

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14732

研究課題名(和文)食品に繁殖する低温増殖性細菌の低温適応機構の解明と食品産業への応用

研究課題名(英文) Analysis of Cold-Adaptation Mechanism of Food Spoilage Bacteria and Its Application to Food Industry

研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA, Tatsuo)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：70243087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：変敗食肉加工品より単離された*Leuconostoc mesenteroides* NH04株が同種のATCC8292株とNBRC3832株に比べてムチンへの高い接着性をもつことや、食品添加物である亜硝酸ナトリウム存在下で接着性が増加することを見いだした。接着に関与する可能性のある細胞表層タンパク質としてbifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenaseのホモログを同定した。一方、本菌の低温適応への関与が示唆される低温誘導性タンパク質として、RNA修飾・構造形成関連タンパク質のホモログや、適合溶質の輸送に関わる膜タンパク質のホモログを同定した。

研究成果の概要(英文)：We found that *Leuconostoc mesenteroides* NH04 isolated from spoiled processed meat products has higher adhesion to mucin than the ATCC8292 strain and the NBRC3832 strain of the same species, and its adhesiveness is increased in the presence of sodium nitrite used as a food additive. A homolog of bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase was identified as a cell-surface protein of NH04 possibly involved in its adhesion. We also identified homologs of proteins involved in RNA modification/folding and transport of compatible solutes as cold-inducible proteins of NH04 that may be involved in its cold adaptation.

研究分野：分子微生物科学

キーワード：低温増殖性細菌 食品変敗 低温適応機構 表層タンパク質 タンパク質生産

1. 研究開始当初の背景

多くの微生物の生育は 4℃ 付近の低温で抑制されることから、食品の長期保存は一般に低温で行われる。しかしながら、このような低温環境下でも活発に生育する微生物群が存在する。時としてこのような微生物群が低温保存下の食品中で増殖し、これにより食品の商品価値がなくなり、多大な損害が発生している。特にこのような微生物の増殖は、製品が小売店に出荷されたのち、あるいはさらに消費者の手に渡ったのちに顕在化することが多く、このような場合、人に対して無害な微生物であっても、商品回収の必要が生じ、その輸送に莫大な経費が必要となる。このような背景から、食品産業界では、低温増殖性微生物の生育を抑制する手法や、製品出荷前の早い段階でこれらを検出する手法の開発が強く望まれてきた。

一方、本研究代表者は過去十数年にわたって自然環境中の低温増殖性微生物、特に海水由来の低温増殖性細菌の低温適応機構の解析やそれらの応用開発を行ってきた。そこで、その経験を活かし、食品由来の低温増殖性細菌の低温適応機構や食品付着機構を解析し、それらの生育抑制や早期検出を可能にする新しい手法を開発するための基盤構築に取り組むこととした。

低温保存下の食肉から分離された低温増殖性乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NH04 について予備的な検討を行った結果、低温誘導性タンパク質として同定されたアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ AhpC が、同属の乳酸菌の低温増殖速度を高めることが見いだされた (*AMB Express* (2015) 5, 11)。これは活性酸素の除去に関与する酵素である。活性酸素は低温で細胞内濃度が高まることが報告されており、その除去が、これらの細菌の低温適応に重要であるものと推測された。AhpC は低温増殖性の細菌において、同属の常温性細菌よりも高発現しており、その活性の阻害によって生育を抑制できる可能性や検出のマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、食品に繁殖する低温増殖性微生物の低温適応機構や、食品への付着機構を解明し、これらの微生物の生育抑制や早期検出のための基盤となる知見を得ることを目的とした。また、これらの微生物の優れた低温増殖性を積極的に活用し、低温での物質生産の宿主として開発することも目指した。上述の低温増殖性乳酸菌 *L. mesenteroides* NH04 を主な研究対象とするほか、魚類の腸内に棲息する低温増殖性細菌も対象として研究を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) *L. mesenteroides* の固体表面と細胞接着分子への接着性解析：被験菌をポリスチレン製

マイクロタイタープレートに入れた GAM + 1% グルコース培地にて 25℃ および 10℃ で培養し、一定時間培養後の接着細胞を 0.1% クリスタルバイオレット水溶液を用いて染色した。細胞に保持された色素を 33% 酢酸水溶液にて溶出し、波長 590 nm における吸光度を測定することで、付着した細胞量を定量し、被験菌のポリスチレンへの接着性を評価した。細胞接着分子であるムチンおよびフィブロネクチンへの接着性については、各分子をウェル内部にコーティングしたマイクロタイタープレートを用いて解析した。25℃ および 10℃ で定常期まで培養し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄・懸濁した被験菌を各ウェルに分注し、4℃ で一晩インキュベートした。その後、ウェルに付着した細胞を上記と同様の方法で定量し、接着性を評価した。

(2) 細胞表層の化学的性質の解析：MATS (microbial adhesion to solvents) 法によって、被験菌細胞表層の疎水性度やルイス酸性・塩基性の程度を解析した。具体的には、ヘキサデカンとの親和性を解析することで疎水性度を、酢酸エチルおよびクロロホルムとの親和性を解析することでルイス酸性・塩基性の程度を解析した。600 nm における濁度が 0.4 になるよう PBS で調製した細胞懸濁液 3 ml に対して 1 ml の各有機溶媒を加えて攪拌し、有機層と水層が分かれるまで静置した後、水層の濁度を計測し、有機溶媒を加える前の濁度に対する割合を求めることで、各溶媒への親和性を算出した。

(3) 細胞表層タンパク質の同定：1% グルコースを含む GAM 培地と、300 ppm 亜硝酸ナトリウムおよび 1% グルコースを含む GAM 培地を用いて 25℃ で一晩静置培養した菌体を Sulfo-NHS-SS-biotin と反応させ、菌体表層タンパク質をビオチン標識した。菌体破碎後、ビオチン標識されたタンパク質をストレプトアビジンビーズで回収した。還元処理によってビーズからタンパク質を遊離させ、SDS-PAGE で分離した後、ペプチドマスマフィンガープリンティング (PMF) 解析によってタンパク質を同定した。

(4) Shotgun proteome 解析による低温誘導性タンパク質の同定：GAM + 1% グルコース培地にて 10℃ と 25℃ で定常期まで培養した菌体を破碎後、遠心分離で得られた上清中のタンパク質に対して還元及びアルキル化処理を行った。その後、トリプシン消化を行い、Thermo Scientific 社の Tandem Mass Tag™ 試薬にてペプチドを標識した。標識されたペプチドを LC-MS/MS に供し、タンパク質の発現変動解析を行った。

(5) 低温誘導性膜タンパク質の同定：GAM + 1% グルコース培地にて 10℃ と 25℃ で定

常期まで培養した菌体を超音波破砕機により破砕し、超遠心分離で沈殿画分（膜タンパク質画分）を得た。得られた膜タンパク質画分を二次元電気泳動により分離し、SYPRO Ruby で染色した。25 培養に対して 10 培養でのスポット強度が 2 倍以上のタンパク質を低温誘導性タンパク質とし、PMF 解析により同定した。

(6) NH04 株を宿主とした異種タンパク質発現用プラスミドの構築：NH04 株固有のプラスミドの塩基配列を決定し、複製に関わる領域を推定した。この領域を、pUC19 の ori 配列を含む領域、および *Escherichia coli* および *L. mesenteroides* の選択マーカーとしてのエリスロマイシン (EM) 耐性遺伝子発現カセットと融合することで pUCNH04E を構築した。pUCNH04E を NH04 株および *L. mesenteroides* の標準株 2 種 (ATCC8292 株、NBRC3832 株) にエレクトロポレーション法により導入し、形質転換効率を調べた。また、得られた形質転換体について、GAM + 1% グルコース液体培地にて非選択圧条件下 (EM 非存在下) で培養を行い、一定培養時間毎に採取した菌体試料を選択 (EM 含有) および非選択 (EM 非含有) GAM + 1% グルコース寒天培地に播種した。非選択培地上で生育したコロニーの数に対する選択培地上で生育したコロニーの数の割合 (プラスミド保持率) を算出することで、菌体内におけるプラスミドの安定性を評価した。

4. 研究成果

(1) 変敗食肉加工品より単離された乳酸菌 *L. mesenteroides* NH04 株と、同種の標準株 2 種 (ATCC8292 株と NBRC3832 株) のポリスチレン表面、細胞接着分子であるムチンおよびフィブロネクチンへの接着性を調べた。また、細胞接着と関わる細胞表層の化学的性質について調べた。25 と 10 のいずれにおいても、NH04 株では標準株 2 株に比べてポリスチレン表面およびムチンへの接着性が高いことがわかった。また、抗菌性食品添加物である亜硝酸ナトリウム存在下では、NH04 株のみ接着量の増加が認められた。一方、フィブロネクチンへの接着性は各株間で大きな差はみられなかった。細胞表層の化学的性質について、NH04 は標準株 2 株に比べて細胞表層のルイス塩基性が強いことがわかった。これより、NH04 株は標準株に比べて高い細胞接着能力を有し、特に亜硝酸ナトリウム存在下で顕著に細胞接着性を増加する仕組みを有していることが示唆された。

(2) NH04 株の細胞接着に関与するタンパク質を明らかにするため、表層タンパク質をビオチンラベル化試薬 Sulfo-NHS-SS-biotin と反応させ、標識されたタンパク質をストレプトアビジンビーズで回収した。亜硝酸ナトリウム存在下で培養した菌体で生産量が増加

したタンパク質を PMF 解析に供した結果、bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase のホモログが同定された。本タンパク質は *Listeria monocytogenes* において接着分子として作用することが報告されており、NH04 株においても接着分子として働くことが推測された。

(3) 25 と 10 で培養した NH04 株のタンパク質を抽出しプロテオーム解析に供した結果、15 種の低温誘導性タンパク質が同定された。このうち 6 種 (LEUM_0003、LEUM_0759、RluB、LEUM_1577 および 2 種の Csp) が RNA の修飾・構造形成に関わるタンパク質であったことから、RNA の修飾・構造形成と低温適応の関連が示唆された。また、シグナル伝達を担う分子である c-di-GMP の合成を行う diguanylate cyclase が同定された。c-di-GMP が関わるシグナル経路は、細胞表層にある多糖類や細胞接着分子の生産との関連が知られていることから、接着性の解析の結果と合わせて、低温適応における diguanylate cyclase の低温誘導的な発現の重要性が示唆された。

(4) NH04 株の低温適応機構を明らかにすることを目的として、低温誘導的に発現する膜タンパク質群を解析した。25 に対して 10 での生産量が 2 倍以上のタンパク質を PMF 解析に供した結果、5 種のタンパク質が同定された。このうち 2 種 (GlnQ、OpuBA) は適合溶質の輸送に関わる膜タンパク質のホモログであり、適合溶質の輸送と低温適応との関連が示唆された。

(5) NH04 株は、優れた低温増殖性をもつことから、熱安定性の低いタンパク質や常温では宿主に毒性を示すタンパク質などの生産宿主として期待される。本菌を宿主とした発現系に有用なベクター (形質転換効率と宿主内での安定性の高いベクター) の構築を進めた。本菌固有のプラスミドを見だし、その塩基配列を決定して複製に関わる領域を推定した。この領域を、pUC19 の ori 配列を含む領域、およびエリスロマイシン (EM) 耐性遺伝子と融合し、新規ベクター pUCNH04E を構築した。pUCNH04E を NH04 株および *L. mesenteroides* 標準株 (ATCC8292 株と NBRC3832 株) にエレクトロポレーション法により導入した。形質転換効率は、3 株いずれにおいても pGK::nucMCS (従来用いられてきた *E. coli*-*L. mesenteroides* シャトルベクター) よりも高く、NH04 株では約 10 倍高いことがわかった。また、pGK::nucMCS の保持率が培養 36 時間の時点で 3 株いずれにおいてもほぼ 0% であったのに対し、pUCNH04E は標準株 2 株においては約 40%、NH04 株においては 90% 以上の高い保持率であった。以上から、pUCNH04E は NH04 株を宿主とした異種タンパク質発現系用のべ

クターとして有用と考えられた。

(6) アジの腸内から分離した低温増殖性細菌 *Shewanella* sp. HM13 が優れた膜小胞生産性をもつことを見いだした。この膜小胞の主成分である 49 kDa のタンパク質の一次構造を明らかにするとともに、膜小胞への移行に関与する遺伝子を見いだした。本タンパク質の膜小胞移行機構を利用することで、膜小胞をプラットフォームとしたタンパク質生産系の開発が可能になることが期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Kawamoto J, Kurihara T, Esaki N, Proteomic insights of psychrophiles (2017) *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology Second Edition*, pp. 423-435 査読無

Yokoyama F, Kawamoto J, Imai T, Kurihara T, Characterization of extracellular membrane vesicles of an Antarctic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, and their enhanced production by alteration of phospholipid composition (2017) *Extremophiles*, **21**, pp. 723-731 査読有
DOI: 10.1007/s00792-017-0937-z

Ito T, Gong C, Kawamoto J, Kurihara T, Development of a versatile method for targeted gene deletion and insertion by using the *pyrF* gene in the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10 (2016) *J. Biosci. Bioeng.* **122**, pp. 645-651 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.06.004

川本 純, 栗原 達夫, 低温菌の低温環境への適応メカニズム (2015) *生物工学* **93**, pp. 477-480 査読無

[学会発表](計15件)

横山 文秋, 川本 純, 陳 晨, 今井 友也, 栗原 達夫, 低温菌 *Shewanella* sp. HM13 におけるベシクル分泌関連タンパク質の探索、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 16 日

釜阪 紘平, 陳 晨, 横山 文秋, 川本 純, 今井 友也, 小川 拓哉, 栗原 達夫, 低温菌 *Shewanella* sp. HM13 の膜小胞輸送による選択的タンパク質分泌に関与する遺伝子の探索、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 16 日

Yagura K, Goto S, Ninomiya T, Kawamoto J, Ogawa T, Kurihara T, Characterization and application of a psychrotrophic lactic acid

bacterium, *Leuconostoc mesenteroides* NH04, International Workshop on Microbes in Hostile Environments, 2017 年 12 月 4 日

釜阪 紘平, 陳 晨, 横山 文秋, 今井 友也, 川本 純, 小川 拓哉, 栗原 達夫, 低温菌 *Shewanella* sp. HM13 における菌体外小胞輸送を介したタンパク質輸送に関与する遺伝子の探索、ConBio2017、2017 年 12 月 8 日

陳 晨, 河合 総一郎, 川本 純, 今井 友也, 栗原 達夫, 膜小胞生産性低温適応細菌 *Shewanella* sp. HM13 によるタンパク質分泌機構の解析、ConBio2017、2017 年 12 月 8 日

釜阪 紘平, 陳 晨, 横山 文秋, 今井 友也, 川本 純, 小川 拓哉, 栗原 達夫, 低温菌 *Shewanella* sp. HM13 の菌体外膜小胞を介した選択的タンパク質分泌機構の解析、極限環境生物学会 2017 年度年会、2017 年 11 月 11 日

横山 文秋, 川本 純, 今井 友也, 栗原 達夫, アジ腸管由来低温菌のベシクル形成関連タンパク質の同定、特殊環境微生物セミナー 2017、2017 年 10 月 6 日

横山 文秋, 川本 純, 今井 友也, 栗原 達夫, 低温菌が分泌する膜小胞の特性解析～膜小胞を基盤とした低温下における異種タンパク質発現系への応用可能性～、第 64 回生化学会近畿支部例会、2017 年 5 月 27 日

Chen C, Kawai S, Kawamoto J, Imai T, Kurihara T, Analysis of a protein secretion mechanism via the membrane vesicle production of a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. HM13, 日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 18 日

横山 文秋, 川本 純, 今井 友也, 小川 拓哉, 栗原 達夫, 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 による菌体外膜小胞の生産とエイコサペンタエン酸生産能の欠損が膜小胞分泌におよぼす影響、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 27 日

Chen C, Kawai S, Kawamoto J, Imai T, Kurihara T, Analysis of protein secretion system of a membrane vesicle-producing cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. HM13, Extremophiles 2016, 2016 年 9 月 15 日

Yokoyama F, Kawamoto J, Imai T, Ogawa T, Kurihara T, Molecular characterization of eicosapentaenoic acid-containing membrane vesicles produced by a psychrotrophic bacterium *Shewanella livingstonensis* Ac10, Extremophiles 2016, 2016 年 9 月 13 日

横山 文秋、川本 純、今井 友也、小川 拓哉、栗原 達夫、低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の菌体外膜小胞の特性とエイコサペンタエン酸が小胞形成にあたる影響の解析、第 63 回生化学会近畿支部例会、2016 年 5 月 21 日

陳 晨、河合 総一郎、川本 純、今井 友也、栗原 達夫、Characterization of a new cold-adapted *Shewanella* sp. to develop a system for secretory production of proteins、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日

二宮 健匡、後藤 清太郎、川本 純、工藤和幸、栗原 達夫、低温適応性乳酸菌を宿主とした新規ベクターの構築、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 達夫 (KURIHARA, Tatsuo)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号： 7 0 2 4 3 0 8 7

(2) 連携研究者

川本 純 (KAWAMOTO, Jun)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号： 9 0 5 1 1 2 3 8