

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05765

研究課題名(和文) 酵素スクリーニング法によるD-Asp高分泌生産乳酸菌の単離と分泌機構の解明

研究課題名(英文) Isolation of high D-amino acid-producing bacteria by an enzymatic screening method and analysis of the high production mechanism

研究代表者

高橋 祥司 (Takahashi, Shouji)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：90324011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：D-アスパラギン酸(D-Asp)に高い特異性を有する酵母由来D-アスパラギン酸オキシダーゼを用いたD-Asp分泌生産乳酸菌のスクリーニング法を開発し、既知のD-Asp分泌生産乳酸菌よりも約3倍高いD-Asp分泌生産能を有する*Lactobacillus curvatus* WDN19株を単離することに成功した。WDN19株のD-Asp高分泌生産能は、高いアスパラギン酸ラセマーゼ(RacD)活性および高いアスパラギナーゼ活性とトランスポゾン挿入によるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子破壊とL-Asp輸送体遺伝子挿入によるD-Asp生合成前駆体L-Aspの高い供給能による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

D-アスパラギン酸(D-Asp)は抗生物質原料として有用であり、またヒトに対して有益な健康効果を示すことから、D-Aspの多様な応用的利用が期待されている。したがって、D-Aspの生産技術の開発が重要となっており、本研究は微生物を用いたD-Aspの工業的発酵生産法開発の基盤となる研究である。また、乳酸菌はヒトに対して多様な健康効果を示すことから、新規な機能性食品の開発においても意義のある研究である。近年、多様な種類のD-アミノ酸が微生物により分泌生産されることが明らかにされているが、その生理機能は明らかにされていない。本研究は、微生物界におけるD-アミノ酸の機能解明にも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed an enzymatic screening method for D-aspartate (D-Asp)-producing lactic acid bacteria (LAB) using a yeast D-aspartate oxidase with a high substrate specificity toward D-Asp. We have isolated a high D-Asp-producing LAB strain, *Lactobacillus curvatus* strain WDN19, using the screening method. The high D-Asp-producing ability of strain WDN19 was attributed to the high aspartate racemase (RacD) activity and the high L-Asp providing ability, a precursor of D-Asp biosynthesis by RacD, due to the high asparaginase activity and the disruption of an aspartate aminotransferase gene and the insertion of an aspartate transporter gene by a transposon insertion.

研究分野：応用微生物学

キーワード：D-アスパラギン酸 乳酸菌 高分泌生産 酵素学的スクリーニング *Lactobacillus curvatus* D-アスパラギン酸オキシダーゼ アスパラギン酸ラセマーゼ ゲノム配列

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

D-アスパラギン酸 (D-Asp) は抗生物質原料として有用である (Senuma et al., J Ferment Bioeng, 1989)。また, D-Asp 投与による統合失調症の改善や神経障害性の鎮痛・認知機能障害の改善が期待されている (Li et al., Anim Nutr, 2018)。さらに, D-Asp の抗酸化作用, 肌の真皮コラーゲン繊維束形成促進効果 (美容効果) (Gao et al., Appl Microbiol Biotechnol, 2015) や精子運動性能の向上 (不妊改善効果) も報告されている (Maccina G et al., Animal Reprod Sci, 2009)。したがって, D-Asp の医薬品や化粧品としての利用や新たな機能性食品への利用など広範な応用的利用が期待されている (図 1)。

乳酸菌は整腸作用, 血圧降下作用, 血中コレステロール低下作用や免疫賦活化作用などヒトに有益な多様な生理効果を示すことが知られている (乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 日本乳酸菌学会編, 2010)。また, ある種の乳酸菌は, 細胞壁成分として D-Asp を生合成しており, 0.075 ~ 0.3 mM の D-Asp を培養液に分泌している (Mutaguchi et al., SpringerPlus, 2013)。いくつかの細菌において酸性 L-アミノ酸の細胞内濃度が浸透圧変化で増減し (Schleyer et al., Arch Microbiol, 1993; Glaasker et al., J Bacteriol, 1996), 機械受容チャネル (MscS) により細胞外に排出されることが知られているが (Nakamura et al., Appl Environ Microbiol, 2007), 酸性 D-アミノ酸が同様に排出されるかは不明である。

申請者らは D-Asp 特異的に作用する酵素 D-アスパラギン酸オキシダーゼ (D-Asp 特異的 DDO) を見だし, その酵素学的諸特性や生理機能について解析してきた (Takahashi et al., J Biochem, 2004; J Biochem, 2016 など)。また, 申請者らはこの DDO の D-Asp 高特異性を生かした D-Asp の発色定量法やバイオセンサー素子を開発してきた (Kato, Takahashi et al., Biosci Biotechnol Biochem, 2012; 鈴木, 高橋ら, 第 14 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 2018)。

### 2. 研究の目的

本研究では, 申請者らが見いだした D-Asp 特異的 DDO を用いたハイスループットな D-Asp 分泌生産乳酸菌のスクリーニング法を開発して D-Asp 高分泌生産乳酸菌を単離し, その D-Asp 高分泌機構を解明することで, 生物界における D-アミノ酸の学術的に未解明な問い (「どの微生物が?, どの D-アミノ酸を?, 最大でどの程度の濃度で?, 何のために?, どのようにして細胞外に分泌している?」) に対して解を得るとともに, 新規な機能性食品の開発や, 医薬品原料として有用で機能性を有する多様な D-アミノ酸の効率的な高発酵生産法を開発するための基盤を築くことを目的とし, 以下の 3 項目の達成を目指した (図 1)。

(1) D-Asp 特異的 DDO を用いてハイスループットな D-Asp 高分泌生産乳酸菌のスクリーニング法を開発する。

(2) 開発した酵素スクリーニング法を用いて D-Asp 分泌生産乳酸菌を複数単離・同定し, どのような乳酸菌が細胞外に多量の D-Asp を分泌するか明らかにする。

(3) D-Asp 高分泌生産乳酸菌がどのようなメカニズムで D-Asp を高分泌生産するのか明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) D-Asp 特異的 DDO の調製:

大腸菌において D-Asp 特異的 DDO を His タグ融合タンパク質として発現させ, 金属アフィニティカラムを用いて精製した。

(2) D-Asp 特異的 DDO を用いた D-Asp 定量:

96 ウェルマイクロプレートを用いて 0 ~ 4 mM D-Asp を D-Asp 特異的 DDO (ChDDO) と反応させ, 反応により生成する  $H_2O_2$  をペルオキシダーゼを用いて発色基質と反応させ, 発色強度をプレー

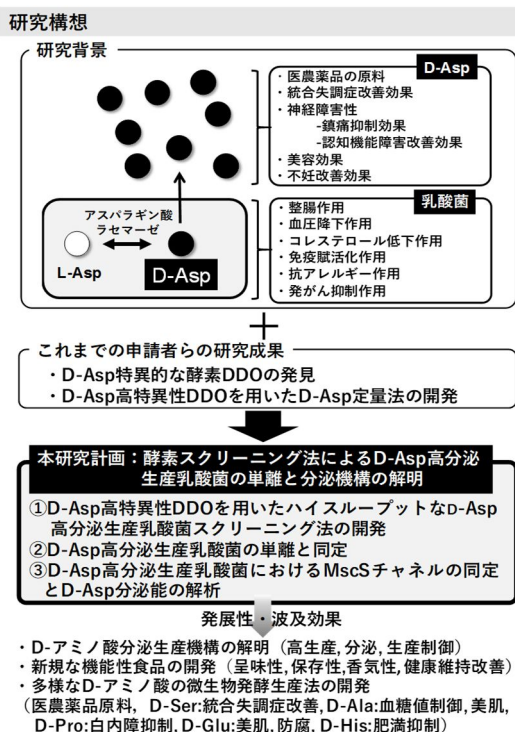


図 1 研究の背景と目的

トリンダーで測定し D-Asp 濃度との関係を解析した(図2)。

(3)乳酸菌培養液の D-Asp 定量:

D-Asp 分泌生産乳酸菌株 (*Lb. brevis* JCM1170 株, *Lb. gasseri* JCM1131 株) と D-Asp 非生産細菌株 (*S. epidermidis* JCM2414 株と *E. coli* K-12 株) を理研 BRC 微生物材料開発室から入手し, これら菌株の MRS 培地培養液上清中の D-Asp を開発した酵素法により定量した。また, 同試料の D-Asp 濃度を HPLC で定量し, 酵素法の値と比較した。

(4)D-Asp 分泌生産乳酸菌のスクリーニング: 新潟県内で購入した漬物などの懸濁液をシクロヘキシミドと  $\text{NaNO}_3$  を含む MRS 培地に塗布し, 嫌気培養した。生育した菌株からハロー形成試験とカタラーゼ試験により乳酸菌を選抜した。乳酸菌株を 96 ウェルプレートで培養し, 培養液上清の D-Asp 濃度を開発した酵素法で定量し, D-Asp 分泌生産乳酸菌を複数株取得した。

(5)D-Asp 分泌生産乳酸菌の同定:

D-Asp 分泌生産乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子をデータベースに対して検索して同定した。また, D-Asp 高分泌生産乳酸菌 (WDN19 株) の *rpoA* 遺伝子, *pheS* 遺伝子の配列およびゲノム配列や糖やアミノ酸の発酵試験などの表現解析を行うことで, 詳細に同定した。

(6)WDN19 株の D-Asp 高分泌生産機構の解析:

WDN19 株とその基準株である *Lactobacillus curvatus* DSM 20019 株の D-Asp 分泌生産能, 細胞内アスパラギン酸ラセマーゼ (*RacD*) 活性と転写量, 細胞内アスパラギナーゼ (*AnsA*) 活性, 細胞内 D, L-Asp 濃度, アスパラギン細胞内取り込み能や大腸菌で発現させた *RacD* 遺伝子発現産物の触媒活性を比較解析した。

(7)WDN19 株の機械受容チャネル (*mcsS*, *mcsL*) 遺伝子破壊の検討:

WDN19 株のゲノム配列より, 既知の *mcsS* と *mcsL* 遺伝子に高い相同性を示す遺伝子を探索した。次いで, これら機械受容チャネル遺伝子上流と下流領域を PCR で増幅して pUC19 に組み込むことで遺伝子破壊ベクターを作成した。作成した遺伝子破壊ベクターの WDN19 株への導入をエレクトロポレーション法で検討した。

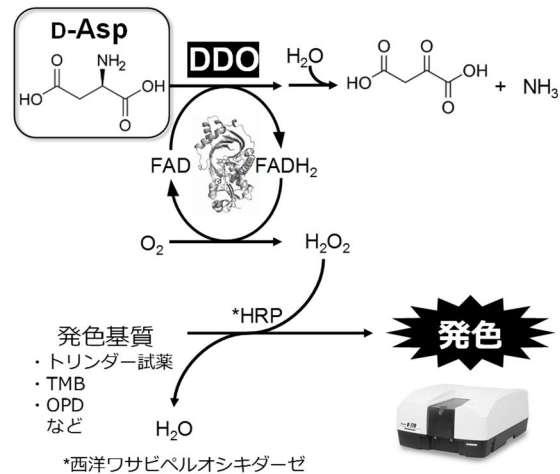


図2 酵素 DDO を用いた D-Asp 定量法

#### 4. 研究成果

(1)D-Asp 特異的 DDO を用いた D-Asp 分泌生産乳酸菌ハイスループットスクリーニング法の開発:

検出に最適な HRP 発色基質を決定するため, HRP 発色基質として多用されている *o*-dianisidine, TMB と OPD およびトリンダー試薬である phenol/4AA と TOOS/4AAP を用いて, D-Asp と ChDDO の反応で生成する  $\text{H}_2\text{O}_2$  を HRP カップリング反応でマイクロプレートリーダー上で D-Asp を検出した(図2)。その結果, トリンダー試薬を用いた反応系では, D-Asp 濃度と吸光度が高い感度と相関性を示し, また培地成分は測定系にほとんど影響を与えなかった(図3)。

乳酸菌培養液中の D-Asp が実際に定量できるか明らかにするため, D-Asp を生産することが知られている乳酸菌 2 種 (*Levilactobacillus brevis* JCM 1170 と *Lactobacillus gasseri* JCM 1131) と D-Asp を生産しない菌株 2 種 (*Staphylococcus epidermidis* JCM 2414 と *Escherichia coli* K-12) を MRS 培地で培養し, 培養液上清の D-Asp を酵素法と HPLC で測定したところ, 酵素法と HPLC 法で測定値に差が生じた。しかし, 酵素法で得られた値を補正することによって, 正確に濃度を推定できることが分かった。

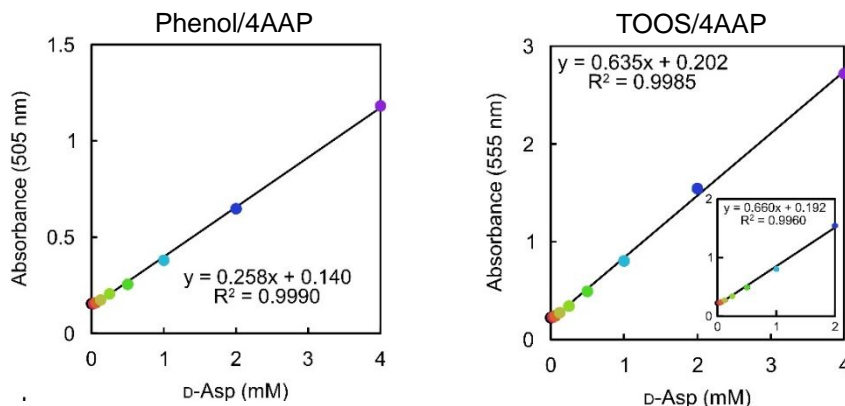


図3 トリンダー試薬を用いた DDO/HRP 反応による D-Asp 定量



(2) 酵素スクリーニング法を用いた D-Asp 分泌生産乳酸菌の単離と同定：

新潟県内で販売されている発酵食品や野菜・果実から乳酸菌株を 628 株した。これら単離した株の培養液上清の D-Asp 濃度を酵素法で測定したところ、菌株の違いによって呈色のばらつきが見られ、また既知の報告のなかで最も高い D-Asp 生産能が報告されている *Lv. brevis* JCM 1170 の培養液上清よりも、強い反応液の呈色を示す乳酸菌株が 1 株得られ、WDN19 株と名づけた (図 4)。WDN19 株の D-Asp 分泌生産能は 803  $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$  であり、*Lv. brevis* JCM 1170 株よりも 2.6 倍高い D-Asp 生産能を有していた。

WDN19 株を含む D-Asp 生産乳酸菌 13 株と非生産乳酸菌 12 株の計 25 株について分子系統解析を行ったところ、WDN19 株は乳酸菌 *Latilactobacillus curvatus* DSM 20019 に最も近縁であった。また、解析した乳酸菌株は 4 属 10 種の乳酸菌に分類され、D-Asp 分泌生産能は同じ種に属する乳酸菌でも株間で大きく異なることが示唆された。

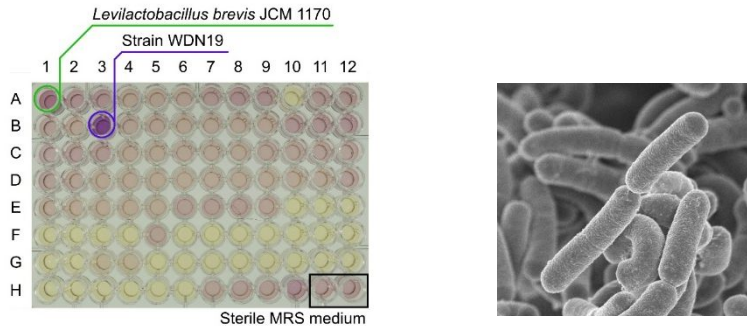


図 4 D-Asp 高分泌生産乳酸菌 *Latilactobacillus curvatus* WDN19 株

(3) WDN19 株の D-Asp 高分泌生産機構の解明：

WDN19 株のゲノム配列と生化学的な表現形を解析し、WDN19 株は *Lt curvatus* に属すると考えられた。*Lt curvatus* の基準株である DSM 20019 株の D-Asp 分泌生産能は WDN19 株に比べて著しく低かったことから、WDN19 株の D-Asp 高分泌能は株固有の性質であることが分かった。WDN19 株細胞内の RacD 活性、RacD 遺伝子転写量と AnsA 活性は DSM 20019 株よりも高く、組換え RacD の分子活性も WDN19 株由来のものの方が高かった。さらに、WDN19 株ゲノムのアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子 (*aspC*) がアスパラギン酸:アラニン交換輸送体遺伝子 (*aspT*) を含むトランスポゾンで破壊されていた。以上の知見より、WDN19 株の D-Asp 高分泌生産能は、高い L-Asp 供給能と L-Asp からの高い D-Asp 変換能に起因すると考えられた (図 5)。

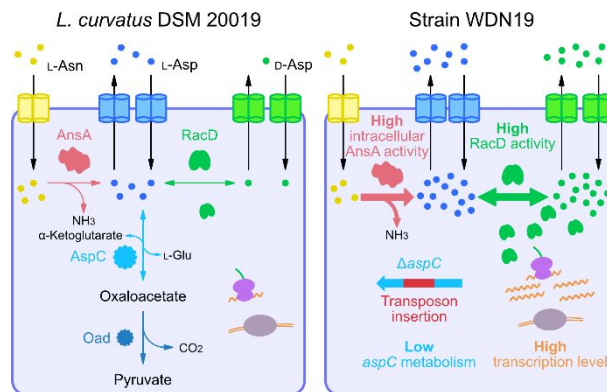


図 5 *Lt. curvatus* WDN19 株の D-Asp 高分泌生産機構

(4) WDN19 株の機械受容チャネル (*mcsS*, *mcsL*) 遺伝子破壊の検討：

機械受容チャネルと D-Asp 分泌の関係を探るため、WDN19 株のゲノム配列に既知の *mcsS* と *mcsL* 遺伝子に高い相同性を示す遺伝子を見いだした。これら機械受容チャネル遺伝子の破壊ベクターを作成し、電圧ポレーション法により WDN19 株への導入を検討したが、現在のところ遺伝子破壊株は得られていない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Shouji	4. 巻 104
2. 論文標題 D-Aspartate oxidase: distribution, functions, properties, and biotechnological applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2883 ~ 2895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10439-9	査読の有無 有
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 Shibata Kimihiko, Hagiya Saho, Okawara Rena, Abe Katsumasa, Takahashi Shouji, Kera Yoshio	4. 巻 84
2. 論文標題 Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometric assay for d-aspartate N-methyltransferase activity in ark shells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 500 ~ 506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1689094	査読の有無 有
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 Shibata Kimihiko, Sugaya Noriko, Kuboki Yuko, Matsuda Hiroko, Abe Katsumasa, Takahashi Shouji, Kera Yoshio	4. 巻 84
2. 論文標題 Aspartate racemase and D-aspartate in starfish; possible involvement in testicular maturation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 95 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1660614	査読の有無 有
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 Shimekake Yuya, Furuichi Takehiro, Abe Katsumasa, Kera Yoshio, Takahashi Shouji	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel thermostable d-amino acid oxidase of the thermophilic fungus Rasamsonia emersonii strain YA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48480-y	査読の有無 有
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 Takahashi shouji, Osugi Kohei, Shimekake Yuya, Shinbo Akira, Abe Katsumasa, Kera Yoshio	4. 巻 103
2. 論文標題 Characterization and improvement of substrate-binding affinity of D-aspartate oxidase of the thermophilic fungus <i>Thermomyces dupontii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 4053 ~ 4064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-09787-y	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kajitani K, Ishikawa T, Shibata K, Kouya T, Abe K, Kera Y, Takahashi S.
2. 発表標題 Isolation of a highly D-aspartate-producing lactic acid bacterium by enzymatic screening method
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimekake Y, Furuichi T, Goto M, Abe K, Kera Y, Takahashi S.
2. 発表標題 Structure insights into a thermostable fungal D-amino acid oxidase
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimekake Y, Furuichi T, Suzuki H, Abe K, Goto M, Kera Y, Takahashi S.
2. 発表標題 A structural determinant of the substrate specificity of thermophilic fungal D-amino acid oxidases
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Furuichi T, Shimekake Y, Goto M, Abe K, Kera Y, Takahashi S.
2. 発表標題 Identification of amino acid residues involved in the thermal stability of a thermostable fungal D-amino acid oxidase
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長岡技術科学大学 環境生物化学研究室HP <a href="https://envbiochem.amebaownd.com/">https://envbiochem.amebaownd.com/</a> 長岡技術科学大学 環境生物化学研究室HP <a href="https://envbiochem.amebaownd.com/">https://envbiochem.amebaownd.com/</a>
--

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
研究分担者	柴田 公彦  (Shibata Kimihiko)  (10369928)	長岡技術科学大学・工学研究科・准教授    (13102)	

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
---------	---------