

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850176

研究課題名(和文) 乳酸菌のカロテノイド生産促進機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of carotenoid biosynthesis regulatory mechanisms in lactic acid bacteria

研究代表者

萩 達朗 (Hagi, Tatsuro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門 畜産物研究領域・主任研究員

研究者番号：00510257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Enterococcus gilvusを用いて、乳酸菌のカロテノイドを中心とした酸化ストレス応答機構を解明するため、好気培養(酸化ストレス)によって影響を受ける遺伝子群および代謝産物をトランスクリプトームおよびメタボローム解析で探索した。菌株を好気培養した結果、アセチルCoAからメバロン酸を経てカロテノイド合成に繋がるイソプレノイド合成経路の遺伝子群の発現量が増加し、代謝産物についても、アセチルCoA合成に関与する代謝産物の増加が認められた。これらの結果、酸化ストレスによって活性化されるイソプレノイド合成経路は、乳酸菌の酸化ストレス応答機構の一部として重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the carotenoid-centered oxidative stress response mechanism in lactic acid bacteria (LAB), effects of aerobic culture condition on gene expressions and metabolites in carotenoid-producing Enterococcus gilvus was investigated using whole-transcriptome and metabolome analysis. It turned out that aerobic culture condition increased the level of gene expression of isoprenoid biosynthesis pathway, converting Acetyl-CoA to carotenoid via mevalonate, and metabolites related to Acetyl-CoA biosynthesis. These results indicate that isoprenoid biosynthesis pathway, which could be induced by aerobic condition, plays an important role in oxidative stress response mechanisms in LAB.

研究分野：農学

キーワード：乳酸菌 カロテノイド トランスクリプトーム メタボローム 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

地球上の生物が持つカロテノイド生産制御機構について、光や酸素を生育に利用する光合成生物や好気性細菌では、光や酸化ストレスによってカロテノイド生産が制御（促進）されることが知られている。一方、通性嫌気性細菌の乳酸菌では、*Enterococcus* 属や *Lactobacillus* 属などの一部がカロテノイド（ジアポニューロスポレン）を生産することが知られている。このカロテノイドは炭素数が 30 で、炭素数が 40 の - カロテンやリコペンなど植物が生産するカロテノイドとはサイズが異なるが、抗酸化作用を有する共役二重結合を持っており、酸化ストレス機構の 1 つであることが予想される。しかしながら、乳酸菌由来カロテノイドの機能については知見が浅く、乳酸菌のカロテノイド生産制御機構については報告が無い。また、カロテノイド生産乳酸菌については食品からの分離例は多いが、カロテノイド生産乳酸菌を積極的に利用した食品は無く、乳酸菌由来カロテノイドを大量生産させることで、抗酸化作用の強い乳製品の創出が期待できる。そこで本研究では、乳酸菌のカロテノイド生産促進に関わる遺伝子群および代謝産物の探索を行うこととした。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、生乳からカロテノイド生産乳酸菌 *Enterococcus gilvus* を分離し、乳酸菌由来カロテノイドが、乳酸菌の酸化ストレス耐性を向上させる抗酸化物質として機能することを明らかにしてきた。さらに、通性嫌気性細菌である乳酸菌は通常、嫌気的に培養されるが、好気的に培養して酸化ストレスを与えたところ、カロテノイドの生産量が著しく増加することがわかってきた。

これらの結果を踏まえ申請者は、好気培養と嫌気培養条件で培養した各菌体の遺伝子発現および代謝産物を比較することで、未解明であるカロテノイド生産制御機構を解明することができる考えた。また、乳酸菌の抗酸化物質であるカロテノイド生産を最大限に効率化させるシステムを構築することも期待できる。そこで本研究では、カロテノイド高生産条件（好気培養）で影響を受ける遺伝子群および代謝産物をオミックス解析（ホールトランスクリプトームおよびメタボローム）で明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1)カロテノイド高生産培養条件の最適化
カロテノイド生産促進に関連する遺伝子は、カロテノイド生合成遺伝子とともに誘導されることが予想される。そこで、好気培養（カロテノイド高生産条件）および嫌気培養（低生産条件）で *E. gilvus* を培養し、カロテノイド生合成遺伝子の発現が最も誘導される好気培養条件（時間）を決定する。
具体的には、*E. gilvus* を 200 mL の GM17 培

地 (M17 培地に 0.5% グルコースを添加) が入った 500 mL の三角フラスコに接種し、4 時間アネロパック内で嫌気培養した。その後、1 つはアネロパックから取り出し、振とう培養器で好気培養を行い、片方はそのまま嫌気培養を継続し、各培養条件から培養菌体を経時的にサンプリングして RNA を抽出し、逆転写定量 PCR を用いてカロテノイド生合成遺伝子 *crtN* および *crtM* の発現量を測定した。

(2)ホールトランスクリプトーム解析

(1)で決定した培養条件で菌体をサンプリングし、RNA を調製後、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いてシーケンスおよび遺伝子発現量の定量解析を行った。カロテノイド生合成経路に関連する遺伝子群を中心に、好気と嫌気培養条件との間で差があった遺伝子（変動遺伝子）を抽出した。また、抽出した各遺伝子について、定量 PCR で再現性の確認を行った。

(3)代謝産物のメタボローム解析

(1)で決定した培養条件で菌体および培養上清をサンプリングし、メタノールを用いて菌体から代謝物質を抽出し、LC-MS でメタボローム解析を行った。得られた代謝物質データについて、好気と嫌気培養で異なる物質を明らかにし、カロテノイド高生産条件（好気培養）で変動する代謝経路を推測した。特に、カロテノイド合成は「ピルビン酸 アセチル CoA メバロン酸経路 イソプレノ合成経路 カロテノイド合成経路」の流れを中心に進行するため（イソプレノイド生合成経路）、これらカロテノイド合成経路の上流にある前駆体の代謝経路に関連する代謝物質を中心に探索した。

また、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 生体内の代謝マップを参考に、メタボローム解析で得られた代謝経路に、ホールトランスクリプトーム解析で得られた変動遺伝子群を照らし合わせ、変動した代謝物質と遺伝子との相関性を確認した。

4. 研究成果

(1)カロテノイド高生産条件の最適化

好気培養時間が 30 分、1 時間、2 時間の菌体をサンプリングし、嫌気培養条件を対照区として *crtNM* の遺伝子発現変化を調べた結果、30 分間好気培養することで、嫌気条件に比べて *crtNM* 遺伝子発現量が 5 - 6 倍に増加した。この時、菌体内カロテノイド量も大幅に増加していた。一方、時間がたつにつれて、両条件における *crtNM* の遺伝子発現量の差は減少し、2 時間後では嫌気条件下の発現量とほとんど差がなかった。そこで、好気培養条件処理は 30 分とし、以下のオミックス解析を行った。

(2)ホールトランスクリプトーム解析

嫌気条件と比較して、好気条件で発現量が著しく上昇した遺伝子を表 1 に示した。好気条件下では、名称・機能が不明なタンパク質をコードする遺伝子を除き、ピルビン酸を

アセチル CoA に変換するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体に関連する遺伝子群 (*dld*, *pdhB*, *pdhA*) や、ピルビン酸をアセチンに変換する酵素をコードする遺伝子群 (*aldB*, *als*) の発現量が数十倍に増加していた。また、カロテノイド生合成の上流領域に注目し、アセチル CoA から始まり、メバロン酸、イソプレンを經由するイソプレノイド生合成経路の遺伝子群の発現量について調べたところ、メバロン酸合成に関わる遺伝子 *hmgs* を除き、その他の 8 遺伝子については有意に増加することが明らかとなった(表 2)。このことから、ピルビン酸からカロテノイドまでの代謝経路遺伝子群が好気培養によって全体的に増加し、カロテノイド生産の促進に繋がったと考えられる。また、表 3 に示したように、好気培養によって UvrABC system protein をコードする DNA 修復系遺伝子、カロテノイド生産に関わると推測される転写制御因子 Spx をコードする遺伝子(プラスミドとクロモソームに存在)の発現量が変動した。同時に、酸化ストレス応答因子として広く知られている NADH oxidase や superoxide dismutase の遺伝子発現量も増加していた。

表1. 好気条件下で顕著に発現量が増加した遺伝子

遺伝子名	遺伝子産物	発現量比 (好気/嫌気)	
		NGS ¹	qPCR ²
1 <i>glo</i>	glyoxalase	32.8	24.9*
2 <i>dld</i>	dihydrolypoyl dehydrogenase	29.6	32.8*
3 <i>aldB</i>	alpha-acetolactate decarboxylase	29.1	26.5*
4 <i>pdhB</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	29	34.4*
5 <i>dlst</i>	dihydrolypooamide S-succinyltransferase	28.3	35.4*
6 <i>als</i>	acetolactate synthase catabolic	28	39.7*
7 <i>pdhA</i>	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1	26.6	32.6*

¹ 次世代シーケンサーの結果、² 定量PCRの結果
* P<0.05

表2. イソプレノイド生合成経路に関連する遺伝子群の発現量変化

遺伝子名	遺伝子産物	発現量比 (好気/嫌気)	
		NGS ¹	qPCR ²
<i>crtN</i>	dehydroqualene desaturase	4.8	5.9*
<i>crtM</i>	dehydroqualene synthase	4.5	5.3*
<i>mvk</i>	mevalonate kinase	1.6	2.3*
<i>pmvk</i>	phosphomevalonate kinase	1.5	1.9*
<i>mpd</i>	diphosphomevalonate decarboxylase	1.5	2*
<i>ipi</i>	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	1.4	2.3*
<i>ispa</i>	geranyltranstransferase	1	1.3*
<i>hmgs</i>	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	0.9	1.2*
<i>hmgr</i>	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	0.9	1.2*

¹ 次世代シーケンサーの結果、² 定量PCRの結果
* P<0.05

表3. 転写因子およびその他のストレス応答遺伝子群の発現量変化

遺伝子名	遺伝子産物	発現量比 (好気/嫌気)	
		NGS ¹	qPCR ²
<i>spx</i>	spx/MgsR family transcriptional regulator (Plasmid)	11.6	9.8*
<i>spx</i>	spx/MgsR family transcriptional regulator (Chromosome)	3.3	4.7*
<i>uvrB</i>	UvrABC system protein B	3.3	3.6*
<i>uvrA</i>	UvrABC system protein A	3.2	3.6*
<i>nox</i>	NADH oxidase	9	7.2*
<i>sod</i>	superoxide dismutase [Fe]	6.1	8.0*

¹ 次世代シーケンサーの結果、² 定量PCRの結果
* P<0.05

(3) メタボローム解析

E. gilvus を好気培養した時に変動する代謝産物をメタボローム解析で調べるとともに、昨年度得たホールトランスクリプトーム解析結果とメタボローム解析結果との関連性について検討した。メタボローム解析の結果、菌体抽出物については主成分解析によって好気および嫌気条件下での代謝産物の違いが示された(図 1)。しかしながら、培養上清についてはバラツキが大きく、解析を行うことができなかった。菌体について、好気培養条件下では、コエンザイム A の生産に必要なパントテン酸やその派生物の増加が確認でき、ホールトランスクリプトーム解析の結果でも、コエンザイム A の合成経路に関わる遺伝子群の一部について、遺伝子発現量が増加傾向であった。また、NAD やペプチドについても、変動が確認できた。NAD については酸化還元反応において重要な物質で、乳酸菌が酸化ストレスを受けた結果、菌体内の酸化還元バランスが著しく変動したためだと考えられる。

これまでの結果を併せると、ピルビン酸からアセチル CoA、メバロン酸、イソペン、そしてカロテノイド合成の一連の代謝経路が好気培養で誘導され、カロテノイド生産促進に繋がっていることが示唆された。

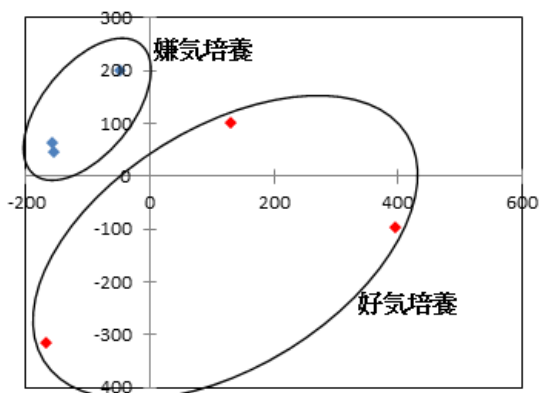


図 1. 主成分解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tatsuro Hagi, Miho Kobayashi, and Masaru Nomura(2015). Aerobic conditions increase isoprenoid biosynthesis pathway gene expression levels for carotenoid production in *Enterococcus gilvus*. FEMS Microbiology Letters, 362(12), fnv075(査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

萩達朗, 小林美穂, 野村将, ホールトランスクリプトーム解析によるカロテノイド生産乳酸菌の酸化ストレス応答因子の探索、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

萩達朗, 小林美穂, 野村将, 好気培養がカロテノイド生産乳酸菌のイソプレノイド合成経路に与える影響、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 27 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

〔その他〕

ホームページ等

Tatsuro HAGI. Aerobic condition accelerates carotenoid production in *Enterococcus gilvus*. Atlas of Science (<http://atlasofscience.org/aerobic-condition-accelerates-carotenoid-production-in-enterococcus-gilvus/>), 2015

萩達朗、乳酸菌由来カロテノイドは乳酸菌のマルチストレス耐性向上に利用できる、日本政策金融公庫、No.2021、平成 26 年 10 月 24 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩 達朗 (HAGI, Tatsuro)

農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・畜産物研究領域・主任研究員

研究者番号：00510257