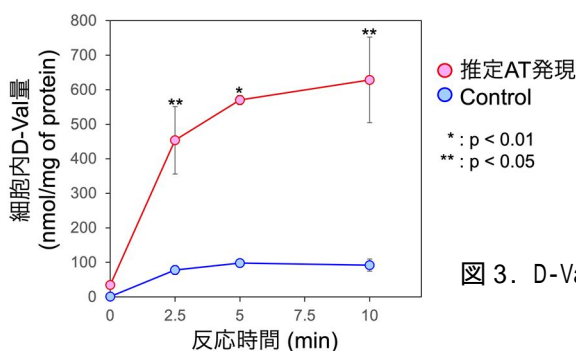


図 3. D-Val 取込み活性の検討

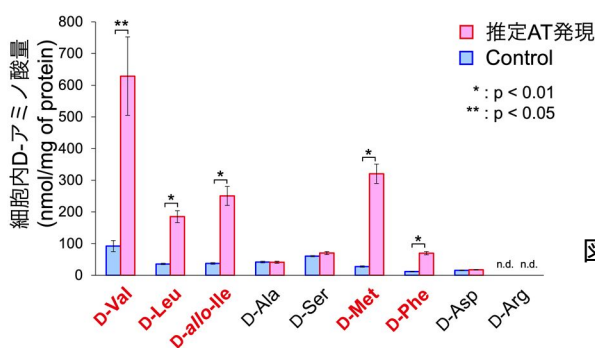


図 4. D-アミノ酸取込み活性の検討

一方、上記と同様の細胞を用いて、L-Val の取込み活性を検討した(図 5)。L-Val の場合も細胞内での量が時間経過に従って増加し、そして、いずれの反応時間においても、推定 TP 発現宿主の方が、細胞内量が高いことから、推定 AT が L-Val 取込み活性を有することが示された。また、L-アミノ酸の場合には L-BCAA に加え、L-Met、L-Phe、L-Ala の取込み活性を有することが示された(図 6)。

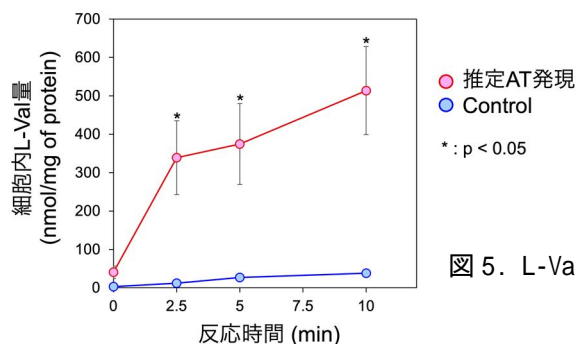


図 5. L-Val 取込み活性の検討

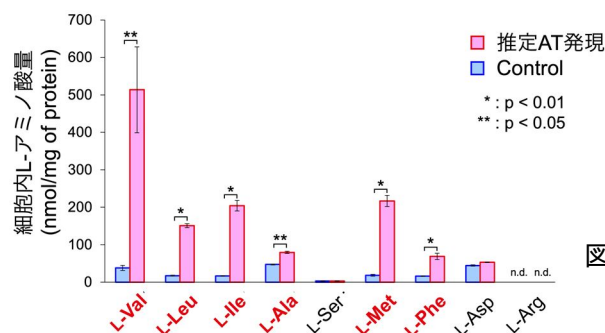


図 6. L-アミノ酸取込み活性の検討

乳酸菌を含む多くの細菌において、L-BCAA の取込み活性を有するトランスポーターの存在が報告されている。しかしながら、D-BCAA 取込み活性をもつ膜輸送体が報告された例は無く、本研究成果が初めての例となる。*L. buchneri* を含む D-BCAA 生産乳酸菌は培養液中に遊離型の D-BCAA を蓄積する一方で、本研究対象とした AT は D-BCAA を細胞内へ輸送する活性をもつことから、D-BCAA が乳酸菌細胞の内外でどのように移動するのか、その移動によってどのような生理的機能を発揮するのか、非常に興味深い。今後は該当 AT の D-BCAA および L-BCAA の排出活性も検討し、加えて、乳酸菌の生育段階における該当 AT 遺伝子の発現量の変化を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 牟田口祐太	4. 巻 92
2. 論文標題 発酵食品における乳酸菌のD-アミノ酸生産	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本イースト工業会技術報告	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 牟田口祐太	4. 巻 99
2. 論文標題 細菌-宿主間相互作用におけるD-アミノ酸の新規機能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.99.9_492	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 牟田口祐太	4. 巻 46
2. 論文標題 乳酸菌におけるD-アミノ酸の新規機能の解明に関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science digest	6. 最初と最後の頁 771-774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mutaguchi Y, Kasuga K, Kojima I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Production of D-Branched-Chain Amino Acids by Lactic Acid Bacteria Carrying Homologs to Isoleucine 2-Epimerase of <i>Lactobacillus buchneri</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2018.01540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牟田口祐太、出口柊平、春日和
2. 発表標題 乳酸菌 <i>Lentilactobacillus buchneri</i> に見出されたD-分岐鎖アミノ酸トランスポーター
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度広島大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牟田口祐太
2. 発表標題 発酵食品における乳酸菌のD-アミノ酸生産
3. 学会等名 令和4年度日本イースト工業会技術懇談会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牟田口祐太、梅津光、春日和
2. 発表標題 <i>Staphylococcus piscifermentans</i> 、 <i>Staphylococcus condimentii</i> 、 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 由来イソロイシン2-エピメラーゼホモログの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牟田口祐太、黒澤健太、春日和、小嶋郁夫
2. 発表標題 D-BCAA生産乳酸菌がもつイソロイシン2-エピメラーゼホモログタンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第154大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牟田口祐太、春日和、小嶋郁夫
2. 発表標題 Staphylococcus condimenti 及び Aerococcus sanguinicola由来イソロイシン2-エピメラゼホモログの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牟田口祐太
2. 発表標題 Production of D-forms of branched-chain amino acids by lactic acid bacteria and a novel amino acid racemase
3. 学会等名 平成30年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人腸内細菌学会ホームページ用語集「D-アミノ酸 (D-Amino acid)」2021年 https://bifidus-fund.jp/keyword/kw087.shtml
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------